

Avaliação da degradação do herbicida Diuron utilizando extração em fase sólida

Milton R. de Abreu Roque
Vera Lúcia Ferracini
Itamar Soares de Melo

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL

Presidente: Fernando Henrique Cardoso

Ministro da Agricultura e do Abastecimento:

Francisco Sérgio Turra

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa

Presidente: Alberto Duque Portugal

Diretores: Dante Daniel Giacomelli Scolari

José Roberto Rodrigues Peres

Elza Angela Battaglia Brito da Cunha

Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental - CNPMA

Chefe Geral: Bernardo van Raij

Chefe Adjunto de Pesquisa e Desenvolvimento: Deise M. Fontana Capalbo

Chefe Adjunto Administrativo: Vander Roberto Bisinoto

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA DIURON UTILIZANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Milton R. de Abreu Roque

Vera Lucia Ferracini

Itamar Soares Melo

Jaguariúna, SP

1998

EMBRAPA-CNPMA. Boletim de Pesquisa, 3.

Exemplares desta publicação podem ser solicitados à:
**Embrapa – Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e
Avaliação de Impacto Ambiental - CNPMA**

Rodovia SP-340 - km 127,5 - Bairro Tanquinho Velho

Caixa Postal 69 13820-000 - Jaguariúna, SP

Fone: (019) 867-8700 Fax: (019) 867-8740

e-mail:edis@cnpma.embrapa.br

Comitê de Publicações: Aldemir Chaim
Célia M.M.de S.Silva
Franco Lucchini
Julio F. Queiroz
Magda A. de Lima
Maria Cristina Tordin

Editoração: Regina Lucia Siewert Rodrigues

Revisão e Normalização: Maria Amélia de Toledo Leme

Tiragem: 500 exemplares

ROQUE, M.R. de A.; FERRACINI, V.L.; MELO, I.S. de.
**Avaliação da degradação do herbicida diuron utilizando
extração em fase sólida.** Jaguariúna: EMBRAPA-
CNPMA,1998. 15p. (EMBRAPA-CNPMA. Boletim de
Pesquisa, 3).

CDD 632.954

©EMBRAPA-CNPMA, 1998

ÍNDICE

R	ESUMO	05
S	UMMARY.....	06
I	NTRODUÇÃO	07
M	ATERIAL E MÉTODOS.....	08
R	ESULTADOS E DISCUSSÃO	09
C	ONCLUSÕES	13
R	EFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13

AVALIAÇÃO DA DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA DIURON UTILIZANDO EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

*Milton R.A. Roque¹
Vera Lucia Ferracini²
Itamar Soares Melo³*

RESUMO

O diuron 3-(3-4-diclorofenil) 1,1-dimetiluréia é um herbicida comercializado em vários países, entre eles Brasil e Estados Unidos. Este trabalho avaliou a degradação deste herbicida, em meio de cultura. Para quantificar a degradação foi utilizado um método de extração em fase sólida (SPE). A taxa de recuperação do diuron em SPE foi de 84,5 %. Uma linhagem de *Acinetobacter baumannii* (D12-12) apresentou os melhores resultados, com uma taxa de degradação de 14,4% e 13% na concentração de 20 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. A linhagem D16-12 de *Acinetobacter baumannii* apresentou proporcionalidade na taxa de degradação em função da concentração do diuron.

Palavras-chave: diuron, degradação, extração, cromatografia, *Acinetobacter baumannii*.

¹ Biólogo M.Sc., Bolsista da Fapesp, Embrapa Meio Ambiente, caixa postal 69 13820-000 Jaguariúna, SP.

² Química Ph.D., Embrapa Meio Ambiente.

³ Engenheiro Agrônomo Ph.D., Embrapa Meio Ambiente.

SUMMARY

The diuron 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea is a herbicide commercialized in various countries, inclusive Brazil and USA. This work evaluated the degradation of this herbicide in culture media. To quantify the degradation a solid phase extraction (SPE) was used. The diuron recuperated in SPE was 84,5%. The strain D12-12 of *Acinetobacter baumannii* showed the best results, with a degradation rate of 14,4% and 13% in 20 and 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The strain D16-12 of *A. baumannii* showed proportionality between degradation rate and diuron's concentration.

Index terms: diuron, degradation, extraction, chromatography, *Acinetobacter baumannii* .

INTRODUÇÃO

O herbicida diuron, aplicado principalmente em cana-de-açúcar no Estado de São Paulo apresenta alta persistência, fitotoxicidade e adsorção no solo (Blanco & Oliveira, 1987). Pode ser lixiviado e contaminar águas superficiais, lençóis freáticos, leitos de rios e estuários (Newman, 1995). Tornou-se um problema ambiental por ser aplicado em extensas áreas e por tempo superior a 15 anos (Musumeci et al., 1995).

Devido à baixa degradação química, uma das principais alternativas para a degradação do produto no solo é através do metabolismo microbiano. Alfonso Hernandez et al., (1984) observaram que a degradação do produto por processos não biológicos varia entre 55 a 70% do ingrediente ativo após 3 semanas e, essa taxa aumenta para 80 a 85% quando ocorre degradação microbiana.

Um dos principais produtos do metabolismo do diuron é o DCA (3,4-dicloroanilina), o qual pode sofrer condensação formando TCAB (3',3,4',4-tetracloroazobenzeno) assim como outras reações complexas de polimerização (Field, 1997).

Metodologias para análise e extração do diuron e de seus metabólitos em meio de cultura são escassas, sendo utilizados métodos colorimétricos (Walker, 1987) com baixa sensibilidade e alguns métodos cromatográficos (Field, 1997; Karu et al., 1994).

Métodos rápidos e seguros de extração e quantificação do diuron e metabólitos, em meio de cultura e no solo são de particular interesse, especialmente quando se trabalha com um número elevado de amostras.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a taxa de degradação do diuron por linhagens de *Acinetobacter baumannii*, isoladas previamente da rizosfera de cana de açúcar (Roque et al., 1996), utilizando extração em fase sólida.

MATERIAL E MÉTODOS

Utilizou-se três linhagens (D12-12, D12-18, e D16-12) de *Acinetobacter baumannii*, isoladas da rizosfera de cana-de-açúcar e resistentes ao diuron (Roque, 1996).

Para testar o método de extração fase sólida (SPE), foram utilizados os seguintes tratamentos, em duplicata: 1) água, 2) água + diuron nas concentrações de 1,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 3) 3,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 4) 6,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e 5) Meio J.E. K_2HPO_4 -0,5g.L⁻¹; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -0,5g.L⁻¹; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -0,5g.L⁻¹; CaCl_2 -10 mg.L⁻¹; MnCl_2 -0,1mg.L⁻¹; ZnSO_4 -0,01mg.L⁻¹], (Jones & Edington, 1968) + diuron 3,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para a curva de calibração foi utilizado padrão técnico do diuron, nas concentrações de 1,6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 3,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 4,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 6,4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Na quantificação da degradação do diuron as linhagens foram repicadas, em duplicata, para meio mineral J.E. + diuron nas concentrações de 20 e 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e incubados por 32 dias.

As amostras das diferentes linhagens foram concentradas em colunas de sílica C-18 SEP-PAK®, Millipore, VAC-3mL (condicionadas com 10mL de isopropanol e 3mL de água), lavadas com 3mL de água para retirada de sais, seca com N_2 e em seguida eluídas com 2 mL de metanol.

Após a evaporação do metanol com N_2 , as amostras foram diluídas em 2mL da fase móvel (metanol:água; 63:37, v/v) e 50 μL foram injetados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE). A coluna utilizada para análise foi a de fase reversa C_{18} com fluxo de 1,5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando detetor ultravioleta, $\lambda_{\text{máx}}$ a 251 nm. O tempo de retenção do diuron foi de aproximadamente 10 minutos.

A taxa de recuperação do diuron nas três linhagens (D12-12, D12-18, e D16-12) de *Acinetobacter baumannii* foi avaliada.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 mostra a porcentagem de recuperação do diuron em meio de cultura aquoso. As porcentagens de recuperação variaram de $83,9 \pm 2,92 \%$ a $118,8 \pm 3,24 \%$. Os valores de recuperação aceitos para a validação de métodos analíticos devem estar entre 70% e 110%. A estimativa de desvio padrão destas recuperações não deve ser

superior a 15% em relação ao valor médio (AOAC International, 1995; ISO, 1990). Neste caso ficou demonstrado que o método de extração em fase sólida é válido para o meio de cultura utilizado.

Tratamentos	Área	Concentração diuron ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% recuperação
2	3,609	1,79	$118,8 \pm 3,42$
3	7,550	3,12	$97,5 \pm 2,76$
4	14,228	5,37	$83,9 \pm 4,52$
5	6,636	2,81	$87,8 \pm 3,82$

TABELA 1. Porcentagem de recuperação do diuron nos tratamentos 2) ($\text{H}_2\text{O} + 1,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$), 3) ($\text{H}_2\text{O} + 3,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), 4) ($\text{H}_2\text{O} + 6,4 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e 5) (J.E. + $3,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$).

Na figura 1 temos a curva de calibração do diuron com um coeficiente de correlação de 0,998.

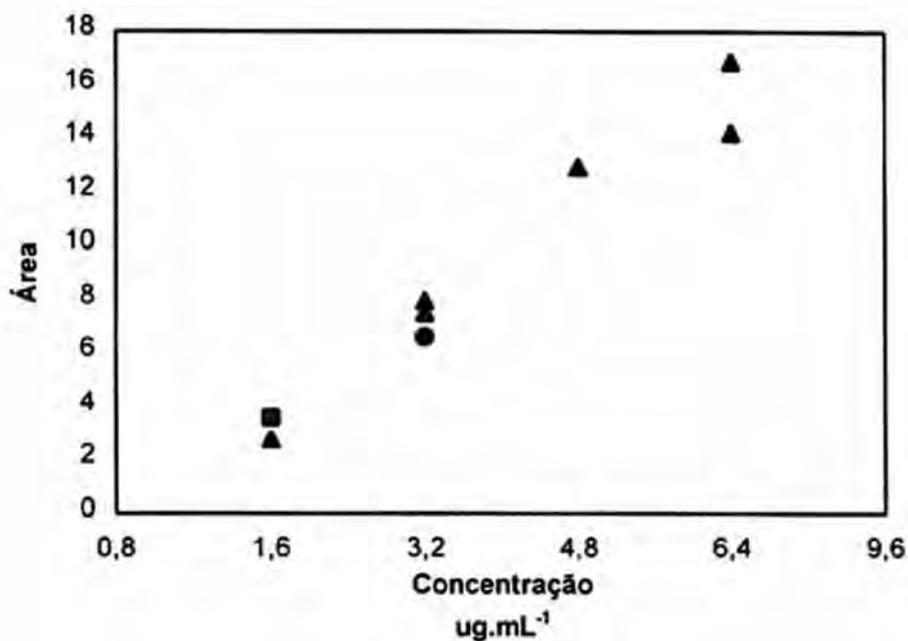


FIGURA 1. Curva de calibração do diuron técnico ▲ , amostras 2) (■ , H₂O + 1,6 µg.mL⁻¹), 3) (▲ , H₂O + 3,2 µg.mL⁻¹), 4) (▲ , H₂O + 6,4 µg.mL⁻¹), e 5) (● , J.E. + 3,2 µg.mL⁻¹)

As porcentagens médias de recuperação do diuron para as linhagens de *A. baumannii*, nas concentrações de 20 µg.mL⁻¹ e 40 µg.mL⁻¹ foram de 91,05% ± 5,32 e 87,9 ± 1,79%, respectivamente. A porcentagem de degradação do diuron, após 32 dias de incubação variou de 3,78 - 14,39% na concentração de 20 µg.mL⁻¹. Na concentração de 40 µg.mL⁻¹ de diuron a degradação variou de 10,86 - 12,92%, conforme Tabela 2.

Linhagens	% de recuperação do diuron		% de degradação do diuron	
	20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
D12-12	85,57	87,07	14,39	12,92
D12-18	91,37	89,13	8,63	10,86
D16-12	96,21	87,71	3,78	12,29
Média \pm	91,05% \pm	87,9 \pm		
S.D.	5,32	1,79%		
Testemunha	88,84	90,16		

TABELA 2. Porcentagem de recuperação e de degradação do diuron

No experimento com as linhagens bacterianas, a concentração de $40\mu\text{g.mL}^{-1}$ apresentou maior uniformidade nos resultados e uma maior taxa de degradação para todas as linhagens testadas. A linhagem D16-12 apresentou variação na taxa de degradação em função da concentração do diuron.

A linhagem D16-12 apresentou os melhores resultados, com uma taxa de degradação de 14,39 % e 12,92 % na concentração de $20\mu\text{g.mL}^{-1}$ e $40\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

CONCLUSÕES

- O sistema de extração fase sólida, utilizando colunas C₁₈ mostrou ser eficiente na recuperação de diuron em meio de cultura.
- As linhagens de *Acinetobacter baumannii* apresentaram, em cultura pura, capacidade de degradação do herbicida diuron.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFONSO HERNANDEZ, M.M.; MARTINEZ VIEIRA, R.; URDANIVIA, M.L.. Decomposición del herbicida diurón por acción de los microorganismos de un suelo ferralítico amarillento lixiviado. **Ciencias de la Agricultura**, v.19, p.99-104, 1984.

AOAC INTERNATIONAL. Collaborative study guidelines. **Journal of the AOAC International**, v.78, p.143-A-157A, 1995.

BLANCO, H.G.; OLIVEIRA, D.A. Persistência de herbicidas em latossolo vermelho-amarelo em cultura de cana da açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.22, n.7, p.681-687,1987.

FIELD J. A.; RALPH, L.; REED; T.; SAWYER, E.; MARTINEZ, M. Diuron and its metabolites in surface water and ground water by solid phase

extraction and in-vial elution. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.45, p.3897-3902, 1997.

ISO. **General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.** [S.I.] : Organization International de Normalization, 1990. (IEC Guide, 25).

JONES, J.G.; EDINGTON, M.A. An ecologic survey of hydrocarbon-oxidizing microorganisms. **Journal of General Microbiology**, v.52, p. 381-390, 1968.

KARU, A.E.; SCHMIDT, D.J.; RICHMAN, S.J.; COOPER, C.; TRAN, D.; HSU, J. Validation of a monoclonal immunoassay for diuron in groundwater. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, n.2, p.310-315, 1994.

MUSUMECI, M. R.; NAKAGAWA, L.E.; LUCHINI, L.C.; MATALLO, M.B.; DE ANDREA, M.M. Degradação do diuron - ^{14}C em e em plantas de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, n.6, p. 775-778, 1995.

NEWMAN, A. Ranking pesticides by environmental impact. **Environmental Science and Technology**, v.29, p.324A -326 A, 1995.

ROQUE, M.R.A.; MELO, I.S.; YANO, D.M.Y.; FRIGUETTO, R.T.S.; ALVES, V. Isolamento e comportamento de rizobactérias resistentes ao herbicida diuron. In: WORKSHOP SOBRE BIODEGRADAÇÃO, 1996, Campinas. **Anais**. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1996. p.219. (Embrapa-CNPMA. Documentos, 5).

WALKER, A. Enhanced degradation of Iprodione and Vinclozolin in soil: a simple colorimetric test for identification of rapid -degrading soils. **Pesticide Science**, v.21, p.233-240, 1987.



Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

