



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

PATRÍCIA CAVANI MARTINS DE MELLO

**DEGRADAÇÃO DE DIURON EM SOLO BIOAUMENTADO
POR MICRORGANISMOS ISOLADOS DA RIZOSFERA DA
CANA-DE-AÇÚCAR**

PATRÍCIA CAVANI MARTINS DE MELLO

**DEGRADAÇÃO DE DIURON EM SOLO BIOAUMENTADO
POR MICRORGANISMOS ISOLADOS DA RIZOSFERA DA
CANA-DE-AÇÚCAR**

Monografia apresentada ao Curso de Pós-graduação em Química dos Recursos Naturais da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial ao Título de Mestre.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Ilza Lobo.

Londrina
2008

P ____ D Mello, Patrícia Cavani Martins de.
Degradação de Diuron em Solo Bioaumentado por
Microrganismos Isolados da Rizosfera da Cana-de-Açúcar. –
Londrina, 2008.. 88 f.

Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos
Naturais) – Departamento de Química. Universidade
Estadual de Londrina, 2008

Bibliografia: f. 86 – 95.

Orientadora; Prof^ª. Dr^ª. Ilza Lobo.

1. Diuron. 2. Degradação microbiana. 3. Cana-de-Açúcar.
I. Mello, Patrícia Cavani Martins de. II Degradação de
Diuron em Solo Bioaumentado por Microrganismos
Isolados da Rizosfera da Cana-de-Açúcar.

PATRICIA CAVANI MARTINS DE MELLO

**DEGRADAÇÃO DE DIURON EM SOLO BIOAUMENTADO POR
MICRORGANISMOS ISOLADOS DA RIZOSFERA DA CANA-DE-
AÇÚCAR**

Monografia apresentada ao Curso de Pós-graduação em Química dos Recursos Naturais da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial ao Título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Ilza Lobo
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr André Luiz Martinez de Oliveira
Universidade Estadual de Londrina

Profª Drª Suzana Lucy Nixdorf
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 28 de agosto de 2008.

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais por todo amor e dedicação, que os fizeram cumprir com excelência a tarefa de criar seus filhos.

À minha querida mãe, pelo investimento na minha formação pessoal e profissional, que me fez almejar e conquistar tudo àquilo que me propus a fazer.

À Renata, pelo apoio incondicional, palavras de carinho e incentivo nesta jornada exaustiva e triunfal da minha vida.

À professora Maria Josefa Santos Yabe pela oportunidade oferecida, incentivo à conclusão e continuidade deste trabalho nas suas amplas perspectivas.

À professora Ilza Lobo pelos esclarecimentos, indicações e paciência fundamentais para os resultados e conclusão deste trabalho.

À Elaine Amorim Soares Menegon pelo incentivo e abertura do Centro de Pesquisas em Ciências da Fundação Educacional do Município de Assis no fornecimento da estrutura necessária para evolução, discussão e conclusão deste trabalho.

Ao amigo Fabiano dos Santos Simões, pela solicitude e companheirismo de sempre.

Aos meus amados, tesouros da minha vida: Zaga, Lú, Daniel, Fábio, Lúcia, Renan, Tina, Adelço, Lucas, Thaís, Neto, Lena, Gabriel, Leandro, Ana, Fábio, Otávio, André, Paulo e Alhandra. Onde quer que eu vá, levo vocês no meu coração.

Ao Dr. Antonio Aparecido Mozeto do laboratório de Biogeoquímica Ambiental, da UFSCar, pelo fornecimento das análises de carbono orgânico total.

Ao senhor Luiz Zardeto da Cooperativa Agrícola de Pedrinhas Paulista, pelo fornecimento das análises de capacidade de troca de cátions.

Ao senhor Carlos Garcia pela indicação das áreas de coleta de solo rizosférico de cana-de-açúcar da Usina Nova América.

À Faculdade de Filosofia e Ciências da UNESP, em particular aos professores Edson Luis Maistro e Flávia Cristina Goulart, pelo incentivo e convivência com este compromisso.

*Nós nunca sabemos a que altura estamos até sermos
impelidos à mostrá-la. E se cumprirmos o plano,
nossa altura chega ao céu, se não nos impedirmos
de sermos reis.*

Emily Dickinson

MELLO, Patrícia Cavani Martins de.. 2008. Degradação de Diuron em Solo Bioaumentado por Microrganismos Isolados da Rizosfera da Cana-de-Açúcar. 88 f. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina. 2008.

RESUMO

O diuron, N-(3,4-diclorofenil)-N,N-dimetilureia é um herbicida substituído de uréia muito utilizado no cultivo de cana-de-açúcar, em composição com outras substâncias como a hexazinona. A via microbiana é considerada a principal forma de transformação deste herbicida e o 3-(3,4-diclorofenil)-3-metilureia (DCPMU), 3,4-diclorofenilureia (DCPU) e 3,4-dicloroanilina (DCA), são considerados os principais produtos desta degradação. Este trabalho teve por objetivo verificar a degradação microbiana do diuron em um solo bioaumentado com microrganismos da rizosfera de cana-de-açúcar. Os microrganismos foram selecionados de uma área com aplicação histórica do herbicida, passaram por um processo de isolamento de em solução de Hexarom WG[®] como fonte de nutrientes e foram caracterizados segundo a coloração de Gram, morfologia, reações bioquímicas e formação de esporos. Os microrganismos foram utilizados em outro estudo de crescimento em soluções de diferentes composições, uma das quais tendo o diuron como única fonte de nutrição. O solo empregado no estudo de degradação foi caracterizado segundo sua textura e CTC e as variáveis umidade, teor de carbono orgânico total, pH, contagem de bactérias aeróbias mesófilas e de fungos. A concentração de diuron, DCPMU, DCPU e DCA, foram monitoradas no processo através de análises por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A área de estudo foi subdividida em lotes, sendo lote A bioaumentado, lote B bioaumentado e enriquecido com diuron, lote C enriquecido com diuron e lote D controle. A metodologia de análise do diuron e metabólitos, foi otimizada e validada, segundo a repetibilidade, reprodutibilidade e linearidade, para os níveis de concentração 25, 50, 100, 200, 500 e 1000 mg. L⁻¹. O processo de isolamento por 5 semanas permitiu verificar uma diminuição da população microbiana quando se utilizou somente o herbicida como fonte de nutriente. No estudo de crescimento em soluções de diferentes composições os resultados permitiram observar que na presença do diuron a população microbiana foi maior que a observada nas outras soluções, o que pode ser evidência da adaptação dos microrganismos selecionados à partir da área de estudo, ao diuron. A classificação textural do solo foi definida como arenosa. Dos parâmetros monitorados, apenas a concentração do diuron apresentou diferenças significativas entre os lotes e as profundidades. Os metabólitos DCPMU, DCPU e DCA estiveram abaixo dos limites de quantificação do método utilizado. O tratamento dos dados através de análise multivariada permitiu observar que a população bacteriana influenciou na degradação do diuron e que o herbicida teve correlações positivas com as partes mais superficiais da área de estudo, assim como com os teores de carbono orgânico total, pressupondo que este seja o sítio de adsorção de maior afinidade. As correlações negativas entre os resultados do teor de bactérias aeróbias mesófilas e concentração de diuron permitiram observar que o processo tenha ocorrido por via catabólica.

Palavras-chave: Diuron. Degradação microbiana. Metabólitos. Cana-de-Açúcar. Solo Rizosférico. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

MELLO, Patrícia Cavani Martins de Mello.(2008) Degradation of Diuron in Bioaugmented Soil by Rhizosphere Microorganisms Isolated from Sugarcane.88 f. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – State University of Londrina, Londrina. 2008.

ABSTRACT

The diuron, N-(3,4-dichlorophenyl)-N, N-dimethylurea is one of urea replaced herbicide widely used in the cultivation of sugar cane in composition with other substances such as hexazinona. The microbial route is considered the main form of transformation and 3 - (3,4-dichlorophenyl)-3-metilureia (DCPMU), 3,4-diclorofenilureia (DCPU) and 3,4-Dichloroaniline (DCA) are considered main products of this degradation. This study aimed to verify the microbial degradation of diuron in a bioaugmented soil with microorganisms of sugarcane rhizosphere. The microorganisms were selected in an area with historical application of herbicide, went through a process of isolation of a solution of Hexarom WG[®] as a source of nutrients and were characterized as Gram stain, morphology, biochemical reactions and formation of spores. The microorganisms were used in another study of growth in solutions of different compositions, one of which has diuron as the sole source of nutrition. The soil employed in the study was characterized by CTC, texture and moisture variables, total organic carbon content, pH, counting of aerobic mesophilic bacteria and fungi. Concentration of diuron, DCPMU, DCPU and DCA were determined by high performance liquid chromatography (HPLC). The study area was subdivided into lots, being lot A bioaugmented, lot B bioaugmented and enriched with diuron, lot C enriched with diuron and lot D control. The methodology of analysis of diuron and metabolites, has been optimized and validated, according to the repeatability, linearity and reproducibility, for the concentration levels 25, 50, 100, 200, 500 and 1000 mg. L⁻¹. The process of isolation for 5 weeks has shown a decrease in microbial population when using the herbicide only as a source of nutrient. In the study of growth in solutions of different compositions can observe that the results in the presence of diuron the microbial population was higher than that observed in other solutions, which may be evidence of the adaptation of microorganisms selected from the study area for the diuron. The classification textutal soil was defined as sandy soil. Of the parameters monitored, only the concentration of diuron showed significant differences between the lots and the depths. The metabolites DCPMU, DCPU and DCA were below the limits of quantification of the method. The processing of data through multivariate analysis has pointed out that the bacterial population influenced the deterioration of diuron and that the herbicide had positive correlations with the most superficial of the study area, and with the levels of total organic carbon, assuming that this is the favorite adsorption site of the herbicide. The negative correlations between the level of aerobic mesophilic bacteria and concentration of diuron evidenced that the process has occurred through catabolic relationship.

Key words: Diuron. Degradation. Metabolite. Sugarcane. Rhizosphere Soil. High Performance Liquid Chromatography.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 PRODUÇÃO CANAVIEIRA NO ESTADO DE SÃO PAULO	16
2.2 NECESSIDADE DO USO DE HERBICIDAS	16
2.3 USO DE HERBICIDAS NA CULTURA DE CANA-DE-AÇÚCAR	18
2.4 COMPORTAMENTO DE HERBICIDAS NO SOLO	19
2.5 HEXARON WG [®]	22
2.6 HEXAZINONA	22
2.7 DIURON	23
2.7.1 Características Físico-Químicas do Diuron	25
2.7.2 Comportamento do Diuron no Ambiente	25
2.8 Degradação Microbiana do Diuron	27
2.9 PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO <i>EX SITU</i> E <i>IN SITU</i>	29
2.9.1 Estudos do Processo de Degradação <i>Ex-Situ</i>	29
2.9.2 Estudos do Processo de Degradação <i>In-Situ</i>	30
2.10 Biorremediação	32
2.10.1 Fatores de Biorremediação	32
2.10.2 População Microbiana para os Processos de Biorremediação	33
2.10.3 Usos da Biorremediação	35
2.10.4 Bioaugmentação	35
2.11 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS	36
3 OBJETIVO	41
3.1 OBJETIVO GERAL	41
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4 MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 COLETA DE SOLO RIZOSFÉRICO	43
4.2 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DO SOLO RIZOSFÉRICO	43
4.3 INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE MICRORGANISMOS RESISTENTES NA SOLUÇÃO DE HEXARON WG [®]	43

4.3.1	Investigação de Bactérias Aeróbias Mesófilas (Plaqueamento em PCA).....	44
4.3.2	Investigação de Fungos (Plaqueamento em PDA)	44
4.3.3	Purificação das Colônias	44
4.4	INOCULAÇÃO DE SOLUÇÃO DE HEXARON WG [®] COM MICRORGANISMOS	
	ISOLADOS	45
4.5	ESTUDO COMPARATIVO DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS EM	
	SOLUÇÕES DE DIFERENTE COMPOSIÇÃO.....	45
4.6	CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS	46
4.7	ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DO DIURON NO SOLO.....	47
4.7.1	Área de Estudo da Biodegradação do Diuron no Solo	47
4.7.2	Aumento da Biomassa Microbiana	48
4.7.3	Inoculação da Biomassa na Área de Estudo e Incorporação do Herbicida	48
4.7.4	Organograma do Processo de Bioaugmentação dos Lotes de Solo.....	49
4.8	DETERMINAÇÃO DE UMIDADE.....	50
4.9	CLASSIFICAÇÃO TEXTURAL DO SOLO.....	50
4.10	DETERMINAÇÃO DO pH	50
4.11	QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS DO SOLO	50
4.12	DETERMINAÇÃO DO CARBONO ORGÂNICO TOTAL	51
4.13	DETERMINAÇÃO DA CTC	51
4.14	VALIDAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE DIURON E METABÓLITOS DO SOLO.....	51
4.15	QUANTIFICAÇÃO DO DIURON E METABÓLITOS NO SOLO.....	52
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	MICRORGANISMOS	53
5.1.1	Investigação da Ocorrência de Microrganismos Resistentes na Solução de	
	Hexaron Wgâ.....	53
5.1.2	Inoculação de Solução de Hexaronâ com Microrganismos Isolados	54
5.1.3	Estudo Comparativo de Crescimento dos Microrganismos Isolados em	
	Soluções de Diferente Composição.....	55
5.1.4	Caracterização dos Microrganismos Isolados	58
5.2	CLASSIFICAÇÃO TEXTURAL.....	59
5.3	ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DO DIURON NO SOLO BIOAUMENTADO	60
5.3.1	Teor de Umidade	60
5.3.2	pH	62

5.3.3	Quantificação de Microrganismos do Solo	65
5.3.4	Carbono Orgânico Total	70
5.3.5	Quantificação do Diuron e Metabólitos no Solo	72
5.3.6	Análise de Dados Multivariados	76
6	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais herbicidas empregados nas culturas paulistas.....	17
Tabela 2 – Produtos comerciais formulados com diuron	24
Tabela 3 – Composição das soluções para estudo comparativo de crescimento dos microrganismos isolados em solução de Hexaron WG [®] 0,75%.....	46
Tabela 4 – Investigação de microrganismos resistentes em solução de Hexaron WG [®] 0,75%	55
Tabela 5 – Monitoramento do pH e crescimento microbiano em soluções de diferente composição	56
Tabela 6 – Morfologia, coloração de gram, testes bioquímicos e de formação de esporos dos microrganismos selecionados para o estudo de degradação do diuron no solo	58
Tabela 7 – Classificação textural do solo nas diferentes profundidades	60
Tabela 8 – Variação do teor de umidade (%) nos lotes em 5 semanas de monitoramento.....	61
Tabela 9 – Análise estatística (Teste de Tukey) dos resultados do monitoramento do teor de umidade do solo.....	61
Tabela 10 – Análises químicas no lote D na primeira e na última coleta do monitoramento.....	63
Tabela 11 – Análises de micronutrientes no lote D na primeira e na última coleta do monitoramento.....	64
Tabela 12 – Contagem de bactérias aeróbias mesófilas (UFC/g de solo) pelo plaqueamento em PCA em 5 semanas de monitoramento	66
Tabela 13 –Análise estatística (teste Tukey) da contagem de bactérias aeróbias mesófilas (UFC/g de solo) pelo plaqueamento em PCA em 5 semanas de monitoramento.....	67
Tabela 14 – Contagem de fungos pelo plaqueamento em PDA (UFC/g de solo) em 5 semanas de monitoramento	68
Tabela 15 – Análise estatística (teste Tukey) da contagem de fungos (UFC/g de solo) pelo plaqueamento em PDA em 5 semanas de monitoramento	69
Tabela 16 – Conteúdo de carbono orgânico total (%) em 5 semanas de monitoramento.....	71

Tabela 17 – Análise estatística (teste Tukey) do monitoramento do teor de carbono orgânico total (%)	71
Tabela 18 – Condições de análise e resultados dos testes de validação da extração de diuron e metabólitos do solo	73
Tabela 19 – Áreas dos picos cromatográficos dos analitos estudados para os níveis de concentração de spike 25 mg. L ⁻¹ a 1000 mg. L ⁻¹	74
Tabela 20 – Concentração de diuron (mg. Kg ⁻¹) em 5 semanas de monitoramento.....	74
Tabela 21 – Análise estatística (Teste Tukey) do monitoramento da concentração de diuron (mg. Kg ⁻¹) no solo	76
Tabela 22 – Matriz de correlação entre as variáveis estudadas no monitoramento da degradação do diuron em solo bioaumentado	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação de minerais de carga variável	21
Figura 2 – Fórmula estrutural da Hexazinona	23
Figura 3 – Fórmula estrutural do Diuron.....	23
Figura 4 – Trajetória da degradação aeróbica do diuron.....	28
Figura 5 – Área de estudo da biodegradação do diuron no solo, delimitada em 4 m ² , e subdividida em lotes de 1 m ²	47
Figura 6 – Organograma do processo de bioaugmentação dos lotes de solo	49
Figura 7 – Plaqueamento de fungos em PDA do solo rizosférico, resistentes à Hexaron WG® 0,75 %	53
Figura 8 – Plaqueamento de bactérias aeróbias mesófilas em PCA, do solo rizosférico resistentes à Hexaron WG® 0,75 %	54
Figura 9 – Crescimento microbiano em soluções de diferente composição	57
Figura 10 – Cromatograma de análise de <i>spike</i> de solo ao nível de concentração de 50mg. L ⁻¹ da mistura de padrões	72
Figura 11 – Cromatograma de uma amostra de solo sem fortificação da mistura de padrões DCPMU, DCA, Diuron e DCPU	72
Figura 12 – Cromatograma de amostra do lote C, na profundidade de 0 – 10 cm, coletado em na primeira semana de estudo	75
Figura 13 – Dispersão das amostras e influência das variáveis nas componentes principais 1 e 2 da análise estatística multivariada profundidades.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
CAS	Chemical Abstracts Service Registry Number
CEE	Comunidade Económica Européia
CTC	Capacidade de Troca de Cátions
DCA	3,4-dicloroanilina
DCPMU	3-(3,4-diclorofenil)-3-metilureia
DCPU	3,4-diclorofenilureia
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
K_f	Índice de Adsorção
K_{oc}	Coeficiente de Partição
K_{ow}	Coeficiente de Partição Octanol-Água
MSMA	Metano Arseniato Monossódico
SIA	Sistema de Informações Sobre Agrotóxicos
UNICA	União da Indústria da Cana-de-Açúcar

1. INTRODUÇÃO

No Estado de São Paulo, a classe dos herbicidas é a que tem respondido pelo maior valor das vendas de defensivos agrícolas. Em 2006, foi responsável por 43,1 % do faturamento total paulista, ou seja, US\$ 348,1 milhões, representando 46,4 % do total de vendas de produtos comerciais. As vendas de herbicidas estão voltadas, principalmente, para cana-de-açúcar, soja e milho.

O Brasil é o maior produtor mundial de cana, com uma área plantada de 5,4 milhões de hectares e uma safra anual de cerca de 354 milhões de toneladas. Na safra 07/08 a produção brasileira de cana-de-açúcar foi de 324.848.429 toneladas, sendo a região centro-sul e centro-sudeste, responsável por 97 % da produção.

O diuron, N-(3,4-diclorofenil)-N,N-dimetilureia, é um herbicida pertencente à família das fenilamidas da subclasse das feniluréias. Este herbicida substituído de uréia inibe a fotossíntese pela prevenção da produção de oxigênio e bloqueia a transferência de elétrons ao nível II em microrganismos e plantas. Tem sido usado em uma grande variedade de culturas anuais e perenes a uma taxa de 1,8 kg. ha⁻¹. ano⁻¹, e em áreas de não cultivo como estradas, caminhos de jardins e linhas férreas a uma taxa de 3 kg. ha⁻¹. ano⁻¹. Na França seu uso foi limitado desde 1999 e é considerado como uma substância perigosa pela Comissão Européia. Sua dispersão na agricultura leva a poluição para o meio aquático pela lixiviação do solo.

O sistema metabólico que se tem mostrado mais apto para degradar as moléculas xenobióticas é o microbiano, sendo a bioaugmentação autóctone definida como o processo de biorremediação onde se utilizam microrganismos nativos no ambiente a ser tratado. A utilização de microrganismos autóctones nos estudos de biorremediação do diuron se destaca quanto às taxas e tempo de degradação, quando comparada aos outros processos.

Este trabalho propôs avaliar a degradação do diuron em solo bioaugmentado com microrganismos da rizosfera da cana-de-açúcar.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 PRODUÇÃO CANAVIEIRA NO ESTADO DE SÃO PAULO

O Brasil é o maior produtor mundial de cana, com uma área plantada de 5,4 milhões de hectares e uma safra anual de cerca de 354 milhões de toneladas. Em consequência disso, também é, naturalmente, o mais importante produtor de açúcar e de álcool (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, 2007). Na safra do ano de 2007 a produção brasileira de cana-de-açúcar foi de 426.022.444 toneladas, sendo o estado de São Paulo o maior produtor com 264.336.825 toneladas, seguido dos estados do Paraná e Minas Gerais com 31.994.581 e 29.034.195 toneladas, respectivamente (UNICA, 2007).

No período compreendido entre 2005 e 2006, as principais regiões produtoras do estado de São Paulo foram Araçatuba, Assis, Bauru, Campinas, Itapetininga, Piracicaba, Presidente Prudente, Ribeirão Preto e São José do Rio Preto. (IEA, 2007) As regiões de Araçatuba, Presidente Prudente e São José do Rio Preto, onde foram instaladas as primeiras destilarias autônomas de álcool, cresceram consideravelmente nas últimas safras. Além do menor preço da terra, a baixa concentração industrial, que garante grande potencial de expansão da área plantada, e a topografia regular apresentada por essas regiões produtoras propicia mecanização da lavoura e ótimas condições de irrigação (BELICK e VIAN, 2003).

2.2 NECESSIDADE DO USO DE HERBICIDAS

Na implantação de uma área agrícola através de um sistema de cultivo, há sérias e significativas transformações nos subsistemas geomórfico, edáfico e biológico, tornando-os mais simples (agroecossistema), em comparação com o ecossistema, este, um sistema mais complexo. Esta transformação resulta na diminuição da capacidade de autorregulação do sistema e uma das principais consequências desta transformação é o aumento exagerado das populações de determinadas espécies de insetos, microrganismos, nematóides e plantas silvestres, de tal forma, a se tornarem pragas agrícolas – plantas daninhas ou vegetação invasora; e assim, comprometendo de forma significativa a produção, e de modo geral, inviabilizando economicamente a unidade produtiva (BLANCO, 2003)

O controle de plantas daninhas é uma prática de elevada importância para a obtenção de altos rendimentos em qualquer exploração agrícola e tão antiga quanto a própria agricultura. O método mais utilizado para controlar as invasoras é o químico, isto é, o uso de herbicidas. Suas vantagens são a economia de mão de obra e a rapidez na aplicação (IEA, 2007).

Metodologias alternativas têm sido estudadas como o uso de cobertura morta, também conhecido como plantio direto, sobre o controle de plantas daninhas. OLIVEIRA e SOUZA (2003), confirmaram sua eficiência em plantações de bananas, pelo efeito do "mulch" sobre o solo, que impede, ou reduz, o contato das ervas daninhas com os raios solares, conseqüentemente evitando a germinação das sementes e o desenvolvimento das ervas.

O uso de herbicidas em particular, aumentou substancialmente devido ao desenvolvimento de produtos mais específicos, da habilidosa comercialização por parte das indústrias químicas, da promoção ativa, da emergência de métodos de preparo conservacionista da terra e do desenvolvimento de tecnologia da aplicação mais conveniente (SILVA E MELLO, 2000).

No Estado de São Paulo, a classe de herbicidas é a que tem respondido pelo maior valor das vendas de defensivos agrícolas. Em 2006, foi responsável por 43,1% do faturamento total paulista, ou seja, US\$ 348,1 milhões. Do total de 104.233 toneladas de defensivos agrícolas vendidas para a agricultura paulista em 2006, em quantidade de produto comercial, os herbicidas representaram 46,4% ou 48.370 toneladas (IEA, 2007).

As culturas de maior consumo de herbicidas no estado de São Paulo, são atualmente cana-de-açúcar, soja e milho. A Tabela 1 lista os princípios ativos de herbicidas mais empregados nas culturas paulistas.

Tabela 1 - Principais herbicidas empregados nas culturas paulistas.

Cultura	Herbicida
Cana-de-açúcar	2,4 D, Acetoclor, Ametrina, Diuron, Hexazinona, Glifosato, MSMA, Metolaclor, Metribuzim e Terbutiuron, ¹
Soja	2-4-D, Carfentrazone, Clorimuron, Diuron, Glifosato, e Paraquat. ²
Milho	2,4-D Acetoclor, Alaclor, Amicarbazone, Atrazina, Cianazina, Dimetenamida, Isoxaflutole, Linuron, Metolaclor, Pendimetalin, Terbutilazine, Trifluralin e Simazine. ³

1- Fonte – BLANCO, 2003. **2- Fonte** – Embrapa, 2004; **3 – Fonte** – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, 2006.

Na prática, os herbicidas podem entrar de várias maneiras em contato com o meio ambiente, mas, uma vez presente, e principalmente no solo, vários fatores determinarão seu destino. A análise desse comportamento, através da avaliação risco/benefício é que definirá se um determinado herbicida provocará dano ao ambiente em que atua, dano este que pode ser medido avaliando-se o ambiente antes, durante e após a utilização do produto (GUIMARÃES, 1987)

2.3 USO DE HERBICIDAS NA CULTURA DE CANA-DE-AÇÚCAR

Devido as suas características próprias de produção e manejo, as principais maneiras para o controle da plantas daninhas na cultura de cana-de-açúcar são: cultural, capinas e o químico por meio do uso de herbicidas. A combinação de algumas medidas de controle, como: preparo do solo, condição da área de cultivo (plantio novo ou soqueira), período residual do herbicida, grupo de plantas daninhas predominantes e a sua abundância, qualidade do solo, uso de adjuvantes, solubilidade, seletividade do herbicida, persistência do herbicida no solo e a rotação de herbicidas, maximizam o controle das plantas daninhas e minimizam o efeito dos herbicidas no ambiente (BLANCO, 2003).

As misturas dos herbicidas são utilizadas para aumentar o espectro de controle, por exemplo, na mistura do Diuron + hexazinona, ocorre um incremento no controle do Diuron, este de maior eficiência sobre as latifoliadas, agora na associação com o hexazinona, há também o controle das gramíneas. As misturas, também, em função das características próprias de cada herbicida, como a sua lipofilicidade e solubilidades, que influenciam na lixiviação, permitem que o herbicida permaneça em uma faixa mais profunda do perfil do solo, e não apenas superficialmente, propiciando desta forma, um maior controle das sementes que estão neste perfil (BLANCO, 2003).

Segundo Clement e colaboradores (1979), a associação dos herbicidas Diuron e hexazinona foi testada para a cana-de-açúcar em um experimento em solo arenoso. Foram testados em pré-emergência os tratamentos: hexazinona em 4 doses; hexazinona + Diuron em 3 doses; Diuron + 2,4 D amina e ametrina + 2,4 D amina. Aos 47, 78 e 111 dias, efetuaram-se as avaliações de fitotoxicidade à cana-de-açúcar e controle à *Digitaria sanguinalis*, *Colopogonio sp*, *Paspalum distichum* e *Wedellia paludosa*. Os resultados mostraram que os tratamentos com hexazinona (954 g/ha) e hexazinona (719 g/ha) + Diuron

(2048 g/ha) tiveram diferença estatística em relação à produção quando comparadas à testemunha, além de serem eficientes no controle às plantas daninhas presentes no experimento. Nenhum tratamento prejudicou as qualidades tecnológicas da cana-de-açúcar.

2.4 COMPORTAMENTO DE HERBICIDAS NO SOLO

Relativamente à ação dos produtos químicos e mais propriamente dos herbicidas sobre o ambiente, vários fatores são conhecidos por influenciar o comportamento desses produtos sobre o meio que atuam; o destino de um herbicida é decidido através dos efeitos de vários processos físico-químicos e biológicos, que causam a degradação e o movimento do produto.

Dentre esses fatores, muitos dos quais são interdependentes, tem-se: a decomposição, seja ela química, fotoquímica ou biológica, a volatilização, a lixiviação, o arrastamento lateral, a solubilidade, o coeficiente de partição (K_{oc}) do produto e os processos de adsorção/desorção (GUIMARÃES, 1987). Diferenças nas estruturas e propriedades das substâncias químicas, e nas características e condições ambientais, todos podem afetar esses processos. Condições meteorológicas, composição das populações de microrganismos no solo, presença ou ausência de plantas, localização do solo na topografia e práticas de manejo dos solos podem também afetar o destino de herbicidas no ambiente. Além disso, a taxa e a quantidade de água movendo na superfície e através do perfil do solo têm um grande impacto no movimento do herbicida (SPADOTTO, 2002).

A adsorção é considerada como sendo um dos principais processos que afetam a interação entre o pesticida e a fase sólida do solo, influenciando diretamente a magnitude do efeito de outros fatores como biodegradabilidade, lixiviação, entre outros. A adsorção nos colóides do solo, especificamente na fração mineral, para a maioria dos pesticidas, envolve diferentes mecanismos, como: fixação física, forças de van der Waals, ligação de hidrogênio, ligação iônica, complexação através de íons metálicos, ligação hidrofóbica, complexo de transferência de carga (VIEIRA *et al.*, 1999).

Cada solo tem sua própria capacidade de adsorver um determinado herbicida. A razão entre a quantidade de herbicida adsorvido e a quantidade na solução do solo é chamada índice de adsorção (K_f). Um baixo índice de sorção significa que uma grande quantidade de herbicida aplicado encontra-se na solução do solo e foi pouco adsorvido.

Herbicidas com um baixo índice de sorção são mais disponíveis para lixiviação em um dado solo do que aqueles com um valor maior. O índice de sorção de alguns herbicidas é variável dependendo de fatores do solo como pH e matéria orgânica (RODRIGUES *et al.*, 1995).

Rae e colaboradores (1998) investigaram a natureza e a extensão da sorção de herbicidas e de produtos da sua degradação pelos sedimentos de um aquífero arenoso do sistema da bacia de Londres, em Shortlands. Entre os compostos estudados estavam o Diuron e seu metabólito DCPU. Os resultados mostraram que aquele sedimento possui uma capacidade alta de sorção para todos os compostos estudados. A análise dos coeficientes de regressão linear sugeriu que a sorção do Diuron, está mais significativamente relacionada com a fração de carbono, a capacidade de troca catiônica, a área de superfície do sedimento, a fração de silte e o pH de equilíbrio da solução remanescente.

Os fatores mais importantes para a adsorção ao solo são os constituintes que representam a fase sólida (argila, minerais, matéria orgânica, óxidos e hidróxidos de alumínio e ferro, e sílica), o pH e o teor de água do solo (RODRIGUES, 1995). Adsorção e dessorção de moléculas orgânicas no solo são processos controlados pelas suas propriedades químicas e pelas propriedades superficiais de cada solo. Os componentes do solo que possuem cargas superficiais são os minerais silicatados, óxidos e matéria orgânica.

Quanto às propriedades dos compostos orgânicos, são consideradas relevantes: grupos funcionais da molécula; acidez ou alcalinidade dos grupos funcionais; tamanho e formato da molécula; polaridade e carga da molécula; e capacidade de polarização da molécula. Estas propriedades determinam a solubilidade aquosa da molécula e como conseqüência, a tendência da molécula em ser adsorvida na superfície do solo (NEDER, 1998).

A superfície mineral e orgânica do solo (adsorvente) pode adsorver moléculas orgânicas (adsorvatos) de maneira fraca ou forte, dependendo da força de interação entre adsorvente/adsorvato. As interações fortes são indicativas de uma adsorção química ou quimio-adsorção, na qual é estabelecida uma ligação covalente ou ligação eletrostática de curta distância entre a molécula e a superfície. As interações fracas, por outro lado, são características de adsorção física, na qual as interações de ligação não são muito energéticas (menores do que 10 kcal/mol de adsorvato) (NEDER, 1998).

As partículas dos solos podem apresentar carga negativa constante em qualquer nível de acidez, mas existem também cargas negativas que se manifestam à medida que o pH se eleva. A diferença entre esses dois tipos de cargas negativas está na sua origem. As cargas fixas são provenientes de alterações na composição em minerais de argila do tipo

2:1 (montmorilonita, vermiculita, etc), enquanto as cargas variáveis se originam da dissociação do H^+ em minerais do tipo 1:1 (caulinita), óxidos de Fe e Al e matéria orgânica humificada. A matéria orgânica humificada apresenta uma quantidade de cargas, por grama de material, maior que os minerais 2:1, razão pela qual nas regiões de clima tropical muitas vezes a matéria orgânica é responsável por até 90 % das cargas existentes nos solos (UEHARA e GILLMAN, 1981).

A carga superficial variável (ou dependente de pH) depende das atividades de íons potencialmente determináveis (H^+ e OH^-) e da concentração de eletrólitos (força iônica, I). Dependendo do pH do solo estas superfícies apresentam carga líquida negativa, positiva, ou nenhuma carga (APPEL *et al.*, 2003). Os óxidos (de Fe, Al, Mn) tendem a ganhar ou perder prótons dependendo do pH (Figura 1) e a magnitude e o sinal da carga superficial por sua vez afeta diretamente a reação com outros íons. Baixos valores de pH do solo aumentam a atividade dos íons H^+ na superfície das partículas, a qual pode alterar a intensidade de adsorção do herbicida. Como o pH do solo afeta a carga superficial e a concentração de íons H^+ , este pode ser ajustado para influenciar a mobilidade e transformação dos herbicidas (ATALAY e HWANG, 1999).

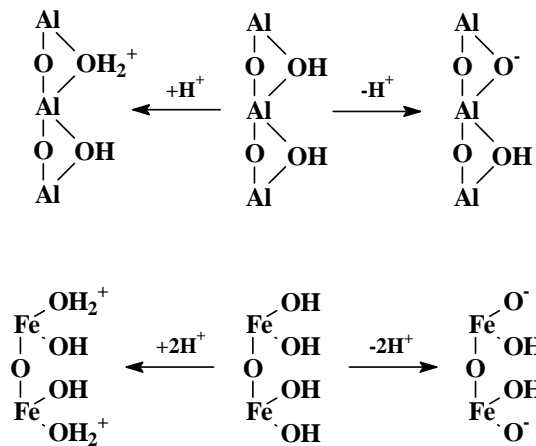


Figura 1 – Representação de minerais de carga variável. (Fonte: MOURIÑO, 2005)

A matéria orgânica do solo apresenta cargas elétricas de superfície e contribui para a CTC (20 a 70 % na maioria dos solos) e a força da acidez depende da natureza do grupo reativo envolvido e da conformação estrutural do grupamento na molécula. A dissociação de prótons dos grupos COOH começa a partir de valores de pH da solução do solo iguais ou superiores a 3,0 (MEURER, 2000). Entre os constituintes da

matéria orgânica do solo, as substâncias húmicas são as mais importantes, devido à sua larga distribuição nos ambientes terrestres e aquáticos (PRADO *et al.*, 2001). A humificação da matéria orgânica do solo tem influência direta nas propriedades físicas, químicas e biológicas dos constituintes orgânicos que podem interagir com os componentes orgânicos exógenos (BENOIT *et al.*, 1999). Na presença de matéria orgânica, compostos orgânicos simples (como exemplo o herbicida 2,4-D), podem promover uma variedade de interações sortivas através do equilíbrio reversível. Esses processos também podem afetar a intensidade da bioatividade e lixiviação por parte destes compostos no ambiente (VIEIRA *et al.*, 1999).

Os grupos funcionais apresentam uma capacidade de perder ou receber íons H^+ (dissociação ou protonação) e são responsáveis pela geração de carga da matéria orgânica do solo. A força da acidez depende da natureza do grupo funcional reativo envolvido e da conformação estrutural do grupamento na molécula. A maior reatividade da matéria orgânica do solo, em comparação com os minerais, também se deve à grande área superficial específica. Ao contrário dos argilominerais, que podem apresentar cargas negativas permanentes ou pH-dependentes, a matéria orgânica do solo apresenta somente cargas pH-dependentes e predominantemente negativa na faixa de pH dos solos (MEURER, 2000).

2.5 HEXARON WG[®]

Apresenta-se na formulação de grânulos dispersíveis em água, sendo recomendado para a cultura da cana-de-açúcar (ROSSI, 2008).

2.6 HEXAZINONA

O herbicida Hexazinona (3-ciclohexil-6-dimetilamino-1-metil-1,3,5-triazina-2,4(1H,3H)-diona) (figura 2) é uma s-triazina de amplo espectro de ação usado para o controle de uma grande variedade de plantas daninhas (WANG; WANG; TAN, 2005). Pode ser absorvido pelas raízes da planta ou pelas folhas, atuando como inibidor da fotossíntese. A Hexazinona (CAS: 51235-04-2) é bastante solúvel em água (33 g. L-1) e

móvel no solo, com grande potencial de carreamento, sendo considerado um importante contaminante de águas (WANG; WANG; TAN, 2005). A hidrólise da hexazinona foi descrita por Zhonglin, Zhengjun e Daoji (1998), que observaram que esta é muito lenta tendo meia-vida superior a 1 ano, em solução tampão com pHs de 5 a 9. Peterson, Boutin e Freemark (1997) avaliaram a toxicidade do hexazinona em algas verdes, diatomáceas, cianobactérias e plantas flutuantes, e encontrou que todos estes são sensíveis a este herbicida (ROSSI, 2008).

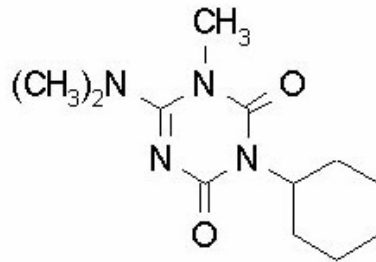


Figura 2 – Fórmula estrutural da Hexazinona (Fonte: ROSSI, 2008)

2.7 DIURON

O Diuron (3-(3,4-diclorofenil) 1,1dimetiluréia) (Figura 3), é um herbicida substituído de feniluréia, usado extensivamente para longa duração na pré-emergência de áreas cultivadas. Nas plantas susceptíveis, tem como mecanismo de ação a inibição da reação de Hill durante a fotossíntese, causando a clorose seguida de necrose das folhas (RODRIGUES E ALMEIDA, 1998, apud TOMAS, 2003).

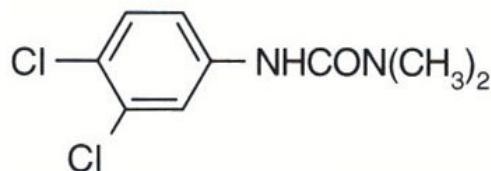


Figura 3 - Fórmula estrutural do Diuron (Fonte: ROSSI, 2008)

O emprego do Diuron como produto agrícola inclui: aplicação em pré e pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de abacaxi, alfafa, algodão, banana, cacau, café, cana-de-açúcar, citros, seringueira e uva. Também é usado como dessecante da cultura de algodão e na pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de milho, soja e trigo (GIACOMAZZI e COCHET, 2004). Os usos não agrícolas do Diuron incluem a aplicação em ferrovias, rodovias, pistas de aeroportos, oleodutos, subestações elétricas, pátios industriais. Também é aplicado na manutenção de aceiros de florestas (observada legislação específica) e de reflorestamentos (GIACOMAZZI e COCHET, 2004).

A Tabela 2 apresenta os produtos comerciais que contém Diuron em sua formulação, sua composição, a classificação toxicológica e o potencial de periculosidade ambiental. A classificação obedece ao Decreto N°. 98.816 de 11/01/1990, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária -ANVISA do Ministério da Saúde, sendo: classe I (extremamente tóxico), classe II (altamente tóxico), classe III (medianamente tóxico) e classe IV (pouco tóxico).

Tabela 2 - Produtos comerciais formulados com Diuron

Produto	Composição	Classificação toxicológica	Potencial de periculosidade ambiental
Hexaron WG [®]	Hexazinona + Diuron	Classe II	Classe II
Herburon 500 BR [®]	Diuron	Classe II	Não avaliado
Fortex SC [®]	Diuron + MSMA	Classe II	Não avaliado
Advance [®]	Diuron + Hexazinone	Classe III	Classe II
Karmex [®]	Diuron	Classe III	Classe II
Karmex 800 [®]	Diuron	Classe III	Classe II
Velpar K [®]	Diuron + Hexazinone	Classe III	Não avaliado
Velpar K GrDA [®]	Diuron + Hexazinone	Classe III	Não avaliado
Diuron Nortox 500 SC [®]	Diuron	Classe III	Classe II

Classe II – altamente tóxico; Classe III: medianamente tóxico.

Fonte – Sistema de Informações sobre Agrotóxicos (SIA)

2.7.1 Características Físico-Químicas do Diuron

O Diuron (CAS: 330-54-1) é um pó cristalino e incolor na sua forma pura, não iônico, com uma solubilidade moderada de 42 mg.L^{-1} a $20 \text{ }^\circ\text{C}$. Ele se apresenta como um sólido à temperatura ambiente, com ponto de fusão entre $158\text{-}159 \text{ }^\circ\text{C}$. A pressão de vapor é de $0,009 \text{ mPa}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ e a constante calculada de Henry é de $0,000051 \text{ Pa.m}^3.\text{mol}^{-1}$, sugerindo que o Diuron não é volátil da água ou do solo. A taxa de hidrólise é pequena em pH neutro, mas aumenta conforme as condições se tornem fortemente ácidas ou básicas. Seu coeficiente de partição octanol-água é baixo ($\log K_{ow} = 2,6$). Este composto tem uma constante de partição na fração solo-matéria orgânica de 485, o que prediz que sua adsorção é maior nas partículas orgânicas do solo. Este alto valor de K_{oc} mostra sua alta capacidade de adsorção, e então, uma distribuição heterogênea no solo (GIACOMAZZI e COCHET, 2004).

O Diuron é considerado uma molécula orgânica de polaridade média (BARCELO e HENNION, 1987), de caráter básico devido à ressonância do anel aromático que proporciona a disponibilidade de protonação dos pares de elétrons nos átomos de nitrogênio presentes nos grupamentos amino (RODRIGUES *et al.*, 1995). Como regra geral, os compostos não polares têm $\log K_{ow}$ acima de 4 ou 5 enquanto os polares apresentam valores inferiores a 1-1,5. Entre estes dois valores, as moléculas são moderadamente polares. Os pesticidas com K_{ow} entre 1,51 e 3,52 são considerados medianamente polares (CUNHA, 2005).

2.7.2 Comportamento do Diuron no Ambiente

O Diuron é aplicado ao solo, onde tende a ser acumulado, devido a sua baixa solubilidade em água (42 mg L^{-1} a 25°C). O tempo de meia vida deste herbicida em solos varia de 90 a 180 dias. Também foi observado em outros trabalhos que este pode variar de um mês a um ano, embora valores maiores de 3000 dias também tenham sido reportados. Esta variabilidade pode ser atribuída a diferenças na composição do solo e outras condições (CATILLO *et al.*, 2006).

A persistência do Diuron no solo pode ser atribuída a uma combinação de três propriedades: estabilidade química, baixa solubilidade em água e forte adsorção no solo por partículas (GOODDY, CHILTON e HARRISON, 2002). A dissipação do Diuron pode também ser atribuída à lixiviação devido às precipitações intensas, tornando-se a principal causa da poluição dos lençóis subterrâneos (GIACOMAZZI e COCHET, 2004).

Devido à sua alta persistência o Diuron pode ser encontrado em muitos ambientes como o solo, sedimentos e água (GIACOMAZZI e COCHET, 2004). A contaminação de águas subterrâneas por pesticidas tem tido uma atenção maior desde a última década. Nos Estados Unidos, um número considerável de trabalhos existe relacionando a ocorrência dos pesticidas e dos compostos provenientes da sua degradação em aquíferos. No Reino Unido, o número de estudos de campo é limitado, com as pesquisas se concentrando em estudos de potencial de lixiviação (GOODDY, CHILTON e HARRISON, 2002).

No município de Jaboticabal, SP, a presença do Diuron foi investigada no Córrego Rico e na água de abastecimento do município, entre agosto e novembro de 2006. Os resultados mostraram a presença do analito estudado nas amostras referentes à coleta de agosto/06 em níveis onde o método não pode efetuar análise quantitativa, apenas qualitativa. Nas outras coletas não foi detectado em concentração acima de $1,55 \text{ mg.L}^{-1}$ para água de rio e de $1,28 \text{ mg.L}^{-1}$ para água potável (FURTADO, 2008).

Claver e Ormad (2006) estudaram a presença de 44 substâncias encontradas em amostras de água da bacia do rio Ebro (Espanha), todas incluídas na Rede de Comunicações de Controle de Pesticidas, cujo propósito é monitorar a poluição difusa de águas superficiais causadas por pesticidas contidos em algumas das listas de substâncias perigosas estabelecidas pela legislação e de substâncias usadas em grande quantidade na bacia. A maioria dos pontos foi implantada onde verificou-se ocorrência de escoamento superficial (*run-off*) de pesticidas de áreas agrícolas. O Diuron apareceu em pontos específicos em algumas estações, ao longo do estudo. A 3,4-dicloroanilina que é um composto derivado da degradação ambiental do Diuron foi freqüentemente encontrada.

Okamura *et al*, 2003, verificaram que 86 % das amostras estudadas do ambiente aquático japonês, apresentaram uma concentração de $3,05 \text{ } \mu\text{g.L}^{-1}$ de Diuron. Na costa alemã e águas marinhas, um nível acima do permitido de 430 ng.L^{-1} foi detectado. Voulvoilis *et al*, 2002, encontraram Diuron principalmente na água marinha e foi demonstrado que um aumento na matéria-orgânica acelera sua sorção nos sedimentos marinhos se comparado a outros biocidas. Este fenômeno parece ser levemente irreversível (GIACOMAZZI, 2004).

O Diuron, herbicida mais utilizado nas áreas urbanas da Comunidade Econômica Européia (CEE), foi o produto mais encontrado em uma investigação sobre o uso de herbicidas em duas represas de água semi-urbanas. A maior concentração detectada na superfície da água foi de $8,7 \mu\text{g.L}^{-1}$. Comparado com os padrões da Comunidade Econômica Européia (CEE) para a produção de água potável ($0,01 \mu\text{g.L}^{-1}$), é claro que os usos suburbanos comprometem a produção de água a partir de águas de rios (BLANCHOU, 2004).

Uma das formas de redução da concentração do Diuron do ambiente, bem como outros pesticidas é a degradação. Vários estudos consideraram a degradação microbiana o principal mecanismo de dissipação do Diuron no solo, bem como em ambientes aquáticos. Foi verificado que os fungos dos solos apresentaram alta capacidade de degradação das feniluréias, inclusive para o Diuron, e em alguns estudos também foi encontrada atividade degradativa das bactérias (CASTILLO *et al.*, 2006).

2.8 DEGRADAÇÃO MICROBIANA DO DIURON

O Diuron é degradado sob condições aeróbicas pelos microrganismos que realizam N-demetilação do grupo uréia e, posteriormente, a hidrólise podendo transformar-se nos seguintes metabólitos: 3-(3,4-diclorofenil)-3-metilureia (DCMPU), 3,4-diclorofenilureia (DCPU) e 3,4-dicloroanilina (DCA) (DALTON *et al.*, 1996). O mecanismo proposto envolve duas reações de N-demetilação sucessivas, seguida da clivagem da amida, levando a 3,4-dicloroanilina. Isto foi confirmado por produtos de degradação de diversos fungos, onde diversos metabólitos foram isolados (WIDEHEM, *et al.*, 2002). A trajetória de degradação aeróbica do Diuron e seus metabólitos são apresentados na Figura 4.

Com a maioria das linhagens isoladas, a enzima citocromo monoxigenase (P450) tem sido identificada na N-demetilação dos herbicidas. Muitas espécies de bactérias são conhecidas por possuir esta enzima, algumas das quais são conhecidas pela sua capacidade em degradar herbicidas como o sulfenilureia por *Streptomyces gryvoleus*, tiocarbamatos por *Rhodococcus sp.* ou triazinas por *Rhodococcus sp.* *Arthrobacter sp.* foi inibida por metirapone, que é um inibidor específico da citocromo monoxigenase, sugerindo que esta enzima possa estar envolvida na demetilação do Diuron. A hidrólise da amida parece envolver uma amilase levando a formação da 3,4-dicloroanilina (GIACOMAZZI, 2004).

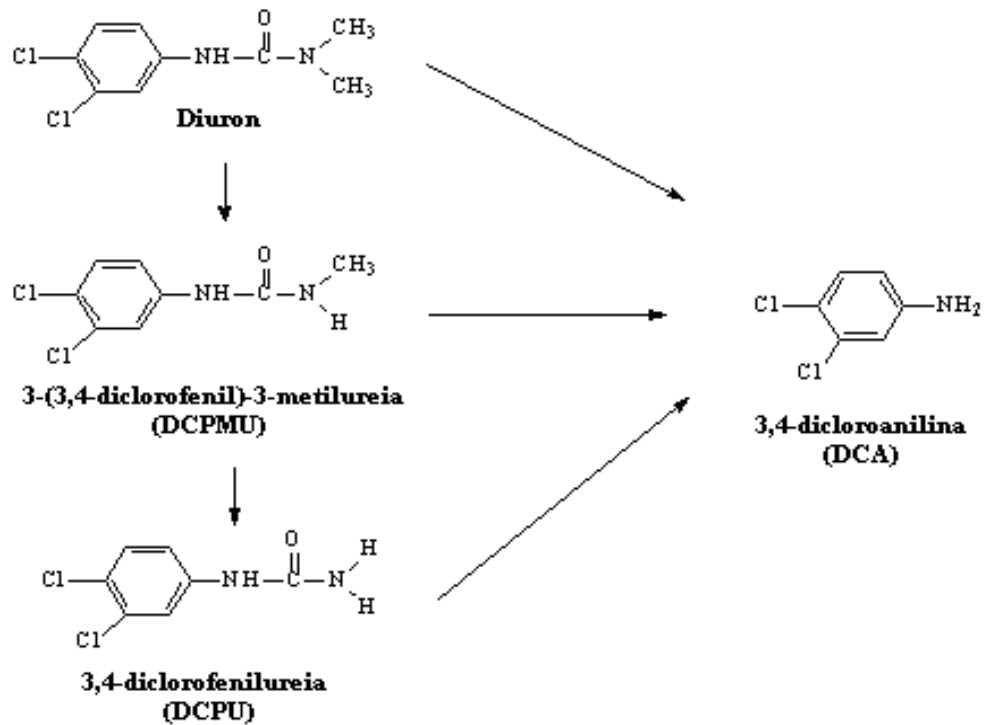


Figura 4 - Trajetória da degradação aeróbica do Diuron (SCRIBNER *et al.*, 2000).

A capacidade de degradação do Diuron por nove espécies de fungos basidiomicetos da ordem *Agaricales*, conhecidos como fungos de podridão branca (ABREU, 2007) (*Agrocybe semiorbicularis*, *Auricularia auricola*, *Coriolus versicolor*, *Dichotomitus squalens*, *Flammulina velupites*, *Hypholoma fasciculare*, *Phanerochaete velutina*, *Pleurotus ostreatus*, *Stereum hirsutum*) foi investigada por Bending, Frioloux e Walker (2002). Depois de 42 dias de estudo, o Diuron atingiu seu pico de degradação – 96,4 %, em meio de cultura líquido, com a espécie *Phanerochaete velutina*. Os resultados foram diferentes quando os fungos foram aplicados em biopilhas, onde o Diuron foi degradado a 84,1 % de sua taxa inicial, com a espécie *Hypholoma fasciculare*. Atribuiu-se a diferença dos resultados à sorção do Diuron a matéria orgânica das biopilhas que o tornaram menos disponível a degradação.

Tixier *et al* (2000) pesquisou a degradação do Diuron com linhagens de fungos demonstrando que o composto não é mineralizado e que os metabólitos identificados exibiram alta toxicidade a organismos não alvos, sugerindo uma preocupação ambiental maior do que a anteriormente reconhecida ao Diuron quando usado.

2.9 PROCESSOS DE BIORREMEDIAÇÃO *EX SITU* E *IN SITU*

Os tipos possíveis de atividades de biorremediação são separados em duas categorias principais: *ex situ* e *in situ*. A biorremediação *in situ* ocorre no solo, água ou outro ambiente sem a retirada do material do local para a descontaminação e por isso são em geral as mais desejáveis, devido ao menor custo e menor perturbação, porque evitam a escavação e transporte do material contaminado, mas pode ser limitada à profundidade pela qual o solo pode ser tratado. Em geral, os processos acontecem até 60 cm de profundidade. Por outro lado, a biorremediação *ex situ* requer que parte ou todo o material seja removido do local de contaminação para o seu tratamento. Em relação à eficiência, este processo é mais atrativo porque as condições controladas do sistema permitem condições mais aceleradas de degradação e em muitos casos aumentam a sua extensão, diminuindo os subprodutos (GAVRILESCO, 2005).

2.9.1. Estudos do Processo de Degradação *Ex-Situ*

Os estudos laboratoriais do Diuron e de sua degradabilidade compreendem estudos de batelada e de coluna. Nos estudos de batelada, variáveis físicas e químicas do solo e a atividade biológica, são avaliados na interação dos componentes com a matriz. Os estudos de coluna procuram investigar a lixiviação do herbicida e de seus metabólitos em eventos de precipitação ou de *run-off* ao longo do perfil do solo, avaliando as possibilidades de contaminação de mananciais e lençóis subterrâneos (LANDRY, 2006; GOODDY, 2002; CARRACIOLO *et al*, 2005).

A lixiviação de Diuron e Orizalin através de colunas abertas foi estudada em laboratório usando três solos de vinhedo provenientes de Vosne-Romanné (Burgundy - França): um rendosolo, um calcosolo e um calcosolo com vegetação. A mobilidade dos dois herbicidas foi maior nos dois calcosolos que no rendosolo, não somente devido ao diferente conteúdo de carbono orgânico, mas às diferenças nas texturas e estruturas do solo. As concentrações de N-3,4-diclorofenil-N,N-dimetilureia (DCPMU) e -3,4-diclorofenil-N,N-metilureia (DCPU) também foram monitoradas. No final do experimento, 0,6 % e 0,8 % do DCPMU (baseado na quantidade de Diuron aplicado) foi recuperado nos lixiviados dos solos

com menor conteúdo orgânico, o calcosolo (1,6 % de carbono orgânico entre 0 – 10 cm de profundidade) e no calcosolo com vegetação (1,9 % de carbono orgânico); no entanto, não foi encontrado DCPMU nos lixiviados de rendosolo (2,4 % de carbono orgânico). Devido a presença de frações grosseiras maiores que 2 mm e areia, menos Diuron foi transportado no rendosolo que nos dois calcosolos. As distribuições dos resíduos de Diuron e do seu metabólito DCPMU variaram pelos perfis do solo, sendo mais adsorvidos nas camadas mais superficiais. A taxa mais alta adsorvida de Diuron foi de 20,6 % no calcosolo com vegetação e a de DCPMU foi de aproximadamente 3 % no mesmo solo (LANDRY, 2004).

Landry e Andreux (2006) promoveram uma investigação da lixiviação de Diuron e orizalin, sob condições externas em lisímetros, por um ano, em quatro tipos de solo, sendo um rendosolo e três calcosolos. Depois de 673mm de chuva, grandes quantidades de Diuron e orizalin foram detectados nos percolados e as condições experimentais confirmaram que a lixiviação do Diuron e então o seu potencial de contaminação de águas subterrâneas é maior do que do orizalin (LANDRY, 2006).

Boeira e Souza (2004) estudaram a sorção de Diuron em solos com diferentes texturas classificados como: neossolo quartazarênico, latossolo vermelho distrófico e latossolo vermelho distroférico, através de modelagem matemática. Foram levantados parâmetros físicos e químicos do solo e climáticos. O neossolo quartazarênico mostrou baixa capacidade de adsorção e intensa dessorção de Diuron, indicando risco potencial de lixiviação do herbicida se aplicado em áreas com predominância dessa classe de solo, e nas profundidades estudadas. Os latossolos vermelho distrófico e vermelho distroférico apresentaram capacidade elevada de adsorção e de retenção de Diuron. A adsorção de Diuron correlacionou-se positivamente com o teor de carbono orgânico nos solos (BOEIRA, 2004).

2.9.2 Estudos do Processo de Degradação *In-Situ*

Os estudos de degradação e adsorção do Diuron e seus resíduos nos locais de uso são limitados muitas vezes pelos fatores ambientais que dificultam o tratamento dos dados e a modelagem da interação do herbicida com o solo e a água. Outro fator de limitação dos estudos *in-situ* vem da necessidade de identificação de isótopos dos compostos (VIDALI, 2001).

Goody e colaboradores (2002) estudaram a degradação *in situ* do Diuron através da implantação de um lote experimental em um solo calcáreo no sul da Inglaterra para investigar seu destino e transporte. Aplicou-se Diuron na superfície do solo a uma taxa de 6,7 kg.ha⁻¹, juntamente com traçador conservativo brometo de potássio a uma taxa de 200 kg.ha⁻¹, em janeiro de 2001. Foram analisadas amostras de solo coletadas aos 54 cm de profundidade e águas de retenção, por 50 dias. Monitorou-se a quantidade de Diuron e três de seus metabólitos: DCPMU, DCPU e DCA. As concentrações de Diuron foram aproximadamente cinco vezes mais altas no solo do que nas águas de retenção. Há evidências para sugerir que a degradação ocorre tanto na superfície do solo como em maiores profundidades do solo. Os metabólitos em geral pareceram se movimentar mais lentamente que a matriz. Altas concentrações de Diuron e de seus metabólitos continuaram presentes no solo depois de cinquenta dias e permaneceram como fonte potencial de contaminação de águas subterrâneas (GOODDY, 2002).

A ocorrência de Diuron e de resíduos da sua degradação em corpos aquáticos é bastante utilizada para determinar a qualidade de reservatórios de água potável. Carraciolo e colaboradores (2005) investigaram o potencial de lixiviação de diversos herbicidas, entre eles o Diuron e um de seus metabólitos de degradação, a 3,4-dicloroanilina, em solos microbiologicamente ativos e solos esterilizados. Associadamente aos estudos laboratoriais, foi feito um estudo em campo utilizando-se lisímetros, para avaliar o potencial de contaminação do lençol subterrâneo. Os dados obtidos em campo foram comparados com os dados laboratoriais. A estimativa do potencial de contaminação foi feita através da avaliação do tempo de desaparecimento de 50 % (DT₅₀) da dose aplicada do composto original e do coeficiente de sorção (K_{oc}). No entanto, as características analíticas do processo utilizado, pareceram promover a degradação do Diuron, o que o classificou neste trabalho como um composto com potencial de contaminação transitório e que a sua degradação no campo ocorre em taxas baixas.

Os estudos com lisímetro evidenciam que o Diuron pode alcançar as camadas mais profundas do solo tanto através do escoamento da matriz do solo, como pela sua percolação através dos macroporos do solo. Outra possibilidade de contaminação é relacionada ao fenômeno de degradação não ocorrer significativamente na superfície reduzindo a sua concentração. Os eventos de precipitação que ocorrem imediatamente após a aplicação dos herbicidas podem influenciar positivamente a sua lixiviação. (CARRACIOLO *et al.*, 2005)

2.10 BIORREMEDIAÇÃO

A descontaminação de sítios pode ser obtida por técnicas de remediação e restauração. Usualmente estas técnicas são onerosas e tecnologias avançadas tais como o uso de sistemas biológicos de tratamento para reduzir ou destruir resíduos perigosos são vistos como uma opção para a descontaminação (UETA *et al*, 2004)

A biorremediação é definida como o processo pelo qual os resíduos orgânicos são degradados biologicamente em condições controladas para um estado inócuo, ou para níveis inferiores a concentração limites estabelecidos por processos regulamentados. Por definição é a utilização de organismos vivos para degradar os contaminantes ambientais a formas menos tóxicas (VIDALI, 2001).

2.10.1 Fatores de Biorremediação

O sucesso de um programa de biorremediação de áreas contaminadas dependerá, em parte, de um bom planejamento inicial sobre isolamento e seleção de um microrganismo ou de um consórcio de microrganismos eficientes na degradação da molécula em estudo. O isolamento permite estudar com mais detalhes as vias metabólicas, enzimas, produtos intermediários, entre outros (SILVA e MELLO, 2000).

O controle e otimização de processos de biorremediação incluem: a existência de uma população microbiana capaz de degradar os poluentes, a disponibilidade de contaminantes para a população microbiana, e os fatores ambientais como o tipo de solo, temperatura, pH, presença de oxigênio ou outros de elétrons, e nutrientes (VIDALI, 2001).

Os estudos relativos às enzimas envolvidas no processo de biodegradação auxiliam a estabelecer correlações sobre estrutura-biodegradabilidade. Também, o isolamento pode explicar que tipo de degradação pode estar ocorrendo no ambiente, se catabólica (mineralização) ou cometabólica.

No processo por via catabólica, a biomassa da população aumenta às custas do substrato e a concentração deste diminui consideravelmente com a expansão da população microbiana. Na mineralização a molécula é degradada completamente à moléculas inorgânicas de ocorrência universal, como: CO₂, CO, H₂O, NH₃, H₂S, HCl. Em alguns casos

uma porção da molécula pode ser degradada e outra porção pode se acumular no solo. No cometabolismo, não há nenhum dispêndio de energia e o crescimento microbiano requer a presença de um outro substrato, isto é, um substrato secundário é requerido como fonte de carbono e energia. Desta forma, os microrganismos podem transformar a molécula sem dela retirar energia para o seu desenvolvimento (MELLO e AZEVEDO, 1997).

Outros processos de biodegradação são as reações de conjugação e a adaptação cruzada que consistem, respectivamente, na combinação da molécula do xenobiótico ou um de seus metabólitos com outros compostos como carboidratos ou aminoácidos, levando à formação de moléculas mais hidrossolúveis e ocasionando uma remoção temporária da molécula do ambiente e à capacidade das populações microbianas degradarem um composto similar àquele já estudado, pela coincidência de fatores relativos à sua estrutura (SILVA e MELLO, 2000).

2.10.2 População Microbiana para os Processos de Biorremediação

Microrganismos podem ser isolados a partir de praticamente qualquer das condições e dos ambientes, sendo adaptáveis a situações extremas de temperatura, oxigenação, disponibilidade de água e mesmo na presença de compostos extremamente tóxicos, sendo que seus principais requisitos para o desenvolvimento são uma fonte de energia e uma fonte de carbono. Podemos subdividir estes microrganismos nos seguintes: aeróbios (i.e.: *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Sphingomonas*, *Rhodococcus* e *Mycobacterium*), anaeróbios (i.e.: *Desulfavibrio*, *Clostridium* e *Providencia*), fungos (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Absidia* e *Rhizopus*) e bactérias metilotróficas (i.e.: *Methylobacterium*) (VIDALI, 2001 e COLLA *et al*, 2007).

De acordo com Martins (2006) os microrganismos ocupam geralmente menos de 0,5 % do espaço poroso do solo. Métodos microscópicos associados a testes bioquímicos, demonstram que apenas algumas células microbianas são fisiologicamente ativas, estando na sua maioria em estado dormente ou mortas, evidenciando as condições estressantes do solo. Observa-se que aproximadamente 15 a 30 % das bactérias e 2 a 10 % dos fungos estão metabolicamente ativos. Dentre seus os constituintes, as frações representadas pelas argilas e matéria orgânica que formam o complexo coloidal do solo, destacam-se pela sua capacidade de interação com os microrganismos.

Entre os grupos de organismos geralmente presentes no solo estão bactérias, actinomicetos, fungos, algas, nematóides, protozoários, insetos, aracnídeos, entre outros e a sua atividade biológica é de grande relevância para a produtividade agrícola, reciclagem de nutrientes e qualidade do ambiente (MEURER, 2000).

A pesquisa sobre a rizosfera tem sido direcionada para a influência na transformação de poluentes em solos e agora está bem estabelecido que a transformação mediada por processos microbianos na rizosfera representa um importante papel na persistência, mobilidade e toxicidade de poluentes do solo (BOLAN, 2001).

Algumas espécies de microrganismos têm sido estudadas quanto à capacidade de degradação de herbicidas de feniluréia, como *Variovorax* sp., *Delfia* acidoforans, *Pseudomonas* sp, *Sphingomonas* sp., *Bacillus sphaericus*, *Arthrobacter* sp., *Cunninghamella elegans*, *Mortierella isabellina*, *Talaromyces wortmanni*, *Rhizopus japonicus*, *Rhizoctonia solani* e *Aspergillus niger*. No entanto, até recentemente, não há registros de culturas que possam degradar a estrutura fenil. (SORENSEN *et al*, 2003).

Castillo *et al* (2006) compararam a capacidade de degradação de 53 linhagens de actinomicetos isolados de solo de cultivo de citrus regularmente tratados com diuron e de solos não tratados, em meio de cultura líquido enriquecido. Observou-se que as linhagens isoladas de solo regularmente tratado com o herbicida foram capazes de degradar o diuron em taxas de até 95,6%, enquanto que as bactérias isoladas de solo não cultivado foram capazes de degradar o diuron em uma taxa máxima de 50%. Uma das linhagens isoladas de solo cultivado foi capaz de degradar o diuron à metade da concentração inicial em 1,4 dias.

Ramos (2005) estudando a biorremediação *in vitro* em meio aquoso, do herbicida Velpar K® (Diuron 46,8%, Hexazinona 13,2% e ingredientes inertes 40%), com o uso de inoculante microbiano, verificou um aumento significativo na contagem de células em cerca de 60 vezes para todas as concentrações do herbicida utilizadas no estudo, em comparação ao branco – composto pelo inóculo ativado com melaço e concluiu que o herbicida foi utilizado como fonte de carbono e energia no estudo. O método utilizado para o monitoramento não detectou, no entanto, o crescimento de microrganismos como fungos e leveduras.

O isolamento, a caracterização e a identificação dos microrganismos com habilidade ou atividade enzimática metabolizadora dos materiais químicos potencialmente tóxicos são fatores essenciais para o uso em biorremediação (MIDIO, 1997).

2.10.3 Usos da Biorremediação

Diversos compostos são disponíveis para a biorremediação como solventes clorados (tricloroetileno, percloroetileno), bifenilas policloradas (4-clorobifenil, 4,4-diclorobifenil), fenóis clorados (pentaclorofenol), benzeno, tolueno, etilbenzeno, xileno e hidrocarbonetos poliaromáticos (naftaleno, antraceno, fluoreno, pireno, benzo(a)pireno) (VIDALI, 2001).

Um dos campos mais promissores da biotecnologia que visa o emprego dos microrganismos direciona-se para a remediação de locais contaminados devido ao uso de agroquímicos (UETA E PEREIRA 2004). Entre os pesticidas já estudados que são susceptíveis a biorremediação estão: atrazina, carbaril, carbofurano, diazinona, glifosato, paration, 2,4-D (VIDALLI, 2001).

A biodegradação é o principal mecanismo de desaparecimento de pesticidas no solo, porém sua contribuição varia muito para diferentes substâncias. Para o DDT, menos de 20 % da sua degradação ocorre por via biológica, enquanto para a atrazina, este tipo de transformação é responsável por mais de 80 % de sua degradação no ambiente (DAMIM, 2005).

2.10.4 Bioaugmentação

Nós podemos definir a bioaugmentação como a melhoria na capacidade de uma matriz contaminada (solo ou outro ambiente) de remover a poluição através da introdução de cepas ou consórcios de microrganismos específicos. A premissa básica para esta intervenção é a de que a capacidade metabólica dos microrganismos nativos presentes no ambiente para a limpeza será aumentada por uma capacidade genética exógena, conduzindo assim a um processo de degradação mais amplo (FANTROUSSI e AGATHOS, 2005). Esta técnica tem sido bastante estudada para vários herbicidas, hidrocarbonetos clorados e carbonatos através do emprego de populações indígenas aclimatadas, isolados selecionados e até mesmo microrganismos transgênicos contendo plasmídeos degradadores (PRIMO, 2008).

Há diferentes opiniões (i.e.: companhias prestadoras de serviços, institutos de pesquisa e de regulação) sobre qual dos dois métodos trabalham melhor na prática: bioaugmentação ou bioestimulação (FANTROUSSI e AGATHOS, 2005).

A bioaugmentação dispõe claramente de certas vantagens sobre a bioestimulação, nos casos em que um poluente tóxico ou a falta de microrganismos adequados (tanto quantidade e qualidade) são importantes. O sucesso da bioaugmentação exige uma compreensão das biodisponibilidades do poluente, acrescentado à sobrevivência e à atividade do microrganismo ou, o respectivo material genético e as condições gerais do ambiente que controlarão as taxas de biorremediação do solo. A recente aplicação de técnicas genéticas tem auxiliado a compreensão do destino dos microrganismos acrescentados, nos aproximando dos parâmetros críticos que promoverão o desenho da engenharia dos processos de bioaugmentação (VOGEL, 1996).

Existem poucas evidências definitivas de sucesso dessa técnica, exceto em algumas situações específicas, como se verifica com o *Agrobacterium radiobacter* J14 que possui elevada capacidade de degradar a atrazina e o fungo *Phanerochaete chrysosporum*, o qual degrada mais que 60 xenobióticos, incluindo 12 aromáticos policíclicos, 12 aromáticos clorados, 9 policíclicos aromáticos, 3 alquil-clorados, 6 biopolímeros e 16 corantes diversos (Bumpus, 1993 apud PRIMO, 2008). Em geral, a bioaugmentação é mais apropriada para tratamentos de contaminantes muito recalcitrantes, em contaminações recentes e onde se pretende aplicar a degradação acelerada (PRIMO, 2008).

2.11 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Validação de um método é o processo de comprovação, através do fornecimento de evidência objetiva, de que os requisitos para uma aplicação ou uso específicos pretendidos foram atendidos. Os parâmetros de validação devem estar claramente declarados no procedimento documentado e incluir, quando aplicável: especificidade e seletividade, linearidade, faixa de trabalho e faixa linear de trabalho, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, exatidão e tendência (*bias*), reprodutibilidade, robustez e incerteza de medição (INMETRO, 2007).

Uma amostra, de maneira geral, consiste dos analitos a serem medidos, da matriz, e de outros componentes que podem ter algum efeito na medição, mas que não se quer

quantificar. A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Um método que produz resposta para apenas um analito é chamado específico. Um método que produz respostas para vários analitos, mas que pode distinguir a resposta de um analito da de outros, é chamado seletivo (INMETRO, 2007). A seletividade consiste na análise da solução padrão do mesmo, em presença de quantidades conhecidas de possíveis interferentes (impurezas, excipientes, produtos de degradação), demonstrando que os resultados não são afetados pelos mesmos. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI, 2004).

Para técnicas cromatográficas, além das comparações visuais dos cromatogramas, diferentes parâmetros devem ser calculados para descrever a especificidade do método. Os parâmetros mais importantes são: resolução, retenção relativa (fator de separação), fator de capacidade (fator de retenção), fator de simetria e número de pratos teóricos (INMETRO, 2007).

Vários testes e suas estatísticas correspondentes podem ser utilizados para o estudo da seletividade dependendo da disponibilidade do analito, da matriz sem o analito e de amostras de referência nas concentrações de interesse. Se a matriz da amostra sem analito ou um grupo satisfatório de amostras de referência estão disponíveis, podem ser aplicados os testes F (*Snedecor*) de homogeneidade de variâncias e o teste *t* (*Student*) de comparação de médias, ou então realizada a análise dos desvios em relação aos valores de referência. Normalmente, parte-se da hipótese em que a matriz não afeta o sinal do analito em níveis de concentrações elevados ou acima da faixa. Preparam-se dois grupos de amostras de teste, um com a matriz e o outro sem, ambos os grupos com a concentração do analito idêntica em cada nível de concentração de interesse. O número de amostras paralelas em cada nível de concentração deve ser maior ou igual a 7 (sete) para permitir o uso adequado dos modelos estatísticos e proporcionar uma comparação válida (INMETRO, 2007).

A linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. A quantificação requer que se conheça a dependência entre a resposta medida e a concentração do analito. A linearidade é obtida por padronização interna ou externa e formulada como expressão matemática usada para o cálculo da concentração do analito a ser determinado na amostra real. Pode ser observada pelo gráfico dos resultados dos ensaios em função da concentração do analito ou então calculada a partir da equação da regressão linear, determinada pelo método dos mínimos quadrados (INMETRO, 2007).

Segundo o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (2007), para qualquer método quantitativo, existe uma faixa de concentrações do analito ou valores da propriedade no qual o método pode ser aplicado. No limite inferior da faixa de concentração, os fatores limitantes são os valores dos limites de detecção e de quantificação. No limite superior, os fatores limitantes dependem do sistema de resposta do equipamento de medição. Dentro da faixa de trabalho pode existir uma faixa de resposta linear e dentro desta, a resposta do sinal terá uma relação linear com o analito ou valor da propriedade. A extensão dessa faixa pode ser estabelecida durante a avaliação da faixa de trabalho. A faixa linear de trabalho de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições especificadas para o ensaio. A faixa linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico.

A faixa de trabalho deve cobrir a faixa de aplicação para a qual o ensaio vai ser usado. A concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho. Os valores medidos obtidos têm que estar linearmente correlacionados às concentrações (INMETRO, 2007).

Sensibilidade ou especificidade é a capacidade do método analítico de registrar pequenas variações da concentração do analito na amostra e pode ser avaliada através dos limites de detecção e quantificação (LOBO, 1997). Pode-se expressar a sensibilidade através da inclinação da curva de regressão linear de calibração e é determinada juntamente aos testes de linearidade. A sensibilidade depende da natureza do analito e da técnica da detecção utilizada (GUIA..., 2002; INMETRO, 2007). Para verificar a sensibilidade do método de análise são determinados os limites de detecção e de quantificação.

O limite de detecção do equipamento (LDE) é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do equipamento. O limite de detecção do método (LDM) é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95 % ou 99 % de confiança de que a concentração do analito é maior que zero. LDM é determinado através de análise completa de uma dada matriz contendo o analito (GUIA... 2002; INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

O limite de quantificação do equipamento (LQE) É definido como a menor concentração do analito que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade. Conhecido também em algumas situações como “Limite de Determinação”. Na

prática corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração (excluindo o branco). A diferença entre o limite de detecção e o limite de quantificação é a ordem de grandeza das incertezas associadas (GUIA..., 2002; RIBANI, *et al.*, 2004; INMETRO, 2007).

Exatidão e tendência do método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. Quando se aplica a exatidão em uma série de resultados de ensaio, implica uma combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência) e é importante no estabelecimento da rastreabilidade aos padrões reconhecidos. A tendência pode ser explicada como recuperação analítica (valor observado/valor esperado). Os processos normalmente utilizados para avaliação da exatidão do método são, entre outros: uso de materiais de referência, participações em comparações interlaboratoriais e realização de ensaios de recuperação (GUIA..., 2002; RIBANI, *et al.*, 2004; INMETRO, 2007).

A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de um mesmo método, efetuadas sob condições variadas de medição. A precisão intermediária, também denominada de reprodutibilidade interna, refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas; diferentes equipamentos; diferentes tempos. É reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável de usar (INMETRO, 2007).

Para determinar a precisão intermediária de um método, efetuam-se “n” medições em replicata, ou em ensaio único, sobre a amostra, nas condições pré-definidas. Quando aplicável, este procedimento é repetido sobre outras amostras, abrangendo outros níveis de concentração. (INMETRO, 2007).

A precisão é avaliada pelo desvio padrão absoluto (σ), que utiliza um número significativo de medições, normalmente maior que 20. Na prática, em validação de métodos, o número de determinações é geralmente pequeno e o que se calcula é a estimativa do desvio padrão absoluto (s).

A precisão também pode ser expressa através do intervalo de confiança da média, que é uma faixa de valores no qual existe uma determinada probabilidade de se encontrar certo valor de uma variável, calculada pela equação.

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetibilidade, quando o método é realizado sob as mesmas condições, por um analista somente, no mesmo laboratório, com os mesmos instrumentos e reagentes e com a mesma

série de analitos; reprodutibilidade, quando é realizada sob diferentes condições (analista, dia, instrumentos diferentes, etc); precisão intermediária que refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, amostras idênticas ou padrões, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais) um exemplo é variar os analistas, equipamentos, tempo ou mesclar essas variáveis, o importante é pré definir quais condições variar (LOBO, 1997; RIBANI *et al.*, 2004; INMETRO, 2007).

A robustez de um método de ensaio mede a sensibilidade que este apresenta face a pequenas variações. Um método diz-se robusto se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo executado. Para determinar a robustez de um método de ensaio, pode-se recorrer ao teste de *Youden*. Trata-se de um teste que permite não só avaliar a robustez do método, como também ordenar a influência de cada uma das variações nos resultados finais, indicando qual o tipo de influência de cada uma dessas variações. Convém salientar que quanto maior for a robustez de um método, maior será a confiança desse relacionamento à sua precisão. Nesse método são realizados 8 ensaios, separados para determinar os efeitos da variação das 7 diferentes etapas, no procedimento analítico, por exemplo: tempo de agitação, tamanho da amostra, concentração ácida, tempo e temperatura de aquecimento, agitação, pH. As oito medições podem ser realizadas numa ordem aleatória (INMETRO, 2007).

Após crítica dos resultados obtidos, fazer um controle mais rigoroso dos fatores de maior influência. Se não houver diferença significativa, calcular a média e o desvio padrão dos 8 resultados, de s até z. O desvio padrão é uma estimativa realista da precisão do método (INMETRO, 2007).

Os estudos de validação produzem dados de desempenho global do método e fatores de influência individuais que podem ser aplicados à estimativa da incerteza de medição associada aos resultados do método em rotina (INMETRO, 2007). Veja e Frenich (2005) asseguraram a qualidade dos resultados para a análise de 32 pesticidas, entre eles o Diuron, aplicando-se critérios internos nas rotinas de análise: (1) extração de uma matriz para eliminar o falso positivo pela contaminação nos processos de extração, instrumentos ou reagentes utilizados, (2) extração de uma amostra previamente contaminada ao segundo nível de concentração da calibração para assegurar a eficiência da extração e (3) curvas de calibração preparadas diariamente em extratos de matrizes para checar-se tanto a sensibilidade como a linearidade na faixa de trabalho das concentrações para se evitar erros de quantificação causados por possíveis flutuações instrumentais ocasionadas pela matriz.

3. OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho teve por objetivo averiguar a degradação de diuron (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetiluréia), no solo, após a aplicação de biomassa microbiana isolada da rizosfera cana-de-açúcar, em seus metabólitos DCMPU (3,4-diclorofenil)-3-(metiluréia), DCPU (3,4-diclorofeniluréia) e DCA (3,4-dicloroanilina).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Selecionar uma área de cultivo de cana-de-açúcar com aplicação histórica do herbicida diuron;
- ✓ Fazer a seleção de microrganismos rizosféricos resistentes ao herbicida diuron em soluções estéreis de Hexaron WG[®] como única fonte de nutriente;
- ✓ Fazer um estudo da capacidade de crescimento de microrganismos resistentes ao herbicida diuron em soluções enriquecidas ou não com o composto;
- ✓ Caracterizar os microrganismos isolados através da sua morfologia, coloração de Gram, testes de formação de esporos e testes bioquímicos.
- ✓ Desenvolver e validar uma metodologia para análise e quantificação do herbicida diuron e dos metabólitos DCMPU, DCPU e DCA, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), estabelecendo os limites de quantificação e de detecção dos compostos no solo;

✓ Desenvolver e validar uma metodologia de extração de diuron e metabólitos de amostras de solo;

✓ Fazer a bioaugmentação de lotes de solo sem aplicação histórica de diuron (referência), com os microrganismos isolados selecionados de solo rizosférico e monitorar os parâmetros: umidade, pH, concentração de bactérias aeróbias mesófilas, concentração de fungos, concentração de diuron e dos metabólitos DCPMU, DCPU e DCA em três profundidades durante 5 semanas;

✓ Relacionar a degradação do herbicida e formação dos metabólitos, com os parâmetros monitorados no solo, durante as semanas de estudo, através de análise estatística multivariada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA DE SOLO RIZOSFÉRICO

A coleta de solo rizosférico foi realizada com objetivo de isolar microrganismos para serem utilizados no enriquecimento de uma área de estudo. As amostras de solo foram coletadas em uma área cultivada com cana-de-açúcar e com aplicação histórica de aproximadamente 5 anos do herbicida diuron na Usina Nova América S/A (Tarumã, SP).

A dosagem estimada de herbicida aplicada no período de pré-emergência da cultura a cada safra foi de 1,8 a 3,0 kg ha⁻¹ de produtos comerciais, baseados na recomendação do fabricante. Foram coletadas cinco plantas de cana-de-açúcar com o auxílio de uma enxada e encaminhadas ao laboratório. Todo o solo aderido às raízes foi retirado delicadamente com uma espátula de inox, transferido para um béquer de vidro e homogeneizado.

4.2 ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DO SOLO RIZOSFÉRICO

Pesou-se 10,00 g de solo rizosférico e diluiu-se em 200,0 mL de solução 0,75 % (m/v) de Hexaron WG[®] estéril (solução 1) e incubou-se em shaker a 28° C/100 rpm por 10 dias. Decorrido o tempo, retirou-se uma alíquota para investigação da ocorrência de microrganismos resistentes.

4.3 INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE MICRORGANISMOS RESISTENTES NA SOLUÇÃO DE HEXARON WG[®]

Transferiu-se 1,0 mL da solução 1 para um tubo de ensaio contendo 9,0 mL de água peptonada estéril a 0,1 %. Esta solução foi diluída 1000 vezes obtendo-se uma

concentração final 5,0 mg de solo por litro de solução (solução 2). Esta solução foi plaqueada em agar padrão de contagem (PCA) estéril e agar batata glicose (PDA) estéril, para a investigação de bactérias aeróbias mesófilas e fungos, respectivamente.

Os procedimentos para investigação dos microrganismos citados foram feitos conforme metodologia descrita por Silva (1995).

4.3.1 Investigação de Bactérias Aeróbias Mesófilas (Plaqueamento em PCA)

Transferiu-se 1,0 mL da solução 2 para placa de Petri estéril juntamente com 10,0 mL de PCA estéril. Após a homogeneização do material e solidificação do agar, as placas foram invertidas e incubadas em estufa a 32° C por um período de até 48 horas. Este procedimento foi feito em 4 replicatas.

4.3.2 Investigação de Fungos (Plaqueamento em PDA)

Transferiu-se 0,1 mL da solução 2 para placa de Petri contendo PDA acidificado com ácido tartárico a 1,0 %. Após a homogeneização do material as placas foram incubadas em estufa a 25°C por um período de até 5 dias. Este procedimento foi feito em 4 replicatas.

4.3.3 Purificação das Colônias

Das placas resultantes do procedimento descrito nos itens 4.3.1 e 4.3.2, 36 colônias foram selecionadas visualmente e fez-se uma purificação destas colônias por estriamento em superfície em novo meio de cultura, incubando-se nas mesmas condições para o crescimento das colônias.

4.4 INOCULAÇÃO DE SOLUÇÃO DE HEXARON WG[®] COM MICRORGANISMOS ISOLADOS

Adicionou-se 3,0 mL de solução 0,75 % de Hexaron WG[®] estéril sobre o meio de cultura de cada placa de colônia purificada e descolaram-se as colônias delicadamente com o auxílio de uma alça de Drigalsky. Este material foi transferido para um balão volumétrico de 200 mL, completando-se o volume com solução de Hexaron WG[®] estéril a 0,75 %. Foram transferidos 50 mL da solução anterior para 4 frascos erlenmeyer de 500 mL contendo 200 mL de solução de Hexaron WG[®]. Os frascos foram levados ao shaker regulado a 32 °C e 150 rpm, para um estudo de 5 semanas. A cada semana coletou-se 10,0 mL de solução de cada erlenmeyer e transferiu-se para 190 mL de uma nova solução de Hexaron WG[®] estéril na mesma concentração (repique). A cada troca, verificou-se a quantidade de colônias através de plaqueamento em PCA e PDA. Na 5^a semana interrompeu-se o procedimento de trocas de soluções. Após o último plaqueamento, 10 colônias foram selecionadas para os trabalhos subseqüentes e para um estudo comparativo de crescimento em soluções de diferentes composições.

As colônias foram transferidas para tubos de agar nutriente inclinado devidamente identificados para aumentar a sua biomassa e foram submetidas à testes de coloração de Gram, teste de formação de esporos e testes bioquímicos para caracterização. Os tubos foram mantidos a -5 °C sendo repicadas a novos meios de cultura mensalmente.

4.5 ESTUDO COMPARATIVO DE CRESCIMENTO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS EM SOLUÇÕES DE DIFERENTE COMPOSIÇÃO

Este estudo foi feito com os microrganismos provenientes do processo de isolamento com solução de Hexaron WG[®] 0,75 %, segundo metodologia adaptada de Silva *et al.*, 2000. A composição das soluções utilizadas neste estudo comparativo está listada na Tabela 3.

Com o auxílio de uma alça de platina, retirou-se em triplicata uma parte da biomassa dos tubos de agar nutriente inclinado e transferiu-se para um tubo de ensaio contendo 10,0 mL de água estéril. Agitou-se o tubo até completa descompactação e

homogeneização das células e transferiu-se 1,0 mL desta solução para os frascos 1, 2, 3, 5 e 6, que foram incubados em shaker a 28 °C/100rpm. O frasco 4 foi usado para investigação de perdas abióticas. Determinou-se a quantidade de células em câmara de Neubauer e o pH no início do estudo (tempo zero) e a cada 5 dias.

Tabela 3. Composição das soluções para estudo comparativo de crescimento dos microrganismos isolados em solução de Hexaron WG[®] 0,75 %.

Frasco	Composição
1	100,0 mL de água destilada estéril + 1 mL de solução de microrganismo
2	100,0 mL de solução nutriente ¹ + 1 mL de solução de microrganismo
3	100,0 mL de solução mineral J. E. ² + 1 mL de solução de microrganismo
4	100,0 mL de solução mineral J. E. enriquecida com diuron ³
5	100,0 mL de solução nutriente enriquecida com diuron ⁴ + 1 mL de solução de microrganismo
6	100,0 mL de solução mineral J. E. enriquecida com diuron + 1 mL de solução de microrganismo

(1) Solução nutriente: água peptonada estéril 0,1 %; (2) Solução mineral J. E. (K₂HPO₄ 0,5 g, (NH₄)₂SO₄ 0,5 g, MgSO₄.7H₂O 0,5 g, FeCl₂.1H₂O 10,0 mg, CaCl₂ 10,0 mg, MnCl₂ 0,1 mg, ZnSO₄ 0,01 mg, água destilada q.s.p.1000 mL) (Jones e Edington, 1968 apud Silva e Melo 2000); (3) Solução mineral J.E. enriquecida com diuron: (K₂HPO₄ 0,5 g, (NH₄)₂SO₄ 0,5 g, MgSO₄.7H₂O 0,5 g, FeCl₂.1H₂O 10 mg, CaCl₂ 10 mg, MnCl₂ 0,1 mg, ZnSO₄ 0,01 mg, diuron (p.a.) 20,0 mg, água destilada q.s.p.1000 mL); (4) Solução nutriente enriquecida com diuron + microrganismo: água peptonada estéril 0,1 % e diuron 20 mg L⁻¹;

4.6 CARACTERIZAÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS

A caracterização dos microrganismos isolados para o estudo de degradação do diuron no solo foi feita através de coloração de Gram, teste de formação de esporos e testes bioquímicos de catalase, citrato, fermentação de sacarose, fermentação de lactose, indol, motilidade, redução do nitrato, vermelho de metila e Voges–Proskauer, segundo metodologias descritas pelo Bacteriological Analytical Manual (FDA, 1984).

4.7 ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DO DIURON NO SOLO

4.7.1 Área de Estudo da Biodegradação do Diuron

Uma área de preservação permanente, localizada na Usina Nova América, Tarumã - S.P., foi selecionada para o estudo da biodegradação do diuron. As coordenadas geográficas do local selecionado são: S 22° 41.969' e W 50° 30.816'.

O estudo foi implantado a uma distância de 100 m das áreas de cultivo da cana-de-açúcar e solo com propriedades similares à área de cultivo. Considerando-se a topografia da região, foi selecionada uma área plana para evitar a lixiviação diagonal do material, e em maior altitude em relação a área de cultivo de cana-de-açúcar para evitar contaminação ou interferência da mesma.

Esta área foi delimitada em 4 m², e subdividida em lotes de 1 m², sendo: lote A – bioaumentado com microrganismos selecionados, lote B – bioaumentado com microrganismos selecionados e com aplicação de Hexaron WG[®], lote C – com aplicação de Hexaron WG[®] (monitoramento de perdas abióticas) e lote D – controle. Tomou-se o cuidado de aplicar os compostos com espaçamento de 50 cm entre os lotes para evitar interferências entre os mesmos. A Figura 5 mostra a área selecionada para o estudo de biodegradação.

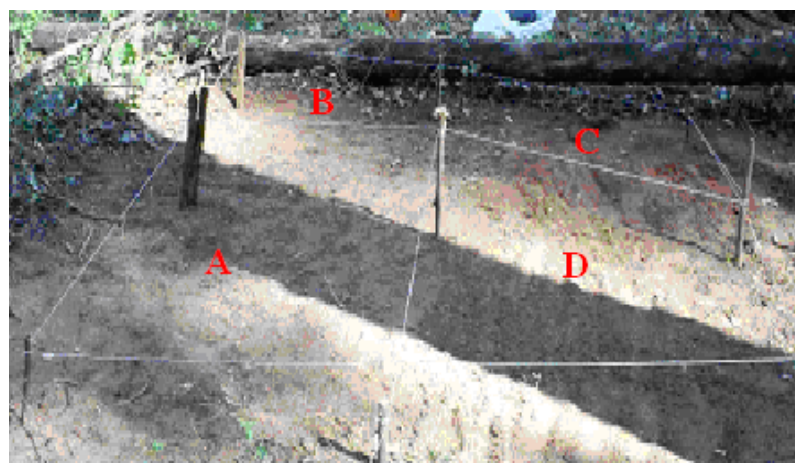


Figura 5.– Área de estudo da biodegradação do diuron no solo, delimitada em 4 m², e subdividida em lotes de 1 m².

4.7.2 Aumento da Biomassa Microbiana

Coletou-se material em duplicata de cada um dos 10 tubos de agar nutriente inclinado (item 4.5) com o auxílio de uma alça de platina e transferiu-se para um tubo de ensaio contendo 10 mL de água destilada estéril, para a solubilização da biomassa. O tubo foi homogeneizado em um agitador de tubos e 0,1 mL desta solução foi plaqueado em PCA por superfície e incubado em estufa a 32 °C. Foram preparadas 70 placas. Após o crescimento, a biomassa foi suspensa em 3,0 mL de água destilada estéril com o auxílio da alça de Drigalsky, como descrito anteriormente. Transferiu-se este material para um balão volumétrico de 500 mL previamente esterilizado por irradiação de luz UV e completou-se o seu volume com água destilada estéril.

4.7.3 Inoculação da Biomassa na Área de Estudo e Incorporação do Herbicida

Foi feita uma limpeza superficial da área selecionada retirando-se pedregulhos e material vegetal (folhas e galhos de árvore). Posteriormente coletou-se aproximadamente 2000 cm³ de solo superficial transferindo-o para sacos plásticos. Este material foi encaminhado para o laboratório, peneirado em malha 2 mm e transferido para 30 frascos de polietileno de 500 mL semi-abertos. Os frascos foram autoclavados por 30 minutos a 120 °C e 1 atm. Após a autoclavagem, verificou-se a eficiência da esterilização através da inoculação destas amostras de solo em PCA e PDA.

O solo foi dividido em 2 partes iguais (1,0 kg), umedecido novamente e inoculado com 250 mL da solução de biomassa descrita no item 4.7.2. Após a homogeneização levou-se à estufa regulada a 32 °C por 12 horas, antes da sua transferência para a área de estudo. Na área de estudo, cada quilograma de solo foi disponibilizada homogeneamente sobre os lotes A e B e deixados por 1 semana para adaptação dos microrganismos às novas condições ambientais, sendo umedecidos a cada 2 dias com 2 litros de água destilada até a data de incorporação do herbicida.

Aplicou-se 1,25 L de solução de Hexaron WG[®] 1,2 % nos lotes B e C com o auxílio de um regador de plantas. A dosagem de herbicida aplicado foi a máxima recomendada pelo fabricante, 12 kg L⁻¹ de calda, representando 3 kg ha⁻¹. Após 24 h da

incorporação do herbicida, procederam-se as coletas de solo com o auxílio de um trado, em 3 profundidades (0 a 10, 10 a 20 e 20 a 30 cm). As amostras foram encaminhadas ao laboratório para análises de: pH, matéria orgânica, umidade, contagem de bactérias aeróbias mesófilas e de fungos. Coletou-se material por 5 semanas. A capacidade de troca de cátions (CTC) foi determinada na primeira e na última coleta, somente no lote D. A textura foi determinada na primeira coleta somente no lote D.

4.7.4 Organograma do Processo de Bioaugmentação dos Lotes de Solo

A figura 6 representa o organograma do processo de bioaugmentação dos lotes de solo.

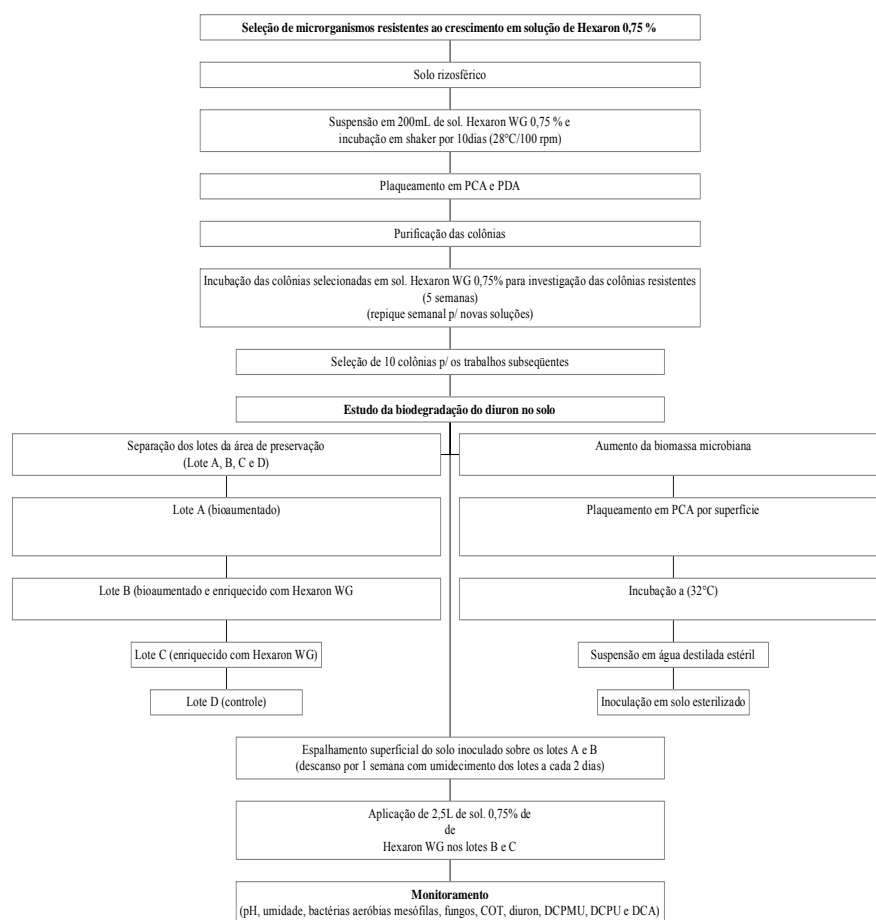


Figura 6: Organograma do processo de bioaugmentação dos lotes de solo.

4.8 DETERMINAÇÃO DE UMIDADE

A determinação da porcentagem de umidade foi obtida pela diferença do peso do conjunto antes e após a secagem a 105 °C/24 h, de uma massa de solo, segundo as recomendações da Embrapa (1997).

4.9 CLASSIFICAÇÃO TEXTURAL DO SOLO

Foi realizada pelo método da pipeta (dispersão total), segundo as recomendações do Instituto Agrônômico do Paraná (IAPAR), no lote controle (D).

4.10 DETERMINAÇÃO DO pH

O pH foi determinado pela medição do potencial com eletrodo combinado de vidro imerso em suspensão solo:líquido (CaCl_2 1mol. L^{-1}) (1:2,5) (m/v), segundo as recomendações da Embrapa (1997).

4.11 QUANTIFICAÇÃO DE MICRORGANISMOS DO SOLO

Determinou-se o número de unidades formadoras de colônias da comunidade microbiana do solo. Pesou-se 10,00 g de cada amostra de solo que foram adicionados a frascos contendo 100 mL de água peptonada 0,1 %. Os frascos foram agitados por 10 minutos a 150 rpm em mesa agitadora. A partir deste frasco foram preparadas as diluições em água peptonada a 0,1 %, com um fator de 10^{-5} para bactérias e 10^{-2} para fungos. A partir destas soluções foram feitos os plaqueamentos em PCA e PDA, conforme metodologia descrita nos itens 4.3.1 e 4.3.2.

4.12 DETERMINAÇÃO DO CARBONO ORGÂNICO TOTAL

As concentrações de carbono foram determinadas pelo método de combustão catalítica sob atmosfera de oxigênio, utilizando analisador de carbono Shimadzu, modelo TOC-5000A (ALMEIDA *et al.*, 2003). As análises foram realizadas no laboratório de Biogeoquímica da UFSCar, São Carlos, SP.

4.13 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE TROCA CATIÔNICA (CTC)

A CTC foi composta pela somatória de íons cálcio (Ca^{2+}), magnésio (Mg^{2+}) e potássio (K^+) trocáveis, analisados pelo método da resina de troca iônica, conforme descrito pelo Instituto Agrônomo de Campinas (IAC, 2001).

4.14 VALIDAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE DIURON E METABÓLITOS DO SOLO

Os padrões diuron, DCPMU, DCPU e DCA foram adquiridos da empresa Dr. Ehrenstofer (Alemanha). O metanol utilizado para o preparo das soluções padrão, processo de extração e análise cromatográfica eram grau HPLC, Merck.

A validação da extração foi feita a partir da metodologia adaptada descrita por Vega *et al.* (2005) e Lobo (1997). Cinco gramas do solo da área de estudo foram contaminados com 1,0 mL de uma solução padrão formado pelos 4 analitos de interesse (solo fortificado) nos seguintes níveis de concentração: 1000, 500, 200, 100, 50 e 25mg. L⁻¹.

Após 24 h da contaminação, 20 mL de metanol grau HPLC foram adicionados ao solo e a extração dos analitos foi feita por ultra-som em um aparelho Logen-Sonic por 30 minutos. O material foi centrifugado (1200 rpm/30 min) em um aparelho marca Excelsa Baby II, filtrado em papel qualitativo (8 µm) e levado à análise cromatográfica após diluição (1:1) (v/v) com água ultrapura Milli-Q[®] ajuste à concentração da fase móvel. A concentração final dos analitos na amostra, após as diluições foram: 5,00, 2,50, 1,00, 0,50, 0,25, 0,125 mg. Kg⁻¹ de solo.

A precisão foi determinada quanto à repetibilidade e precisão intermediária com o solo fortificado no nível de concentração de 200 mg L^{-1} . O teste de repetibilidade foi realizado a partir de seis injeções consecutivas e calculou-se o coeficiente de variação (CV) para as áreas e alturas dos picos correspondentes aos 4 compostos de interesse.

A eficiência foi avaliada pela recuperação do processo de extração determinada pela comparação da área dos picos dos analitos nos extratos do solo, com a área dos picos dos analitos em soluções padrão na mesma concentração.

Os limites de detecção e quantificação foram determinados através da análise de solos fortificados em concentrações cada vez menores, sendo a solução de menor concentração utilizada a de 25 mg L^{-1} .

4.15 QUANTIFICAÇÃO DO DIURON E METABÓLITOS NO SOLO

A quantificação do diuron e de seus metabólitos no solo foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência em um aparelho da marca Waters, composto de módulo de bombeamento Waters 600, módulo para desgaseificação de solventes, injetor manual Rheodyne (7725I), detetor UV-Variável por Arranjo de Diodos (Waters 2996) e software Waters (Empower 2 Personal Single System Add-On). Utilizou-se coluna Waters (XTerra RP18 $5\mu\text{m}$ $4,6\times 150 \text{ mm}$) e pré-coluna Waters (XTerra RP18 $5\mu\text{m}$ $3,9\times 20 \text{ mm}$).

A fase móvel utilizada que permitiu a melhor separação dos picos cromatográficos foi metanol:água ultra pura Milli-Q[®] na proporção de 50:50.

A identificação dos picos de diuron e metabólitos foi executada com base de seus tempos de retenção e por comparação entre o espectro UV dos extratos de solo e dos compostos em soluções padrão (Gatidou *et al.*, 2004). O comprimento de onda selecionado foi determinado através de análise do pico de absorvância dos seus compostos. O diuron, o DCPMU e o DCPU foram analisados em 254 nm e a DCA em 240 nm .

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MICRORGANISMOS

5.1.1 Investigação da Ocorrência de Microrganismos Resistentes na Solução de Hexaron WG[®]

A investigação da ocorrência de microrganismos resistentes foi feita pela dissolução de solo rizosférico em solução de Hexaron[®]. Após a incubação, a solução foi plaqueada em PCA (agar padrão de contagem) e PDA (agar batata glicose) estéreis, para investigação da ocorrência de microrganismos resistentes. O plaqueamento resultou em uma grande quantidade de colônias de morfologia diversificada, como mostrado nas figuras 6 e 7.

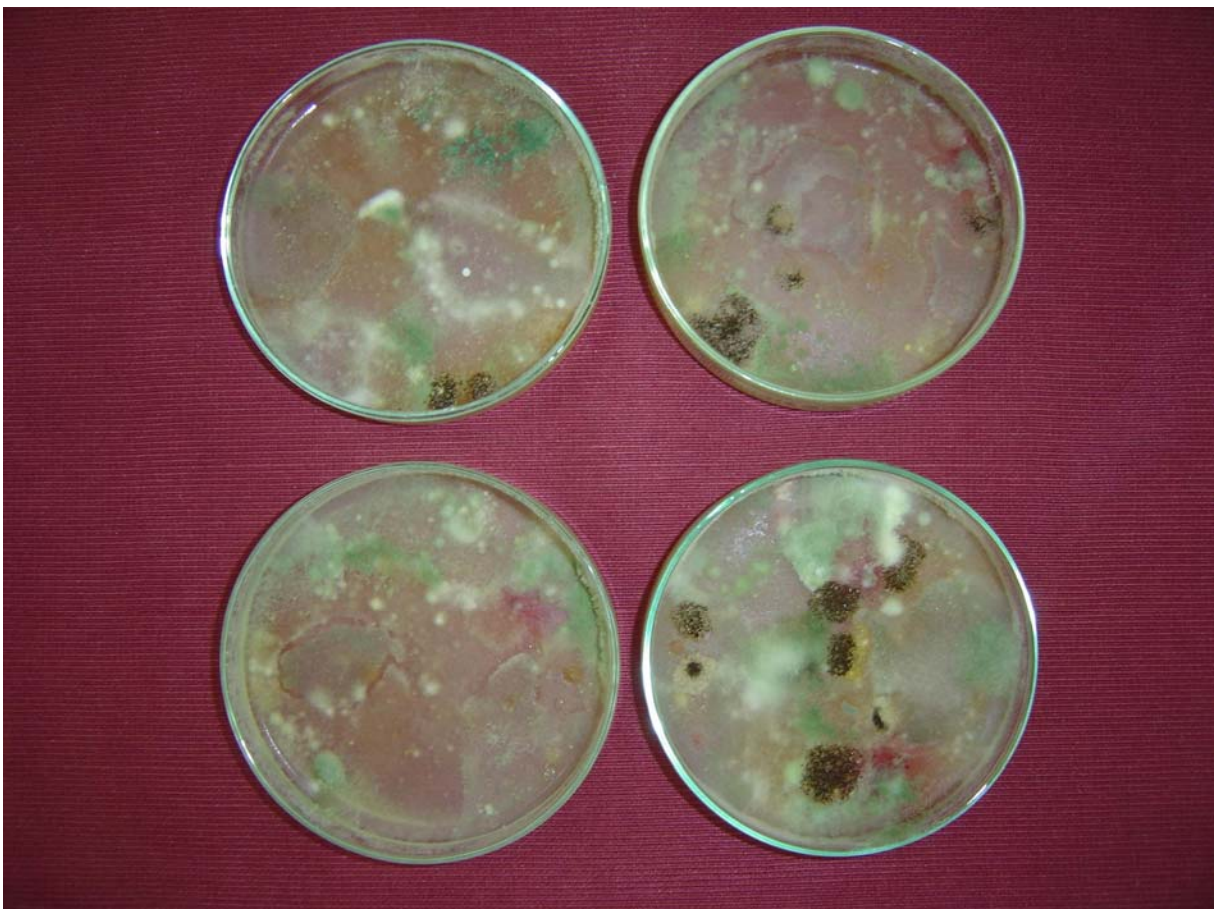


Figura 7 - Plaqueamento de fungos em PDA do solo rizosférico, resistentes à Hexaron WG[®] 0,75 % .

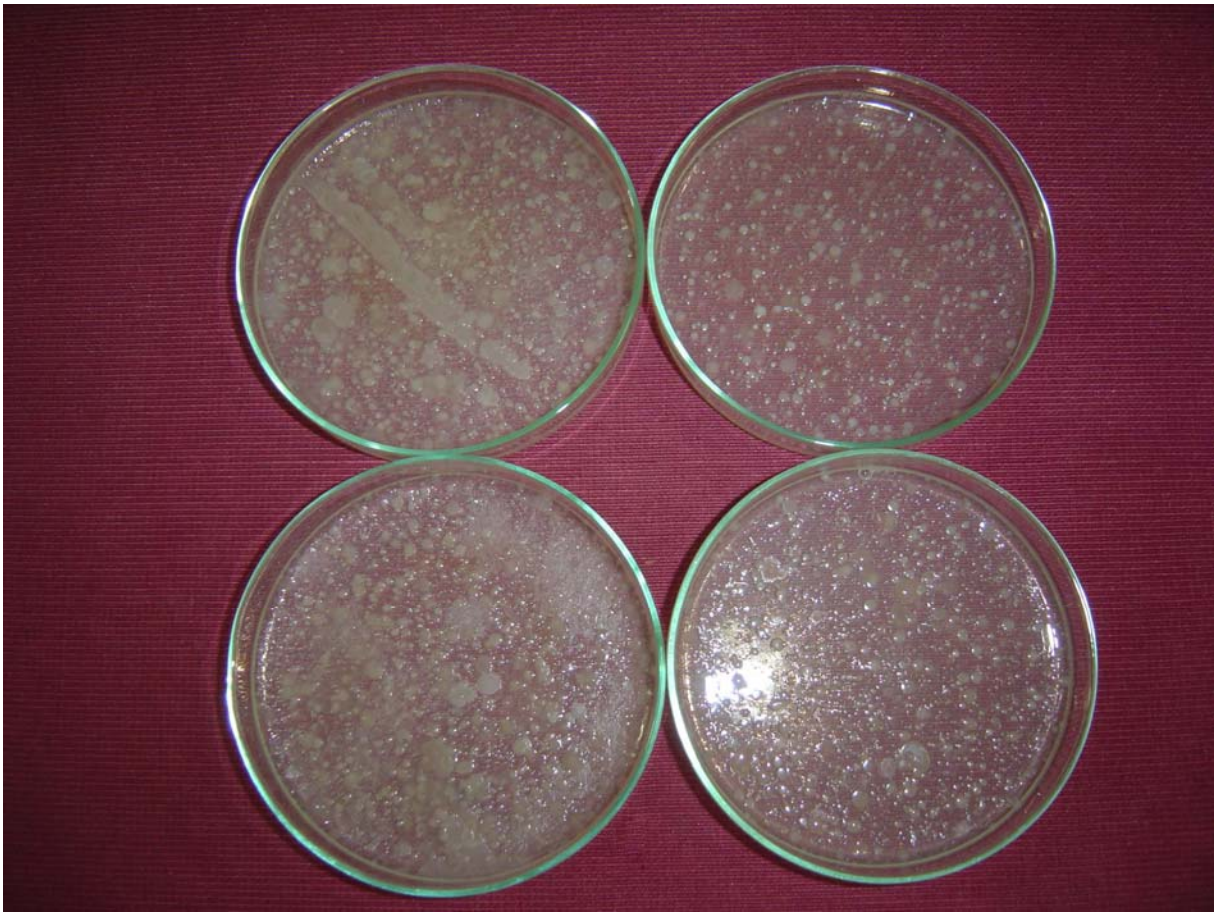


Figura 8 - Plaqueamento de bactérias aeróbias mesófilas em PCA, do solo rizosférico resistentes à Hexaron WG[®] 0,75 % .

5.1.2 Inoculação de Solução de Hexaron WG[®] com Microrganismos Isolados

Os resultados da investigação da resistência dos microrganismos selecionados para o estudo são mostrados na Tabela 4. Verifica-se que a cada repique a população bacteriana manteve seu nível populacional em torno de $1 \cdot 10^5$ UFC. g^{-1} de solo. A população de fungos não foi quantificada a partir da terceira semana de estudo.

Observando os resultados da Tabela 4, verifica-se que as bactérias aeróbias mesófilas provenientes da rizosfera da cana de açúcar, foram capazes de sobreviver em meio contendo como única fonte de nutrientes a solução de Hexaron WG[®]. Verifica-se também, que as condições de incubação foram favoráveis a este tipo de microrganismo. O mesmo não foi verificado para os fungos, que não tiveram sua população quantificada após 3 semanas de incubação. Este fato pode estar relacionado à fatores inerentes à fonte de nutrição, como pH

do meio, visto que a população fúngica tem preferência às condições de crescimento em meio ácido e em temperaturas mais baixas que os microrganismos aeróbios mesófilos.

Tabela 4 - Investigação de microrganismos resistentes em solução de Hexaron WG[®] 0,75 %

Plaqueamento de bactérias aeróbias mesófilas em PCA (UFC. g⁻¹ de solo) do solo rizosférico resistentes à Hexaron WG[®] 0,75 %					
Solução	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana	5ª semana
I	136. 10 ⁵	65. 10 ⁵	45. 10 ⁵	12. 10 ⁵	48. 10 ⁵
II	140. 10 ⁵	43. 10 ⁵	46. 10 ⁵	13. 10 ⁵	37. 10 ⁵
III	171. 10 ⁵	71. 10 ⁵	28. 10 ⁵	12. 10 ⁵	39. 10 ⁵
IV	80. 10 ⁵	62. 10 ⁵	30. 10 ⁵	22. 10 ⁵	80. 10 ⁵
Plaqueamento de fungos em PDA (UFC/g de solo) do solo rizosférico resistentes à Hexaron WG[®] 0,75 %					
Solução	1ª semana	2ª semana	3ª semana	4ª semana	5ª semana
I	1. 10 ⁴	1. 10 ⁴	0	0	0
II	1. 10 ³	1. 10 ³	0	0	0
III	1. 10 ⁴	1. 10 ⁴	1. 10 ³	0	0
IV	1. 10 ³	0	0	0	0

5.1.3 Estudo Comparativo de Crescimento dos Microrganismos Isolados em Soluções de Diferente Composição

Após o isolamento das linhagens resistentes ao processo de repicagem e aumento da sua biomassa, foi feito um estudo comparativo de crescimento em soluções de diferente composição.

Os resultados referentes ao monitoramento microbiano (Tabela 5), permitem observar que quando se utilizou o diuron como única fonte de carbono (solução 6) foi 1,3 vezes maior ao final do estudo comparada à solução 3, que se diferenciavam pela presença do diuron. A solução 5, que apresentava em sua composição uma fonte auxiliar de nutriente, teve uma contagem 1,7 vezes mais baixa que solução 2 o que nos faz concluir que havendo uma outra fonte de nutriente mais assimilável que o diuron, será preferida pelo microrganismo para

a sua nutrição. Outra discussão importante se faz acerca das soluções 2 e 6, que diferenciavam-se pela presença do diuron. A solução 6 apresentou valores de contagem de células sutilmente maiores (1,1 vezes) que a solução 2, ao longo do estudo. Este fator pode ser evidência da adaptação dos microrganismos selecionados à partir da área de estudo, ao diuron.

Tabela 5 - Monitoramento do pH e crescimento de microrganismos isolados em soluções de diferente composição

Solução	Coleta 1		Coleta 2		Coleta 3		Coleta 4		Coleta 5	
	(tempo zero)		(5° dia)		(10° dia)		(15° dia)		(20° dia)	
	Cel./mL	pH	Cel./mL	pH	Cel./mL	pH	Cel./mL	pH	Cel./mL	pH
1	$3,5 \cdot 10^{-2}$	7,50	1,5	7,13	0,25	6,93	4	6,34	0,2	6,12
2	$3,5 \cdot 10^{-2}$	8,55	4,75	8,58	9,5	8,53	3	8,55	12,75	9,00
3	$3,5 \cdot 10^{-2}$	7,52	10,5	7,52	71,75	7,47	1,75	7,40	11,25	7,33
4	$3,5 \cdot 10^{-2}$	7,02	0	7,14	0	7,43	0	7,33	0	7,26
5	$3,5 \cdot 10^{-2}$	8,18	6,5	8,20	72,75	8,34	12,5	8,78	7,5	9,00
6	$3,5 \cdot 10^{-2}$	7,20	4,75	7,21	35,25	7,49	4,5	7,43	15	7,32

1: Microrganismos em água; 2: Microrganismos em sol. nutriente; 3: Microrganismos em sol. mineral; 4: Sol. mineral suplementada com diuron; 5: Microrganismos em sol. nutriente suplementada com diuron; 6: Microrganismos em sol. mineral suplementada com diuron

O estudo de desenvolvimento de microrganismos em soluções de diferente composição é um importante parâmetro para explicar que tipo de degradação pode estar ocorrendo: se catabólica ou cometabólica. Ao se comparar a composição da solução 5 e 6 verifica-se que a presença da fonte auxiliar de nitrogênio (solução nutriente) proporcionou uma fase exponencial (fase log) de crescimento maior. Ao vigésimo dia do estudo (coleta 5) sua quantificação foi mais baixa comparada à solução 6, provavelmente ocasionada pela diminuição no teor de nutrientes do meio, que compromete o seu desenvolvimento. A figura 8 mostra graficamente como foi a evolução do crescimento microbiano no estudo.

Roque e Mello (2000) estudaram a cinética de crescimento de *Acinetobacter baumannii*, comprovadamente degradadora de diuron e verificaram a importância da fonte de nitrogênio e carbono para a biodegradação. Os melhores resultados foram observados na presença de NH_4NO_3 . A glicose como fonte de carbono não estimulou o crescimento, sugerindo uma atividade de repressão catabólica na presença de glicose. A presença de diuron, com ou sem fonte de N e C, foi o fator seletivo para a ocorrência do crescimento da

linhagem. Esta característica foi relacionada com o local de isolamento da bactéria (solo rizosférico) e com a aplicação do diuron.

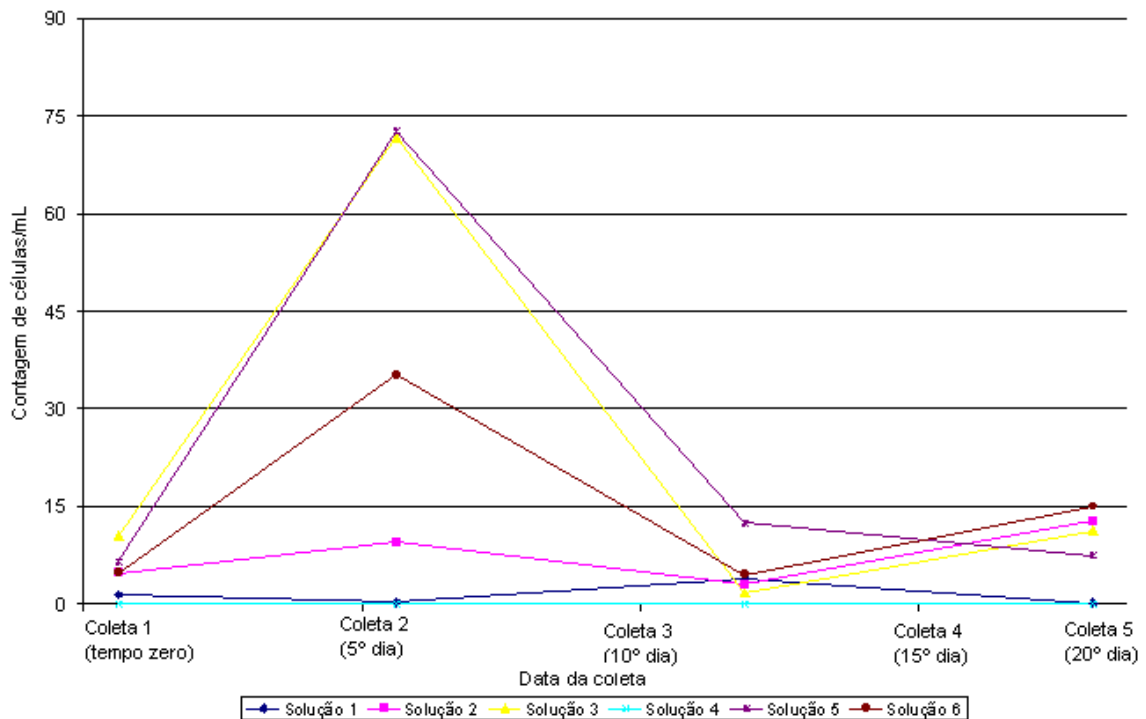


Figura 9 - Crescimento microbiano em soluções de diferente composição. Sol.1: Microrganismos em água; Sol. 2: Microrganismos em solução nutriente; Sol.3: Microrganismos em solução mineral; Sol.4: Solução mineral suplementada com diuron; Sol. 5: Microrganismos em solução nutriente suplementada com diuron; Sol.6: Microrganismos em solução mineral suplementada com diuron.

A capacidade de degradação de diuron por bactérias isoladas de um solo que sofreu tratamento sucessivos com diuron (40mg/kg de solo) por 3 meses, através da sua adição à soluções minerais enriquecidas com diuron (20mg/L) como única fonte de carbono e nitrogênio, foi verificada por Cullington (1999). Verificou-se que as soluções minerais enriquecidas que sofreram inoculações sucessivas com o solo tratado, tiveram uma taxa de degradação mais acelerada no meio de cultura, caindo de 23,3 para 0,1mg/L nos primeiros três dias de incubação. A taxa de degradação do diuron sempre foi acompanhada pela formação do principal metabólito de sua degradação: a 3,4-dicloroanilina.

Embora os resultados apresentados mostrem a adaptação dos microrganismos à presença do diuron, os valores são baixos se comparados à quantidade de microrganismos presentes no início do estudo (item 5.1.2 e Tabela 4). Este fator pode ser explicado pela diferença na composição do meio entre o solo e a água, como supressão de oxigênio, ausência de alguns nutrientes, diferença na composição da fonte orgânica, presença

de luz e pH. Outra observação deve ser feita em relação à evolução do crescimento microbiano, visto que o crescimento exponencial acontece nos primeiros 4 dias de estudo, depois do qual a população entra em decadência, voltando a ter uma pequena evolução nos últimos 4 dias dos estudo.

5.1.4 Caracterização dos Microrganismos Isolados

A caracterização dos microrganismos segundo a sua morfologia, coloração de Gram e testes de formação de esporos e bioquímicos são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 – Morfologia, coloração de gram, testes bioquímicos e de formação de esporos dos microrganismos selecionados para o estudo de degradação do diuron no solo.

Teste	Microrganismo Isolado									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Morfologia	Cocos	Bacillus	Bacillus	Bacillus	Bacillus	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos	Cocos
Coloração de Gram	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Citrato de Simmons	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
Fermentação de sacarose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Fermentação de lactose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-
Indol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Motilidade	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Redução do nitrato	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Vermelho de metila	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Voges-Proskauer	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Formação de esporos	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-

Através da comparação dos resultados, verifica-se que apenas os microrganismos 3 e 4 apresentam as mesmas características. Porém esta informação não é suficiente para informar que sejam do mesmo tipo, onde a investigação sistemática das

características (Manual Bergey's) e amplificação do DNA de todos os microrganismos selecionados para informações mais precisas dos microrganismos envolvidos na degradação do diuron. Este procedimento também é importante para investigação de microrganismos que ainda não tenham sido relacionados na literatura científica sobre biorremediação do diuron.

Widehemn *et al* (2001) fez um processo de isolamento de microrganismos a partir de um solo de jardim tratado regularmente com diuron a uma taxa de 2 g.m⁻² e caracterizou o microrganismo que apresentou potencial de degradação do diuron. As células não formaram esporos, não apresentaram motilidade, eram gram-positivas. Os testes de catalase foram positivos. Não ocorreu a fermentação de lactose e sacarose. De acordo com estes e outros testes, a bactéria foi identificada como uma *Arthrobacter sp.*, com características próximas à *A. globiformis*.

A *Arthrobacter sp.* é um gênero de actinomiceto, subordem *Micrococcineae*. Os actinomicetos são bactérias facultativas em relação à formação de esporos (OLIVEIRA, 2003). Partindo-se deste pressuposto, as características deste gênero de bactéria combinam com aquelas investigadas para o microrganismo 10. Os actinomicetos são importantes degradadores de pesticidas, particularmente os gêneros: *Microrcoccineae* (*Artrrobacter*, *Brevibacterium*, *Clavibacter*), *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*), *Micromonosporineae* (*Micromonospora*), *Propionibacterineae* (*nocardioides*) e *Streptomyceneae* (*Streptomyces*). (SCHRIJVER e MOT, 1999).

A bactéria *Streptomices sp* já foi identificada como degradadora do herbicida diuron por ESPOSITO *et al* (1998). Não se verificou a formação de metabólitos de degradação do herbicida neste estudo.

Harada (2006) ao estudar a degradação de s-triazinas fez a identificação taxonômica *Bacillus cereus* encontrando os critérios: gram-positivo, motilidade e catalase positivas, resultados que concordam com as características dos microrganismos 3, 4 e 6 investigados neste trabalho.

5.2 CLASSIFICAÇÃO TEXTURAL

As porcentagens de areia, silte e argila do solo são apresentadas na Tabela 7 as quais variaram de 80 a 87 % de areia até 30 cm de profundidade. De acordo com os valores mostrados, o solo tem classificação textural arenosa (EMBRAPA, 1997).

Tabela 7 - Classificação textural do solo analisados em diferentes profundidades.

Profundidade	% Areia	% Argila	% Silte
0-10cm	80,0	11	9
0-20cm	88,0	10	2
0-30cm	87,0	12	1

5.3 ESTUDO DE DEGRADAÇÃO DO DIURON NO SOLO BIOAUMENTADO

O aumento da biomassa dos microrganismos isolados do solo rizosférico foi promovido com o objetivo de se inocular lotes de solo em um ambiente natural e verificar as interações entre solo, herbicida e microrganismos ao longo de 5 semanas de estudo e em profundidades diferentes, após a aplicação do herbicida. Os seguintes parâmetros foram monitorados: umidade, pH, CTC (na primeira e na última semana, somente no solo controle), matéria-orgânica e a concentração de herbicidas e de seus três metabólitos: DCPMU, DCPU e DCA.

5.3.1 Teor de Umidade

Os resultados referentes ao teor de umidade dos lotes de solo analisados, são apresentados na Tabela 8, variando de 1,11 % a 5,64 %.

A composição do solo, majoritariamente arenosa, não permite boa retenção de água. O conteúdo de água do solo teve um valor médio de 4,10 % ao longo do estudo. Em todo o período de monitoramento dos lotes não houve eventos de chuva. A análise estatística (Teste Tukey) (Tabela 9) do monitoramento do teor de umidade do solo não apresentou diferença significativa ao nível de 5 %, entre as profundidades e os lotes, mantendo-se estável durante todo o período de monitoramento.

Tabela 8 - Variação do teor de umidade (%) nos lotes em 5 semanas de monitoramento.

Lote	Semana				
	1	2	3	4	5
A 0 – 10cm	1,11	3,89	2,55	2,96	2,82
A 10 – 20cm	2,57	4,93	4,00	4,13	3,79
A 20 – 30cm	3,54	5,14	4,29	4,33	3,86
B 0 – 10cm	1,30	4,35	3,01	3,63	2,80
B 10 - 20cm	2,77	4,81	4,12	4,51	3,45
B 20 - 30cm	3,84	4,96	4,90	4,76	4,03
C 0 – 10cm	2,70	4,38	2,89	3,28	2,85
C 10 - 20cm	2,24	5,04	3,98	4,18	3,62
C 20 - 30cm	3,83	5,08	4,52	4,40	4,40
D 0 – 10cm	1,51	4,54	2,52	2,99	3,01
D 10 - 20cm	4,20	4,89	4,40	4,08	4,85
D 20 – 30cm	3,15	4,68	4,30	5,43	5,64

Tabela 9 - Análise estatística (Teste de Tukey) dos resultados do monitoramento do teor de umidade do solo.

Tratamento	Semanas				
	1	2	3	4	5
A	1,96 ^{Aa}	4,35 ^{Ab}	4,05 ^{Ab}	3,81 ^{Ab}	3,50 ^{Aab}
B	2,64 ^{Aa}	4,70 ^{Ab}	4,01 ^{Aab}	4,30 ^{Aab}	3,42 ^{Aab}
C	2,92 ^{Aa}	4,84 ^{Ab}	3,80 ^{Aab}	3,95 ^{Aab}	3,62 ^{Aab}
D	2,95 ^{Aa}	4,70 ^{Aa}	3,74 ^{Aa}	4,16 ^{Aa}	4,50 ^{Aa}

Teste de Tukey. Letras maiúsculas iguais significam que não existe diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos. Letras minúsculas diferentes significam que existe diferença significativa ($P < 0,05$) entre as coletas.

O teor de água é um fator importante na lixiviação de herbicidas do solo, influenciando a mobilidade de um produto através de um sistema ecológico; os produtos com alta solubilidade em água têm uma maior tendência para alcançar os sistemas de aquáticos. A solubilidade em água pode afetar a adsorção, a desorção e a volatilidade de um produto em sistemas aquáticos, bem como possíveis transformações por hidrólise, fotólise, oxidação, redução e biodegradação em água (GUIMARÃES, 1987).

O diuron tem coeficiente de partição octanol-água (K_{oc}) alto, predizendo que estará mais ligado à fase sólida do solo do que na sua fase líquida (GIACOMAZZI, 2004) e possui média solubilidade em água (42mg. L^{-1}), processos que desfavorecem a sua movimentação pelo perfil vertical do solo.

O baixo teor de água verificado no monitoramento deste estudo e as características químicas próprias do herbicida permitem dizer que o diuron tem alta tendência a estar mais aderido à superfície do solo, onde o teor de água é menor, como observado no monitoramento. O teor de água pode influenciar também no desenvolvimento microbiano visto que é um parâmetro importante para a manutenção da microbiota do solo. A influência do calor sobre a microbiota do solo foi determinada através da secagem do solo a 110°C por 134 dias (ESTUDO EM..., 2008) . À medida que o teor de umidade do solo diminuiu, a população da microbiota decresceu. Um dado interessante observado é que as atividades metabólicas dos microrganismos se mantiveram por mais tempo quando o solo foi incubado apenas com água. O mesmo não foi observado quando se utilizaram nutrientes no processo.

Melhores correlações entre o teor de umidade do solo e os outros parâmetros monitorados no estudo serão apresentadas por análise multivariada dos dados (item 5.3.6). A confirmação destes dados se dará pela observação dos resultados apresentados no monitoramento do herbicida.

5.3.2 pH

Os valores de pH se mantiveram em $4,16 (\pm 0,25)$ durante o monitoramento dos lotes e podem ser considerados como solos de acidez elevada ($\text{pH} \leq 5,0$) (EMBRAPA, 1997). As Tabelas 10 e 11 apresentam as análises químicas e de micronutrientes, respectivamente, do solo no lote D, no primeiro e no último dia do monitoramento. Os valores apresentam uma grande quantidade de alumínio na área de estudo, que são reflexo do pH baixo da área.

Tabela 10 – Análises químicas no lote D na primeira e na última coleta do monitoramento.

Lote (data da coleta)	P (res.) (mg. dm ⁻³)	M.O. (g.dm ⁻³)	pH	H+Al (mmolc.dm ⁻³)	Al (mmolc .dm ⁻³)	S (mg.dm ⁻³)	S. BASE (mmolc.dm ⁻³)	CTC (mmolc.dm ⁻³)	V (%)	m (%)
D 0-10 (07/09/07)	7	19	4,4	26	4	1	10,9	36,9	29,5	26,8
D 10-20 (07/09/07)	5	15	4,1	31	7	1	5,7	36,7	15,5	55,1
D 20-30 (07/09/07)	4	14	4,1	30	7	5	4,7	34,7	13,5	59,8
D 0-10 (29/09/07)	6	14	4,2	28	6	4	8,6	36,6	23,5	41,1
D 10-20 (29/09/07)	4	13	4,0	31	6	5	4,6	35,6	12,9	56,6
D 20-30 (29/09/07)	4	13	4,1	30	10	8	4,6	34,6	13,3	68,5

Em pH baixo, o hidrogênio (H^+) atua sobre os minerais liberando íons alumínio (Al^{3+}) que ficam predominantemente retidos pelas cargas negativas das partículas de argila do solo, em equilíbrio com o Al^{3+} em solução. Assim, a quantidade de Al^{3+} em solução aumenta com a acidez do solo. O Al^{3+} , por sua vez, é um dos componentes mais importantes da acidez potencial do solo porque reage com a água, liberando íons H^+ . A acidez potencial devido ao Al trocável é observada em $pH \leq 5,5$ (ECHART, MOLINA, 2003). O aumento da concentração de alumínio na solução do solo aumenta o risco de dano à vegetação, além de provocar mudanças na disponibilidade de nutrientes (magnésio e fósforo) e em suas espécies (nitrato e amônio). Estas mudanças influem na fertilidade do solo podendo ser impactantes sobre a estrutura e função da vegetação (FLUES; HAMA, 2003).

É sabido também que o cátion alumínio (Al^{3+}) interage com qualquer sistema que usa Mg^{2+} ou qualquer forma de fósforo (i.e.; microrganismos e plantas). O alumínio pode inibir um grande leque de processos metabólicos essenciais regulados por cálcio, proteínas regulatórias, e a divisão celular podem ser posteriormente afetadas por tais alterações (ECHART, MOLINA, 2003). Em concentrações moderadas de alumínio tóxico, a inibição do crescimento celular é, provavelmente, o evento primário e a inibição da divisão celular é uma resposta aos efeitos sobre o crescimento celular, refletindo regulação interna dos processos de crescimento e desenvolvimento dos organismos (MARSCHNER, 1991).

Tabela 11 – Análises de micronutrientes no lote D na primeira e na última coleta do monitoramento.

Lote (data da coleta)	K (mmolc/dm ³)	Ca (mmolc/dm ³)	Mg (mmolc/dm ³)	Cu (mg/dm ³)	Zn (mg/dm ³)	Mn (mg/dm ³)	Fe (mg/dm ³)	B (mg/dm ³)
D 0-10 (07/09/07)	0,9	7	3	0,8	0,3	61,9	37	0,14
D 10-20 (07/09/07)	0,7	4	1	0,9	0,2	33,2	37	0,21
D 20-30 (07/09/07)	0,7	3	1	0,9	0,1	27,3	32	0,14
D 0-10 (07/09/07)	0,6	5	3	0,9	0,2	34,5	38	0,14
D 10-20 (07/09/07)	0,6	3	1	0,9	0,2	29,0	37	0,21
D 20-30 (07/09/07)	0,6	3	1	0,9	0,1	23,1	34	0,14

A sorção de pesticidas ionizáveis é altamente influenciada pelos valores de pH do solo. Pesticidas básicos, como a ametrina, tornam-se protonados a baixos valores de pH (pH inferior ao valor de pKa do pesticida), enquanto pesticidas ácidos, como o imazaquim, se ionizam, tornando-se aniônicos a valores de pH mais altos (1 ou mais unidades de pH acima do valor de pKa do pesticida). Como, geralmente, ocorre predomínio de cargas negativas no solo, a elevação do pH tende a contribuir para uma menor sorção de moléculas de pesticida pelos colóides do solo. Para pesticidas não iônicos como o diuron o pH exerce pouca influencia sobre o processo de sorção e quando esta influencia ocorre, parece não estar relacionada a fatores intrínsecos da molécula (DAMIM, 2005).

Sheng *et al* (2005) estudaram o efeito do pH na sorção de diuron em solos tratados com cinzas. A sorção de diuron em solo com pH 6,0 foi um pouco menor que em pH 3,0. Esta diferença de sorção pode ser devida ao fato de que o pH mais alto dissolve mais a matéria orgânica na solução e dissocia mais os grupos ácidos. A dissociação dos grupos ácidos pode deixar a matéria-orgânica mais hidrofílica, reduzindo a sorção do diuron. Em concentração de equilíbrio de 2,0 mg/L os coeficientes de sorção foram 4,6 L. Kg⁻¹ e 3,5L. Kg⁻¹ em pH's 3,0 e 6,0, respectivamente. O teor de cinzas no solo não influenciou o processo de sorção, havendo a mesma sorção (3594 L. Kg⁻¹) em pH 3,0 e 6,8. A não influencia do pH era esperada porque as forças de London entre as moléculas de diuron e as porções elétricas neutras da superfície das cinzas não mudam com o pH.

A matéria orgânica do solo consiste de restos vegetais ou animais não decompostos ou parcialmente decompostos. Pode ser subdividida em: substâncias húmicas e substâncias não húmicas. Do ponto de vista agrônomo é de suma importância a

quantificação dessas frações visto que, por exemplo, os ácidos fúlvicos é a fração que apresenta maior solubilidade em água, maior reatividade, desta forma, a sua maior presença no solo possivelmente irá contribuir para uma maior CTC, retenção de água, capacidade tampão, maior facilidade de liberação de nutrientes e, em termos ambientais, maior interação com os pesticidas. (PEIXOTO, 2008). Os valores de saturação por bases (V %) e saturação por alumínio (m %) também servem para indicar o potencial nutricional dos solos (PRADO, 2007) porque influenciam diretamente a CTC, já que este parâmetro está relacionado com a presença de cargas negativas na superfície desses colóides (PEIXOTO, 2008).

Os mecanismos de adsorção dos herbicidas e a atuação dos microrganismos do solo sobre os mesmos, podem ser altamente influenciados pela qualidade química do solo, no que se refere ao teor de micronutrientes. Os elementos nitrogênio, fósforo, potássio, cálcio, magnésio, enxofre, boro, cobre, ferro, manganês e zinco, podem ser retidos pelos diversos componentes orgânicos e inorgânicos através de adsorção iônica ou molecular ou por precipitação em formas pouco solúveis e competem entre si e com outros compostos orgânicos e inorgânicos por lugares de adsorção ou por ligantes complexantes disponíveis (CAMARGO, 2006).

A retenção dos nutrientes não é afetada apenas pela sua concentração na solução, mas também pela concentração de todos os outros constituintes do sistema. Sua solubilidade pode ser influenciada pelo pH do solo, assim como a sua concentração pode influenciar o pH do solo e, conseqüentemente, a movimentação dos micronutrientes catiônicos (cobre, ferro, manganês e zinco), aumenta com a diminuição do pH do solo (CAMARGO, 2006).

Segundo EMBRAPA (1999), o solo desta região, conforme suas características químicas é classificado como Latossolo Vermelho Distrófico típico álico (Lvd). A nova classificação não contempla esta classe, e o solo atualmente é considerado do tipo Latossolo Vermelho (SIBCS, 2005).

5.3.3 Quantificação de Microrganismos do Solo

Os resultados da contagem de bactérias aeróbias mesófilas pelo plaqueamento em PCA estão listados na Tabela 12. Os fatores ambientais, provavelmente pH, teor de matéria-orgânica e outros nutrientes podem ter influenciado o desenvolvimento das

bactérias isoladas da área de cultivo. Melhores correlações entre o teor de bactérias aeróbias mesófilas do solo e os outros parâmetros monitorados no estudo serão apresentadas por análise multivariada dos dados (item 5.3.6).

Tabela 12 - Contagem de bactérias aeróbias mesófilas (UFC/g de solo) pelo plaqueamento em PCA em 5 semanas de monitoramento

Lote	Semana				
	1	2	3	4	5
A 0 – 10cm	6400	50	53	37	17
A 10 – 20cm	800	15	22	9	12
A 20 – 30cm	950	10	12	87	9
B 0 – 10cm	750	57	54	45	57
B 10 - 20cm	600	43	8	22	21
B 20 - 30cm	950	38	7	21	22
C 0 – 10cm	1100	34	24	158	22
C 10 - 20cm	900	30	33	52	23
C 20 - 30cm	350	14	14	79	22
D 0 – 10cm	1250	113	82	24	74
D 10 - 20cm	500	113	18	18	31
D 20 – 30 cm	1150	78	8	17	63

A análise estatística (Teste Tukey) (Tabela 13) permitiu observar que não houve diferenças significativas nas quantidades de microrganismos aeróbios mesófilos entre as profundidades dos lotes. Apenas o lote A apresentou diferença significativa na quantidade de bactérias aeróbias mesófilas na primeira semana de estudo, quando comparado às semanas subseqüentes e à coleta dos outros lotes na mesma semana. A inexistência de diferença significativa entre os resultados de monitoramento dos lotes pode significar que a presença do diuron não influenciou na diminuição da população de bactérias aeróbias mesófilas do solo, assim como não serviu de fonte de nutrientes para a multiplicação e crescimento da população.

Tabela 13 - Análise estatística (teste Tukey) da contagem de bactérias aeróbias mesófilas (UFC/g de solo) pelo plaqueamento em PCA em 5 semanas de monitoramento.

Tratamento	Semana				
	1	2	3	4	5
A	2716 ^b	24,7 ^a	28,7 ^a	44,2 ^a	12,2 ^a
B	766,7 ^a	45,7 ^a	23 ^a	29,7 ^a	33 ^a
C	783,3 ^a	25,7 ^a	23,3 ^a	96,3 ^a	22,2 ^a
D	966,7 ^a	101,2 ^a	35,8 ^a	17,8 ^a	55,8 ^a

Teste de Tukey. Letras iguais significam que não existe diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos e as coletas. Letras diferentes significam que existe diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos e as coletas.

Damim (2005) verificou que a presença ou a ausência do herbicida não influenciou significativamente a biomassa microbiana em um estudo de biodegradação do herbicida em dois latossolos tratados com lodo de esgoto e que a biodegradação foi influenciada negativamente pela presença do lodo de esgoto visto que este aumenta a sorção do diuron em sua matriz.

Dellamatrice e Monteiro (2004) mostraram grande variação no número de bactérias após 64 dias de incubação do diuron de um solo sem histórico de aplicação do herbicida. A biomassa microbiana não apresentou variação significativa no estudo, mas quantidades significativas de resíduo de diuron foram encontradas na biomassa microbiana.

A diminuição da concentração do diuron no meio não foi acompanhada pelo crescimento microbiano, em um estudo de degradação do diuron com bactérias isoladas do solo, sugeriu uma rota secundária de metabolização não associada com a formação de compostos necessários ao crescimento vegetativo. (ESPOSITO, 1998). BELLINASSO (2003) demonstrou uma degradação mais eficiente do herbicida trifluralina quando se utilizou fonte secundária de carbono e nitrogênio em meio de cultura líquido. CEDERLUND (2006) verificou que as taxas de degradação do diuron foram mais altas quando se adicionou palha de luzerna ao material de lastro ferroviário. A degradação do diuron nestas condições apenas estimulou a primeira demetilação da molécula.

O processo onde se observa a diminuição de um xenobiótico pela ação bacteriana, sem que o mesmo seja utilizado como fonte de energia, é chamado de cometabolismo. É importante ressaltar que a mineralização por esta via dificilmente é observada (DAMIM, 2005).

Os resultados da contagem de fungos pelo plaqueamento em PDA estão listados na Tabela 14.

Tabela 14 - Contagem de fungos pelo plaqueamento em PDA (UFC/g de solo) em 5 semanas de monitoramento

Lote	Semana				
	1	2	3	4	5
A 0–10cm	480	192	700	185	238
A 10–20cm	100	125	485	40	403
A 20–30cm	235	56	500	35	430
B 0–10cm	2090	838	455	105	177
B 10–20cm	1500	767	855	65	628
B 20–30cm	980	81	940	80	574
C 0–10cm	520	324	480	415	266
C 10–20cm	3000	55	1710	330	155
C 20–30cm	265	47	20	455	230
D 0–10cm	655	364	835	170	182
D 10–20cm	240	52	260	215	198
D 20–30cm	375	248	60	65	284

Verificam-se diferenças significativas nos resultados de monitoramento da população fúngica (Tabela 15) apenas na primeira semana de estudo entre os lotes A e B e entre os lotes A e C. Comparando-se os resultados da contagem de fungos e da contagem de bactérias ao final do estudo, verifica-se que a população fúngica esteve presente em uma quantidade trinta vezes mais alta no lote A e treze vezes mais alta no lote B. Melhores correlações entre o teor de fungos do solo e os outros parâmetros monitorados no estudo serão apresentadas por análise multivariada dos dados (item 5.3.6).

Tabela 15 - Análise estatística (teste Tukey) da contagem de fungos (UFC/g de solo) pelo plaqueamento em PDA em 5 semanas de monitoramento.

Tratamento	Semana				
	1	2	3	4	5
A	271,7 ^a	124 ^a	561,7 ^{ac}	87,7 ^a	357,7 ^{ac}
B	1523,3 ^{bf}	561,7 ^{ac}	750 ^{ac}	83,3 ^a	459,2 ^{ac}
C	1261,7 ^{bcd}	142 ^a	736,7 ^{adf}	400 ^{ad}	217 ^a
D	423,3 ^{ad}	220,8 ^a	385 ^{ad}	150 ^a	221,3 ^a

Teste de Tukey. Letras iguais significam que não existe diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos e as coletas. Letras diferentes significam que existe diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos e as coletas.

Os fungos são abundantes no solo, nos vegetais e em massas de água, onde vivem muito bem em folhas mortas ou em madeira. Crescem como células únicas, as leveduras, ou como colônias filamentosas multicelulares, os bolores e cogumelos. O principal elemento da forma vegetativa ou de crescimento de um bolor é a hifa, uma estrutura tubular ramificada com cerca de 2 a 10 μ de diâmetro. A maioria das colônias cresce na superfície de meios líquidos ou sólidos como lençóis irregulares, secos e filamentosos. Devido ao envelhecimento das hifas filamentosas, as colônias são mais resistentes do que as de bactérias. Seus esporos são excepcionalmente resistentes ao calor e dessecação (CARACTERÍSTICAS..., 2007). A maior tolerância dos fungos à acidez do solo também deve ser elucidada. São microrganismos heterotróficos, portanto obtêm alimento do meio onde habitam. Estão essencialmente mais aderidos à superfície do solo devido à sua característica aeróbia (NASCIMENTO, 2008).

Diversos fungos do solo são capazes de degradar as cadeias laterais demetiladas de herbicidas de feniluréia como IPU, diuron, linuron, monuron, metobomuron e clorotoluron. Uma grande diversidade de espécies de fungos pode degradar parcialmente os herbicidas de feniluréia incluindo: *Cunninghamella elegans*, *Mortierella isabellina*, *Talaromyces wortmanii*, *Rhizopus japonicus*, *Rhizoctonia solani* and *Aspergillus niger* e sugere-se que alguns dos metabólitos criados na degradação fúngica são mais facilmente degradados por atividades bacterianas (SORENSEN, 2003).

A eficiência de degradação do diuron por três fungos (*Beauveria bassian*, *Cunninghamella elegans*, *Fusarium oxysporum*, *Geotrichum candidum* e *Mortierella isabellina*) foi testada por TIXIER (2000), onde a linhagem *C.elegans* foi considerada a mais

eficiente. As pesquisas foram feitas utilizando-se meios complexos para o crescimento das células, favorecendo as condições cometabólicas. Não se verificou no estudo, um balanço de massa entre as perdas de diuron e a formação de seus metabólitos demetilados. A retenção do herbicida nas células microbianas também não foi verificada. A não detecção dos metabólitos da degradação do diuron foi atribuída à mineralização ou à ineficiência da sua detecção por HPLC-UV em 254nm.

5.3.4 Carbono Orgânico Total

O teor de carbono orgânico do solo foi estimado pela determinação do carbono orgânico total. O termo carbono orgânico do solo se deve ao fato das metodologias para a determinação da matéria orgânica do solo determinar na verdade o teor de carbono orgânico e só então convertê-lo para matéria orgânica com o uso de um fator numérico correspondente ao percentual teórico de carbono orgânico naquele material. (GUEDES, 2006). A matéria orgânica do solo (MOS) é composta de constituintes lábeis e estáveis. Essa divisão, baseada na taxa de decomposição, permite melhor entendimento da dinâmica da MOS. Os constituintes lábeis, genericamente denominados matéria orgânica lábil ou C orgânico lábil, incluem resíduos de plantas em decomposição, substâncias não-húmicas não ligadas aos constituintes minerais, formas solúveis em água, macrorganismos (fauna) e biomassa microbiana. A mineralização dos constituintes lábeis ocorre em poucas semanas ou meses. Os componentes mais estáveis da MOS, representados por substâncias húmicas e outras macromoléculas, são, por sua vez, resistentes ao ataque microbiano, devido à sua estrutura molecular ou por estarem fisicamente protegidos em complexos organominerais ou retidos no interior de agregados, podendo persistir no solo por centenas de anos (THENG *et al.*, 1989 in PASSOS, 2007).

Os teores de carbono orgânico total são apresentados na Tabela 16 e sua análise estatística (Teste Tukey) na Tabela 16. Não houve variação significativa nos teores de carbono entre as profundidades e os lotes durante o monitoramento. As correlações entre o teor de carbono orgânico e os outros parâmetros monitorados neste estudo serão discutidas através da análise multivariada.

Tabela 16 – Conteúdo de carbono orgânico total (%) nos lotes em diferentes profundidades, em 5 semanas de monitoramento.

Lote	Semana				
	1	2	3	4	5
A 0-10cm	0,658	0,490	0,547	0,529	0,512
A 10-20cm	0,456	0,32	0,349	0,378	0,352
A20-30cm	0,511	0,268	0,311	0,295	0,310
B 0-10cm	0,741	0,499	0,518	0,589	0,475
B 10-20cm	0,441	0,279	0,336	0,342	0,352
B 20-30cm	0,333	0,276	0,271	0,389	0,292
C 0-10cm	0,796	0,467	0,567	0,576	0,446
C 10-20cm	0,472	0,363	0,517	0,501	0,366
C 20-30cm	0,358	0,288	0,331	0,450	0,346
D 0-10cm	0,914	0,384	0,660	0,378	0,584
D 10-20cm	0,527	0,275	0,359	0,471	0,453
D 20-30cm	0,440	0,281	0,281	0,429	0,483

Tabela 17 - Análise estatística (teste Tukey) do monitoramento do teor de carbono orgânico total (%).

Tratamento	Semana				
	1	2	3	4	5
A	0,470 ^{abc}	0,535 ^{abc}	0,358 ^{ab}	0,402 ^{abc}	0,939 ^{abc}
B	0,428 ^{abc}	0,506 ^{abc}	0,350 ^{ab}	0,375 ^{abc}	0,374 ^{abc}
C	0,578 ^{ac}	0,541 ^{abc}	0,370 ^{abc}	0,470 ^{abc}	0,353 ^{ab}
D	0,567 ^{abc}	0,626 ^c	0,309 ^b	0,433 ^{abc}	0,507 ^{abc}

Teste de Tukey. Letras iguais significam que não existe diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos e as coletas. Letras diferentes significam que existe diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos e as coletas.

5.3.5 Quantificação do Diuron e Metabólitos no Solo

As figuras 10 e 11 apresentam respectivamente a separação dos picos cromatográficos nas condições empregadas neste trabalho e a ausência de picos dos compostos estudados no solo controle, sem fortificações dos herbicidas.

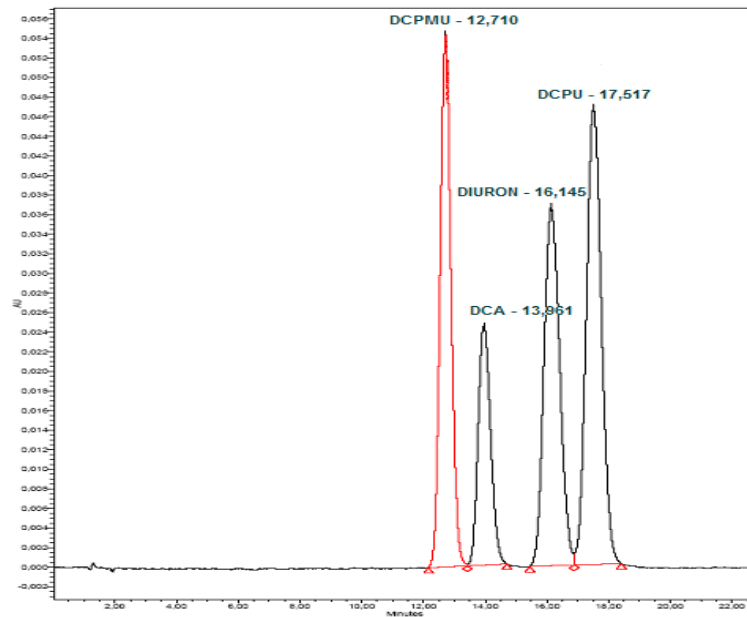


Figura 10 - Cromatograma de uma amostra de solo fortificado ao nível de concentração de 50mg. L^{-1} da mistura de padrões DCPMU, DCA, Diuron e DCPU. Condições: injeção de $20\ \mu\text{L}$, fase móvel metanol:água 50:50 (v/v), vazão de $1\ \text{mL. min}^{-1}$, coluna Waters XTerra RP18 $5\ \mu\text{m}$ $4,6 \times 150\ \text{mm}$ e pré-coluna Waters XTerra RP18 $5\ \mu\text{m}$ $3,9 \times 20\ \text{mm}$, detector de 254 nm.

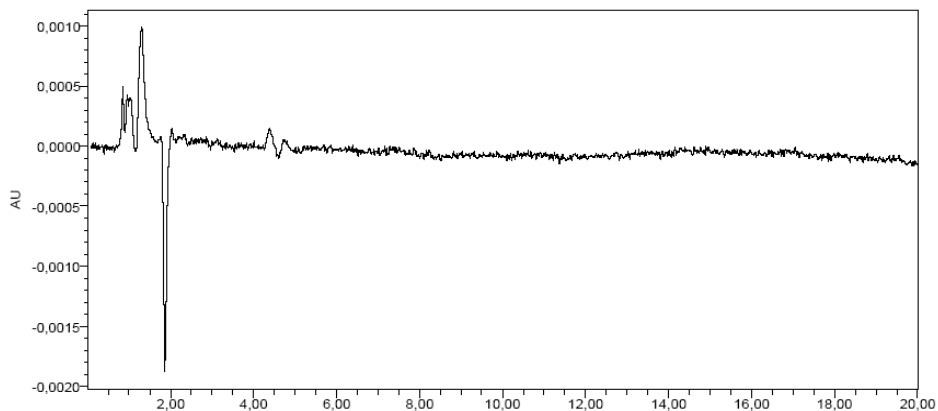


Figura 11 - Cromatograma de uma amostra de solo sem fortificação da mistura de padrões DCPMU, DCA, Diuron e DCPU. Condições: injeção de $20\ \text{mL}$, fase móvel metanol:água 50:50 (v/v), vazão de $1\ \text{mL. min}^{-1}$, coluna Waters XTerra RP18 $5\ \mu\text{m}$ $4,6 \times 150\ \text{mm}$ e pré-coluna Waters XTerra RP18 $5\ \mu\text{m}$ $3,9 \times 20\ \text{mm}$, detector de 254 nm.

O diuron e os metabólitos do solo foram quantificados após a validação das condições cromatográficas. Os resultados dos testes de validação estão relacionados na Tabela 18.

Tabela 18 - Condições de análise e resultados dos testes de validação da extração de diuron e metabólitos do solo.

Condição	Diuron	DCPMU	DCPU	DCA
Coluna	XTerra RP18	XTerra RP18	XTerra RP18	Xterra RP18
Fase móvel (v:v)	MeOH : H ₂ O (50:50)	MeOH : H ₂ O (50:50)	MeOH : H ₂ O (50:50)	MeOH : H ₂ O (50:50)
Vazão da fase móvel (mL. min⁻¹)	1	1	1	1
Detector (nm)	254	254	254	240
Limite de Detecção (mg. Kg⁻¹)	0,0625	0,0625	0,0625	0,0625
Limite de Quantificação (mg. Kg⁻¹)	0,125	0,125	0,125	0,125
Repetibilidade (%)	0,78	2,20	2,17	1,72
Reprodutibilidade (%)	2,48	2,11	3,10	2,77
Linearidade (R)	0,9993	0,9988	0,9978	0,9988

O valor dos limites de detecção obtido para o diuron, DCPMU, DCPU e DCA foram de 0,0625 mg. Kg⁻¹ e os limites de quantificação foram de 0,125 mg. Kg⁻¹ de solo.

Os valores dos CV relativos quanto a repetibilidade foram de 0,78 %; 2,20 %; 2,17 % e 1,72 % para diuron, DCPMU, DCPU e DCA respectivamente. Os valores dos CV relativos quanto à precisão intermediária foram de 2,48 %; 2,11 %; 3,10 % e 2,77 % para diuron, DCPMU, DCPU e DCA respectivamente.

Os valores dos coeficientes de correlação (R) para as curvas padrão dos herbicidas sempre estiveram acima de 0,99 para cada composto. A Tabela 19 apresenta as áreas dos picos cromatográficos dos analitos estudados para os níveis de fortificação de 5,00, 2,50, 1,00, 0,50, 0,25, 0,125 mg. Kg⁻¹ de solo.

Tabela 19 - Áreas dos picos cromatográficos dos analitos estudados para os níveis de fortificação de 0,125 mg. Kg⁻¹ a 5,00 mg. Kg⁻¹

Nível de fortificação	Diuron	DCPMU	DCPU	DCA
0,125 mg. Kg⁻¹	226033,186	20832,493	26271,968	9242,321
0,25 mg. Kg⁻¹	51212,371	41084,430	49679,073	16478,960
0,50 mg. Kg⁻¹	123306,413	95056,864	117391,598	46309,990
1,00 mg. Kg⁻¹	217486,800	153836,134	233111,070	112798,040
2,50 mg. Kg⁻¹	478937,798	379386,589	438180,322	233900,134
5,00 mg. Kg⁻¹	944393,213	695854,395	908613,539	482734,564

O diuron foi quantificado nos lotes enriquecidos com o Hexaron WG[®] em todas as coletas e em todas as profundidades. A concentração dos metabólitos esteve abaixo dos limites de quantificação do método em todas as amostras comprometendo as discussões acerca de suas interações com o solo e as outras variáveis. Os resultados das concentrações de diuron estão expressos na Tabela 20.

Tabela 20 – Concentração de diuron (mg. Kg⁻¹) das amostras de solo em diferentes profundidades em 5 semanas de monitoramento.

Lote	Semana				
	1	2	3	4	5
B 0-10cm	8,44	5,50	4,44	2,66	3,30
B 10-20cm	2,05	2,04	1,97	1,88	1,87
B 20-30cm	0	1,99	1,82	1,79	1,74
C 0-10cm	8,87	1,71	6,3	6,29	4,34
C 10-20cm	2,46	1,71	2,23	1,83	1,88
C 20-30cm	2,02	1,70	1,85	1,75	0

A análise estatística (Teste Tukey) (Tabela 21) permite observar que houve diferenças significativas nas quantidades de diuron entre as profundidades e as coletas no monitoramento. Verifica-se que o lote C apresentou valores de concentração 1,7 vezes que o lote B ao final do estudo.

A figura 12 apresenta um cromatograma típico de uma amostra monitorada nas condições de análise especificadas (Tabela 18).

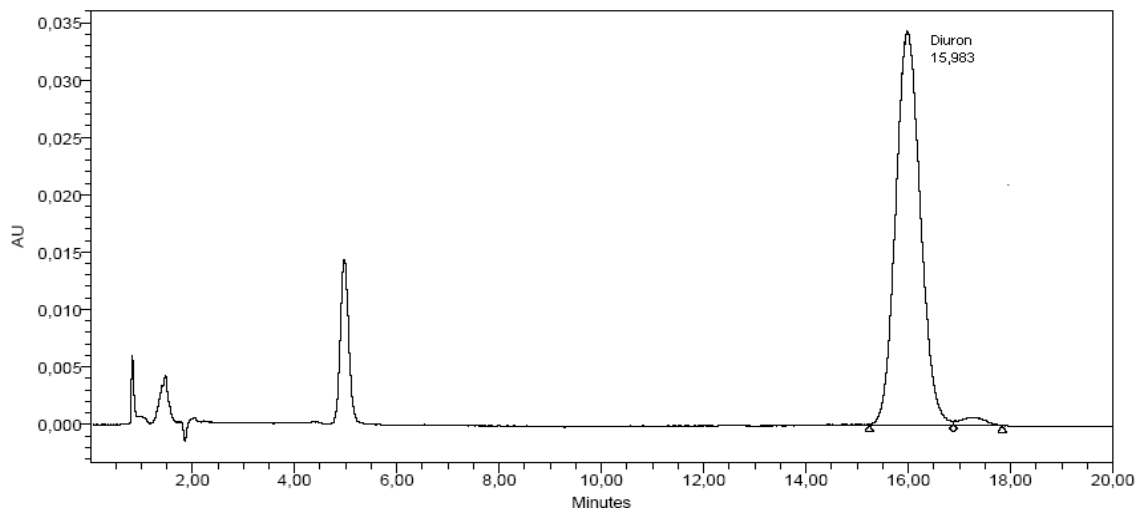


Figura 12 – Cromatograma de uma amostra do lote C, na profundidade de 0 – 10 cm, coletado na primeira semana de estudo.

Outro fator relevante foi a presença do diuron em concentrações 30 vezes mais altas na superfície da área de estudo do que nas partes mais profundas.

Jacobson (2005) apresentou similaridades observando maiores recuperações de diuron e de seu metabólito DCPMU nas partes mais altas de um estudo de lixiviação do diuron em coluna. Neste mesmo estudo, o autor observou que os teores de cobre no solo comprometeram a atividade microbiana e atribuiu a este fator as baixas taxas de degradação do diuron por via microbiana. No nosso estudo, valores altos de alumínio no solo foram detectados e as possíveis relações com a sua concentração e o comprometimento das atividades microbianas não foram estabelecidas e precisam ser mais bem estudadas.

É assumido que o diuron e seus metabólitos estejam mais adsorvidos à superfície do solo (TWORKOSKI *apud* GOODDY, 2002) se associando à matéria orgânica do solo, que é considerado o principal sítio de adsorção do diuron neste ambiente.

Em um estudo de casa de vegetação foi verificado que o diuron proporcionou redução acentuada na formação de matéria seca da parte aérea de aveia em 40 dias de estudo, nas amostras colhidas até 5 cm de profundidade, indicando que o herbicida apesar de pouco móvel no solo manteve-se disponível para a atuação na planta (COLINA 2005).

As correlações entre as concentrações de diuron e os outros parâmetros monitorados neste estudo serão discutidas através da análise multivariada.

Tabela 21 - Análise estatística (Teste Tukey) do monitoramento da concentração de diuron (mg. Kg⁻¹) no solo.

Lote	Semana				
	1	2	3	4	5
B 0-10cm	8,44 ^b	5,50 ^c	4,44 ^d	2,66 ^{eh}	3,30 ^f
B 10-20cm	2,05 ^{eah}	2,04 ^{eah}	1,97 ^{ae}	1,88 ^{ae}	1,87 ^{ae}
B 20-30cm	0,0 ^a	1,99 ^{eah}	1,82 ^a	1,79 ^{ae}	1,74 ^a
C 0-10cm	8,87 ^b	1,71 ^a	6,3 ^g	6,29 ^g	4,34 ^d
C 10-20cm	2,46 ^h	1,71 ^a	2,23 ^{ah}	1,83 ^e	1,88 ^a
C 20-30cm	2,02 ^{ah}	1,70 ^a	1,85 ^{ae}	1,75 ^a	0,0 ^a

Teste de Tukey. Letras iguais significam que não existe diferença significativa ($P > 0,05$) entre os tratamentos, as profundidades e as coletas. Letras diferentes significam que existe diferença significativa ($P < 0,05$) entre os tratamentos, as profundidades e as coletas.

As diferentes concentrações de diuron entre os lotes B e C neste estudo podem ser atribuídas à atuação dos microrganismos utilizados para a bioaugmentação, visto que as outras características monitoradas não apresentaram variação significativa entre os lotes. Apesar da população microbiana, de bactérias e fungos também não ter sofrido variação significativa no estudo, a degradação do diuron por via cometabólica deve ser considerada como mecanismo de atuação. A atenuação natural ou as perdas abióticas do diuron também parecem ter lugar neste estudo, visto que as concentrações de diuron diminuíram em torno de 2,7 vezes do início para o fim do estudo. A degradação biótica do diuron, no entanto foi mais efetiva, visto que as diferenças entre as concentrações do início para o fim do estudo foram de aproximadamente 4,3 vezes.

Cederlund (2006) verificou taxas de degradação 10 vezes maiores do diuron quando comparou a degradação metabólica e cometabólica do herbicida.

Damim (2005) verificou que fontes alternativas sobre a molécula do herbicida podem diminuir a sua mobilidade e disponibilidade á degradação microbiana.

5.3.6 Análise de Dados Multivariados

5.3.6 Análise de Dados Multivariados

O modelo estatístico dos métodos multivariados considera a correlação entre muitas variáveis analisadas simultaneamente, permitindo a extração de uma quantidade muito maior de informação. A Análise dos Componentes Principais, PCA (do inglês “Principal

diuron e o lote C foi enriquecido com diuron. As relações entre o diuron e as amostras mais superficiais, provavelmente está relacionada a maior adsorção do herbicida à sítios de ligação na superfície do solo e sua baixa percolação vertical no perfil.

A amostras de SB1 tiveram uma correlação aproximada com o teor de fungos do solo, mostrando a maior adaptabilidade deste tipo de microrganismo à presença do herbicida. A análise da matriz de correlação (Tabelas 22 e 23), no entanto, não estabelece a diminuição da concentração do diuron com o desenvolvimento da população de fungos a não ser pela quarta semana de monitoramento, onde os dois se correlacionaram negativamente. A proximidade dos microrganismos aeróbios mesófilas às áreas mais superficiais dos lotes A e D (SA1 e SD1) (figura 11), mostra a necessidade de oxigênio para o desenvolvimento. Estes microrganismos não estiveram correlacionados aos teores de carbono orgânico total, observado pela matriz de correlação, mas em muitos momentos se relacionaram negativamente com os teores de diuron, mostrando a capacidade de utilização do mesmo como fonte de nutrição.

Observa-se uma boa proximidade entre a amostra F4 e SC2. Isto pode ser explicado pela presença de fungos nativos da área, visto a metodologia de determinação de fungos não distingue os microrganismos nativos daqueles provenientes da bioaugmentação. Também, em relação às amostras F6, SB2, SC2 e SC3, podemos inferir que os fungos, sendo mais resistentes às condições adversas da área de estudo e à presença do diuron. A matriz de correlação demonstra que a população fúngica não foi influenciada pelo pH, pois a correlação é positiva. Surpreendentemente, a população de bactérias aeróbias mesófilas, não sofreram influência negativa do pH.

O teor de bactérias aeróbias mesófilas e a população fúngica apresentaram boas correlações positivas com os teores de carbono orgânico total, nos levando a acreditar estas moléculas orgânicas não estiveram disponíveis para a sua utilização como fonte de carbono e outros nutrientes. O fato das bactérias aeróbias mesófilas terem correlação positiva com o carbono orgânico diuron, nos leva a afirmar que o herbicida foi majoritariamente degradado por via catabólica.

Em relação ao diuron é importante observar que não esteve próximo aos lotes de maior profundidade (SB2, SB3, e SC3) que foram monitorados no estudo, mas apresentou boa proximidade dos lotes SB1, SC1 e SC2). Visto que o teor de carbono orgânico total esteve mais próximo às áreas mais superficiais (SA1, SB1, SC1 e SD1), confirma-se que seus sítios de adsorção do diuron estão relacionados às espécies orgânicas do meio.

Tabela 22 - Matriz de correlação entre as variáveis estudadas no monitoramento da degradação do diuron em solo bioaumentado.

	pH	U	R	F1	F2	F3	F4	F5	F6	C1	C2	C3
pH	1	-0,844	0,621	0,139	0,094	0,314	-0,063	0,507	-0,457	0,852	0,733	0,934
U	-0,844	1	-0,816	-0,126	-0,146	-0,441	-0,114	-0,104	0,197	-0,681	-0,833	-0,898
R	0,621	-0,863	1	-0,097	-0,179	0,562	-0,184	-0,219	-0,007	0,522	0,784	0,667
F1	0,139	-0,126	-0,097	1	0,761	0,471	0,253	0,005	-0,239	-0,063	0,020	0,362
F2	0,936	-0,146	-0,018	0,761	1	0,397	0,775	0,079	0,101	-0,111	0,014	0,240
F3	0,314	-0,441	0,562	0,471	0,397	1	0,088	-0,259	0,154	0,122	0,401	0,400
F4	0,063	-0,114	-0,184	0,253	0,775	0,088	1	0,019	0,374	-0,164	-0,007	0,020
F5	0,507	-0,104	-0,219	0,005	0,079	-0,259	0,019	1	-0,513	0,592	0,141	0,272
F6	0,457	0,197	-0,007	-0,239	0,101	0,154	0,374	-0,513	1	-0,676	-0,412	-0,428
C1	0,852	-0,681	0,522	-0,063	-0,111	0,122	-0,164	0,592	-0,676	1	0,821	0,721
C2	0,733	-0,833	0,784	0,020	0,014	0,401	-0,007	0,141	-0,412	0,821	1	0,746
C3	0,934	-0,898	0,667	0,362	0,240	0,400	0,020	0,272	-0,428	0,721	0,746	1
C4	0,819	-0,874	0,620	0,151	0,272	0,276	0,275	0,375	-0,443	0,847	0,886	0,817
C5	0,777	-0,456	0,162	0,506	0,294	0,194	-0,074	0,549	-0,633	0,635	0,408	0,781
C6	0,587	-0,583	0,578	0,031	-0,108	0,304	-0,238	0,084	-0,642	0,793	0,791	0,582
P1	-0,119	0,149	-0,047	-0,100	-0,098	-0,117	-0,001	-0,030	-0,204	0,190	0,203	-0,123
P2	0,510	-0,560	0,464	-0,171	-0,207	-0,081	-0,157	-0,022	-0,166	0,347	0,262	0,531
P3	0,062	-0,094	0,220	-0,012	-0,078	0,187	-0,117	-0,180	-0,387	0,420	0,458	0,067
P4	0,619	-0,819	0,661	0,251	0,192	0,295	0,153	0,085	-0,460	0,697	0,820	0,718
P5	0,505	-0,241	0,072	-0,147	-0,051	-0,067	0,065	0,636	-0,178	0,409	0,298	0,346
P6	0,182	-0,232	0,271	0,341	0,186	0,454	-0,037	-0,086	-0,446	0,433	0,556	0,250
DIU2	0,672	-0,488	0,372	0,430	0,280	0,514	-0,052	0,312	-0,259	0,467	0,538	0,694
DIU3	0,248	-0,330	0,317	0,838	0,446	0,683	-0,065	-0,218	-0,179	0,042	0,292	0,489
DIU4	0,694	-0,463	0,340	0,236	0,197	0,398	-0,022	0,403	-0,207	0,510	0,529	0,648
DIU5	0,654	-0,385	0,302	-0,107	-0,022	0,199	-0,057	0,469	-0,125	0,535	0,479	0,511
DIU6	0,694	-0,479	0,383	0,213	0,159	0,419	-0,058	0,361	-0,204	0,516	0,554	0,654

Tabela 22. Matriz de correlação entre as variáveis estudadas no monitoramento da degradação do diuron em solo bioaumentado (continuação).

	C4	C5	C6	P1	P2	P3	P4	P5	P6	DIU2	DIU3	DIU4	DIU5	DIU6
pH	0,819	0,777	0,587	-0,119	0,510	0,062	0,619	0,505	0,182	0,672	0,248	0,694	0,654	0,694
U	-0,874	-0,456	-0,583	0,149	-0,560	-0,094	-0,819	-0,241	-0,232	-0,488	-0,330	-0,463	-0,385	-0,479
R	0,620	0,162	0,578	-0,047	0,464	0,220	0,661	0,072	0,271	0,372	0,317	0,340	0,302	0,383
F1	0,151	0,506	0,031	-0,100	-0,171	-0,012	0,251	-0,147	0,341	0,430	0,838	0,236	-0,107	0,213
F2	0,272	0,294	-0,108	-0,098	-0,207	-0,078	0,192	-0,051	0,186	0,280	0,446	0,197	-0,022	0,159
F3	0,276	0,194	0,304	-0,117	-0,081	0,187	0,295	-0,069	0,454	0,514	0,683	0,398	0,199	0,419
F4	0,275	-0,074	-0,238	-0,009	-0,157	-0,170	0,153	0,065	-0,037	-0,052	-0,065	-0,022	-0,057	-0,058
F5	0,375	0,549	0,084	-0,030	-0,022	-0,180	0,085	0,636	-0,086	0,312	-0,218	0,403	0,469	0,361
F6	-0,443	-0,633	-0,642	-0,204	-0,166	-0,387	-0,460	-0,178	-0,446	-0,259	-0,179	-0,207	-0,125	-0,204
C1	0,847	0,635	0,793	0,190	0,347	0,420	0,697	0,409	0,433	0,467	0,042	0,510	0,535	0,516
C2	0,886	0,408	0,791	0,203	0,262	0,458	0,820	0,298	0,556	0,538	0,292	0,529	0,479	0,554
C3	0,817	0,781	0,582	-0,123	0,531	0,067	0,718	0,346	0,250	0,694	0,489	0,648	0,511	0,654
C4	1	0,534	0,705	0,072	0,366	0,314	0,886	0,280	0,435	0,449	0,193	0,452	0,395	0,452
C5	0,534	1	0,431	0,123	0,277	0,123	0,362	0,366	0,184	0,713	0,445	0,678	0,539	0,664
C6	0,705	0,431	1	0,315	0,403	0,758	0,762	-0,095	0,735	0,220	0,182	0,187	0,149	0,216
P1	0,072	0,123	0,315	1	-0,191	0,748	0,065	-0,230	0,259	-0,014	-0,049	0,007	0,044	0,025
P2	0,366	0,277	0,403	-0,191	1	0,039	0,416	-0,058	-0,155	-0,122	-0,108	-0,062	-0,092	-0,116
P3	0,314	0,123	0,758	0,748	0,039	1	0,440	-0,417	0,741	-0,078	0,076	-0,111	-0,125	-0,083
P4	0,886	0,362	0,762	0,065	0,416	0,440	1	-0,080	0,595	0,220	0,342	0,138	0,010	0,150
P5	0,280	0,366	-0,095	-0,230	-0,058	-0,417	-0,080	1	-0,264	0,629	-0,061	0,737	0,810	0,720
P6	0,435	0,184	0,735	0,259	-0,155	0,741	0,595	-0,264	1	0,199	0,423	0,094	-0,049	0,111
DIU2	0,449	0,713	0,220	-0,014	-0,122	-0,078	0,220	0,629	0,199	1	0,618	0,969	0,821	0,969
DIU3	0,193	0,445	0,182	-0,049	-0,108	0,076	0,342	-0,061	0,423	0,618	1	0,409	0,070	0,418
DIU4	0,452	0,678	0,187	0,007	-0,062	-0,111	0,138	0,737	0,094	0,969	0,409	1	0,934	0,775
DIU5	0,395	0,539	0,149	0,044	-0,092	-0,125	0,010	0,810	-0,049	0,821	0,070	0,934	1	0,639
DIU6	0,452	0,664	0,216	0,025	-0,116	-0,083	0,150	0,720	0,111	0,969	0,418	0,775	0,639	1

6. CONCLUSÕES

A população microbiana da rizosfera da cana de açúcar foi diversificada e indicada para estudos de degradação de poluentes específicos. Após seleção deve ser feita na presença dos poluentes e os microrganismos devem ser sistematicamente caracterizados a fim de serem utilizados para aplicação à outros xenobióticos aos quais tenham potencial de degradação.

Fontes paralelas de nutrição podem aumentar o processo de degradação de diuron em lotes de solo, visto que os estudos de incubação em soluções de diferente composição e o estudo de degradação em solo bioaumentado dão fortes indícios dos processos cometabólicos.

Os estudos de degradação do diuron em ambientes controlados, como os estudos *ex situ*, poderão dar mais detalhes quanto aos processos envolvidos na degradação tornando-as ferramentas para o planejamento de atividades de descontaminação de ambientes.

Os valores de alumínio encontrados no solo no qual foi feito o estudo de degradação, é reflexo dos baixos valores de pH do solo. Na comparação dos valores de pH entre os lotes verifica-se que a variação não é significativa. Os microrganismos utilizados no processo de bioaumentação não foram afetados por esta variável.

Dentre os parâmetros monitorados no estudo, apenas a concentração de diuron teve diferença significativa nos resultados das amostragens entre as profundidades e as coletas. Os outros fatores se apresentaram com valores aproximados, demonstrando que não houve intervenção dos processos de enriquecimento com diuron e com a bioaumentação do solo.

A metodologia desenvolvida para análise e quantificação do herbicida diuron e dos metabólitos DCPMU, DCPU e DCA, por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), apresentou CV relativos quanto a repetibilidade de 0,78 %; 2,20 %; 2,17 % e 1,72 % e valores dos CV relativos quanto à precisão intermediária foram de 2,48 %; 2,11 %; 3,10 % e 2,77 % para diuron, DCPMU, DCPU e DCA respectivamente. Os valores dos coeficientes de correlação (R) para as curvas padrão dos herbicidas sempre estiveram acima de 0,99 para cada composto.

Procedimentos de retirada de interferentes e concentração dos extratos precisam ser mais bem desenvolvidos para diminuir os limites de quantificação e de detecção dos compostos no solo.

A bioaugmentação dos lotes de solo sem aplicação histórica de diuron (referência), com os microrganismos isolados de solo rizosférico se apresentou como uma alternativa interessante e efetiva para a limpeza de compartimentos contaminados com diuron. Mecanismos de manutenção e multiplicação dos microrganismos deverão ser mais bem trabalhados para que as taxas de degradação sejam maiores.

A atenuação natural do diuron foi verificada, mas as taxas de degradação foram menores que os processos relacionados à biodegradação.

A análise estatística multivariada mostrou-se uma ferramenta fundamental para o entendimento das correlações entre os parâmetros monitorados e planejamento de trabalhos futuros.

O estabelecimento de uma metodologia para determinação de diuron e seus metabólitos é de fundamental importância para o estabelecimento de legislações relacionadas à descontaminação do solo por bioaugmentação e biorremediação.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L.D., MARINO, R.H., MESQUITA, J.B., RIBEIRO, G.T.. Degradação da Madeira de *Eucalyptus sp.* por Basidiomicetos de Podridão Branca. 2007. Arq. Inst. Biol. 74, 321-328.
- ALMEIDA, R. N. H. M., MOZETO, A. A., ZARA, L. F., ROSA, A. H., ROCHA, J. C., ROMÃO, L. P. C.; JUNIOR, E. S. JUNIOR. Extração de matéria orgânica aquática por abaixamento de temperatura: uma metodologia alternativa para manter a identidade da amostra. 2003. Química Nova. 208-212.
- ATALAY, A.; HWANG, K. J., Extractability of 2,4-D, Dicamba and MCPP from soil. 1999. Water, Air and Soil Pollution. 114, 155-170.
- BARCELO, D., HENNION, MC.. Trace determination of pesticides and their degradation products in water. Elsevier Science. 542 p. 1997.
- BELLINASSO, M.L. et al. Biodegradation of the herbicide trifluralin by bacteria isolated from soil. 2003. FEMS Microbiology Ecology. 43, 191-194
- BENDING, G. D., FRILOUX, M., WALKER, A. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. 2002. FEMS Microbiology. 212, 59-63.
- BENOIT, P.; BARRIUSO, E.; SOULAS, G. Degradation of 2,4-D, 2,4-Diclorophenol, and 4-Chlorophenol in soil after sorption on humified and nonhumified organic matter. 1999. Journal Environmental Quality. 28, 1127-1135.
- BERGER, B. M.. Factors Influencing Transformation Rates and Products of Phenylurea Herbicides in Soil. 1999. J. Agric. Food Chem. 47, 3389-3396
- BLANCHOU H., FARRUGIA, F., MOUCHEL, J. N. Pesticide uses and transfers in urbanised catchments. 2004. Chemosphere. 55, 905–913.
- BLANCO, F. M. G.. Controle das plantas daninhas na cultura da cana-de-açúcar. Anais Reunião Itinerante de Fitossanidade do Instituto Biológico. 83-89. 2003
- BOEIRA, R. C.; SOUZA, M. D.. Sorção de diuron em solos com diferentes texturas. 2004. Circular Técnica. Embrapa Meio Ambiente. 9, 1-5.
- BOLAN, N., ADRIANO, D.. Rhizosphere, the twilight zone of the hidden half. 2001. Disponível em: <<http://aehsmag.com/issues/2001/december/rhizosphere.htm>>. Acesso em 15/01/2008.
- CAMARGO de, O. A. Reações e interações de micronutrientes no solo. 2006. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2006_3/micronutrientes/Index.htm>. Acesso em: 23/8/2008
- CARACCILO, A. B., GIULIANO, G., GRENNI, P., GUZZELLA, L., POZZONI, F., BOTTONI, P., FAVA, L., CROBE, A. ORRÙ, M., FUNARI, E.. Degradation and leaching of the herbicides metolachlor and diuron: a case study in an area of Northern Italy. 2005. Environmental Pollution. 134, 525–534.

CARACTERÍSTICAS DOS FUNGOS. UNICAMP: Aulas de microbiologia. 2007.

Disponível em: <<http://www.fop.unicamp.br/microbiologia/aulas/fungos.pdf>> Acesso em: ago, 2008.

CASTILLO, M.A., FELISA, N., ARAGON, P., CUESTA, G., SABATER, C. Biodegradation of the herbicide diuron by streptomycetes isolated from soil. 2006. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 58, 196-202.

CEDERLUND, H., BÖRJESSON, E., ONNEBY, K., STENSTRO, J.. Metabolic and cometabolic degradation of herbicides in the fine material of railway ballast. 2007. *Soil Biology & Biochemistry*. 39, 473-484.

CLAVER, A., ORMAD, P., RODRÍGUEZ, L., OVELLEIRO, J. L.. Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain). 2006. *Chemosphere*. 64, 1437 – 1443.

CLEMENT, A.A.; LAMMEL, J.S.; FILHO, J.A. & BARBOSA, J.C.. Weed control in sugar cane with hexazinone and its mixtures with diuron in pre-emergence. 1979. *Planta Daninha*. 2, 85 – 88.

COLLA, L.M., PRIMAZ, A. L., LIMA, M., BERTOLIN, T.E., COSTA, J.A.V.. Isolamento e Seleção de Fungos para Biorremediação a Partir de Solo Contaminado com Herbicidas Triazínicos. 2008. *Ciênc. agrotec*. 32, 809-813.

CULLINGTON, J. E., WALKER, A. Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. 1999. *Soil Biology and Biochemistry*. 31, 677 – 686.

CUNHA, A.C.B. Desenvolvimento de procedimento analítico para determinação de fármacos e pesticidas em amostras aquosas ambientais. 2005. Dissertação (Doutorado em Química) Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

DAMIM, V. Biodegradação, sorção e dessorção do herbicida 14C-diuron em dois latossolos tratados com lodo de esgoto. 2005. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade de São Paulo. Piracicaba.

DELLAMATRICE, P.M.; MONTEIRO, R.T.R.. Isolation of Diuron-degrading Bacteria from Treated Soil. 2004. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 47, 999-1003.

ECHART, C. L., MOLINA S. C.. Fitotoxicidade do alumínio: efeitos, mecanismo de tolerância e seu controle genético. 2001. *Ciência Rural*. 31, 531-541.

Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuária (EMBRAPA). Controle das Plantas Daninhas. 2004. Disponível em: <<http://www.cnpso.embrapa.br/producaosoja/controle.htm>> Acesso em 27/11/2007

Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuária (EMBRAPA). Análise Granulométrica de solo. Manual de métodos de análise de solo. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. 2 ed. rev.atual. Rio de Janeiro, 1997. 212p. cap I. Pág. 27- 35

Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuária (EMBRAPA). Manual de métodos de análise de solo. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. 2 ed. rev.atual. Rio de Janeiro, 1997. 212p. cap II. Pág. 83- 84.

Empresa Brasileira de Pesquisa agropecuária (EMBRAPA). Sistema Brasileiro de Classificação de Solos. Brasília; Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999. 412 p

ESPOSITO, E.; PAULILLO, S. M.; MANFIO, G. Biodegradación of the Herbicide Diuron in Soil by Indigenous Actinomycetes. 1998. Chemosphere. 37, 541-548.

ESTUDOS EM LABORATÓRIO SOBRE A INFLUÊNCIA DO CALOR NA MICROBIOTA DO SOLO. Biblioteca Digital PUC-RJ. Disponível em: <http://www.maxwell.lambda.ele.puc-rio.br/cgi-bin/db2www/PRG_0452.D2W/INPUT>. Acesso em 23 ago, 2008.

FLUES, M.; HAMA, P. Avaliação do nível de vulnerabilidade do solo devido à presença de termelétrica a carvão. 2003. Química Nova. 26, 479–483.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Bacteriological Analytical Manual, 6ed, Washington, 1984.

FANTROUSSI S. E., AGATHOS, S. N.. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? 2005. Current Opinion in Microbiology. 8, 268–275

FURTADO, I. M.A..Eventoweb Gerenciamento de Eventos. Disponível em: <http://www.eventoweb.com.br/xviisbrh/sc/relat/list_techsession.php?TS=68>. Acesso em: 02 ago, 2008.

GAVRILESCO, M. Fate of Pesticides in the environment and its bioremediation. 2005. Eng. Life Sci. 6, p. 497-526

GIACOMAZZI, S.; COCHET, N. Environmental impact of diuron transformation: a review. 2004. Chemosphere, 56, p.1021-1032.

GOODDY, D. C., CHILTON, P.J., HARRISON, I.. A field study to assess the degradation and transport of diuron and its metabolites in a calcareous soil. 2002. The Science of the Total Environment, 297, 67–83.

GUEDES, I.. Papel de matéria orgânica no solo II. Disponível em: <<http://geofagos.wordpress.com/2006/11/29/papel-da-materia-organica-no-solo-ii/>>. Acesso em: 21 ago., 2008.

GUIA para validação de métodos analíticos 1/2002 Boletim da Vigilância Sanitária, n.40,2002. Disponível em: <<http://www.sindusfarma.org.br/publ/bole2002/vs40.htm>> Acesso em: 17 mar.2004.

GUIMARÃES, G. L.. Impactos Ecológicos do Uso de Herbicidas ao Meio Ambiente. 1987. Série Técnica IPEF, Piracicaba, v.4, n.12, p.159.

HARADA, N., TAKAGI, K., FUJII, Kunihiko, IWASAKI, A.. Transformation of methylthio-s-triazines via sulfur oxidation by strain JUN7, a *Bacillus cereus* species. 2006. *Soil Biology and Biochemistry*, 38, 2952-2957.

Instituto Agronômico de Campinas (IAC), 2001. *Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais*. 1. ed. Campinas, 2001.

Instituto de Economia agrícola (IEA), 2007. *Defensivos agrícolas: expectativa de aumento da demanda em 2007*. Disponível em: <<http://www.sindag.com.br/upload/IEA-expectativaaumentodemanda.doc>>. Acesso em: dez. 2007.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO). *Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos*, 2003.

JACOBSON A.R., DOUSSET, S., GUICHARD, N., BAVEYE, P., ANDREUX, F.. Diuron mobility through vineyard soil contaminated with cooper. 2005. *Environmental Pollution*. 138, 250-259.

LANDRY, D., DOUSSET, S., ANDREUX, F.. Laboratory leaching studies of oryzalin and diuron through three undisturbed vineyard soil columns. 2004. *Chemosphere*, 54, 735–742.

LANDRY, D., DOUSSET, S., ANDREUX, F.. Leaching of oryzalin and diuron through undisturbed vineyard soil columns under outdoor conditions. 2006. *Chemosphere*, 62, 1736-1747.

LOBO, ILZA. *Uso de Traçadores Químicos e Isotópicos no Estudo Paleoambiental da Lagoa do Infernã (SP)*, 1997. Dissertação (Doutorado em Química). Universidade Federal de São Carlos. São Carlos.

MELLO e AZEVEDO. *Microbiologia Ambiental*, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, pg 116. 1997.

MEURER, EGON J. *Introdução à ciência do solo*. In: _____. *Fundamentos de química do solo*. 1ª ed. Porto Alegre: Gênese, 2000. p.20 –21.

MIDIO A.F.; MARTINS.D.I... *Herbicida em Alimentos*. 1997. 109p.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, *Agronegócio Brasileiro: Uma Oportunidade de Investimentos*. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/>>. Acesso em: 27 nov. 2007

MOURIÑO, R. O. *Adsorção dos Herbicidas 2,4-d, Atrazina e Alachlor em Solos do Paraná*, 2005. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade estadual de Londrina. Londrina.

NASCIMENTO, J.S.. *Ecologia Microbiana*. Disponível em: <http://ib.ufpel.edu.br/ecologia_microbiana.pdf>. Acesso em: ago 2008.

NEDER, Lúcia Toledo Camara. *Tratamento de Resíduos Industriais Perigosos: Tecnologia de Encapsulamento por Complexos Argilominerais – CAMs*, 1998. (Doutorado em Saúde Ambiental). Universidade Estadual de São Paulo.

OKAMURA, H., AOYAMA, I., ONO, Y., NISHIDA, T.. Antifouling herbicides in the coastal waters of western. 2003. Japan. Mar. Poll. Bull.

OLIVEIRA, C. A. P., SOUZA, C. M.. Influência da cobertura morta na umidade, incidência de plantas daninhas e de broca-do-rizoma (*Cosmopolites sordidus*) em um pomar de bananeiras (*Musa spp.*). 2003. Rev. Bras. Frutic. 25.

OLIVEIRA, F. M.. Identificação e caracterização de actinomicetos isolados de processos de compostagem, 2003 (Mestrado em Microbiologia agrícola e do Ambiente). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

PEIXOTO, M.F.S.. Atributos Físicos, Químicos e Biológicos como Indicadores da Qualidade do Solo. Disponível em: <
http://www.ufrb.edu.br/mapeneo/index2.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=5&Itemid=31>. Acesso em 23 ago, 2008.

PASSOS, R.P. et al.. Carbono orgânico e nitrogênio em agregados de um Latossolo Vermelho distrófico sob duas coberturas vegetais. 2007. Rev. Bras. Ciênc. Solo. 31, 1109-1118.

PRADO, H.. Pedologia Fácil Aplicações na Agricultura. 1. ed. Piracicaba: ESALQ-USP.2007

PRIMO, D.C.. Biorremediação microbiana. Disponível em: <
http://www.ufrb.edu.br/mapeneo/index2.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=52&Itemid=31> Acesso em: 18 ago, 2008.

RAMOS, M. A. G.. Estudo da Biorremediação do Herbicida Velpar[®] *In Vitro* em Meio Aquoso com o Uso do Inoculante Microbiano EM-4 (Microrganismos Eficazes)”. 2005. (Mestrado em Ciências Química Analítica. Universidade de São Paulo. São Carlos.

RAE, J.E. , COOPER, C.S., PARKER, A., PETERS A.. Pesticide sorption onto aquifer sediments. 1998. Journal of Geochemical Exploration, 64, 263–276.

RAIJ, B.van; QUAGGIO, J.A.; CANTARELLA, H.; FERREIRA, M.E.; LOPES, A.S.; BATAGLIA, O.C. Análise química do solo para fins de fertilidade. Campinas: Fundação Cargill, 1987. 170p.

RIBANI, M., BOTOLLI, B. G. C., COLLINS, C.H., JARDIM, C.S.F., MELO, L.F.C.. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. 2004. Rev. Química Nova, V. 27, No. 5, p.771-780,.

RODRIGUES, B.N. & ALMEIDA, F.S. Guia de herbicidas, 4ed., Londrina: edição dos autores. 1998, p.229-240.

ROQUE, M.R.A., MELO, I.S.. Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras do herbicida diuron. 2000. Scientia Agrícola, 57, 723-728.

ROSSI, Stefani.. Uso de biomarcadores para a detecção de efeitos subletais dos pesticidas Roundup[®] e Hexaron[®] em *Astyanax sp.* (*Pisces, Teleostei*). 2008. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) Universidade Federal do Paraná. Curitiba.

SCRIBNER, E.A., E., THURMAN, M., ZIMMERMAN, L.R.. Analysis of selected herbicide metabolites in surface and ground water of the United States. *The Science of The Total Environment*. 248, 157-167.

SCHRIJVER, A.; MOT, R. Degradation of pesticides by actinomicetes. *Critical reviews in microbiology*. 1999. Boca Raton. 25, 85-119..

SENA, Marcelo M. de et al . Avaliação do uso de métodos quimiométricos em análise de solos. *Quím. Nova* , São Paulo, v. 23, n. 4, 2000 . Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422000000400019&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 16 Aug 2008. doi: 10.1590/S0100-40422000000400019

SHENG, G.; YANG, Y.; HUANG, M.; YANG, K.; Influence of pH on pesticide sorption containing weath residue-derived char. 2005 *Environmental Pollution*. 135, 457-463.

Sistema Brasileiro de Classificação de Solos (SiBCS). Síntese da nova versão do SiBCS 2005. Disponível em: < <http://www.cnps.embrapa.br/sibcs/> >. Acesso em: ago, 2008.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C. Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos - Manual Técnico nº 14, Campinas: ITAL, 1995.

SILVA, ROQUE e MELO. *Microbiologia Ambiental: manual de laboratório*, Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, pg 2. 2000

SPADOTTO, C.A. Comportamento e Destino Ambiental de Herbicidas. Comitê de Meio Ambiente, Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas. 2002. [online] Disponível: <http://www.cnpma.embrapa.br/herbicidas/> Acesso em: 02 ago. 2008.

SORENSEN, S. R., BENDING G. D., JACOBSEN, C.S., WALKER A., AAMAND, J.. Microbial degradation of isoproturon and related phenylurea herbicides in and below agricultural fields. 2003. *FEMS Microbiology Ecology*, 45, 1-11.

TIXIER C., SANCELME, M. , AÏT-AÏSSA, S., WIDEHEM, P., BONNEMOY, F., CUER, A., TRUFFAUT, N., VESCHAMBRE, H.. Biotransformation of phenylurea herbicides by a soil bacterial strain, *Arthrobacter* sp. N2: structure, ecotoxicity and fate of diuron metabolite with soil fungi. 2002. *Chemosphere*, 46, 519–526.

TIXIER, C., BOGAERTS, P., SANCELME, M., BONNEMOY, F., TWAGILIMANA, L., CUER, A., BOHATIER, J. VESCHAMBREL, H. Fungal biodegradation of a phenylurea herbicide, diuron: structure and toxicity of metabolites. 2000. *Pest Manag Sci* 56, 455 - 462 .

UEHARA, Goro; GILLMAN, Gavin. *The Mineralogy, Chemistry and Physics of Tropical Soils with Variable Charge Clays*.

UETA, J.. PEREIRA, L.N., SHUHAMA, L.K. CERDEIRA, A.L.. Biodegradação de Herbicidas e Biorremediação. Disponível em: <http://www.rsa.ind.br/midia/biodegrada%E7%E3o_biorremedia%E7%E3o.pdf>. Acesso em: 18 ago, 2004.

UNICA, Produção de cana-de-açúcar do Brasil das safras 1990/91 a 2006/07. Disponível em: <<http://www.portalunica.com.br/portalunica/?Secao=referência>>. Acesso em: 27 nov. 2007.

US FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, FDA. Bacteriological Analytical Manual. 6th ed., Arlington, 1984.

VEGA, A. B., FRENICH, A. G., VIDAL, J.L.M. Monitoring of pesticides in agricultural water and soil samples from Andalusia by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. 2005. *Analytica Chimica Acta*, 538, 117–127.

VIAN, C. E. F., BELICK, W. Os desafios para a reestruturação do complexo agroindustrial canavieiro do Centro-Sul. Disponível em:

<http://www.anpec.org.br/revista/vol4/v4n1p153_194.pdf>. Acesso em 27 nov. 2007

VIEIRA, M. E.; PRADO, A. G. S.; LANDGRAF, M.D. & REZENDE, M. O. O. Estudo da adsorção/dessorção do ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) em solo na ausência e presença de matéria orgânica. 1999. *Química Nova*. 22, 305-308.

VIDALI, M. Bioremediation. An overview. In: International Chemistry Conference in Africa (8th), 2001, Dakar, Sênégál. *Pure Appl. Chem.* 73, 1163–1172.

VOGEL, T. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. 1996. *Current Opinion in Biotechnology*. 7, 311-316.

VOULVOULIS, N., SCRIMSHAW, M.D., LESTER, J.N.. Comparative environmental assessment of biocides used in antifouling paints. 2002. *Chemosphere*. 47, 789-795.

WIDEHEM, P., AÏT-AÏSSA S., TIXIER, C., SANCELME, M., VESCHAMBRE, H., TRUFFAUT, N. Isolation, characterization and diuron transformation capacities of a bacterial strain *Arthrobacter sp.* N2. 2002. *Chemosphere*, 46, 527–534.