UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA ENGENHARIA AMBIENTAL

DAVID SILVA ALEXANDRE

REDUÇÃO DA TOXICIDADE DE SOLOS CONTAMINADOS COM OS AGROTÓXICOS 2,4-D E FIPRONIL UTILIZANDO BIOCHAR DA PALHA DE CANA-DE-AÇÚCAR

São Carlos - SP
2023

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE HIDRÁULICA E SANEAMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA ENGENHARIA AMBIENTAL

DAVID SILVA ALEXANDRE

Redução da toxicidade de solos contaminados com os agrotóxicos 2,4-D e fipronil utilizando biochar da palha de cana-de-açúcar

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos pré-requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola.

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos - SP

2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

A249r

Alexandre, David Silva
Redução da toxicidade de solos contaminados com os agrotóxicos 2,4-D e fipronil utilizando biochar da palha de cana-de-açúcar / David Silva Alexandre; orientador Evaldo Luiz Gaeta Espíndola. São Carlos, 2023.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação e Área de Concentração em Ciências da Engenharia Ambiental -- Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2023.

1. Contaminação. 2. Biocarvão. 3. Bioindicadores. 4. Enchytraeus crypticus. 5. Eruca sativa. I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **DAVID SILVA ALEXANDRE.**

Título da dissertação: "Redução da toxicidade de solos contaminados com os agrotóxicos 2,4-D e fipronil utilizando biochar da palha de cana-de-açúcar".

Data da defesa: 16/02/2023.

Comissão Julgadora	**Resultado**
Prof. Titular **Evaldo Luiz Gaeta Espindola** (Orientador) (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)	Aprovado
Profa. Associada **Valeria Guimarães Silvestre Rodrigues** (Escola de Engenharia de São Carlos/EESC-USP)	Aprovado
Dra. **Cintia Carla Niva** (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária/EMBRAPA)	Aprovado.

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental:

Prof. Titular **Marcelo Zaiat**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:

Prof. Titular **Murilo Araujo Romero**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao universo por me proporcionar conhecer pessoas incríveis e viver momentos enriquecedores.

Gostaria de agradecer à minha família, que sempre apoiou minhas escolhas, independentemente de qualquer fator externo. À minha mãe Raquel, que sempre esteve ao meu lado em todas as fases da minha vida, à minha irmã Lara, que sempre foi um exemplo de ser humano e ao meu pai, Nivaldo, que me ensinou muito sobre a vida e segue sendo exemplo.

Ao Prof. Dr. Evaldo Luiz Gaeta Espíndola, da Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo (EESC/USP), por me aceitar no seu núcleo de pesquisa, por me orientar sabiamente com seus conhecimentos e por ser gentil e empático desde o primeiro contato.

À banca examinadora, composta pela pesquisadora Dra. Maria Edna Tenório Nunes e Profa. Dra. Valéria Guimarães Silvestre Rodrigues, do Departamento de Geotecnia da Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, por terem aceitado o convite da defesa da Dissertação de Mestrado e por terem contribuído de forma substancial no projeto na banca de qualificação.

Agradeço ao Allan Pretti Ogura pelo apoio acadêmico desde o início do mestrado e ao Thandy Junio da Silva Pinto, pela contribuição na análise estatística dos resultados obtidos.

Gostaria de agradecer ao meu amigo Lucas Lopes, por me ensinar a Ecotoxicologia na prática, por ter sido paciente e pela amizade incrível que construímos ao longo desses dois anos.

Ao meu amigo Gleyson Borges pela amizade e momentos incríveis que vivemos durante o mestrado, pois sem ele a minha experiência não teria sido a mesma. As minhas amigas Yohanna Augusta e Kamila Belotti agradeço pela amizade e carinho.

À Profa. Dra. Cassiana Carolina Montagner e às suas alunas do Departamento de Química Analítica, do Instituto de Química, da Universidade Estadual de Campinas (IQ-UNICAMP), pelas análises químicas. Ao Prof. Dr. Luís Reynaldo Ferracciú Alleoni e ao seu aluno de doutorado Matheus Bortolanza Soares, do Departamento de Ciência do Solo, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ-USP), pela concessão do biochar.

Ao professor Prof. Dr. Hugo Sarmento do departamento Hidrologia da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar pela concessão do citômetro e à Laís Conceição de Meneses Silva, pela colaboração nas análises dos testes com *Ceriodaphnia silvestrii*.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro no Projeto Temático nº 2015/18790-3 "*Environmental effects of the pasture-sugarcane*

conversion and pasture intensification", coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Antônio Martinelli, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" [ESALQ – USP]. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001. N° do processo: 88887.612314/2021-00

RESUMO

ALEXANDRE, D. S. **Redução da toxicidade de solos contaminados com os agrotóxicos 2,4-D e fipronil utilizando biochar da palha de cana-de-açúcar**. Dissertação (Mestrado). Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2023.

O Brasil se tornou o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, com 642,7 milhões de toneladas por ano e 8,442 milhões de hectares de área plantada em 2021. Como consequência, a utilização de agrotóxicos nas lavoras tem sido ampliada, implicando efeitos nocivos na estrutura e funcionamento dos ecossistemas. Diversos estudos foram e estão sendo desenvolvidos a fim de comprovar os efeitos deletérios em organismos não-alvos em compartimentos aquáticos e terrestres, bem como com intuito de criar técnicas eficientes e sustentáveis para diminuição de toxicidade de solos contaminados com agrotóxicos. Diante disso, o biochar, um material carbonáceo produzido por pirólise em altas temperaturas, oriundo de diversas matrizes, se apresenta como um potencial substrato alternativo para redução da toxicidade dos solos. A presente pesquisa teve como objetivo avaliar o potencial uso do biochar, produzido a partir da palha da cana-de-açúcar, na diminuição da toxicidade de solos contaminados com os agrotóxicos Regent® 800 WG (i.a. fipronil) e DMA® 806 BR (i.a. 2,4-D), de forma isolada e em mistura. Foram realizados testes em microcosmos por 28 dias, solo e elutriato, avaliando diferentes respostas biológicas de organismos aquáticos e terrestres. Nos microcosmos, foram avaliadas a sobrevivência, reprodução e a alimentação da espécie de enquitreídeos *Enchytraeus crypticus* e a germinação, o crescimento e as biomassas frescas e secas da espécie *Eruca sativa* L. (rúcula). Com o solo e elutriato gerados a partir do microcosmos, foram observadas a taxa de germinação e crescimento da parte aérea e raiz da espécie *E. sativa* e a sobrevivência e a taxa de alimentação do cladócero *Daphnia similis.* Os resultados mostraram que concentrações de 1,31 mg/Kg do herbicida 2,4-D e 0,09 mg/Kg do inseticida fipronil, isolados e em mistura, diminuíram significativamente a reprodução da espécie *E. crypticus* em microcosmos, com ênfase na toxicidade do fipronil e mistura. O biochar da palha da cana-de-açúcar foi eficaz em diminuir a toxicidade ao avaliar a reprodução dos enquitreídeos no tratamento com fipronil (aumento de 43% na reprodução de juvenis), todavia o controle com o biochar apresentou diminuição na reprodução dos organismos em 23% quando comparado com o controle. O biochar se mostrou uma excelente alternativa em diminuir a toxicidade dos agrotóxicos para a espécie *E. sativa*, em virtude do crescimento 2x maior da parte aérea nos tratamentos com 2,4-D na presença de biochar, bem como taxa de germinação 2,8x maior quando comparado com o tratamento 2,4-D sem biochar. Os resultados dos testes realizados com o solo e elutriato também evidenciaram o potencial do biochar em diminuir a toxicidade dos agrotóxicos, principalmente do 2,4-D (mais tóxico para a espécie vegetal). Os testes com solo mostram que o 2,4-D reduziu a emergência da espécie em 31% ao comparar com o controle. Entretanto, nos cenários de contaminação com o 2,4-D houve um aumento de 50% quando comparado a presença e ausência do biochar. Os testes com elutriato mostraram que no tratamento com 2,4-D, o biochar elevou o crescimento da parte aérea e a germinação em 45% e 34%, respectivamente. Ao analisar a mortalidade e a taxa de alimentação da *D. similis* exposta às amostras de elutriato, não foram identificados os efeitos dos contaminantes e nem diferenças significativas entre os tratamentos com e sem biochar. De maneira geral, os resultados indicaram grande potencial do biochar para reduzir a toxicidade dos agrotóxicos 2,4-D e fipronil para as espécies estudadas. Entretanto, sugere-se a realização de estudos com mais espécies e em modelos mais representativos (e.g., mesocosmos ou aplicação em campo).

Palavras-chave: Contaminação, biocarvão, bioindicadores, *Enchytraeus crypticus* e *Eruca sativa*

ABSTRACT

ALEXANDRE, D. S. **Reduction of toxicity of soils contaminated with the pesticides 2,4-D and fipronil using biochar from sugarcane straw**. Dissertation (Master's degree). São Carlos Engineering School, University of São Paulo, São Carlos, 2023.

Brazil has become the world's largest sugarcane producer with 642.7 million tons per year and 8.442 million hectares of the planted area by 2021. As a consequence, the use of agrochemicals in farming has been expanded, implying harmful effects on the structure and functioning of ecosystems. Several studies have been and are being developed to prove the deleterious effects on non-target organisms in aquatic and terrestrial compartments, as well as to create efficient and sustainable techniques to reduce the toxicity of soil contaminated with pesticides. Therefore, biochar, a carbonaceous material produced by pyrolysis at high temperatures, is derived from various matrices and presents itself as a potential alternative substrate for reducing soil toxicity. The present research aimed to evaluate the potential use of biochar, produced from sugarcane straw, in the reduction of toxicity of soils contaminated with the pesticides Regent® 800 WG (a.i. fipronil), DMA® 806 BR (a.i. 2,4-D) in isolation and in mixture. Tests were conducted in microcosms for 28 days, soil and elutriate, evaluating different biological responses of aquatic and terrestrial organisms. In the microcosms, were evaluated the survival, reproduction, and feeding of the *Enchytraeus crypticus* species and the germination, growth, and fresh and dry biomass of the species *Eruca sativa L*. (arugula). With the soil and elutriate generated from the microcosm, were observed the germination rate and growth of the aerial part and root of the species *E. sativa* and the survival and feeding rate of the cladoceran *Daphnia similis*. The results showed that concentrations of 1,31 mg/Kg of the herbicide 2,4-D and 0.09 mg/Kg of the insecticide fipronil, alone and in a mixture, significantly decreased the reproduction of the species *E. crypticus* in microcosms, with emphasis on the toxicity of fipronil and mixture, which was reduced by 25%. The sugarcane straw biochar was effective in decreasing toxicity when evaluating the reproduction of *E. crypticus* in the fipronil treatment (43% increase in the reproduction of neonates), however, the control with biochar showed reproduction decrease of 23% when compared with the control. Biochar proved to be an excellent alternative in reducing the toxicity of pesticides to *E. sativa*, because of the 2x greater growth of the aerial part in the treatments with 2,4-D in the presence of biochar, as well as 2.8x greater germination rate when compared to the 2,4-D treatment without biochar. The results of the tests performed with soil and elutriate also showed the potential of biochar to decrease the toxicity of pesticides, especially 2,4-D (more toxic to the plant species). The soil tests show that 2,4-D reduced the emergence of the species by 31% when compared to the control. However, in the 2,4-D contamination scenarios, there was a 50% increase when comparing the presence and absence of biochar. The elutriate tests showed that in the 2,4-D treatment, biochar increased aboveground growth and germination by 45% and 34%, respectively. When analysing the mortality and feeding rate of *D. similis* exposed to the elutriate samples, neither the effects of contaminants nor significant differences between the treatments with and without biochar were identified. In general, the results indicated great potential for the use of biochar to reduce the toxicity of the pesticides 2,4-D and fipronil for the species studied. However, further studies with more species and in more representative models (e.g., mesocosms or field applications) are suggested.

Keywords: Contamination, biochar, bioindicators, *Enchytraeus crypticus* and *Eruca sativa*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química do 2,4-D (esquerda) e do fipronil (direita). 24
Figura 2. Fluxograma do delineamento experimental. 37
Figura 3. Etapas envolvidas na montagem do microcosmo terrestre. 42
Figura 4. Modelo da unidade experimental (microcosmo) 43
Figura 5. Condições e etapas no desenvolvimento da pesquisa 44
Figura 6. Esquema do teste de germinação com a espécie Eruca sativa. 46
Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura para avaliar a morfologia do biochar. 51
Figura 8. Grupos orgânicos funcionais obtidos por FTIR 52
Figura 9. Imagens do mapeamento dos principais elementos químicos presentes na superfície do biochar 57
Figura 10. Metabólitos do fipronil 61
Figura 11. Quantificação química das concentrações de 2,4-D e fipronil obtidas nas amostras de solo analisadas em µg kg^{-1}. Asterisco (*) indica diferença significativa no mesmo tratamento com e sem biochar. Letras correspondem a diferenças entre os tratamentos na ausência (letra minúscula) e presença de biochar (letra maiúscula). “B” indica diferença significativa em relação ao tratamento 2,4-D com biochar e “c” indica diferença significativa em relação ao tratamento fipronil sem biochar. 62
Figura 12. Quantificação química das concentrações dos subprodutos do fipronil obtidas nas amostras de solo em µg kg^{-1}. Asterisco (*) indica diferença significativa no mesmo tratamento com e sem biochar. 63
Figura 13. Resultados do teste de sobrevivência e reprodução da espécie Enchytraeus crypticus nos microcosmos. Asterisco (*) indica diferença significativa no mesmo tratamento com e sem biochar. Letras correspondem a diferenças entre os tratamentos na ausência (letra minúscula) e presença de biochar (letra maiúscula). “a” indica diferença significativa em relação ao controle sem biochar. “b” indica diferença significativa em relação ao tratamento 2,4-D sem biochar. 64
Figura 14. Resultados do teste de germinação, crescimento, massa fresca e seca da espécie de E. sativa nos microcosmos. Asterisco (*) indica diferença significativa no mesmo tratamento com e sem biochar. Letras correspondem a diferenças entre os tratamentos na ausência (letra minúscula) e presença de biochar (letra maiúscula). “A” indica diferença significativa em relação ao controle com biochar. “a” indica diferença significativa em relação ao controle sem biochar. “B” indica

diferença significativa em relação ao tratamento 2,4-D com biochar. “b” indica diferença significativa em relação ao tratamento 2,4-D sem biochar. “C” indica diferença significativa em relação ao tratamento fipronil com biochar e “c” indica diferença significativa em relação ao tratamento fipronil sem biochar. 67

Figura 15. Resultados dos testes de germinação e crescimento da espécie E. sativa com solo dos microcosmos. Asterisco (*) indica diferença significativa no mesmo tratamento com e sem biochar. Letras correspondem a diferenças entre os tratamentos na ausência (letra minúscula) e presença de biochar (letra maiúscula). “a” indica diferença significativa em relação ao controle sem biochar e “b” indica diferença significativa em relação ao tratamento 2,4-D sem biochar. 72

Figura 16. Resultados testes de germinação e crescimento da espécie E. sativa com elutriato dos microcosmos. Asterisco (*) indica diferença significativa no mesmo tratamento com e sem biochar. Letras correspondem a diferenças entre os tratamentos na ausência (letra minúscula) e presença de biochar (letra maiúscula). “a” indica diferença significativa em relação ao controle sem biochar e “b” indica diferença significativa em relação ao tratamento 2,4-D sem biochar. 74

Figura 17. Resultados dos testes realizado com espécie aquática Daphnia similis. Asterisco (*) indica diferença significativa no mesmo tratamento com e sem biochar. Letras correspondem a diferenças entre os tratamentos na ausência (letra minúscula) e presença de biochar (letra maiúscula). 75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Revisão bibliográfica relacionada ao uso do biochar da cana-de-açúcar na remediação de agrotóxicos 32
Tabela 2. Parâmetros físico-químicos analisados para caracterização dos compartimentos de solo. 39
Tabela 3. Parâmetros físico-químicos a serem analisados para caracterização do elutriato 48
Tabela 4. Composição da fase móvel aquosa (A) e orgânica (B) do método cromatográfico para o modo de ionização negativo. 49
Tabela 5. Parâmetros da espectrometria de massas para os compostos analisados 50
Tabela 6. Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e coeficiente de determinação (R2) para os analitos 50
Tabela 7. Caracterização geral do biochar 53
Tabela 8. Caracterização química do biochar utilizado 56
Tabela 9. Caracterização do solo coletado na área do CRHEA/EESC/USP 58
Tabela 10. Quantificação química das concentrações obtidas nas amostras das soluções-estoque em mg/L 60
Tabela 11. Parâmetros físico-químicos do elutriato 73

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA 14
2. HIPÓTESES 17
3. OBJETIVOS 18
3.1. Objetivo Geral 18
3.2. Objetivos específicos 18
4. SÍNTESE DA BIBLIOGRAFIA FUNDAMENTAL 19
4.1. Utilização do 2,4-D e fipronil na cultura de Cana-de-açúcar 19
4.2. Contaminação e técnicas de redução de toxicidade de áreas poluídas por agrotóxicos 24
4.3. Biochar a partir da Cana-de-açúcar 28
4.4. A abordagem ecotoxicológica na avaliação dos riscos ambientais 33
5. MATERIAIS E MÉTODOS 37
5.1. Biochar: produção, preparo e caracterização 38
5.2. Coleta e caracterização do solo 39
5.3. Organismos testes, condição de cultivo e sensibilidade 40
5.4. Microcosmo e teste multiespécie 41
5.5. Análises ecotoxicológicas 45
5.5.1. Análise de ecotoxicidade: microcosmo 45
5.5.2. Análise de ecotoxicidade: solo 46
5.5.3. Análise de ecotoxicidade: elutriato 47
5.6. Análises químicas dos agrotóxicos 49
5.7. Análise estatística 50
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO 51
6.1. Caracterização do biochar 51
6.2. Caracterização do solo 58
6.3. Quantificação química dos agrotóxicos 60
6.4. Testes multiespécie em microcosmo 64
6.5. Teste de ecotoxicidade solo 72
6.6. Teste de ecotoxicidade com amostras de elutriato 73
7. CONCLUSÕES 78
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS 79
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 80

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Segundo a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO, 2021), a cultura de cana-de-açúcar vem crescendo fortemente no Brasil e em países como Índia, China e Tailândia. No Brasil, essa produção é decorrente do aumento no consumo de etanol, associada ao elevado crescimento na demanda energética global nas últimas décadas, diante das regras de proporção obrigatória de mistura de etanol com a gasolina (BRASIL, 2020). É importante ressaltar que o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo, com uma produção de 642,7 milhões de toneladas por ano e 8,4 milhões de hectares de área plantada (GILLI, 2021). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB, 2021), foi registrada na região sudeste do Brasil, com destaque aos estados de São Paulo e Minas Gerais, uma colheita de 428,6 milhões de toneladas de cana-de-açúcar referente ao ano de 2020/2021. Em âmbito nacional, a CONAB apresentou estimativa de produção de cana-de-açúcar de 628,1 milhões de toneladas para os anos de 2021/2022.

São Paulo é o estado com a maior produção de cana-de-açúcar do país, sendo responsável por 70% das exportações nacionais e por 60% do açúcar produzido no país. O estado de São Paulo comporta 4,3 milhões de hectares de área plantada e uma produção anual de cana-de-açúcar de 342,6 milhões de toneladas. Esse cenário produtivo gera diversas implicações sociais, uma vez que a atividade canavieira produz cerca de 1 milhão de empregos diretos e indiretos, tornando-se responsável por 35% do Produto Interno Bruto (PIB) e possuindo 128 centrais energéticas das 307 existentes no Brasil (ÚNICA, 2020).

Apesar dos inúmeros benefícios econômicos e sociais, a cultura de cana-de-açúcar é caracterizada pelo intenso e frequente uso de agrotóxicos durante seu cultivo, que vem ocorrendo desde a década de 60, quando se iniciou a utilização dos agrotóxicos na agricultura (PIGNATI *et al.*, 2017). Autores como Lacher e Goldstein (1997) atribuíram a utilização desses agrotóxicos como uma das principais ameaças ao meio ambiente, associadas à expansão agrícola, devido ao seu potencial de serem nocivos para a natureza, com sérias implicações para a comunidade biótica e serviços ecossistêmicos associados (SANCHEZ, 2016). Da mesma forma, Fontanetti (2017) também advertiu sobre seu uso intensivo, uma vez que contribui para a contaminação do solo, das águas superficiais e subterrâneas, com diversos efeitos deletérios aos organismos aquáticos e terrestres. De acordo com a Agrofit (2022), existem 324 ingredientes ativos registrados no Brasil, sendo 111 voltados para a cultura de cana-de-açúcar. Esses ingredientes dão base para a formulação

de 2749 produtos comerciais com ampla utilização, dos quais 722 são destinados à cultura de cana-de-açúcar.

Dentre os principais ingredientes ativos dos agrotóxicos aplicados na cultura de cana-de-açúcar, destacam-se o herbicida 2,4-D e o inseticida fipronil, conforme relatório do Instituto de Economia Agronômica (IEA, 2016). Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA, 2021), o 2,4-D possui 38 produtos formulados disponíveis para onze culturas (i.e., arroz, aveia, café, cana-de-açúcar, centeio, cevada, milheto, milho, soja, sorgo e trigo), enquanto existem 74 formulações comerciais registradas no Brasil para o fipronil, as quais são recomendadas para doze culturas (algodão, amendoim, arroz, batata, cana-de-açúcar, cevada, feijão, girassol, milho, soja, sorgo, trigo). Os efeitos tóxicos do 2,4-D e do fipronil sobre a biota vêm sendo descritos em diversos estudos ecotoxicológicos, evidenciando: interferências negativas no comportamento de natação do peixe *Danio rerio* (MOREIRA *et al*., 2020), diminuição da produção e eclosão de ovos do inseto *Chironomus sancticaroli* (PINTO *et al*., 2020a; PINTO *et al*., 2021), diminuição do crescimento e perdas de biomassa no anfípoda tropical *Hyalella meinerti* (PINTO *et al*., 2021), diminuição significativa da reprodutibilidade do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* (SILVA *et al*., 2020), além de serem nocivos para espécies de plantas terrestres e organismos invertebrados do solo (TRIQUES *et al*., 2021).

A contaminação oriunda dos agrotóxicos pode ocorrer por meio do escoamento superficial, lixiviação e volatilização, sendo que até 50% das doses utilizadas nas culturas podem ficar adsorvidas no solo (AMBRÓSIO, 2012). De acordo com Morini *et al.* (2017), a lixiviação é considerada uma das principais rotas de contaminação das águas superficiais e subterrâneas, uma vez que até 2% das doses de agrotóxicos aplicadas podem ser carreadas com as chuvas. As projeções feitas pela USEPA (2020), em relação à produção de açúcar e etanol, mostraram que haverá uma expressiva e contínua utilização de agrotóxicos, o que representa efeitos a curto, médio e longo prazo em relação aos danos ambientais decorrentes dessa prática e dos processos de transporte dos contaminantes nos sistemas terrestres e aquáticos. Portanto, é fundamental a utilização e implementação de técnicas efetivas de remediação de solos contaminados por agrotóxicos, de forma a minimizar os impactos.

Diante desse cenário, o biochar, ou biocarvão, se apresenta como um potencial substrato alternativo para a diminuição de solos contaminados com agrotóxicos. Segundo Ogura *et al.* (2021), o biochar é um material carbonáceo produzido por pirólise em altas temperaturas e tem como uma das suas principais características um elevado potencial de sorção de contaminantes. Nesse estudo,

os autores revisaram o potencial de sorção de agrotóxicos em biochar feito com resíduos de culturas como cana-de-açúcar, milho, arroz e trigo; os autores indicaram que, apesar da elevada produção de cana-de-açúcar no país, a utilização do biochar feito a partir do bagaço da cana-de-açúcar na remediação de solos contaminados ainda é incipiente, embora resultados satisfatórios em relação à sua eficiência já tenham sido apresentados. Por exemplo, Azevedo (2016) e Romero (2018) mostraram resultados favoráveis ao utilizarem o biochar da cana-de-açúcar para o aumento da capacidade de sorção do solo e na recuperação de solos contaminados por agrotóxicos. Azevedo (2016) concluiu que a adição de carvão de cana-de-açúcar ao argissolo aumentou a capacidade de sorção do herbicida clomazone, reduzindo o tempo de meia vida do agrotóxico de 139 para 86 dias, enquanto Romero (2018), obteve Relação de Sorção (RS) no valor de 139,93 do agrotóxico indaziflam em solo, evidenciando que o biochar da cana-de-açúcar possui capacidades satisfatórias em reter o agrotóxico. Ogura *et al.* (2021) e Lima *et al.* (2022) apontaram que ainda existe uma lacuna em relação a aplicação do biochar para diminuir a ecotoxicidade dos solos utilizando bioindicadores ecotoxicológicos.

Em síntese, a relevância em avaliar o potencial uso do biochar da cana-de-açúcar para diminuir a toxicidade de solos contaminados com os agrotóxicos 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura, destaca-se por: (I) avaliar os efeitos ecotoxicológicos dos agrotóxicos em condições de contaminação com múltiplos estressores (e.g., agrotóxicos em mistura), visto seu progressivo e diversificado uso; (II) associar maior sustentabilidade na indústria sucroalcoleira ao adicionar mais um destino aos resíduos oriundos da produção da cana-de-açúcar, (III) suprimento da lacuna existente sobre estudos que associe ensaios de ecotoxicidade dos agrotóxicos com a utilização do biochar, e (IV) devido ser um método que já apresentou resultados satisfatórios reportados pela literatura.

Portanto, diante do exposto, essa proposta de pesquisa tem o intuito de responder a seguinte pergunta: “qual o potencial de utilização do biochar, feito a partir da palha da cana-de-açúcar, na redução da ecotoxicidade de solos contaminados com o herbicida DMA® 806 BR (i.a. 2,4-D) e do inseticida Regent® 800 WG (i.a. fipronil)?

2. HIPÓTESES

Geral

I. O biochar feito a partir da palha da cana-de-açúcar possui capacidade de diminuir a ecotoxicidade dos solos contaminados com os agrotóxicos Regent® 800 WG (i.a. fipronil) e DMA® 806 BR (i.a. 2,4-D), isolados e em mistura.

Específicas

I. Os agrotóxicos Regent® 800 WG e DMA® 806 BR, isolados e em mistura, podem exercer efeitos tóxicos sob as espécies não-alvos de organismos *Enchytraeus crypticus* e *Eruca sativa* e *Daphnia similis*.

II. O biochar produzido a partir da palha da cana-de-açúcar possui capacidade de diminuir a ecotoxicidade de solos contaminamos com os agrotóxicos Regent® 800 WG e DMA® 806 BR em organismos aquáticos e terrestres.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

O objetivo geral desta pesquisa foi avaliar o potencial de uso do biochar, produzido a partir da palha da cana-de-açúcar, na diminuição de ecotoxicidade de solos contaminados com os agrotóxicos Regent® 800 WG (i.a. fipronil) e DMA® 806 BR (i.a. 2,4-D), de forma isolada e em mistura.

3.2. Objetivos específicos

I. Avaliar a redução de ecotoxicidade de solos contaminados com agrotóxicos Regent® 800 WG (i.a. fipronil), DMA® 806 BR (i.a. 2,4-D), isolados e em mistura, por meio da análise dos efeitos biológicos da exposição dos organismos terrestres não-alvo *Enchytraeus crypticus* e *Eruca sativa*.

II. Avaliar a redução de ecotoxicidade dos agrotóxicos Regent® 800 WG (i.a. fipronil) e DMA® 806 BR (i.a. 2,4-D), isolados e em mistura, por meio da análise dos efeitos biológicos da exposição do microcrustáceo invertebrado *Daphnia similis*.

4. SÍNTESE DA BIBLIOGRAFIA FUNDAMENTAL

4.1. Utilização do 2,4-D e fipronil na cultura de Cana-de-açúcar

O termo agrotóxico é regulamentado pelo Decreto nº 4074/02, como:

> produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos; substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento (BRASIL, 1989).

Segundo Andrei (2017), os agrotóxicos são subdivididos e classificados de diversas formas. Quanto ao seu modo de ação podem ser: algicidas, que utilizados no controle de algas em corpos d'águas e piscinas; antimicrobiano, no controle de microrganismos patogênicos; atrativos, utilizados na atração de pragas específicas usando feromônios naturais, confundindo o comportamento de acasalamento de insetos; biopesticida, que são substancias naturais com propriedades pesticidas; desfolhante, usados no processo de colheita fazendo com que haja queda das folhagens; dessecante, utilizados no processo de secagem de plantas e/ou insetos; moluscicida, aplicado no controle de moluscos; nematicida, para controle de organismos do solo e nematóides; ovicida, para controle de ovos de insetos; piscicida, para controle de peixes; regulador de crescimento, atuando no aceleramento ou retardo do crescimento vegetal; repelente, para repelir mosquitos, carrapatos e outros animais; rodenticida, usados no controle de roedores; herbicidas, usados para controlar plantas invasoras: inseticidas, usados no controle de insetos indesejados; fungicidas, utilizados no controle de fungos e bactericidas, aplicados para o controle de bactérias.

Para fins toxicológicos são adotados critérios baseados no Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (GHS), o qual classifica os agrotóxicos em 6 categorias. Categoria I: produto Extremamente Tóxico - faixa vermelha; Categoria II: Produto Altamente Tóxico - faixa vermelha; Categoria III: Produto Moderadamente Tóxico - faixa amarela; Categoria IV: Produto Pouco Tóxico - faixa azul; Categoria V: Produto Improvável de Causar Dano Agudo - faixa azul; e VI: Não Classificado - Produto Não Classificado - faixa verde (Agência Nacional de Vigilância Sanitária, ANVISA, 2019). Já para fins ecotoxicológicos, são adotados os critérios baseados pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e

Recursos Naturais (IBAMA), pela Portaria n° 6 de 2012, que dispõe sobre o efeito e potencial de periculosidade ambiental dos agrotóxicos em organismos dos compartimentos ar, água e solo. Tal portaria classifica os agrotóxicos com classe I (produto altamente perigoso), classe II (produto muito perigoso), classe III (produto perigoso) e classe IV (produto pouco perigoso) (IBAMA, 1996).

Segundo Fontanetti (2017), a utilização de agrotóxicos no Brasil iniciou-se por volta da década de 1920, os quais eram aplicados inicialmente para controle de parasitas e no combate de vetores de transmissão de doenças. Todavia, com a Revolução Verde, o uso desses produtos aumentou de forma exponencial na agricultura, visando ao aumento da qualidade dos produtos agrícolas, ao rendimento da produção e à proteção das culturas contra insetos, fungos e pragas (VELKI *et al.*, 2017). Dentre os diversos agrotóxicos utilizados na cultura de cana-de-açúcar, destacam-se o herbicida 2,4-D, também conhecido como ácido diclorofenoxiacético ($C_8H_6Cl_2O_3$), e o fipronil ($C_{12}H_4Cl_2F_6N_4OS$) (CHRISTOFOLETII *et al.*, 2017).

O 2,4-D pertence ao grupo de herbicidas que possuem como mecanismo de ação a mimetização de auxinas, também conhecidas como auxinas sintéticas. Esse grupo é constituído pelos herbicidas 2,4-D, fluroxypyr, MCPA, picloram, quinclorac, triclopyr e dicamba, e se classificam em ácido benzoico, ácido fenoxicarboxílico, ácido carboxílico e ácido quinolino carboxílico (SILVA *et al.*, 2020). Pela classificação GHS, o 2,4-D é considerado como perigoso, carcinogênico, tóxico e/ou até letal quando ingerido, podendo causar reações alérgicas na pele, lesões oculares, toxicidade para órgãos-alvo específicos e perigos para a vida aquática, com efeitos duradouros. De acordo como Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia - PubChem (2022a), o 2,4-D possui solubilidade em água de 677 ppm a 25°C e 540 a 20°C, densidade de 1,42 kg/m^3 a 20°C, sendo considerado como fortemente ácido. No solo tem mobilidade muito alta com um Coeficiente de Partição de Carbono Orgânico (K_{oc}) de 20 a 136, e a volatilização com base na Constante de Henry de 0,75x10^{-8} atm-cu m/mol indica que o 2,4-D é essencialmente não volátil na água e nas superfícies úmidas do solo. A taxa de degradação no solo é afetada pelas condições do pH, matéria orgânica, temperatura e pela concentração da substância. Já a biodegradabilidade em água dependerá da quantidade de nutrientes presentes. Possui meia-vida de 7 a 14 dias no solo e de 4 a 7 dias em água, uma constante de dissociação (pka) de 2,73, um K_{ow} de 2.81 e um valor de pressão de vapor (PV) de 1.40x10^{-7} mm Hg a 20°C e 1.86x10^{-2} mPa a 25°C. De acordo com a United States Environmental Protection Agency - USEPA (2020), a adsorção aniônica de 2,4-D é afetada pela mineralogia do solo (em particular pelo teor de óxido de ferro e alumínio), o teor de

alumínio trocável e o teor de fosfato do solo. A adsorção tende a se intensificar com o aumento do conteúdo orgânico e diminuição do pH do solo. Assim, pode ocorrer dessorção do 2,4-D em solos minerais, mas não naqueles que contêm muita matéria orgânica.

O mecanismo de ação do 2,4-D ocorre pela desregulação do crescimento e morte subsequente por divisão celular descontrolada em tecido vascular. Esse herbicida tem como características de utilização seu baixo custo, eficiência, amplo espectro e alta solubilidade em água. O 2,4-D é o segundo herbicida mais amplamente utilizado na cultura de cana-de-açúcar (SILVA *et al.*, 2020). Este herbicida tem capacidade de percolar no solo, influenciando a qualidade do solo e das águas subterrâneas, além de poder ser transportado pelas águas das chuvas para outros ambientes (e.g., lixiviação e escoamento superficial). Mesmo diante da sua relativa baixa persistência e sorção em solo, é necessária sua avaliação no meio ambiente, uma vez que, em conjunto com outras substâncias, suas características ambientais podem ser alteradas. A população em geral pode estar exposta ao 2,4-D por meio da inalação do ar ambiente, da ingestão de alimentos e água potável e do contato dérmico com produtos de consumo contendo esse herbicida (PUBCHEM, 2022).

De acordo com relatório o IBAMA, referente aos valores ecotoxicológicos, o 2,4-D possui um fator de bioacumulação em peixes da espécie *Danio rerio* de 1,308 e 0,987 em concentrações teste de 2,12 e 15,85 mg/L, respectivamente. Possui uma Concentração de Efeito para 50% dos organismos (CE_{50}) de 127,63 mg/L para a espécie de alga *Selenastrum capricornutum*, Concentração Letal para 50% dos organismos (CL_{50}) de 309,06 mg/Kg para a espécie de minhoca *Eisenia foetida* e Dose Letal para 50% dos organismos (DL_{50}) para espécie de abelha *Apis mellifera* de 100 µg/abelha. Já em relação aos microcrustáceos, para a espécie *Daphnia magna* possui um CE_{50} de 25 mg/L, Concentração de Efeito Não Observável (CENO) de 79 mg/L, Concentração de Efeito Observável (CEO) de 151 mg/L e Valor Crônico (VC) de 109 mg/L e para a espécie *Daphnia similis* uma CE_{50} de 2,6 mg/L. Para a espécie de peixe *D. rerio*, possui uma CL_{50} de 107,02 mg/L, CENO de 3,2 mg/L, CEO no valor de 5,6 mg/L e um VC de 4,23 mg/L (IBAMA, 2019).

É notório que o 2,4-D é nocivo para organismos não-alvo no ecossistema aquático e terrestres, como vem sendo observado por diversos autores que comprovam tal impacto. Triques *et al.* (2021), por exemplo, evidenciaram que, após exposição a doses recomendadas do herbicida 2,4-D (2,35 mg/kg), a germinação das espécies não-alvo *Raphanus sativus* var *acanthioformis* e *Allium cepa* foram afetadas em 95% e 90%, respectivamente. Ao analisar a influência do 2,4-D em girinos

da espécie *Physalaemus cuvieri*, Santos (2020) atestou que a concentrações de 52,5 μg/L são capazes de induzir a mortalidade da espécie de forma significativa, uma vez que a concentração de 100,0 μg/L de 2,4-D possui capacidade de interferir negativamente na atividade natatória dos girinos, bem como induzir anormalidade nucleares.

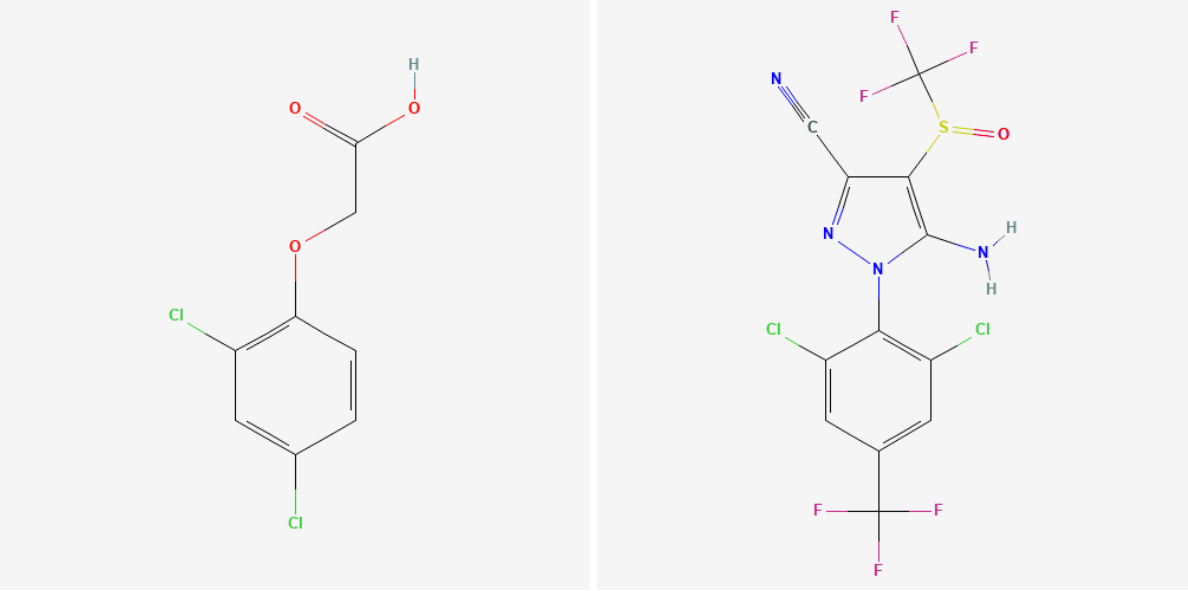
De acordo com Barbosa (2020), o fipronil é um inseticida do grupo químico pirazol, classificado pela ANVISA (2019) como altamente tóxico (classe toxicológica II), sendo facilmente encontrado no mercado, sob diversas formas (pó, emulsões e grânulos). Segundo Barbosa (2020), o fipronil é amplamente utilizado no tratamento do solo para as culturas de cana-de-açúcar para combater curuquerê, tamanduá-da-soja, bicudo, vaquinha-verde amarela, tripés, cupim e outros. Segundo relatório do IBAMA, o fipronil foi o 30° ingrediente ativo mais comercializado no Brasil em 2018, com 1.689,71 toneladas vendidas, com maior consumo no estado de São Paulo (IBAMA, 2018).

O fipronil é considerado pela classificação GHS como perigoso, com efeito de toxicidade aguda quando em contato com a pele ou quando inalado, podendo causar danos aos órgãos quando exposto a longos períodos. Também possui toxicidade alta para organismos específicos não-alvo, sendo perigoso para a vida aquática, com efeitos duradouros. De acordo com PubChem (2022b), o fipronil possui baixa solubilidade em água: 1,9 mg/L a 20°C (pH 5), 2,4 mg/L (pH 9) e densidade de 1,47-1,62 kg/m^3 a 20°C. No solo tem pouca ou nenhuma mobilidade ($K_{oc:}$ 825 a 6863), sendo o K_{oc} dependente da quantidade de matéria orgânica presente. A volatilização com base na Constante de Henry é de 8,4x10^{-10} atm-cu m/mol e indica que o fipronil é essencialmente não volátil na água e nas superfícies úmidas e secas do solo. O fipronil é estável à hidrólise em condições ácidas (pH 5,5) e neutras (pH 7). A taxa de hidrólise do fipronil em condições alcalinas foi medida e verificou-se que a degradação aumentou proporcionalmente com o aumento do pH. A meia-vida correspondente para a reação de hidrólise é de 770 h a pH 9, 114 h a pH 10, 11 h a pH 11 e 2,4 h a pH 12 (BOBE *et al.*, 2001). Segundo a PubChem (2022), a biodegradabilidade varia de 4,6 a 18,5 com base em meias-vidas de 25,1 a 91,2 dias. Possui meia-vida superior a 100,0 dias em pH 5,5 e 7,0, de 32,08 dias em pH 9,0, de 4,75 dias em pH 10,0, de 1 h em pH 11,0 e de 2,4 h em pH 12,0 (USEPA (1996). O fipronil possui K_{ow} de 4.0 e um valor de pressão de vapor (PV) de 2,78x10^{-9} mm Hg a 25°C. Na água ele tente a ser adsorvido nos sólidos suspensos e no solo irá depender da matéria orgânica presente. Além disso, Portruneli (2020) explica que fipronil possui um alto índice de bioconcentração em organismos aquáticos, como 12,4 kg/L encontrado após exposição da espécie *Prochilodus lineatus* ao inseticida.

O mecanismo de ação do fipronil se dá pela paralisia, convulsão e morte dos insetos, através do bloqueamento dos canais de cloreto regulados pelos receptores do ácido gama aminobutírico (GABA, do inglês *Gamma-AminoButyric Acid*) no sistema nervoso central dos organismos (BARBOSA, 2020). De acordo com um relatório do IBAMA, referente aos valores ecotoxicológicos, o inseticida fipronil possui um fator de bioacumulação na espécie de peixes de 321 quando testado em solução com concentração de 850 ng/L. Para a espécie de alga *Selenastrum capricornutum* possui um CE_{50} de 139 mg/L. Para a espécie de minhoca *Eisenia foetida* possui uma CL_{50} de 2388,8 mg/Kg e para a abelha *Apis mellifera* uma DL de 0,00417 µg/abelha. Já em relação aos microcrustáceos, apresenta CENO de 18 µg/L, CEO de 32 µg/L e VC de 24 µg/L *para Ceriodaphnia dubia*. Para a espécie de peixe *Hyphessobrycon callistus* possui uma CL_{50} de 326 µg/L e para a espécie *Brachydanio rerio* uma CENO de 56 µg/L, CEO de 100 µg/L e VC de 74,83 µg/L (IBAMA, 2019).

Diversos autores vêm estudando as implicações e os efeitos ecotoxicológicos do fipronil em ambientes aquáticos e terrestres sobre organismos não-alvo, que podem estar expostos aos agrotóxicos. Moreira *et al.* (2021), por exemplo, evidenciaram que o fipronil se mostrou tóxico quando em contato com a espécie de peixe *Danio rerio*, uma vez que o comportamento natatório dos organismos e a atividade enzimática foram significativamente alterados. Pinto *et al.* (2021) também evidenciaram a toxicidade do fipronil para o inseto *C. sancticaroli*, verificando diminuição da sobrevivência de larvas, do crescimento larval e da biomassa em 72%, além da diminuição da largura da cápsula cefálica nas duas maiores concentrações testadas (426 µg/L). O fipronil foi banido em 2019 no estado de Santa Catarina através da portaria da Companhia Integrada de Desenvolvimento Agrícola de Santa Catarina (CIDASC), ao ser associado com a morte de 50 milhões de abelhas no estado em menos de um mês (COELHO, 2021).

Figura 1. Estrutura química do 2,4-D (esquerda) e do fipronil (direita).



Fonte: PubChem (2022)

4.2. Contaminação e técnicas de redução de toxicidade de áreas poluídas por agrotóxicos

Segundo a Lei N°6938/1981, o termo poluição é utilizado para definir a degradação da qualidade ambiental oriunda de atividades que direta ou indiretamente afetem de forma negativa a biota, as condições estéticas ou sanitárias do meio ambiente, prejudique a segurança, saúde e bem estar da população, criem condições adversas as atividades socioeconômicas e que lancem matérias ou energia em desacordo com os padrões ambientais (BRASIL, 1981).

Já o termo contaminação é usado para definir a presença de substâncias químicas na água, solo e ar, oriunda das atividades humanas, cujas concentrações possam restringir ou impedir a utilização de um recurso ambiental, definidas com base na avaliação de risco à saúde humana, assim como aos bens a proteger (saúde, bem estar da população, fauna, flora, qualidade do solo, água e ar, interesses de proteção à natureza ordenação territorial e planejamento regional e urbano, bem como segurança e ordem pública) (BRASIL, 1981; BRASIL, 2009). Remediação, de acordo com a Resolução CONAMA N°420/2009, é definido como a aplicação de técnicas para remoção, redução ou contenção de contaminantes presentes no meio, a fim de reabilitar uma área contaminada com intuito de tornar o risco tolerável para o uso declarado ou futuro da área.

A contaminação no ambiente por agrotóxicos pode acontecer de diversas formas, como na aplicação direta do produto nas lavouras, por meio de embalagens que entram em contato com o solo sem a lavagem correta, por meio hídrico na utilização do produto diluído em água para

aplicação na cultura, pela deriva das substâncias que ficam contidas em alguns compartimentos das plantas e por meio da dessecação das culturas de cobertura (STEFFEN *et al.*, 2011). A poluição em áreas contaminadas por agrotóxicos depende de diversos fatores, como as características físico-químicas das substâncias empregadas, fazendo parte destas a solubilidade em água, K_{oc}, mobilidade, Coeficiente de Partição Octanol/Água (K_{ow}), volatilidade, meia-vida (DT_{50}), constante de dissociação (pKa) e pressão de vapor (PV) (VEIGA, 2017). A solubilidade em água representa a quantidade máxima que uma substância dissolve em um litro de água. Os autores Bortoluzzi *et al*. (2006) explicam que tal parâmetro é importante uma vez que os agrotóxicos podem infiltrar no solo, influenciando a qualidade das águas subterrâneas, além de poder ser carreados pelas águas pluviais aos corpos d'águas superficiais adjacentes. De acordo com a USEPA (2012), a solubilidade das substâncias varia de > 10.000 mg/L (muito solúvel) a < 0.1 mg/L (solubilidade desprezível). O K_{oc} representa a tendência de uma substância em ser adsorvida pelo solo, sendo independente das características do meio. A autora Veiga (2017) *apud* Santos (2015) explica que substâncias com K_{oc} alto tendem a ser fixadas no solo mais facilmente e possuem baixa mobilidade para água. A USEPA (2012) classifica o K_{oc} de > 4.5 (sorção muito forte ao solo) a <1.5 (sorção desprezível).

O K_{ow} representa a tendência de uma determinada sustância em se distribuir entre o octanol e a água. Substâncias com baixos valores de K_{ow} podem se distribuir facilmente na água e no ar, enquanto substâncias com altos valores de K_{ow} possuem maior tendência de bioacumular em sedimentos, solo e biota (VEIGA, 2017). A classificação de lipossolubilidade (log de K_{ow}) é definida como >1 altamente solúvel (hidrofílico), >4 pouco solúvel (hidrofóbico), >8 dificilmente biodisponível e >10 (não biodisponível) (USEPA, 2012). O grau de volatilidade é classificado de acordo com a Constante da Lei de Henry (HCL), do qual é levado em consideração a solubilidade, pressão de vapor e peso molecular de uma substância em uma solução na água ou no ar (VEIGA, 2017). A volatidade é classificada de $>10^{-1}$ atm-m^3/mol (muito volátil) até $>10^{-7}$ atm-m^3/mol (não volátil) (USEPA, 2012). A meia-vida dos elementos representa o tempo que a substância irá permanecer nos cursos d'águas, indicando a degradação das substâncias, que pode variar de acordo com pH. Tal parâmetro está diretamente relacionado com o fator de bioconcentração (BCF), uma vez que ele representa a tendência da substância em se acumular em um organismo a partir da água, sendo proporcionalmente aos valores de K_{ow} (VEIGA, 2017). A capacidade de dissociação (pKa) expressa a capacidade de dissociação da molécula do agrotóxico, em um valor de pH no qual ocorre 50% de dissociação. Por fim, a pressão de vapor (PV) expressa a facilidade das moléculas em volatilizar mediante diferentes temperaturas.

Para entender o comportamento dos agrotóxicos no meio, os autores Steffen *et al.* (2011) mencionam que é necessário também avaliar as características do solo. De acordo com os autores, além de o fator climático ser uma importante condição para o agrotóxico atingir seu objetivo de forma efetiva, existe também uma vasta e complexa dinâmica física, química e biológica do solo. A presença de matéria orgânica, óxidos de alumínio, ferro e manganês possui capacidade de complexar e reter metais e moléculas orgânicas. Dessa forma, podem ocorrer inativações de íons por meio de reações de adsorção, precipitação e complexação, decompondo compostos orgânicos e diminuindo a sua toxicidade. Por outro lado, fatores como pH, capacidade de troca de cátions, presença de microrganismos, área superficial específica, teor de umidade e porosidade também devem ser levados em consideração.

Após a aplicação, as moléculas dos agrotóxicos são depositadas na parte superior do solo, podendo seguir diferentes rotas, atingir diferentes ecossistemas e influenciar a dinâmica de inúmeros seres vivos, responsáveis pela ciclagem de nutrientes essenciais para plantas e organismos em outros níveis tróficos (STEFFEN *et al.*, 2011). Esse movimento é impulsionado por meio da difusão e fluxo de massa em água, associado as características físico-químicas desses contaminantes, além do potencial de bioacumulação e biomagnificação nos organismos vivos. Alguns agrotóxicos podem deixar seus ambientes alvos, por meio da volatilização (e.g., substâncias com peso molecular baixo), lixiviação, reações químicas e degradação microbiana. Entretanto, muitas destas substâncias não são biodegradáveis, podendo ser transferidas ao longo da cadeia alimentar. O preparo do solo também é um fator relevante quando analisada a contaminação/remediação das áreas por agrotóxicos, uma vez que preparos inadequados, sem a presença de matéria orgânica, deixam os solos expostos e mais suscetíveis à degradação, com consequente erosão e possibilidade de escoamento superficial (STEFFEN *et al.*, 2011).

Diante desse cenário, pesquisadores estão evidenciando contaminações e impactos por agrotóxicos nos compartimentos aquáticos e terrestres. Marques *et al.* (2020), por exemplo, mostraram que agrotóxicos com os ingredientes ativos ácido giberélico e amicarbazona possuem capacidade de lixiviação, com potencial de contaminação das águas subterrâneas. Bortoluzzi *et al.* (2006) comprovaram a presença de três ingredientes ativos (i.e., imidacloprid, atrazina e clomazone) em pelo menos uma das amostras de águas superficiais de córregos limítrofes a áreas onde foram utilizados agrotóxicos. Giordani *et al.* (2020) salientaram que o agrotóxico Comet (ingrediente ativo - i.a. piraclostrobina) se mostrou tóxico para a espécie de minhoca *E. andrei*, reduzindo suas taxas de reprodução e afetando processos no solo, como decomposição da matéria

orgânica e ciclagem de nutrientes. Morro (2021) verificou concentrações traço dos agrotóxicos trifluralina e clorpirifós em solo de ambiente agroecológicos e convencionais utilizados para plantar morangos, mostrando sua capacidade de incorporação dos agrotóxicos de 12,8% a 23,8%. Além disso, a autora explicou que os agrotóxicos encontrados influenciaram nas características solo, como no pH e na quantidade de matéria orgânica.

Ruths *et al.* (2021) explicaram que as pragas estão se multiplicando nas lavouras mesmo com a aplicação dos agrotóxicos, devido ao desenvolvendo de mecanismos de resistência aos produtos, o que acarreta uma maior demanda no setor, no desenvolvimento de novos produtos, em novas formulações de agrotóxicos e uma maior comercialização e aplicação nas culturas. Diante disso, ao associar tais informações com as projeções de produção da agricultura, é esperado que haja um incremento na utilização de agrotóxicos e consequente aumento das áreas contaminadas.

De maneira geral, técnicas convencionais de remediação de áreas contaminadas podem ser aplicadas de forma *in situ* ou *ex situ*. Tavares (2013) explica que os métodos de remediação *ex situ* demandam o deslocamento do material (e.g., solo ou água) até o sítio de tratamento, sendo necessário o bombeamento da água no local e/ou retirada do solo. As técnicas *in situ* permitem que o tratamento ocorra no local. Dessa forma, as técnicas *in situ*, em termos técnicos, seriam a melhor opção, visto os custos, tecnologias usadas e eficiências alcançadas (TAVARES, 2013). Dentre as técnicas *ex situ* para remediação de solos contaminados, destacam-se a compostagem, tratamento biológico controlado a fase sólida, *landfarming*, extração de vapores de solo, desalogenação com glicolato, lavagem do solo, incineração, dessorção a altas temperaturas, pirólises, descontaminação com gás quente, dentre outras. Para a remediação de águas contaminadas, tem-se a utilização de biorreatores, redução/oxidação química, *air sparging* (i.e., aspersão de ar), filtragem e troca iônica. Para as técnicas *in situ* são utilizadas a biorremediação, *bioventing* (bioventração), processos metabólicos, enriquecimento com nitrato, fitorremediação (*in* e *ex situ*), lavagem do solo, estabilização, dentre outras (MORAIS *et al.*, 2014).

Em relação às formas de remediação para agrotóxicos, Pires *et al.* (2005) explicam que as técnicas devem englobar eficiência na descontaminação, além de serem sustentáveis, simples na execução, de baixo custo e com um menor tempo demandado no tratamento. Dentre essas técnicas, as principais formas de remediação são a fitorremediação (SANTOS *et al.*, 2018), a utilização de carvão ativado (RODRIGUES *et al.*, 2019), os processos avançados de oxidação química (SOUZA, 2020) e a utilização do biochar (HUANG *et al.*, 2018; CUBA *et al.*, 2018; SILVA, 2015; AZEVEDO, 2016; RAMIREZ, 2018). Alves (2020) explica que a fitorremediação é um método

atrativo de remediação de solos quando comparado a outras tecnologias que necessitam de escavação, incineração, armazenamento *off-site* e lavagens de solos. A autora ainda ressalta que a fitotecnia não perturba a microfauna e flora existentes no solo. Já o carvão ativado é utilizado por ser rico em carbono, ter grande distribuição de tamanho dos poros e devido à variabilidade de matéria prima para sua produção (RODRIGUES *et al.*, 2019). Os processos avançados de oxidação química são utilizados por apresentarem capacidade de reagir com compostos orgânicos e por possuírem excelente potencial de degradação oxidativa, fazendo com que os compostos se mineralizem na maioria dos casos por completo (Souza, 2020). O biochar é incorporado na remediação e no condicionamento dos solos em função da sua capacidade de sequestro e inserção do carbono, sendo útil na sorção de agrotóxicos, na oxigenação do solo e na redução da acidez (ABBAS *et al.*, 2018; Ogura *et al.*, 2021; Chen *et al.*, 2008).

Verifica-se, portanto, que existe uma crescente demanda por pesquisas no setor da agricultura e na remediação de áreas contaminadas por agrotóxicos, a fim de desenvolver novas tecnologias, descobrir técnicas alternativas de remediação, incluir a economia circular nos processos e melhorar as eficiências de técnicas já utilizadas para que ocorra uma melhor proteção dos ecossistemas, visando à manutenção da diversidade e dos serviços ecossistêmicos associados.

4.3. Biochar a partir da Cana-de-açúcar

Segundo Beesley *et al*. (2011), o biochar é oriundo da carbonização de produtos orgânicos como resíduos agrícolas (milho, arroz, trigo, cana-de-açúcar), materiais lenhosos e biossólidos, obtido por meio da pirólise em altas temperaturas (entre 350 e 1200°C), em um ambiente sem a presença de oxigênio. Ogura *et al.* (2021) explicam que o biochar possui uma alta capacidade de sorção devido a diversos fatores, como sua estrutura de poros, alta capacidade de troca iônica, sua área de superfície específica (ASE) e por ser rico em carbono. Devido às suas características, o biochar vem sendo utilizado na remediação de solos contaminados, na melhoria da qualidade de solos na agricultura, no sequestro de carbono e na produção de bioenergia (ABBAS *et al.*, 2018). Seus mecanismos de ação se dão pela imobilização e redução do transporte e biodisponibilidade de agrotóxicos e poluentes orgânicos e inorgânicos no solo, na adsorção de agrotóxicos utilizados na agricultura, no aumento da capacidade de retenção de água e teor de nutrientes, além da melhoria das propriedades de aeração e estimulação da microbiota do solo, favorecendo a fertilidade e os rendimentos das culturas.

Estudos recentes evidenciaram que o biochar possui capacidade eficiente para imobilização de substâncias orgânicas e inorgânicas em ambientes aquáticos e terrestres. Abbas *et al.* (2018) mencionam que o biochar é eficiente e mais viável quando comparado a outros adsorventes, como o carvão ativado, ou quando comparado a técnica *ex situ*. Diversos trabalhos, como de Cuba *et al*. (2018), Huang *et al.* (2018) e Azevedo (2016), têm mostrado a eficiência de diferentes tipos de biochar na remoção/diminuição de poluentes orgânicos, como compostos orgânicos voláteis, corantes aromáticos, antibióticos, bifenil policlorado (PCB), hidrocarbonetos poliaromáticos (PAHs), agroquímicos e poluentes inorgânicos como sulfetos, amônia, nitrato, fosfato e metais potencialmente tóxicos.

Conforme mencionado por Beesley *et al*. (2011) e Abbas *et al.* (2018), a aplicação do biochar depende de alguns fatores importantes como: tamanho das áreas de superfície, capacidade de troca iônica, capacidade de adsorção e microporosidade, bem como seus diferentes mecanismos envolvidos, como precipitação, enchimento de poros, interação eletrostática, porcionamento e sorção. As características de produção do biochar também são atributos relevantes ao se avaliar a capacidade de sorção dos poluentes, uma vez que as temperaturas de pirólise, dosagens, tempo de contato, pH, tipo da matéria prima e processo de envelhecimento, influenciam diretamente sua eficiência. A relação entre as características do biochar com os mecanismos envolvidos dão suporte para as ligações de compostos polares que, com a ajuda de grupos funcionais carregados na superfície do biochar, restringem e imobilizam agroquímicos e metais potencialmente tóxicos na sua superfície.

Chen *et al.* (2008) e Ahmad *et al.* (2014) explicaram que a sorção dos contaminantes pelo biochar ocorre devido à sua grande área de superfície e distribuição de tamanho de poro, que é influenciada diretamente pela temperatura de pirólise. Tal temperatura altera a grau de carbonização e reduz a abundância de matéria orgânica amorfa; todavia, de acordo com esse autor, alguns trabalhos relataram que tal consequência aumenta a capacidade de adsorção de contaminantes orgânicos, reduzindo assim sua absorção por microrganismos no solo.

Dessa forma, o biochar feito a partir dos subprodutos da cana-de-açúcar (e.g., palha e bagaço) vem se tornando bastante atrativo, visto as projeções de produção de cana-de-açúcar no Brasil, com a consequente e progressiva geração de resíduos da indústria sucroalcooleira (FAO, 2021). A utilização do biochar como alternativa de remediação, e/ou como condicionador do solo, tem elevada importância econômica para a indústria sucroalcooleira, visto que as usinas geram cerca de 200 milhões de toneladas de resíduos por ano (RAMIREZ, 2018). Além dos benefícios

econômicos, a utilização e produção do biochar pode ser entendida como uma alternativa ecológica e sustentável, visto que os resíduos da agricultura, muitas das vezes, são queimados e descartados de forma inadequadas para evitar gastos com transporte, por exemplo. Além disso, ocorre a minimização dos impactos ambientais, a redução da contaminação dos solos e águas por lixiviação dos agrotóxicos e a agregação de valores dos subprodutos da cana-de-açúcar (OGURA *et al.*, 2021; RAMIREZ, 2018; FONSECA, 2020).

Os estudos utilizando o biochar produzido a partir dos subprodutos da cultura de cana-de-açúcar no Brasil ainda são incipientes; todavia, alguns têm avaliado a viabilidade, eficiência e utilização do biochar da cana-de-açúcar na adsorção de agrotóxicos. Segundo Ramirez (2018), o biochar da cana-de-açúcar foi eficiente em adsorver o agrotóxico Indaziflam no solo, diminuindo sua lixiviação, persistência e meia-vida. Cuba *et al*. (2018) também obtiveram resultados satisfatórios na adsorção do glifosato utilizando o biochar de cana-de-açúcar. Em seu trabalho, os autores Fernandes *et al*. (2021) relataram 70% de adsorção do agrotóxico Tiametoxam utilizando biochar da cana-de-açúcar. Huang *et al.* (2018) também obtiveram resultados satisfatórios ao analisar a eficiência do biochar a partir do bagaço de cana-de-açúcar na adsorção do agrotóxico atrazina. Segundo os autores, após a adição de 0,2% e 0,5% de biochar, os coeficientes de sorção (Kd) da atrazina (Ce = 10 mg L − 1) foram aumentados em 26,97% e 79,58%, respectivamente, diminuindo assim sua disponibilidade no solo. Além disso, alguns autores têm testado o biochar para redução de metais potencialmente tóxicos, como Bachir *et al.* (2019), que obteve 20,83% de eficiência de remoção de cádmio após aplicação do biochar feito a partir do bagaço da cana-de-açúcar. Tokhmehchian *et al.* (2020) obtiveram eficiência de 22,2% até 83,3% na remoção de chumbo e de 16,9% a 62,8% na remoção de níquel, utilizando 6% de biochar em relação a quantidade de solo testada.

A relevância da utilização do biochar na diminuição de toxicidade de solos contaminados pelos agrotóxicos ocorre em função da: (I) maior sustentabilidade da indústria sucroalcooleira ao adicionar mais um destino aos resíduos oriundos da produção da cana-de-açúcar, (II) suprimento da lacuna existente sobre estudos que associe ensaios de ecotoxicidade dos agrotóxicos com a utilização do biochar, (III) os estudos sobre a utilização do biochar oriundos da cana-de-açúcar serem recentes e necessitarem de uma maior compreensão e (IV) devido ser um método que já apresentou eficiências quando testados com outros agrotóxicos e substâncias.

Para Ogura *et al.* (2021), as pesquisas sobre a aplicação do biochar na descontaminação de solos enfrentam diversas lacunas e desafios. Dentre os principais desafios tem-se a associação de

ensaios ecotoxicológicos à aplicação do biochar, a avaliação da eficiência da sua utilização, a avaliação da atividade microbiana e suas interações com os agrotóxicos, e o envelhecimento e potencial de dessorção do biochar no meio. Além disso, os trabalhos no Brasil que avaliam a utilização do biochar feito a partir da cana-de-açúcar na remoção dos agrotóxicos 2,4-D e fipronil, são considerados ainda recentes no país. Um breve levantamento referente à utilização de biochar produzido a partir dos subprodutos da cultura da cana-de-açúcar é apresentado no Quadro 1, com ênfase na sua utilização para a remoção de agrotóxicos.

Tabela 1. Revisão bibliográfica relacionada ao uso do biochar da cana-de-açúcar na remediação de agrotóxicos

Autores	Matéria prima	Proporção	Condições de pirólise	Substância	Resultados
Huang *et al*. (2018)	Pontas de cana-de-açúcar picada	0,2% e 0,5%	500°C (5 h)	Atrazina	Após a adição de 0,2% e 0,5% de biochar, os coeficientes de sorção (Kd) da atrazina (Ce = 10 mg/L) foram aumentados em 26,97% e 79,58%, respectivamente, no solo úmido com um baixo nível de carbono orgânico total (COT), enquanto aumentou 31,43% e 60,06%, respectivamente, no solo arrozal com alto teor de COT.
Cuba *et al*. (2018)	Bagaço da cana-de-açúcar	0,1 g	500°C (1 h)	Glifosato	Nos primeiros dois minutos de contato, 30% da concentração inicial foi removida. Após 15 minutos 40 % foi removida (máxima capacidade de adsorção de 3,68 mg^{-1}).
Silva (2015)	Bagaço da cana-de-açúcar	0,25%, 0,5% e 1,0%	400°C (6 h)	Clomazone	As contribuições relativas do carvão para o aumento da sorção nos experimentos foram de 88,4%, 71,1%, 99,9%, 95,4% e 89,4%.
Azevedo (2016)	Bagaço da cana-de-açúcar	5,0 g	400°C (6 h)	Clomazone	Redução do tempo de meia-vida do clomazone de 120 para 86,66 dias.
Ramirez (2018)	Bagaço da cana-de-açúcar	1,0%	500°C (1 h)	Indaziflam	A meia-vida do indaziflam foi de 119 dias em solos sem adição de biocarvão e de 89 dias em solos condicionados com biocarvão. O potencial de contaminação subterrânea de 2,58 para solos não condicionados com biocarvão e para os solos condicionados foi de 1,84. As porcentagens de recuperação do herbicida das amostras de solo variaram entre 79,56 e 106,41%.
Brito *et al.* (2020)	Bagaço da cana-de-açúcar	10 mg	800°C	2,4-D	Remoção máxima de 94,8% e remoção mínima de 22,7%.

Fonte: Autor (2023)

4.4. A abordagem ecotoxicológica na avaliação dos riscos ambientais

O termo Ecotoxicologia foi cunhado por René Truhaut em 1969, tendo como definição: “ramo da Toxicologia preocupado com o estudo de efeitos tóxicos causados por poluentes naturais ou sintéticos, sobre quaisquer constituintes dos ecossistemas: animais (incluindo seres humanos), vegetais ou microrganismos, em um contexto integral" (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

A esfera da Ecotoxicologia é representada também como uma subárea da Biologia e Ecologia que tem como objetivo entender os efeitos, consequências e influências dos agentes tóxicos (xenobióticos) sobre as comunidades e ecossistemas, em diferentes níveis de organização biológica, sendo elas a nível celular, individual ou populacional. Além disso, a Ecotoxicologia busca entender as rotas, destinos e transporte das substâncias nas diferentes vias de transferências (ar, solo, água, biota, sedimento) (NETO, 2018). Na água e no solo os principais mecanismos de transporte dos xenobióticos são: fotólise, hidrólise, biodegradação e oxidação e redução. Na biota são levados em consideração a bioacumulação e metabolismos; nos sedimentos os mecanismos estão associados à hidrólise, degradação microbiana e oxidação/redução, enquanto no ar ocorre através da fotólise, das reações com OH^- (USEPA, 1996).

Segundo Prestes e Vincenci (2019), para avaliar os efeitos de tais substâncias no meio ambiente e estimar os impactos ambientais destas, são utilizados organismos bioindicadores como ferramenta de avaliação, a partir de testes de toxicidade aguda e crônica. Estudos de toxicidade aguda visam demonstrar a ocorrência ou não de efeitos adversos em curto período (e.g., 24 h) por meio de doses únicas ou exposições múltiplas. Nesses testes geralmente são determinadas a Dose Letal Média (DL_{50}) e a Concentração Letal Média (CL_{50}). Os estudos de toxicidade crônica são realizados em um período de vida ou todo ciclo de vida dos organismos teste. Nesses testes, é observada a concentração de efeito não observável (CENO) a fim de avaliar os efeitos subletais e fisiológicos dos organismos, como crescimento e reprodução. Para ambos os testes, é aconselhável utilizar organismos testes de níveis tróficos distintos, visto os diferentes níveis de sensibilidade dos organismos e devido à possibilidade de entender de forma mais abrangente os efeitos sobre o meio (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

As primeiras pesquisas feitas na área de ecotoxicologia no Brasil foram realizadas a partir de 1971, começando com trabalho de Rocha (1971), que teve como propósito de pesquisa verificar se a causa da morte de peixes no rio Atibaia estava relacionada com

efluentes líquidos industriais despejados na região. A partir disso, a ecotoxicologia começou a ser mais estudada, demandando uma maior diversificação dos tipos de organismos testados (peixes, algas, microcrustáceos), o que demandou uma padronização dos testes, feitas pela ABNT em 1987. No estado de são Paulo, os ensaios ecotoxicológicos se iniciaram por volta de 1992 (NETO, 2018).

Dessa maneira, a Ecotoxicologia se faz relevante e necessária para a sociedade e meio ambiente, considerando a enorme diversidade, complexibilidade e diferentes sustâncias químicas liberadas no ambiente. Somente no Brasil, por exemplo, em relação aos agrotóxicos, existe 324 ingredientes ativos e 2749 produtos formulados para ampla utilização na agricultura (AGROFIT, 2022).

A utilização de agrotóxicos colocou as comunidades aquáticas e terrestres em risco, pois organismos não-alvo também estão expostos aos produtos utilizados na agricultura para o controle de pragas, insetos, fungos e outros (AMBROSIO, 2012). Embora tais produtos sejam aplicados diretamente no solo para o controle de organismos-alvo, há um carreamento e disposição de tais substâncias em corpos d'água adjacentes. Ambos os compartimentos possuem comunidades biológicas que vivem e interagem em teias alimentares, sendo considerados organismos não-alvos, os quais são de grande interesse quando se avalia os efeitos adversos dos agrotóxicos (WANG, 2018).

Sendo assim avaliar a ecotoxicidade dos agrotóxicos utilizando bioindicadores ambientais se faz relevante, uma vez entendida a necessidade de avaliar a saúde do ecossistema mediante a presença de substancias xenobióticas. Para isso, diversas metodologias são utilizadas, como estudos laboratoriais a nível de bancada, pesquisas realizadas em modelos ecossistêmicos como micro e mesocosmos e testes *in situ* e *ex situ* (MORAIS *et al.*, 2014).

Após sua aplicação, os agrotóxicos entram em contato direto com o compartimento terrestre, afetando diversos organismos não alvo. Estudo como de Ogura (2023), evidenciam que o inseticida fipronil é capaz de reduzir o tamanho das raízes das espécies *Dolichos lablab*, *Lupinus albus* e *Canavalia ensiformis*, mesmo nas menores concentrações testadas (60 µg/L). Triques *et al.* (2021) observaram que, mesmo em doses menores ao recomendado para a sua utilização, foram comprovados efeitos negativos em espécies de plantas e organismos de solo expostos aos agrotóxicos 2,4-D e fipronil. Quando testada a ½ da dose recomendada nos testes de germinação (2.35 mg/Kg), houve redução na germinação de 90% e 95% para as espécies vegetais *Allium cepa* e *Raphanus sativus*, respectivamente. Para a espécie de

colêmbolo *Folsomia candida*, verificou-se efeitos dos agrotóxicos na sobrevivência e reprodução, mesmo em concentrações bem abaixo da dose recomendada (até 8 vezes menor). Pedro (2008) avaliou os efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos sob a espécie vegetal *A. cepa*, registrando aberrações cromossômicas e a presença de células micronucleadas após exposição aos agrotóxicos.

Os efeitos dos agrotóxicos fipronil e 2,4-D sobre os organismos aquáticos e terrestres estão sendo reportados em diversos estudos. Moreira *et al.* (2021) mostraram, por meio de testes de evitamento com gradientes de agrotóxicos, que a espécie de peixe *D. rerio* evitou as mais altas concentrações de 2,4-D e fipronil testadas (50, 75 e 100 mg i.a./L para o fipronil e 1000, 1500 and 2000 mg i.a./L para 2,4-D) e que a espécie de peixe *Hyphessobrycon eques* evitou concentração mais alta de 2,4-D (2000 mg i.a./L). Os autores também verificaram que houve redução significativa da enzima Acetilcolinesterase (AChE) na espécie *D. rerio,* afetando sua natação e velocidade máxima. Viana *et al.* (2021) também verificou efeitos ao avaliar a toxicidade do 2,4-D e fipronil sob a espécie *D. rerio*. Foram comprovados que o 2,4-D e fipronil bioconcentraram no corpo dos organismos testes, com fator de bioacumulação (BCF) de 1,092 para o fipronil e 1,373 para o 2,4-D. As brânquias dos peixes expostos também tiveram alterações histopatológicas e aumento da área fracional das células cloreto.

Nakagome *et al.* (2006) também demonstraram efeitos tóxicos ao expor a espécie de cladócero *D. magna* aos contaminantes 2,4-D, fipronil e outros. Foram encontrados para o 2,4-D uma CE_{50} de 407,30 mg/L e para o fipronil uma CE_{50} de 0,15 mg/L. Os autores explicam que o fipronil teve maior potencial de impacto ecológico sobre *D. magna* quando relacionado com o 2,4-D, apesar de ambos serem considerados agentes tóxicos. Pinto *et al.* (2021) realizaram ensaios de toxicidade com a espécie bentônica *C. sancticaroli* e relataram a diminuição da sobrevivência larval nas concentrações mais altas testadas com fipronil (0,7 μg/L), sendo que nos testes subletais houve diminuição e consequente redução na biomassa dos organismos em até 72%. Nas maiores concentrações de 2,4-D (426 μg/L) verificou-se a redução da largura da cápsula cefálica, demonstrando ainda efeitos sinérgicos que poderiam potencializar os riscos para os ecossistemas aquáticos quando analisadas as misturas dos agrotóxicos.

Nocelli *et al.* (2019) relataram a diminuição na longevidade de abelhas *Melipone scutellaris* quando expostas a doses comerciais do 2,4-D, indicando que esse herbicida tem capacidade de comprometer a sobrevivência das abelhas de forma direta e que, indiretamente, pode afetar o processo de polinização. Marouani *et al.* (2017) mostraram, por meio da

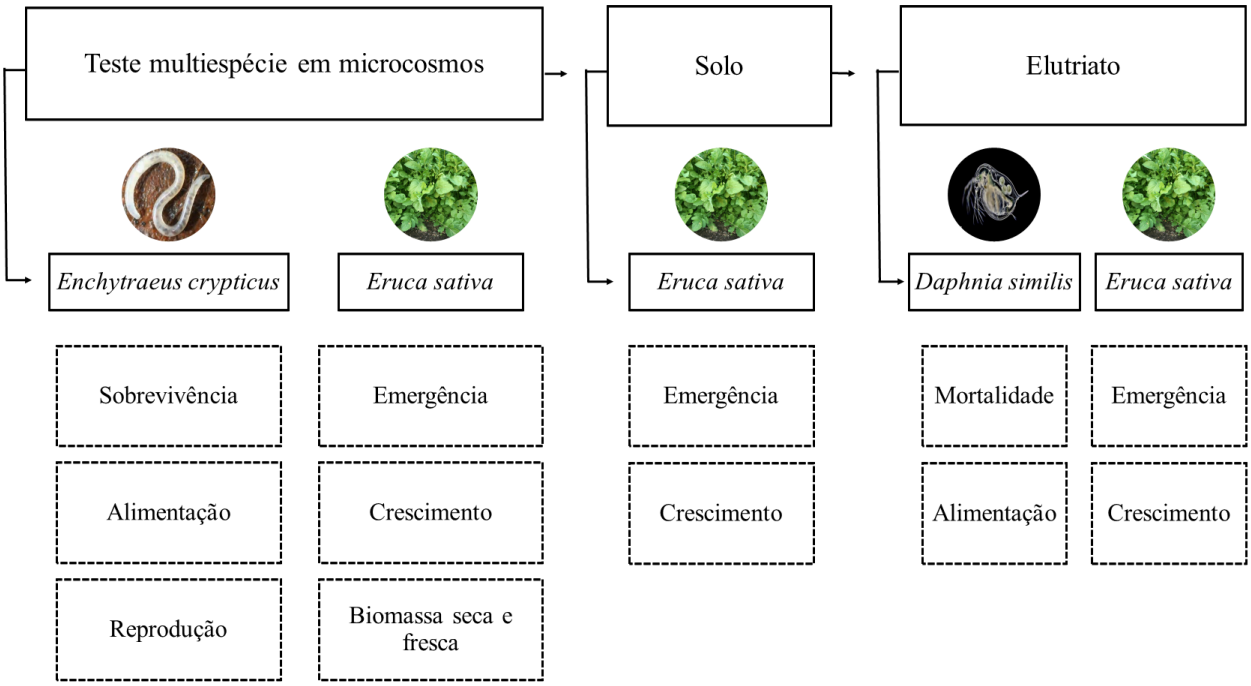
exposição de ratos Wistar ao 2,4-D (100 e 200 mg/espécime), que o agrotóxico foi responsável pela redução significativa do peso corporal, dos testículos, das vesículas seminais e da próstata da espécie testada após 24 dias de exposição. Além disso, ocorreram anormalidades no esperma dos ratos testados em comparação com o controle, indicando a toxicidade do 2,4-D. Tayeb *et al.* (2010) e Bharatiya *et al.* (2020) também obtiveram resultados semelhantes ao analisar os efeitos tóxicos do 2,4-D e fipronil em ratos, evidenciando alterações no fígado e no sistema neurológico, respectivamente. Adicionalmente, os autores verificaram aumento significativo no peso do fígado no final da 4ª semana de exposição, além de indução a ruptura da medula hepática, necrose focal, dilatação dos vasos e núcleo picnótico. Já os efeitos neurológicos evidenciados por Bharatiya *et al.* (2020) foram comprovados após análise da neurotoxicidade causada pela exposição ao fipronil, nos neurônios dopaminérgicos nigroestriatais, responsáveis por causar déficits motores e não motores. Margarido *et al.* (2013) avaliaram respostas de biomarcadores após exposição do agrotóxico fipronil a espécie de girinos *Scinax fuscovarius*. Após exposição, foi evidenciado que a proteína glutationa-S-transferase (GST) foi inibida nos girinos e a atividade da glutationa redutase (GR) variou de acordo com o período de exposição e a concentração de pesticidas.

Portanto, avaliar os efeitos dessas substâncias na biota é extremamente necessário, uma vez que, através desta avaliação é possível estimar quais as consequências nos ecossistemas, evidenciar as implicações e interferências nos ciclos de vida e teias alimentares dos ecossistemas, estimar riscos ambientais e ecológicos, além de sugerir possíveis medidas de mitigação (MOREIRA *et al.*, 2021). Além disso é importante evidenciar que os ensaios ecotoxicológicos também são usados como ferramenta de avaliação de tecnologias de tratamento de solos e águas contaminadas com agrotóxicos, através da comparação dos ensaios de toxicidade de solo/água tratados com o controle. Entretanto, os autores Ogura *et al.* (2021) mencionam que ainda existe uma lacuna em relação a esta avaliação conjunta, referente à eficiência dos tratamentos de solos/água contaminados com agrotóxicos juntamente com ensaios ecotoxicológicos.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida conforme fluxograma apresentado na Figura 2. Os testes multiespécie com organismos de solo foram realizados em microcosmos como unidades experimentais. Os *endpoints* analisados nos microcosmos foram sobrevivência, reprodução e alimentação da espécie de enquitreídeos *Enchytraeus crypticus* (Enchytraeidae: Oligochaeta) e emergência e crescimento da planta *Eruca sativa*. Após os 28 dias de testes *in situ* com os organismos de solo e com a espécie vegetal, o solo do microcosmo foi quarteado para diferentes finalidades. Equivalente a ¼ do solo foi utilizado para análises químicas dos agrotóxicos, testes de germinação com a espécie *E. sativa* e preparo do elutriado para avaliações ecotoxicológicas com a espécie aquática *Daphnia similis* (Crustacea: Daphnidae). O restante do solo (¾) foi utilizado para contagem dos enquitreídeos. Os testes em microcosmos, com solo e elutriato, foram realizados mediante comparação dos tratamentos com o grupo controle e ausência e presença de biochar, avaliando-se o potencial de redução da ecotoxicidade dos agrotóxicos em seus respectivos tratamentos. O tópico 5.5 mostra de forma detalhada o procedimento para análise de cada endpoint avaliado nas respectivas etapas da pesquisa.

Figura 2. Fluxograma do delineamento experimental.



Fonte: Autor (2023)

5.1. Biochar: produção, preparo e caracterização

O biochar utilizado na presente pesquisa foi cedido e caracterizado por Matheus Bortolanza Soares, Doutorando do Programa de Pós-graduação em Solos e Nutrição de Plantas do Departamento de Ciência do Solo, da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, campus Piracicaba. O biochar foi produzido a partir da palha da cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*), resíduo agrícola abundante no Brasil devido à tendência da colheita mecanizada sem queima prévia da cana. Para a produção do biochar, a matéria prima foi colocada em um reator duplo selado para evitar a entrada de O_2. O forno do reator foi aquecido a uma taxa de 5ºC min^{-1} com temperatura final de pirólise de 550 ºC.

A composição elementar do biochar foi determinada de acordo com a EPA 3051A (USEPA, 2007). Para este procedimento, 1 g de biochar foi transferido para tubos de micro-ondas preenchidos com 10 mL de HNO_3 concentrado. Após digestão e filtração, os extratos foram quantificados por espectroscopia de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES). Os teores de carbono e nitrogênio do biochar foram determinados por combustão usando um analisador elementar (LECO 828 Series Combustion - Shimadzu). Os teores de cinzas, carbono fixo e materiais voláteis foram determinados pelo método da mufla (ASTM, 2007). Para determinação destas análises, os cadinhos cerâmicos foram lavados com HCl 9,5% e depois secos. As amostras foram colocadas no forno pré-aquecido a 750 ºC por 10 min e, em seguida, transferidas para o dessecador onde permaneceram até o resfriamento. O conteúdo de cada variável foi calculado pela diferença de massa antes e após o aquecimento.

A área superficial do biochar foi estimada pelo método de sorção de N_2, e então os dados foram ajustados pela isoterma BET (Soares et *al.*, 2022). O potencial de liberação de carbono orgânico dissolvido (DOC) do biochar e o pH do DOC foram determinados de acordo com as diretrizes do guia de métodos analíticos para biochar (Singh et *al.*, 2017). Para determinação do DOC, amostras de 5 g de biochar foram agitadas com 50 mL de água deionizada (1:10 p/v) em um agitador horizontal por 1 h a 21±2 °C, após extração do DOC as amostras foram filtradas em filtro de nylon (0.22 μm) e o teor de DOC foi quantificado em analisador elementar (TOC-L Shimadzu). A área superficial específica foi estimada pela sorção de N_2 e pelo ajuste de isoterma de BET (Song and Guo, 2012).

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada para obter os grupos funcionais de superfície presentes no biochar. Para análise FTIR, as amostras de biochar (n = 3) foram previamente secas e posteriormente montadas em pellets com KBr (diluição de 300:1). As leituras de espectro foram obtidas com resolução de 2 cm^{-1}, varrendo o espectro de 4000 a 500 cm^{-1} (Wang *et al.*, 2019) com a aquisição de 60 varreduras por amostra em equipamento FTIR Alpha Bruker I. Antes da análise das amostras, o equipamento foi calibrado por meio da aquisição de espectro de fundo obtido usando uma amostra de suporte recoberta com ouro. As correções para interferência atmosférica (CO_2 e vapor d'água), subtração de fundo e média espectral foram feitas usando o pacote de *software* OPUS/Mentor. Os espectros foram pré-processados pelo método de suavização de Savitzky-Golay, com polinômio de 15 pontos para reduzir as oscilações eletrônicas e naturais. A morfologia do biochar foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (FEI QUANTA FEG 250) com feixe de 15 kV e aumento de 250x. Para a análise MEV, as amostras foram submetidas a pressão fixa de 5,87 x 10^{-4} Pa.

5.2. Coleta e caracterização do solo

O solo natural foi coletado nas dependências do Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CRHEA), da Escola de Engenharia de São Carlos, da Universidade de São Paulo (EESC/USP), localizado no município de Itirapina, São Paulo, Brasil (22º01’22” S, 43º57’38” W). De acordo com trabalhos anteriores, não há histórico de contaminação por agrotóxicos no local indicado para amostragem (Ogura *et al*., 2023). Toda a caracterização foi feita pelos autores Ogura *et al.* (2022) e Figueiredo *et al.* (2019), conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros físico-químicos analisados para caracterização dos compartimentos de solo.

Parâmetro	Método	Referência
pH	Medidor de pH	(Monteiro; Frighetto, 2000)
Umidade	Gravimetria	(Monteiro; Frighetto, 2000)
Capacidade de armazenamento de água	Gravimetria	(Monteiro; Frighetto, 2000)
Nitrogênio orgânico total	Espectrofotometria	(APHA, 1995)
Fósforo total	Espectrofotometria	(APHA, 1995)
Matéria orgânica	Incineração	(Trindade, 1980)

Metais	Espectrofotometria	(APHA, 1995)
Granulometria	Peneiramento	(ABNT, 2018)
Massa específica	Peneiramento	(ABNT, 2016)
Capacidade de troca de cátions (CTC)	Azul de metileno	(Pejon, 1992)
Substâncias húmicas	Oxidação por combustão catalítica com detecção infravermelha não dispersiva (NDIR)	(IHSS, 2009)
Agrotóxicos 2,4-D e fipronil	LC-MS/MS	(Goulart *et al*., 2020)

Fonte: Adaptado de Ogura *et al*. (2022) e Figueiredo *et al.* (2019)

5.3. Organismos testes, condição de cultivo e sensibilidade

Os invertebrados terrestres *E. crypticus* foram obtidos das culturas estabelecidas no laboratório do NEEA/EESC/USP, as quais têm sido mantidas sob condições controladas de temperatura (20 ± 2 ºC) e fotoperíodo (16L:8E), com manutenção do teor de umidade no substrato (suprimento de água mineral) e disponibilidade de alimento (aveia em flocos finos), de acordo com os procedimentos de cultivo recomendados pela norma ABNT NBR 16387 (ABNT, 2012).

Os organismos da espécie *D. similis* também foram obtidos dos cultivos contínuos estabelecidos no NEEA/EESC/USP, os quais são mantidos em incubadora sob condições controladas de temperatura 20 ± 2 °C e fotoperíodo 16L:8E, com fornecimento de alimento a cada dois dias, utilizando a alga *Raphidocelis subcapitata* (10^5 células/mL) e um complemento alimentar à base de ração fermentada (1 mL/L), seguindo as recomendações das normas ABNT NBR 12713 (ABNT, 2016). Testes de sensibilidade foram realizados mensalmente com a espécie, utilizando as substâncias de referência cloreto de sódio (NaCl), expresso em CE_{50} em 48h.

As sementes de *E. sativa* foram adquiridas em comércio especializado (Feltrin®), com potencial de germinação de 98%. A microalga *R. subcapitata* utilizada no experimento de alimentação com *D. similis* foi obtida de culturas de laboratório preparadas e mantidas conforme OCDE (2011).

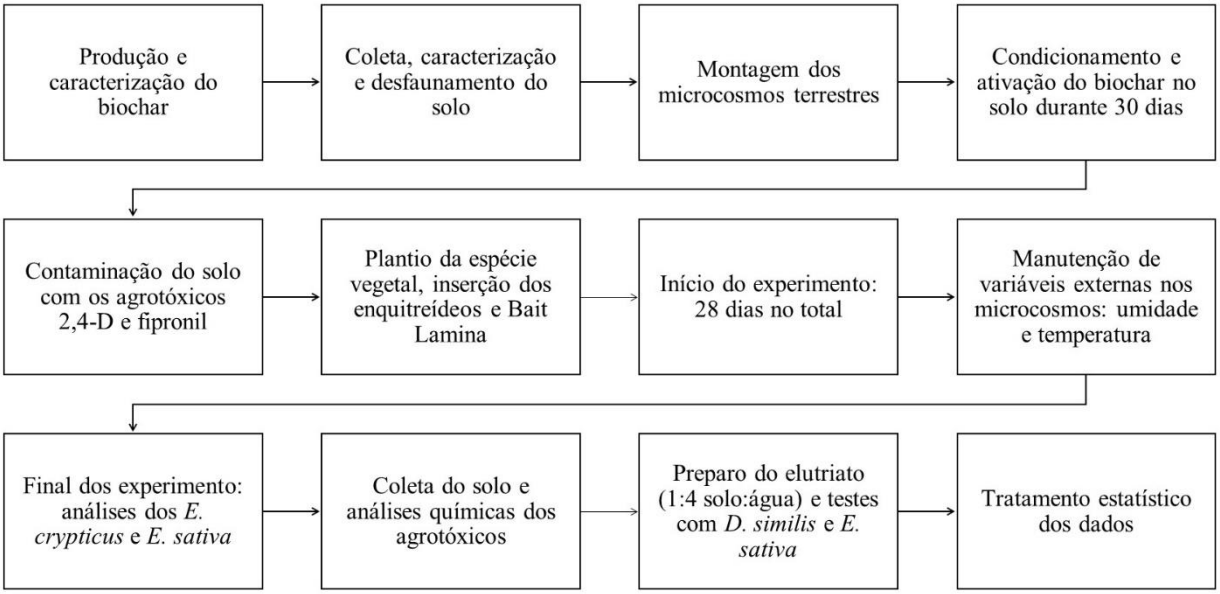
5.4. Microcosmo e teste multiespécie

Para a avaliação da eficiência do biochar em diminuir a ecotoxicidade dos solos contaminados com os agrotóxicos 2,4-D e fipronil, foram construídos microcosmos terrestres em recipiente com capacidade de 1 kg. Os ambientes terrestres foram preparados utilizando recipientes cilíndricos de plástico transparente, com dimensões de 15 cm de diâmetro e 12 cm de altura, posicionados em bancada. Foram utilizadas 32 unidades experimentais no total para tratamento de solo com a presença e ausência do biochar em diferentes tratamentos. As quantidades/massa de biochar testadas nos tratamentos foram escolhidas com base na literatura sobre o tema, sendo estabelecida a dosagem de 3% de biochar (~30g) em relação ao solo (Brito *et al.*, 2020). Foram adotados os seguintes cenários de exposição, com quatro réplicas para cada cenário:

a. Controle (+) somente com o solo e controle (-) com o solo e biochar
b. DMA® 806 BR + solo e DMA® 806 BR + biochar
c. Regent® 800 WG + solo e Regent® 800 WG + biochar
d. Mistura dos agrotóxicos + solo e mistura dos agrotóxicos + biochar

Os microcosmos para os testes em solo foram preenchidos com cerca de 800 g de solo. Inicialmente, o solo já desfaunado foi revolvido de forma homogênea com o biochar para condicionamento e ativação do biochar por 28 dias em incubadora (temperatura 20 ± 2 ºC e fotoperíodo 12L:12E). Feito isso, os agrotóxicos foram aplicados nos respectivos tratamentos após preparação das soluções-estoque. A contaminação foi realizada de forma superficial com auxílio de um Becker de 100 ml. Os agrotóxicos foram aplicados nas unidades experimentais em dosagem única (no início do experimento), e as dosagens teóricas dos agrotóxicos nas soluções-estoque (11,75 mg/L de 2,4-D e 2,0 mg/L de fipronil) foram calculadas baseada nas doses recomendadas do fabricante de ambos os produtos comerciais para cultura de cana-de-açúcar, sendo 1-1,5 L/ha para o herbicida DMA® 806 BR (i.a. 2,4-D) e 192 g/ha para o inseticida Regent® 800 WG (i.a. fipronil). Sendo assim, baseado na quantidade de solo de cada microcosmos, as concentrações previstas dos agrotóxicos em cada recipiente foram de 1,46 mg/L de 2,4-D e 0,25 mg/L de fipronil. Para os experimentos com misturas, foi considerada uma mistura dos agrotóxicos na proporção de 1:1. O passo a passo e etapas envolvidas no experimento com o microcosmo terrestre estão apresentado na Figura 3.

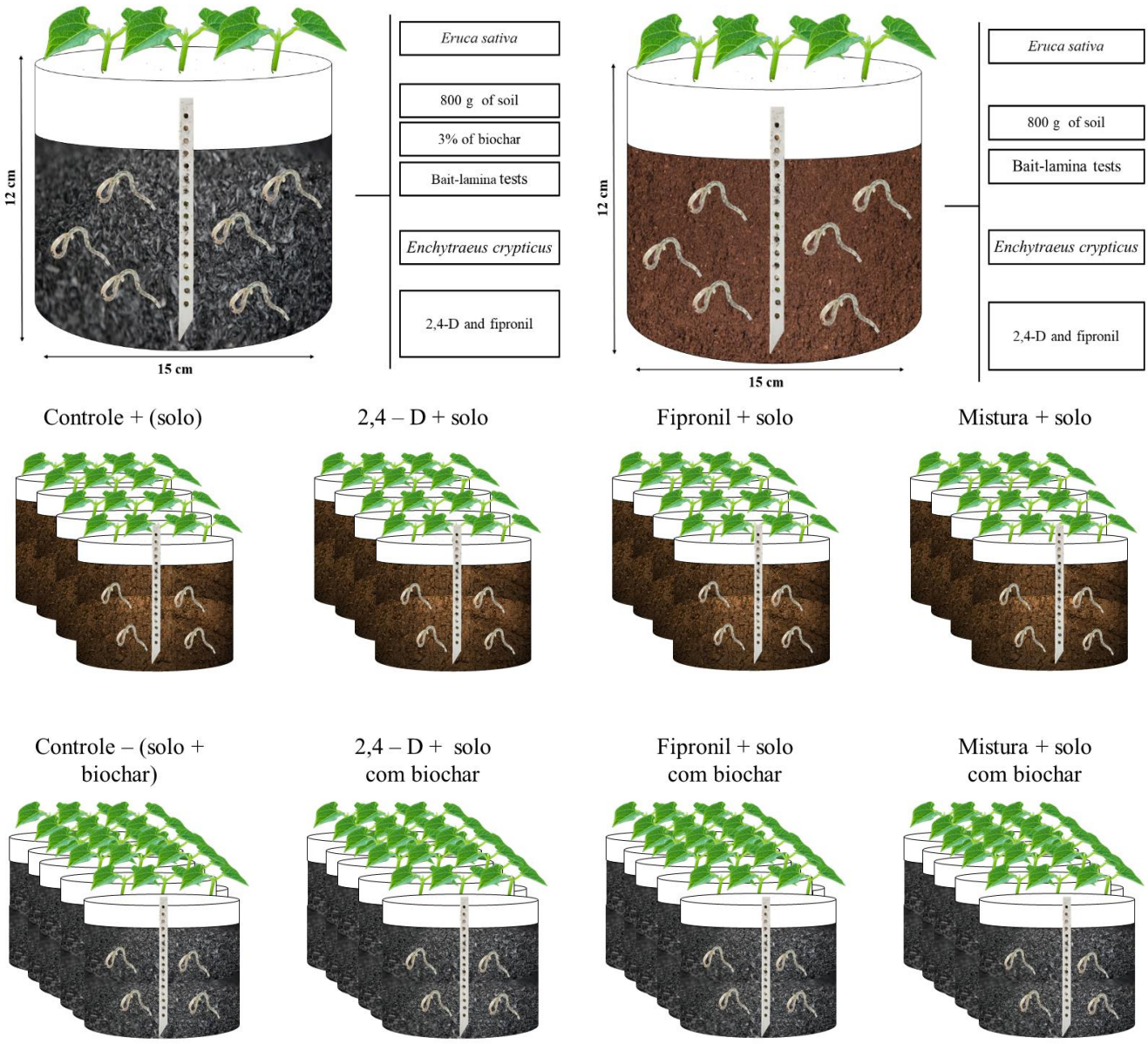
Figura 3. Etapas envolvidas no experimento com o microcosmo terrestre.



Fonte: Autor (2023)

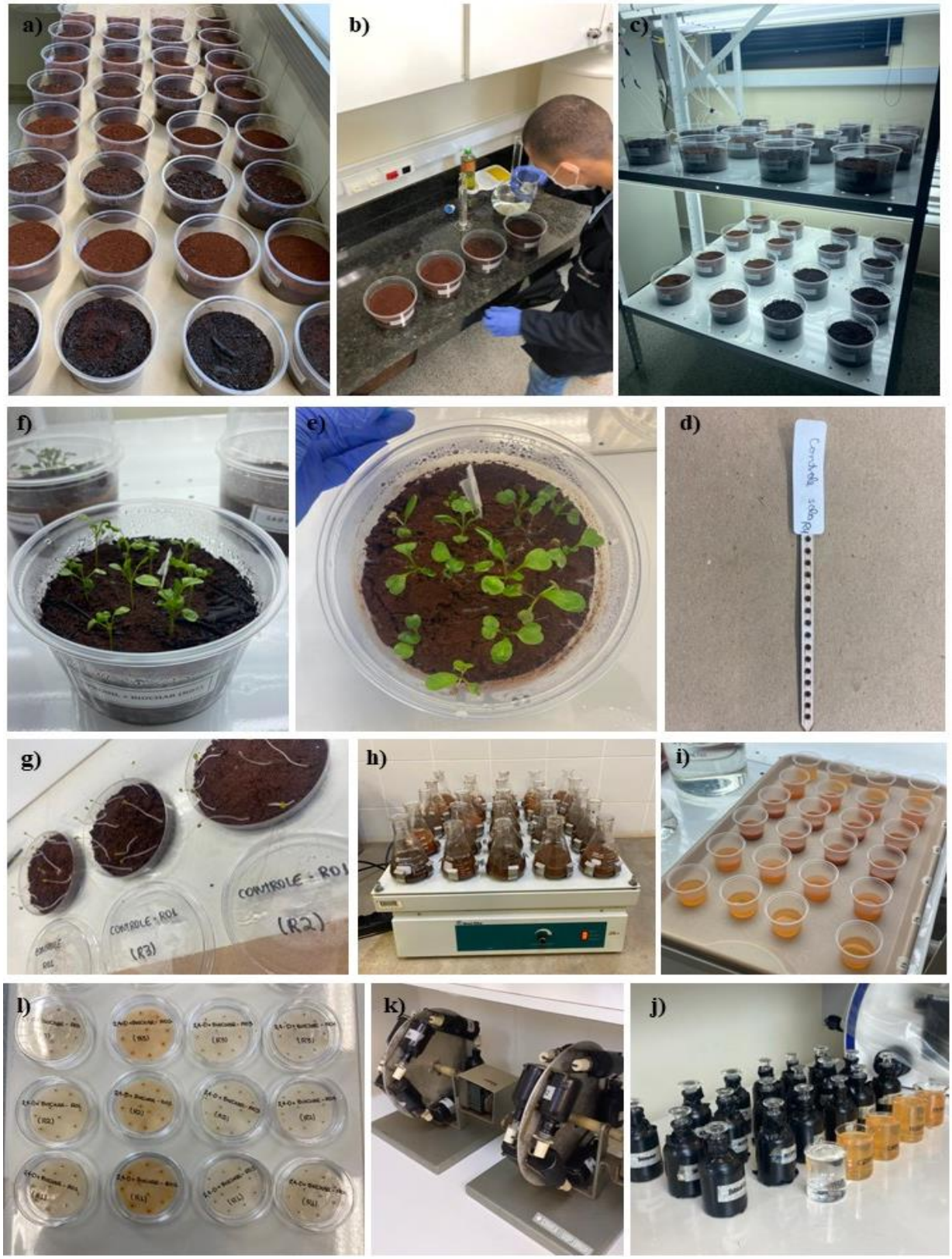
A contaminação com os agrotóxicos foi feita com a inserção de 100 ml da solução estoque nos respectivos recipientes, calculado baseado na área superficial de cada protótipo (0,013 m^2). A eficiência da utilização do biochar em reduzir a ecotoxicidade dos solos contaminados com 2,4-D e fipronil foi avaliada após comparação entre os tratamentos com os controles e por meio dos bioindicadores nos testes ecotoxicológicos. A Figura 4 representa os protótipos individuais nos tratamentos com a presença e ausência de biochar, bem como os cenários de exposição e as réplicas adotadas para a presente pesquisa. Em seguida a figura 5 apresenta fotografias das condições e etapas da pesquisa. As imagens da figura 5 representam: (a) Montagem do microcosmo (b) Contaminação do microcosmo (c) Disposição aleatória do microcosmo (d) Bait Lâmina para testes de alimentação (e) Vista superior do microcosmo (f) Vista frontal do microcosmo (g) Teste germinação com solo (h) Produção do elutriato em banca agitadora (i) Teste agudo com a espécie *D. similis* (j) Recipientes do teste pós-exposição com a espécie *D. similis* (k) roda giratória para teste pós-exposição (l) Teste de germinação com elutriato.

Figura 4. Modelo da unidade experimental (microcosmo)



Fonte: Autor (2023)

Figura 5. Condições e etapas no desenvolvimento da pesquisa



(a) Montagem do microcosmo **(b)** Contaminação do microcosmo **(c)** Disposição aleatória do microcosmo **(d)** Bait Lâmina para testes de alimentação **(e)** Vista superior do microcosmo **(f)** Vista frontal do microcosmo **(g)** Teste germinação com solo **(h)** Produção do elutriato em banca agitadora **(i)** Teste agudo com a espécie *D. similis* **(j)** Recipientes do teste pós-exposição com a espécie *D. similis* **(k)** roda giratória para teste pós-exposição **(l)** Teste de germinação com elutriato.

Fonte: Autor (2023)

5.5. Análises ecotoxicológicas

5.5.1. Análise de ecotoxicidade: microcosmo

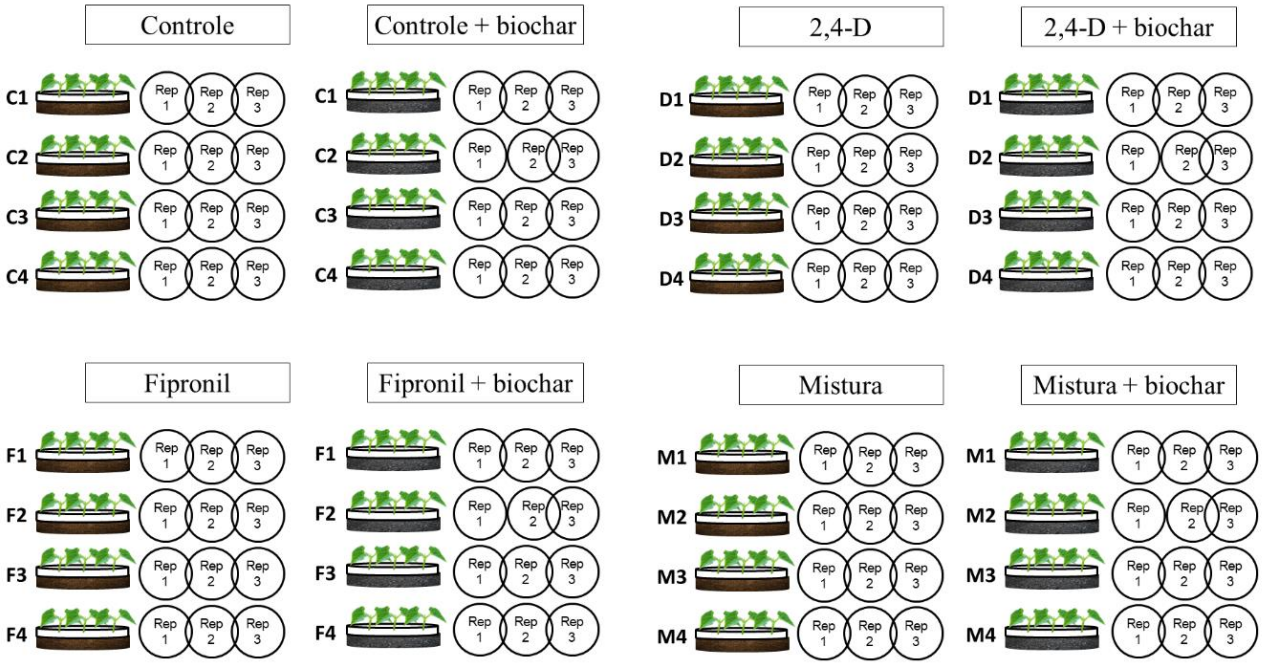
Foram realizados testes ecotoxicológicos para confirmar se o biochar foi capaz de reduzir a ecotoxicidade do solo e água, utilizando organismos terrestres e aquáticos. Os testes de ecotoxicidade com enquitreídeos (*E. crypticus*) seguiram as diretrizes e procedimentos apresentados na norma ABNT NBR 16387 (ABNT, 2012). Para cada cenário de exposição, foram expostos dez organismos no próprio microcosmo durante 28 dias. Os ensaios foram realizados com quatro réplicas (n = 4), e conduzidos sob condições de temperatura de 20 ± 2 ºC e de fotoperíodo de 16L:8E. Os organismos foram alimentados no início do ensaio, com 50 g de massa seca de aveia moída por recipiente-teste. Durante os ensaios, o teor de umidade do solo foi ajustado semanalmente. Os *endpoints* observados após 28 dias foram: número de adultos sobreviventes (sobrevivência), juvenis produzidos (reprodução) e alimentação por meio da *Bait Lâmina* inserida em cada microcosmo, conforme metodologia estabelecida pelo manual de ecotoxicologia terrestres da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA (BROW *et al.*, 2019). Em cada microcosmos foi adicionado uma Bait Lâmina no início do experimento com todos os orifícios preenchidos com alimento feito à base de aveia. Ao final do experimento foram contabilizados a quantidade de orifícios sem alimento de cada *Bait Lâmina*. Após isso, ¼ do solo foi separado para análises químicas e experimentos com o solo e o restante (¾) foram preservados com aproximadamente 500 ml de álcool e 10 ml de do corante químico rosa bengala para posterior contagem dos enquitreídeos. A contagem dos organismos corados foi feita de forma manual com auxílio de lupa de 100mm e bancada de luz.

Os testes de emergência e crescimento com a planta terrestre *Eruca sativa* realizados nas unidades experimentais, seguiram os procedimentos recomendados pela ABNT NBR 11269 (ABNT, 2014). Em cada unidade experimental foram expostas 10 sementes da espécie escolhida. O plantio foi realizado imediatamente após o tratamento com agrotóxicos. Os ensaios tiveram duração de 28 dias no total. Foram observados os seguintes *endpoints*: emergência; comprimento da parte aérea; biomassa fresca e seca. Ao final dos 28 dias, as plântulas foram retiradas dos respectivos tratamento e medidas manualmente.

5.5.2. Análise de ecotoxicidade: solo

Foram realizados teste de germinação com solo oriundo do microcosmo com a espécie *E. sativa*, seguindo ABNT NBR 11269 (ABNT, 2014). Para cada réplica de cada cenário de exposição foi adotado três subréplicas, totalizando 96 placas de Petri. Foram adicionados em cada placa de Petri, aproximadamente 10 g de solo e 10 sementes de *E. sativa*. Com uma pipeta Pasteur, 2 mL de água destilada foram adicionados em cada placa de Petri no início do experimento. Após 5 dias a 20 ± 2 ºC e sem a presença de luz, foram contabilizados a quantidade de sementes emergentes em cada tratamento, bem como o comprimento da parte aérea e raiz. Por meio da Figura 6 é possível analisar o cenário de réplicas e subréplicas do teste.

Figura 6. Esquema do teste de germinação com a espécie *Eruca sativa*.



Rep: replica; **C**: controle; **D**: 2,4-D; **F**: fipronil e **M**: mistura

Fonte: autor (2023)

5.5.3. Análise de ecotoxicidade: elutriato

Foram adotados a proporção de 1:4 na produção do elutriato, equivalendo a 40g de solo em Erlenmeyer de 250 ml com 160 ml de água destilada em mesa agitadora na velocidade de 200 rpm conforme metodologia descrita em Antunes *et al*, (2010). Os testes de toxicidade aguda com *D. similis* foram realizados conforme os procedimentos descritos na norma ABNT NBR 13373 (ABNT, 2017). Inicialmente, foram realizados testes de toxicidade aguda, nos quais os organismos foram expostos ao elutriato, com quatro réplicas (n = 4), com cinco juvenis cada (com idade inferior a 24 h) por 48 h. O *endpoint* observado foi a imobilidade dos organismos. Posteriormente, foi realizado o teste pós-exposição com os organismos que sobreviveram ao teste de toxicidade aguda, a fim de avaliar se os agentes estressores interferiram na taxa de alimentação dos organismos. Para tal, o protocolo desenvolvido por McWilliam e Baird (2009) foi adaptado. Em vidro âmbar (80 mL) foram adicionados 10 organismos em solução de ASTM com *R. subcapitata* a uma concentração de 10^5 células/mL. Os testes foram realizados em triplicata, sendo três recipientes (n = 3) sem a adição de organismos para verificar a densidade final de algas sem interferência dos cladóceros. Os organismos se alimentaram por 4 h na ausência de luz, em agitação leve (1 rmp), para que, posteriormente, fossem removidos dos recipientes. Por fim, foram medidas as taxas de alimentação através da diferença das densidades de algas nos frascos com e sem organismos. Para isso, amostras de cada um dos frascos (1800 µl) foram preservadas em eppendorf com 200 µL de formol com bórax, para posterior contagem em citômetro de fluxo no departamento de Hidrologia na Universidade Federal de São Carlos conforme metodologia estabelecida em McWilliam *et al*, (2002).

A taxa de alimentação pós-exposição foi calculada utilizando a Equação 1 (Allen et al., 1995; Mcwilliam e Baird, 2002).

$$F = V * (C0 - Cf) / t \qquad \text{Equação (1)}$$

onde:

F = taxa de alimentação (organismos celulares $^{-1}$ h^{-1});

V = volume de meio no recipiente de ensaio (80 mL);

C0 = concentração inicial de células (números mL^{-1});

Cf = a concentração final de células (números mL^{-1});

t = a duração da experiência (4 h);

Foram realizados também testes de germinação com *E. sativa* seguindo a mesma metodologia no tópico anterior. Todavia, os testes foram realizados em filtro de algodão e umedecidos com 1 mL do elutriato gerado a partir do solo do microcosmos (ABNT, 2014).

As características físicas e químicas das amostras do elutriato foram medidas, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros físico-químicos a serem analisados para caracterização do elutriato

PARÂMETRO	MÉTODO	REFERÊNCIA
pH	Potenciômetro Micronal B374	–
Oxigênio dissolvido (OD)	Oxímetro YSI	–
Condutividade	Condutivímetro Orion 145A	–
Dureza	Titulação	(Clesceri; Greenbaerg; Eaton, 1998)
Turbidez	Turbidímetro Hach DR/2000	(APHA, 1995)
Sólidos dissolvidos totais (SDT)	Medidor de condutividade	–
Salinidade	Medidor de condutividade	–

Fonte: Autor (2023)

5.6. Análises químicas dos agrotóxicos

As concentrações das soluções-estoque de 2,4-D e fipronil foram confirmadas por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). Cada solução foi medida em triplicata (n = 3) no mesmo dia da preparação e aplicação nas unidades experimentais. Houve a quantificação dos agrotóxicos nas amostras de solo e de água (elutriato) utilizadas para os testes de toxicidade, seguindo o mesmo método analítico. Todo o procedimento de análise foi baseado em Goulart *et al*. (2020).

As matrizes geradas nesse experimento foram destinadas ao Laboratório de Química Ambiental, da Universidade Estadual de Campinas (LQA – Unicamp, sob a supervisão da Dra. Cassiana Carolina Montagner), para a quantificação dos resíduos de agrotóxicos presentes nas amostras. As amostras de água foram filtradas diretamente em vial de vidro âmbar de 2,0 mL, utilizando filtro de seringa de PTFE hidrofóbico com porosidade de 0,22 µm. Como já citado a análise dos compostos foi realizada através da utilização da técnica de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS). Para isso, foi utilizado um cromatógrafo Agilent modelo 1200, equipado com bomba binária, injetor automático e compartimento de coluna termostatizado. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna Zorbax SB-C18 (2,1 x 30 mm, tamanho de partícula de 3,5 µm) a 30 °C. A fase móvel constituída de água ultrapura (A) e metanol (B), previamente filtrados em membranas com 0,2 µm de porosidade, contendo 0,01% (v/v) de NH4OH, aditivo utilizado para favorecer a formação de íons no modo negativo. A separação cromatográfica realizada em composição gradiente está descrito na tabela 2, na vazão de 0,3 mL min-1.

Tabela 4. Composição da fase móvel aquosa (A) e orgânica (B) do método cromatográfico para o modo de ionização negativo.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0,00	70	30
5,00	20	80
6,00	20	80
11,00	70	30
16,00	70	30

Fonte: Montagner (2021)

Os compostos foram ionizados em uma fonte de *electrospray* no modo negativo e monitorados pelo modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*), de acordo com os parâmetros

descritos na Tabela 5. As curvas analíticas foram construídas de acordo com a área obtida para cada composto em função de sua concentração.

Tabela 5. Parâmetros da espectrometria de massas para os compostos analisados

Analito	Íon precursor (m/z)	Íon produto (m/z)	Energia de fragmentação (V)	Energia de colisão (V)
2,4-D	220,9 - 218,9 - 218,9	163 – 161 - 125	70 – 70 – 70	12 – 14 - 18
Fipronil	434,9 – 434,9 – 439,9	330 – 250 -183	100 – 100 - 100	10 – 15 - 30
Fipronil sulfide	419 - 419 -419	382,9 – 313,9 - 262	135 – 135 - 135	5 – 20 -28
Fipronil sulfona	451 – 451 - 451	414,9 – 281,9 – 243,9	100 – 100 – 100	10 – 28 – 40

Fonte: Montagner (2021)

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) instrumentais foram obtidos pela relação sinal/ruído do equipamento. Para o LD foi utilizado uma razão sinal/ruído igual a 3 e para o LQ uma razão sinal/ruído igual a 10. O coeficiente de determinação (R^2) foi obtido a partir das curvas analíticas. Esses parâmetros estão dispostos na Tabela 3.

Tabela 6. Limite de detecção (LD), limite de quantificação (LQ) e coeficiente de determinação (R2) para os analitos

Analito	LD (µg L^{-1})	LQ (µg L^{-1})	R^2
2,4-D	1,0	5,0	0,9984
Fipronil	0,05	0,1	0,9977
Fipronil sulfide	0,1	0,5	0,9984
Fipronil sulfona	0,05	0,1	0,9992

Fonte: Montagner (2021)

5.7. Análise estatística

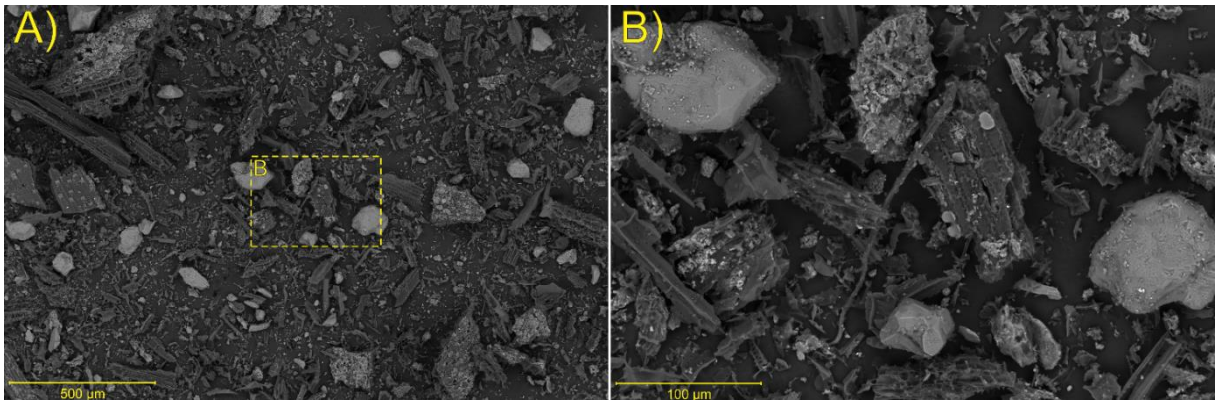
Todos os resultados dos testes realizados foram analisados utilizando ANOVA de duas vias para analisar os efeitos dos agrotóxicos na presença e ausência do biochar e a interação entre eles. Por conseguinte, foi realizado teste de comparação múltipla, por meio de teste pós-hoc de Tukey usando o pacote "*Desc Tools*" desenvolvido por Signorell et al., 2022. Os requisitos de homogeneidade de variância e normalidade dos resíduos foram avaliados por teste de Levene e Shapiro-Wilk, usando o pacote "*Car*" desenvolvido por Fox and Weisberg., 2019, no software R (R CORE TEAM, 2018) usando a aplicação do R Studio. Todas as comparações foram feitas em um intervalo de confiança de 95%, considerando $p < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Caracterização do biochar

Toda a discussão e caracterização acerca das características do biochar utilizados na presente pesquisa foi conduzida e reportada nos artigos de Soares *et al.* (2022a) e Soares *et al.* (2022b). A fim de analisar a morfologia do biochar da palha da cana-de-açúcar, foi utilizada a microscopia eletrônica de varredura que permite a formação de uma imagem a partir do resultado de uma interação de feixe de elétrons incidente sobre o material observado. A imagem 7A) mostra a captação de imagem do biochar na escala de 500 µm e a imagem 7B) registra o biochar na escala de 100 µm. De acordo com Soares *et al.* (2022), a temperatura de pirolise de 550°C influenciou na decomposição da matéria-prima utilizada (palha da cana-de-açúcar), uma vez que, ao aumentar a temperatura, houve a exposição das camadas subjacentes do biochar e, por consequência, uma melhor estrutura de poros. Conz (2015) também explica que a temperatura de pirólise é um importante parâmetro ao analisar morfologicamente a estrutura do biochar, uma vez que ocorre o derretimento, fusão e quebra do material, modificando sua estrutura conforme aumento da temperatura.

Figura 7. Microscopia eletrônica de varredura para avaliar a morfologia do biochar.



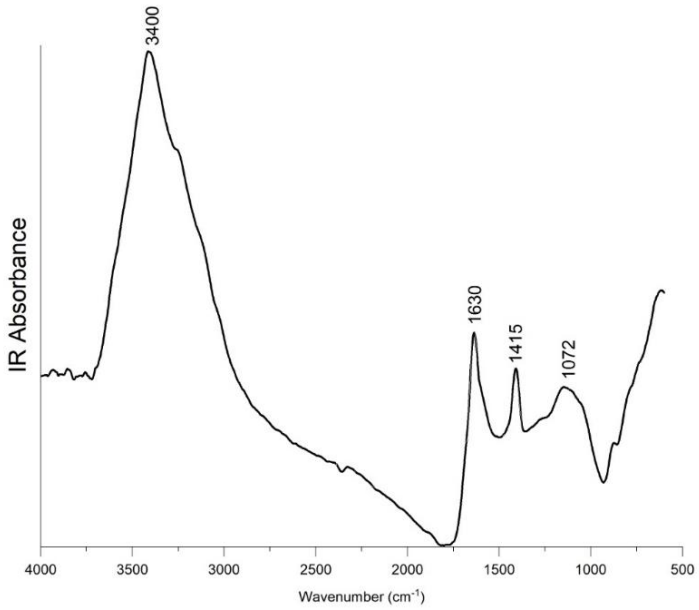
Fonte: Soares *et al.* (2021)

É possível observar, em relação à estrutura de poros do biochar, uma semelhança com a forma de favo de mel. Soares *et al.* (2022) explicam que tal analogia pode estar relacionada ao esqueleto carbonáceo da estrutura capilar biológica da palha da cana-de-açúcar. A resistência das estruturas da biomassa da matéria prima, como as paredes celulares e os vasos condutores são razões para que haja semelhanças estruturais nos poros do biochar, quando

analisado de forma microscópica. Conz (2015), ao observar a superfície do biochar feito da palha da cana-de-açúcar, também encontrou semelhanças morfológicas (e.g., estômatos, tricomas, vasos e parede celular) decorrentes da temperatura de pirólise.

Verifica-se, na Figura 8, a variação das ondas de absorbância da radiação infravermelho do biochar produzido. Soares *et al.* (2022) explicaram que esses grupos funcionais permitem analisar a interação do biochar com o meio, bem como sua capacidade de sorção, uma vez que alguns grupos como C−O ou C−O−H se ligam aos contaminantes podendo reduzir sua mobilidade ou biodisponibilidade para a biota vegetal e animal. Nesse caso, a temperatura não só alterou a composição e estrutura do biochar, mas também diminuiu os grupos funcionais orgânicos presentes em sua superfície conforme aumento da temperatura. Os espectros FTIR (infravermelho por transformada de Fourier ou Fourier Transform Infrared Spectroscopy) indicaram picos de absorção claros em 3400, 1630, 1415 e 1072 cm^{-1}.

Figura 8. Grupos orgânicos funcionais obtidos por FTIR



Fonte: Adaptado de Soares *et al.* (2021)

A capacidade do biochar sorver contaminantes depende da matéria prima e da temperatura final de pirólise. Soares *et al.* (2022) verificaram que o aumento da temperatura de pirólise para produção de biochar de palha de cana-de-açúcar resulta em biomaterial com menor diversidade de grupos funcionais de superfície. Na presente pesquisa, verificou-se a presença de pico de absorção em 3400 cm^{-1} relacionado a vibração de estiramento O-H

associada aos grupos hidroxila resultantes da perda de hidratação quando comparado ao biochar de menor temperatura. Os picos presentes no intervalo de 1800–1600 cm^{-1} diminuíram à medida que a temperatura de pirólise aumentou (>350 °C). Os picos presentes no intervalo de 1600-1800 cm^{-1} representam o alongamento C=O presente em grupos carboxila, cetona conjugada e/ou quinona. Além dos picos presentes no intervalo de 1800-1600 cm^{-1}, a redução nos picos de absorção em 1100 e 1070 cm^{-1} representam, respectivamente, a possível perda de grupos C-O atribuídos aos grupos fenólicos e/ou carboxílicos e grupos C-O-C presentes em polissacarídeos. De maneira geral, a perda dos grupos funcionais devido ao aumento da temperatura foi resultado da despolimerização, volatilização e reorganização estrutural. A perda desses grupos funcionais devido à temperatura de pirólise pode indicar uma limitação do biochar em sorver contaminantes por meio de eletroestática.

A caracterização geral feita do biochar produzido a uma temperatura de 550°C (BC550) está apresentada na Tabela 7, considerando a média de quatro repetições adotadas para cada parâmetro.

Tabela 7. Caracterização geral do biochar

Biochar	N (%)	C (%)	C/N	Umidade (%)	Material Volátil (%)	Cinza (%)	C fixo (%)	pH	COD (mg/L)	ASE m^2/g)
BC550	0,77 ± 0,01	52,6 ± 0,47	68,7 ± 1,30	2,34 ± 0,02	46,0 ± 0,14	10,2 ± 0,24	41,2 ± 0,22	9,3 ± 0,06	1,79 ± 0,03	223,4 ± 22,99

N: Nitrogênio**; C:** Carbono**, COD:** Carbono Orgânico Dissolvido**; ASE:** Área Superficial Específica

Fonte: Adaptado de Soares *et al.* (2021)

O biochar possuiu teor de Carbono (C) e Nitrogênio (N) de 52,6% e 0,77%, respectivamente, sendo a relação entre eles no valor de 68,7. Na matéria prima (palha da cana-de-açúcar) os valores encontrados foram de 36% de C e 0,4% de N. Ao analisar diferentes temperaturas de pirólise em seu estudo com biochar, Soares *et al.* (2022) concluíram que a temperatura de 550°C foi suficiente para aumentar os teores de N em 17% em relação aos biochars produzidos em temperaturas de 350 e 750°C. Os autores explicaram que os valores de C e N encontrados no biochar (BC550) também foram maiores do que as concentrações na palha da cana-de-açúcar. Esses valores de C podem ser explicados devido à remoção de compostos orgânicos voláteis e de baixa resistência térmica, por meio da

temperatura alta e lenta, do qual fizeram permanecer apenas a fase sólida do biochar, aumentando, assim, a concentração de C (Veiga *et al.*, 2021). Mesmo acima do valor encontrado na matéria prima, o N encontrado no biochar não foi alto (0,77%), quando comparado com outros biochars produzidos da mesma matéria prima como 1,8% (CONZ, 2015), 3% (BUENO, 2017) e 7,8% para bagaço da cana-de-açúcar (LOPES, 2022). Em temperatura de pirólise de 550°C, esperava-se que o teor de N fosse maior, conforme os estudos supracitados. Todavia, o resultado encontrado pode ser explicado em função das possíveis perdas de N durante o processamento e queima do biochar, uma vez que tais ações favorecem a liberação de N_2 e CO_2 das estruturas orgânicas presentes no biochar. O N presente na palha da cana-de-açúcar também pode estar associado a compostos orgânicos de baixa resistência a temperaturas, o que promoveria a volatilização do mesmo (VEIGA *et al.*, 2021).

Os valores de material volátil, teor de cinza e Carbono fixo foram de 46%, 10,2% e 41,2%, respectivamente. De acordo com Conz (2015), o material volátil é liberado com o aumento da temperatura. O teor de cinzas pode ser entendido como a parcela inorgânica dos metais presente no biochar proveniente da matéria prima. Com o aumento da temperatura, ocorre perdas de grupos funcionais (N, H e O) nos materiais voláteis, mas o C é parcialmente liberado, uma vez que uma parte dele fica retido no biochar na forma de Carbono fixo. A temperatura de pirólise ocorre em três fases, sendo elas (1) perda de umidade do material em temperatura (~200°C), (2) combustão primária do material e perda do material volátil com rápida decomposição de hemicelulose e celuloses (200 – 500°C) e (3) combustão do carbono fixo, degradação da lignina e de demais compostos orgânicos que possuem fortes ligações químicas (LOPES, 2022 e SOARES, *et al.*, 2021). Conz (2015) obteve resultados semelhantes ao produzir o biochar com a palha da cana-de-açúcar, uma vez que houve decréscimo do material volátil (de 90,61% na biomassa para 44,03% a 550°C), um teor de cinzas de 17% a 550°C e valores de carbono fixo de 35% a 550°C. Soares *et al.* (2022) também comprovaram que a temperatura é capaz de alterar substancialmente tais parâmetros, uma vez que o teor de cinzas aumentou em 132% e 106% em temperaturas de 750 e 550°C, respectivamente, em relação ao biochar produzido sob temperatura de 350°C. Para o C fixo, os valores aumentaram em 65% e 24% nas temperaturas de 750 e 550°C, respectivamente, sob as mesmas comparações. GUPTA *et al.* (2020) explicam que o teor de cinzas se justifica devido à conversão dos compostos orgânicos presente na biomassa em compostos inorgânicos na forma de cinzas. O aumento do Carbono fixo em altas temperaturas está relacionado com a

preservação de compostos formados por estruturas de carbonos aromáticos. Estruturas aromáticas são mais resistentes à degradação térmica, uma vez que o aumento da temperatura produz maior grau de polimerização, resultando em um biochar com estrutura condensada de carbono (GUPTA *et al.*, 2020)

O valor de pH do biochar utilizado neste estudo foi de 9,3, o que pode estar associado à presença de carbonatos e outros sais. Além disso, as altas temperaturas resultam na formação de grupos oxigenados provenientes da transformação térmica da celulose, ocasionando altos valores de pH (CONZ, 2015). O pH é um parâmetro importante ao avaliar a ecotoxicidade dos solos contaminados para organismos terrestres, pois influencia diretamente os organismos e pode afetar a disponibilidade, o transporte e o tempo de meia vida dos contaminantes (MORRO, 2021).

Em relação ao Carbono Orgânico Dissolvido (COD), o biochar apresentou um valor de 1,79 mg/L. Sabe-se que o COD no solo é uma importante propriedade em relação ao transporte de nutrientes e poluentes, bem como funcionamento do ciclo biogeoquímico do carbono, nitrogênio e fósforo. Uma vez aplicado, o COD do biochar pode ser liberado em solo e em água desempenhando um papel importante quanto a mobilidade, persistência, transporte e destino de contaminantes (LIN *et al.*, 2012 e BUENO, 2017). Soares *et al.* (2022) mencionam que o resultado obtido pode ser explicado devido à degradação térmica dos compostos de carbono de baixo peso molecular.

De acordo com Bueno (2017), a área superficial específica (ASE) é uma propriedade física dos biocarvões que corresponde à medida da área da superfície por unidade de peso, a qual é expressa em metros quadrados por grama (m^2/g). De maneira geral, quanto maior a ASE, maior será a capacidade de sorção do biochar. A ASE é um parâmetro importante que influencia de forma substancial a interação com o ambiente, atuando diretamente em processos como adsorção, atividade microbiana, capacidade de retenção de água e outros (NOVOTNY *et al.*, 2017). A ASE do bichar utilizado foi de 223,4 m^2/g. Esse valor pode ser considerado baixo ao comparar, por exemplo, a área superficial específica do carvão ativado, que varia de 800 a 1500 m^2/g, chegando em alguns casos a 4000 m^2/g (PEGO, 2016; BUENO, 2017). Os valores de ASE de biochars encontrados na literatura variam, uma vez que variáveis como temperatura e tempo de pirólise influenciam diretamente a ASE do biochar (JOSEPH, 2009). Os valores encontrados de ASE para biochars produzidos com resíduos da cana-de-açúcar foram de 129 m^2/g (SOARES, *et al.*, 2022 e MIELKE *et al.*, 2022), 22,2 m^2/g (PUGA *et al.*, 2020), 197,48 m^2/g (HUNG *et al.*, 2018) e 469 m^2/g

(BUENO, 2017). Ao comparar diferentes temperaturas de pirólise, Soares *et al.* (2022) perceberam que, ao aumentar o calor de pirólise, houve aumento na ASE em 658% e 1211% nas temperaturas de 550° e 750°C, respectivamente, quando comparados à 350°C. Esse aumento pode estar relacionado com as altas temperaturas, as quais alteram a estrutura do carbono, favorecendo a formação de estruturas semelhantes ao grafeno e resultando em uma maior ASE, devido à liberação de constituintes voláteis presentes na biomassa original.

Os dados da caracterização química do biochar utilizado estão descritos na Tabela 7. Não foram detectados os elementos Arsênio (As), Boro (B), Bário (Ba), Mercúrio (Hg), Sódio (Na) e Chumbo (Pb) pela ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*). Houve detecção dos elementos: 11,2 g/Kg de Alumínio (Al), 8,3 g/Kg de Cálcio (Ca), 0,8 mg/Kg de Cadmo (Cd), 96,3 mg/Kg de Cromo (Cr), 20,3 mg/Kg de Cobre (Cu), 6,1 g/Kg de Ferro (Fe), 5,1 g/Kg de Potássio (K), 4,1 g/Kg de Magnésio (Mg), 200 mg/Kg de Manganês (Mn), 40,5 mg/Kg de Níquel (Ni), 1,8 g/Kg de Fósforo (P), 0,5 g/Kg de Enxofre (S), 0,5 g/Kg de Titânio (Ti) e 35,3 mg/Kg de Zinco (Zn).

Tabela 8. Caracterização química do biochar utilizado

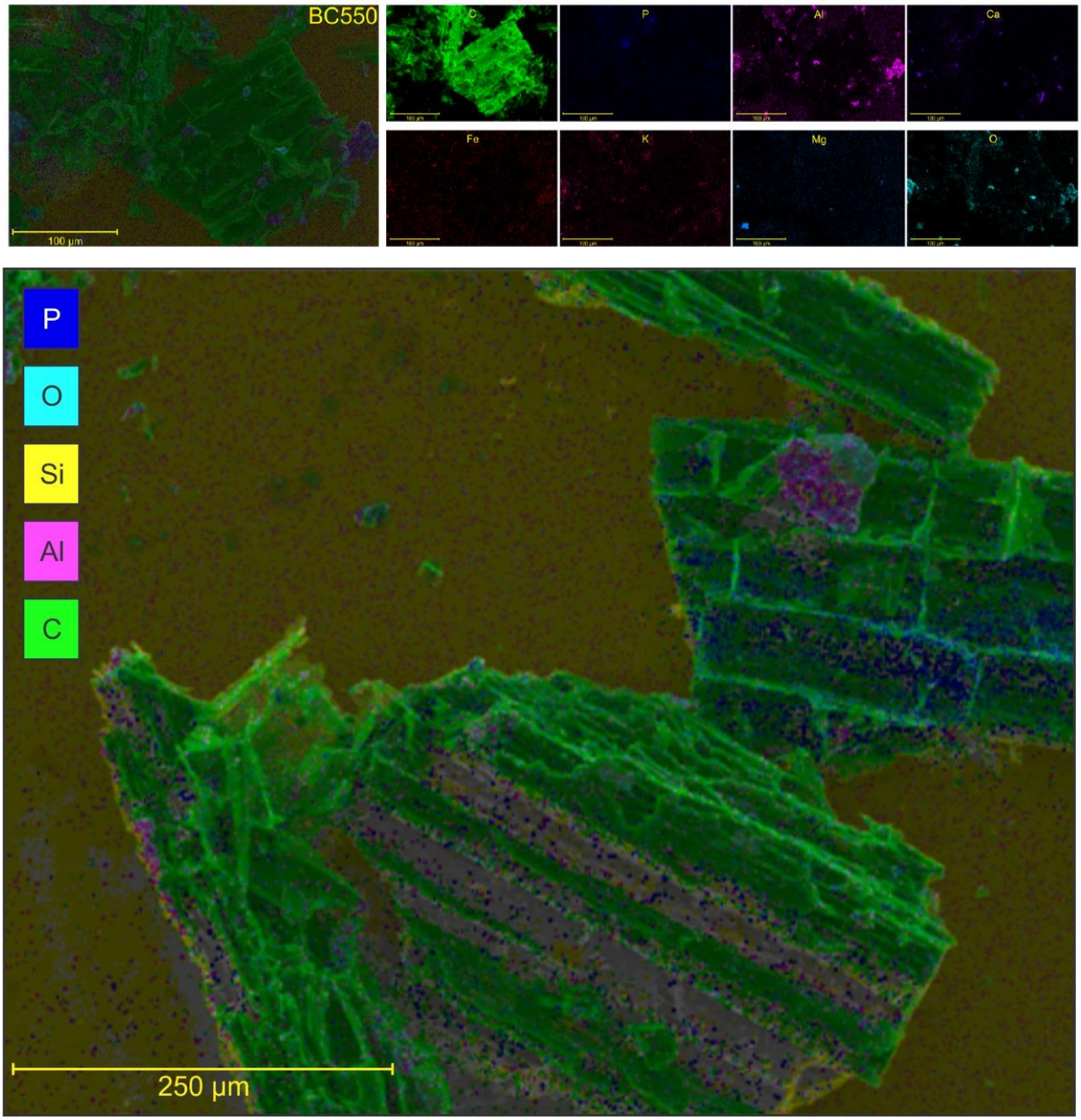
Variáveis	**Al (g/kg)**	**As (mg/kg)**	**B (mg/kg)**	**Ba (mg/kg)**	**Ca (g/kg)**
Média	11,2	< LD	< LD	< LD	8,3
Variáveis	**Cd (mg/kg)**	**Cr (mg/kg)**	**Cu (mg/kg)**	**Fe (g/kg)**	**Hg (mg kg)**
Média	0,8	96,3	20,3	6,1	< LD
Variáveis	**K (g/kg)**	**Mg (g/kg)**	**Mn (mg/kg)**	**Na (mg kg)**	**Ni (mg kg)**
Média	5,1	4,1	200,8	< LD	40,5
Variáveis	**P (g/kg)**	**Pb (mg/kg)**	**S (g/kg)**	**Ti (g/kg)**	**Zn (mg/kg)**
Média	1.8	< LD	0,52	0,50	35,3

Fonte: Adaptado de Soares *et al.* (2021)

Soares *et al.* (2022) explicaram que o oxigênio diminui conforme o aumento da temperatura de pirólise, o que explica os valores de fósforo, cálcio e potássio, que ficam aderidos na superfície do biocarvão, à medida que o oxigênio diminui. O biochar pode servir como uma importante fonte de nutrientes para o solo e aos organismos, uma vez que os elementos químicos e nutrientes se concentram na superfície do biochar. Os autores encontraram altas concentrações de fósforo no biochar da palha da cana-de-açúcar pirolisado em 750°C, mostrando que temperaturas altas de pirolise podem se tornar uma ferramenta útil para quem pretende utilizar o biochar devido às altas concentrações de fósforo. De maneira geral, os autores concluíram que o biochar pode ser considerado um bom aditivo para

melhoria das propriedades do solo, mas a presença de P, juntamente com a baixa disponibilidade de oxigênio no biochar produzidos em altas temperaturas, pode ser um fator limitante quando aplicado para retenção de As. Tal fato acontece devido à competição específica por sítios de sorção na superfície de hidróxidos de Al e Fe. Os principais elementos químicos na superfície do biochar foram mapeados e estão apresentados na Figura 9.

Figura 9. Imagens do mapeamento dos principais elementos químicos presentes na superfície do biochar



Fonte: Adaptado de Soares *et al.* (2021)

6.2. Caracterização do solo

O solo utilizado na presente pesquisa foi caracterizado em estudos anteriores (Ogura *et al*., 2023), conforme a metodologia estabelecida no tópico 5.2. Os resultados das análises de caracterização estão descritos na Tabela 9, a seguir.

Tabela 9. Caracterização do solo coletado na área do CRHEA/EESC/USP.

Granulometria			
Argila [< 0,002 mm] (%)	31,9	Areia fina [0,06 – 0,2 mm] (%)	24,8
Silte [0,002 – 0,06 mm] (%)	21,7	Areia média [0,2 – 0,6 mm] (%)	20,2
Areia [0,06 – 2,0 mm] (%)	46,4	Areia grossa [0,6 – 2,0 mm] (%)	1,4
Parâmetros físicos e químicos			
pH (H_2O)	5,2	pH (KCl)	4,8
Potencial de oxirredução [Eh] (mV)	228,8	Condutividade elétrica (µS cm^{-1})	50,1
Densidade (g cm^3)	1,48	Índice de vazios	1,05
Umidade média (%)	14,6	Porosidade (%)	55
Massa específica aparente (g cm^3)	1,28	Massa específica real (g cm^3)	2,83
Grau de saturação (%)	31	CTC (cmolc kg^{-1})	3,47
Matéria orgânica e substâncias húmicas			
Matéria orgânica (%)	11,4	Ácido húmico (% m/m)	0,452
Extrato húmico total (% m/m)	1,366	Ácido fúlvico (% m/m)	0,914
Metais			
Cádmio (mg L^{-1})	< 0,1	Ferro (mg L^{-1})	26,06
Chumbo (mg L^{-1})	0,037	Manganês (mg L^{-1})	5,705
Cromo (mg L^{-1})	12,33	Níquel (mg L^{-1})	< 0,1
Cobre (mg L^{-1})	< 0,1	Zinco (mg L^{-1})	< 0,1

Fonte: Adaptado de Ogura *et al*. (2023)

O solo de estudo é predominantemente constituído por areia (46,4%), seguido por uma parcela de argila (31,9%), silte (21,7%) e areia fina (24,8%), média (20,2%) e grossa (1,4%). De acordo com suas características, o solo pode ser considerado como argiloso, devido à parcela de argila (>30% de argila), quantidade alta de matéria orgânica e teor de ferro. De acordo com Steffen *et al.* (2011) e Arsego (2009), as características de um solo, como teor de argila, pH, matéria orgânica e CTC, podem influenciar diretamente sua interação com os poluentes, como os agrotóxicos, afetando, portanto, os processos de transporte, sorção, biodisponibilidade e degradação.

A fração de argila e silte no solo correspondem a quase 50% da sua constituição total, e isso favorece a retenção de nutrientes e de agrotóxicos por meio da sorção. Silva *et al*. (2022) explicaram que tal retenção em solos argilosos acontece devido às condições de superfícies hidrofílicas, causadas pela presença de grupos hidroxilas e cátions livres trocáveis. Além disso, os autores pontuam que os pequenos tamanhos das partículas, presença de cargas negativas dos minerais argilosos e grande superfície de contato por unidade de massa são fatores que contribuem para a retenção dos pesticidas no solo.

Silva *et al.* (2022) ainda explicam que a quantidade de matéria orgânica (MO) é um fator importante a se analisar no solo, visto que está intimamente associada com a capacidade de sorção de agrotóxicos. Arsego (2009) explica que a MO deve ser levada em consideração em decorrência da grande superfície específica e da alta CTC. O solo utilizado na presente pesquisa possui elevado índice de matéria orgânica (11,4%) quando comparado com o trabalho de Junior (2022), que encontrou um valor de 0,66% em solo argiloso. O autor também reafirma que solos com maiores teores de MO são mais propensos a sorver agrotóxicos.

O valore de pH encontrado foi de 5,2 podendo ser classificado como um solo ácido (< 7). O pH do solo está intimamente relacionado a diversos fatores importantes, como sobrevivência dos microrganismos no solo, disponibilidade de nutrientes disponíveis, condições ótimas para cultivo. Silva *et al.* (2022) concluíram que o pH pode interferir na biodisponibilidade de agrotóxicos, uma vez que houve menor sorção do agrotóxico estudado (indaziflam) ao aumentar o pH do solo. Porém, os autores ressaltam que avaliar o pH dos agrotóxicos também se faz necessário, visto que sua acidez ou alcalinidade pode alterar a sorção pelo solo.

6.3. Quantificação química dos agrotóxicos

As concentrações dos agrotóxicos adotadas foram baseadas nas doses recomendadas dos produtos formulados para a cultura da cana-de-açúcar (900 g/ha para o 2,4-D e 192 g/ha para fipronil). Sendo assim, as concentrações nominais adotadas para a solução-estoque foram 2,0 mg/L para o inseticida fipronil e 11,25 mg/L para o herbicida 2,4-D, conforme apresentado na metodologia. Por meio da Tabela 10, é possível analisar os valores reais quantificados na solução-estoque preparada para a contaminação do microcosmo. Houve uma perda de 5,3% do herbicida 2,4-D e 62,5% de fipronil, visto que as concentrações reais quantificadas foram 10,5 mg/L para o 2,4-D e 0,75 mg/L para o fipronil.

Perdas podem ser justificadas pela fotodegradação e baixa solubilidade dos agrotóxicos 2,4-D e fipronil, respectivamente. Além disso, os metabolitos do fipronil (i.e., fipronil sulfeto e fipronil sulfona) também foram quantificados na presente pesquisa, tanto nas amostras da solução-estoque de contaminação, quanto no solo ao final do experimento. Os meios de degradação do fipronil no meio ambiente abrangem fotólise, redução, oxidação e hidrólise, gerando os metabólitos fipronil desulfinil, fipronil sulfeto, fipronil sulfona e fipronil amido, respectivamente (CHAGURI, 2016). Por meio da tabela 10, a seguir, é possível analisar os valores dos agrotóxicos quantificados.

Tabela 10. Quantificação química das concentrações obtidas nas amostras das soluções-estoque em mg/L

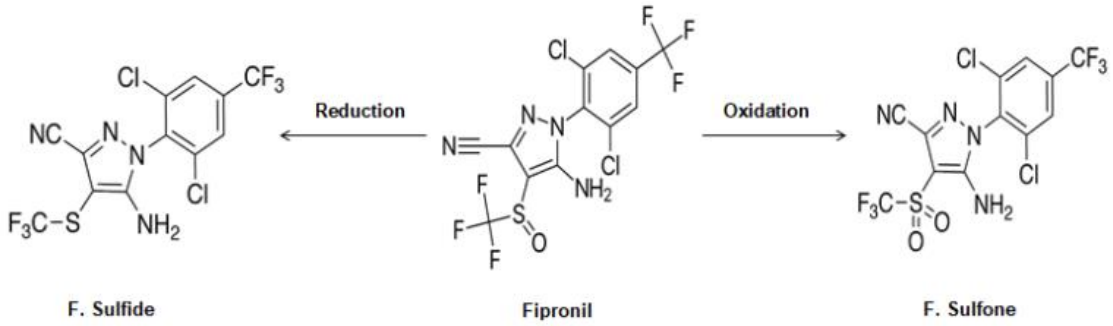
2,4-D	Fipronil	Fipronil Sulfeto	Fipronil Sulfona	Mistura 2,4-D	Mistura Fipronil	Mistura Fipronil Sulfeto	Mistura Fipronil Sulfona
10,66	0,75	0,04	0,09	12,72	1,11	0,05	0,11
10,34	0,75	0,04	0,09	10,66	0,01	0,04	0,07

Fonte: Autor (2023)

Prado e Bonfá (2019) explicam que a produção de metabólitos é uma característica de compostos fluorados, podendo ser mais tóxicos quando comparados ao produto inicial. O fipronil possui baixa tolerância à luz, tornando-o um agente fotolábil, sendo a biodegradação responsável pelos processos de redução e oxidação, que produzem o fipronil sulfeto e sulfona, respectivamente (Figura 10). Chaguri (2016) explica que alguns metabólitos do fipronil, como o fipronil desulfinil, podem ser até 10 vezes mais tóxicos para mamíferos em comparação com o composto parental. O fipronil sulfona, por sua vez, também se mostra mais tóxico para insetos, mamíferos, aves e peixes. De acordo com o autor, diversos estudos relataram que a

via metabólica predominante do fipronil é a oxidação em sulfona, sendo que esse metabólito tem uma afinidade 6 vezes maior em bloquear os receptores GABA (ácido gama-aminobutírico) no cérebro e uma capacidade 20 vezes maior em bloquear os canais de cloreto ativados pelo GABA em mamíferos quando comparado a insetos.

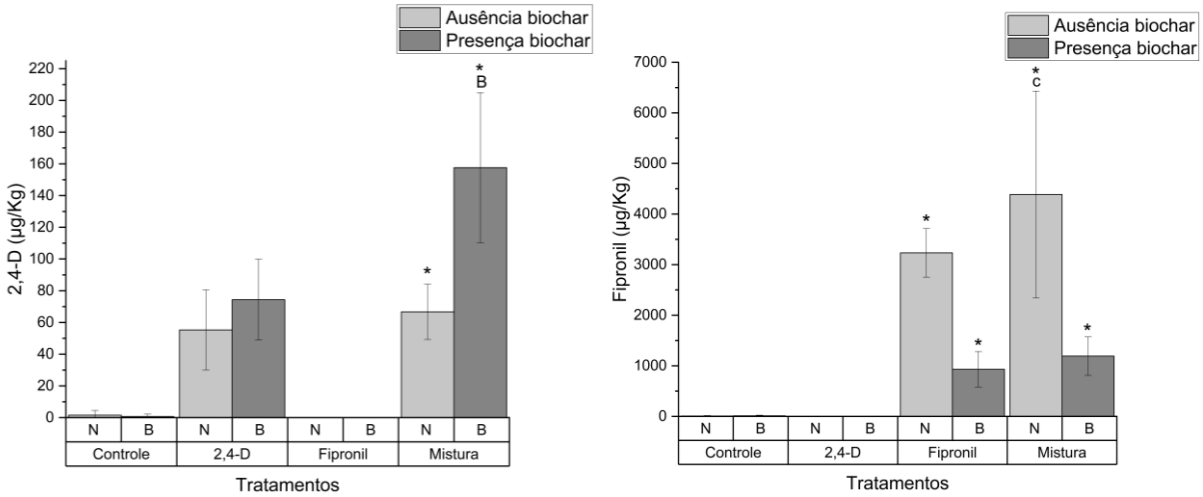
Figura 10. Metabólitos do fipronil



Fonte: Prado e Bonfá (2019)

Após a contaminação do solo com os agrotóxicos presentes na solução-estoque, foram quantificadas ao final do experimento as concentrações residuais no solo (Figura 11), a fim de analisar a parcela dos agrotóxicos que ficou retida. Os valores da quantificação do 2,4-D nos tratamentos utilizando o herbicida foram 55,4 µg/kg com a ausência de biochar e 74,4 µg/kg com biochar. Quando comparado aos valores quantificados na solução-estoque (10,6 mg/L), percebe-se valores baixos no solo para ambos os casos (com e sem biochar). Esses valores podem ser explicados devido aos fatores de degradação do 2,4-D no solo, pelo seu tempo de meia vida de 4 a 17 dias em solo e devido ao pH ácido do solo (5,2), que favorece a não sorção do 2,4-D (PUBCHEM, 2022, USEPA, 2020). Todavia, quando comparados os valores entre si, percebe-se que o valor de 2,4-D é mais alto no tratamento com o biochar, o que pode ser explicado pela presença do próprio biocarvão no tratamento, uma vez que ele possui propriedades na sua estrutura que facilitam a sorção dos agrotóxicos, como sua ASE de 223,4 m^2/g.

Figura 11. Quantificação química das concentrações de 2,4-D e fipronil obtidas nas amostras de solo analisadas em µg kg^{-1}. Asterisco (*) indica diferença significativa no mesmo tratamento com e sem biochar. Letras correspondem a diferenças entre os tratamentos na ausência (letra minúscula) e presença de biochar (letra maiúscula). "B" indica diferença significativa em relação ao tratamento 2,4-D com biochar e "c" indica diferença significativa em relação ao tratamento fipronil sem biochar.



N: ausência de biochar; **B:** presença de biochar

Fonte: Autor (2023)

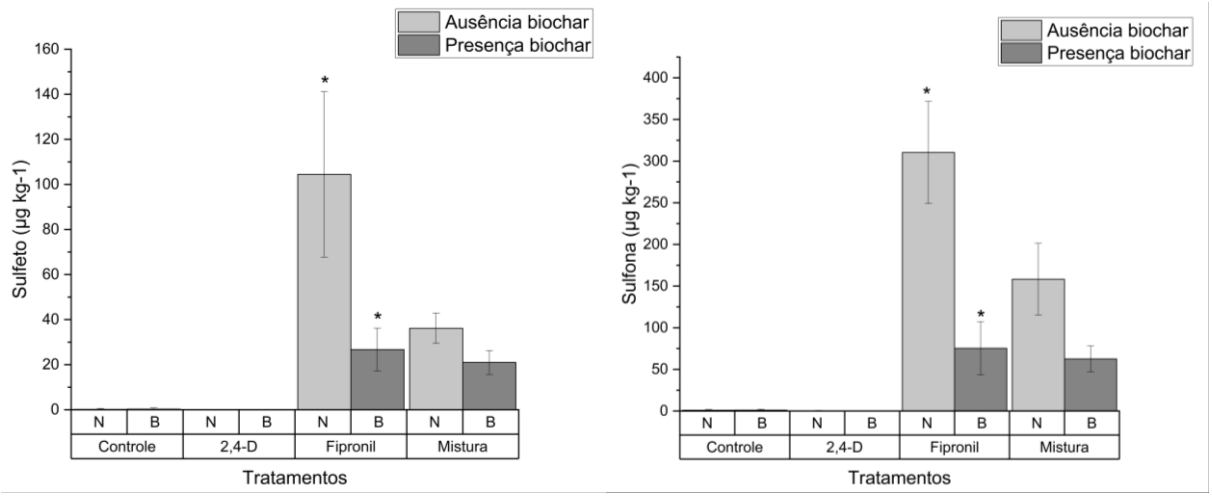
Ao observar a quantificação do 2,4-D no tratamento de mistura, encontrou-se 66,7 µg/kg na mistura sem o biochar e 157,7 µg/kg na mistura com o biochar. Os valores podem ser explicados pela presença do biochar, sendo significativamente maior quando comparado ao tratamento isolado do 2,4-D com biochar. Os valores encontrados de 2,4-D na mistura com a ausência e presença do biochar são significativamente diferentes ($p < 0,05$), mostrando que o biochar influencia a degradação e sorção dos agrotóxicos quando em conjunto com o fipronil. Todavia, é necessário lembrar o fipronil também estava presente no tratamento de mistura, sugerindo uma possível interação de sinergismo entre eles. Alguns autores como Brito *et al.* (2020), Cuba *et al.* (2018), Silva (2015) e Azevedo (2016) também observaram sorção de agrotóxicos no solo ao utilizar biochar oriundo da cana-de-açúcar.

Nos tratamentos de fipronil com e sem biochar, foram encontradas concentrações de 3232,1 µg/kg e 931 µg/kg, respectivamente. Quando comparado com as concentrações da solução-estoque utilizada na contaminação, percebe-se que os valores são maiores em relação a solução-estoque. Tais concentrações acima da concentração-estoque podem ser explicadas devido a um possível acúmulo de agrotóxicos na superfície dos microcosmos, visto as amostras de quantificação terem sido geradas do solo superficial. Nesse tratamento, as concentrações estavam mais altas no tratamento sem a presença de biochar, indicando uma possível ineficiência na sorção do inseticida no solo. Isso pode ser explicado possivelmente

pelo agrotóxico ter ficado retido apenas na superfície do solo, uma vez que, devido ao seu valor de K_{oc} de 825 a 6863, espera-se que o fipronil tenha baixa ou nenhuma mobilidade no solo (PUBCHEM, 2022).

No tratamento mistura os valores de fipronil foram mais altos, com 4387,5 µg/kg na mistura sem o biochar e 1192,3 µg/kg para a mistura com o biochar. Houve diferença significativa quando comparados o tratamento de mistura com o fipronil (ambos sem biochar) ($p < 0,05$), evidenciando que os valores de fipronil, quando em contato com o 2,4-D, são de fato maiores que o do tratamento fipronil isolado. Esse resultado sugere que a interação entre os agrotóxicos 2,4-D e fipronil pode favorecer o aumento do outro em solo. Autores como Pinto *et a.*, 2021 e Silva *et al*, 2020 já encontraram efeitos diferentes na mistura quando comparado efeitos dos agrotóxicos isolados na matriz aquática. Entretanto é necessário mais estudo com tais agrotóxicos para avaliar e caracterizar esta interação na matriz terrestre. Quando comparados o mesmo tratamento (mistura) com a ausência e presença de biochar, os valores são significativamente diferentes ($p < 0,05$), indicando que o biochar influencia as concentrações do fipronil em misturas com o 2,4-D.

Figura 12. Quantificação química das concentrações dos subprodutos do fipronil obtidas nas amostras de solo em µg kg^{-1}. Asterisco (*) indica diferença significativa no mesmo tratamento com e sem biochar.



N: ausência de biochar; **B:** presença de biochar

Fonte: Autor (2023)

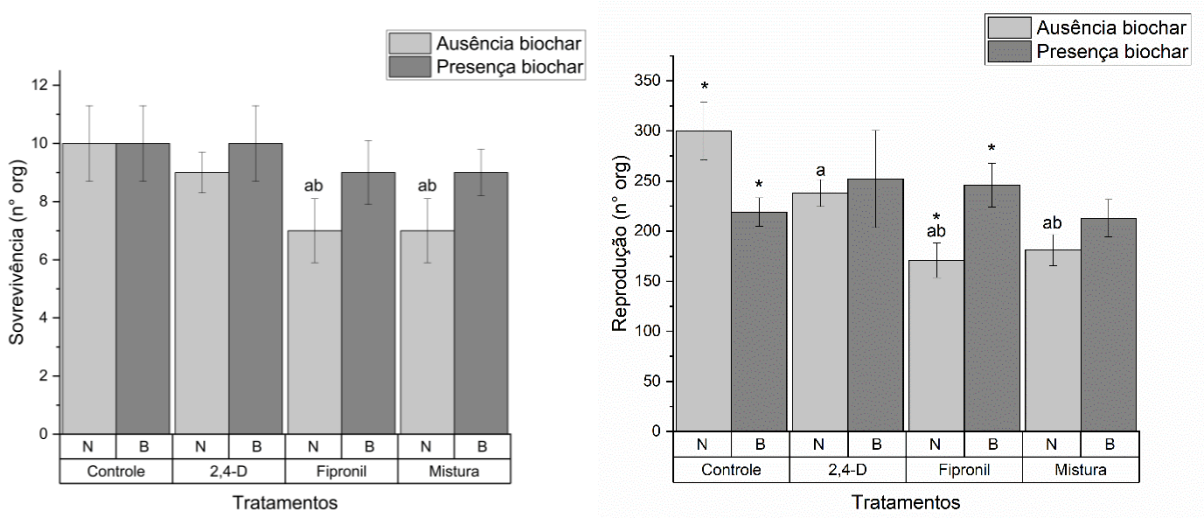
Em relação ao fipronil sulfeto, os valores no tratamento com fipronil isolado foram maiores sem a presença de biochar (104,5 µg/kg sem o biochar e 26,7 µg/kg com o biochar) ($p < 0,05$). Os valores encontrados no tratamento de mistura correspondem a 36,1 µg/kg e 20,9 µg/kg na ausência e presença do biochar, respectivamente. Ao analisar a presença e

ausência do biochar no metabólito fipronil sulfeto, percebe-se que os valores são significativamente diferentes, indicados pelo símbolo (*) asterisco. Os valores para o fipronil sulfona no tratamento com fipronil isolado também foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), quando comparados a presença (310,3 µg/kg) e ausência de biochar e (75,3 µg/kg) com o biochar. Os valores encontrados na mistura foram 158,2 µg/kg e 62,6 µg/kg na ausência e presença do biochar, respectivamente. Pode-se afirmar então, que, o biochar influenciou na retenção dos metabólitos fipronil sulfeto e sulfona.

6.4.Testes multiespécie em microcosmo

A sobrevivência e reprodução da espécie *E. crypticus* estão apresentadas na Figura 13, nos cenários com os agrotóxicos 2,4-D e fipronil, isolados e em mistura.

Figura 13. Resultados do teste de sobrevivência e reprodução da espécie *Enchytraeus crypticus* nos microcosmos. Asterisco (*) indica diferença significativa no mesmo tratamento com e sem biochar. Letras correspondem a diferenças entre os tratamentos na ausência (letra minúscula) e presença de biochar (letra maiúscula). "a" indica diferença significativa em relação ao controle sem biochar. "b" indica diferença significativa em relação ao tratamento 2,4-D sem biochar.



N: ausência de biochar; **B:** presença de biochar

Fonte: Autor (2023)

Os ensaios com a espécie *E. crypticus* estão dentro dos critérios de validação estabelecidos pela OECD 220 (OECD, 2004), uma vez que a mortalidade dos adultos foi <20% com a presença de mais de 30 juvenis por réplica do controle e o coeficiente de variação no controle foi inferior a 50%. Mesmo sem significância estatística em relação a presença e ausência do biochar ($p > 0,05$), a sobrevivência dos organismos foi mais alta em

todos os tratamentos com a presença do biocarvão, exceto no controle, que foi exatamente igual na presença e ausência do biochar. Os tratamentos fipronil e mistura (sem biochar) tiveram diferença significativa quando comparado ao controle (indicado pela letra [a]) e 2,4-D (indicado pela letra [b]), ambos sem biochar. O fipronil isolado e a mistura dos agrotóxicos afetaram de forma significativa a sobrevivência da espécie do enquitreídeo *E. crypticus* quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$). O fipronil se mostrou mais tóxico que o 2,4-D (ambos sem biochar) e o herbicida se apresentou mais tóxico quando combinado com o fipronil (no tratamento de mistura). Triques *et al.* (2021) explicaram que é esperado que o fipronil afete de forma mais significativa a sobrevivência dos organismos em relação ao herbicida 2,4-D, visto o modo de ação dos inseticidas, que tem como finalidade atingir o sistema nervoso central dos organismos. O corpo flexível e pele permeável dos enquitreídeos facilitam a entrada dos agrotóxicos, por meio do contato superficial com o solo contaminado. O fato do tratamento mistura ser mais tóxico quando comparado ao 2,4-D isolado sugere que houve um possível sinergismo entre os agrotóxicos, potencializando seus efeitos quando comparado, por exemplo, com o herbicida 2,4-D isolado. Entretanto, para constatar tal hipótese seria necessário mensurar a soma dos efeitos dos agrotóxicos isolados e depois compara-los com os efeitos da mistura, o que não foi realizado no presente estudo. Porém, diversos estudos reportados na literatura mostraram sinergismo entre o herbicida 2,4-D e o inseticida fipronil, baseado em testes com doses recomendadas e ambientalmente relevantes dos agrotóxicos (Pinto *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2020; Moreira *et al.*, 2020). Portanto, o 2,4-D isolado não se mostrou significativamente tóxico para a sobrevivência dos enquitreídeos, mas houve efeitos adversos significativos na sobrevivência dos organismos expostos ao fipronil.

Em relação à reprodução de *E. crypticus*, foi possível perceber que houve variação significativa na reprodução dos organismos no tratamento controle, quando analisado a ausência e presença do biochar ($p < 0,05$). A reprodução dos organismos no controle com biochar (219 juvenis) foi menor quando comparado ao controle sem biochar (300 juvenis), indicando uma possível toxicidade do biochar na inibição da reprodução dos organismos. Godlewska *et al.* (2021) explicaram que o biochar pode ser tóxico para organismos terrestres, sendo que os efeitos dependem principalmente da presença de metais potencialmente tóxicos, da matéria prima utilizada, do pH e do tempo de pirólise. Conti *et al*. (2018), ao avaliarem a toxicidade de diversos biochars para o colêmbolo *Folsomia candida*, concluíram que o biochar feito a partir do bagaço de uva ocasiona efeitos tóxicos na sobrevivência, na reprodução dos organismos e na eclosão dos ovos. Os autores atribuíram tais resultados aos

valores de pH, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e metais potencialmente tóxicos presentes no biocarvão. Alguns autores encontraram resultados semelhantes ao utilizar bioindicadores na avaliação do potencial uso do biochar em diminuir a biodisponibilidade de agrotóxicos no solo. Bielská *et al.* (2018) tiveram resultados satisfatórios ao diminuir a biodisponibilidade de agrotóxicos no solo, mas houve redução entre 27 e 38% da reprodução de *F. candida* quando testadas as doses de 10% de biochar no solo. Entretanto, a reprodução de *E. crypticus* depende de forma substancial das propriedades do solo, como o pH (TRIQUES et al., 2021). Jänsch *et al*. (2005) explicam que, para essa espécie, as condições de pH ótimas para sobrevivência e reprodução de juvenis variam de 5,9 a 6,5. O pH do solo com o biochar medidos no presente experimento foi de 7,4 o que sugere uma condição não satisfatória para a reprodução dos organismos no controle com o biochar.

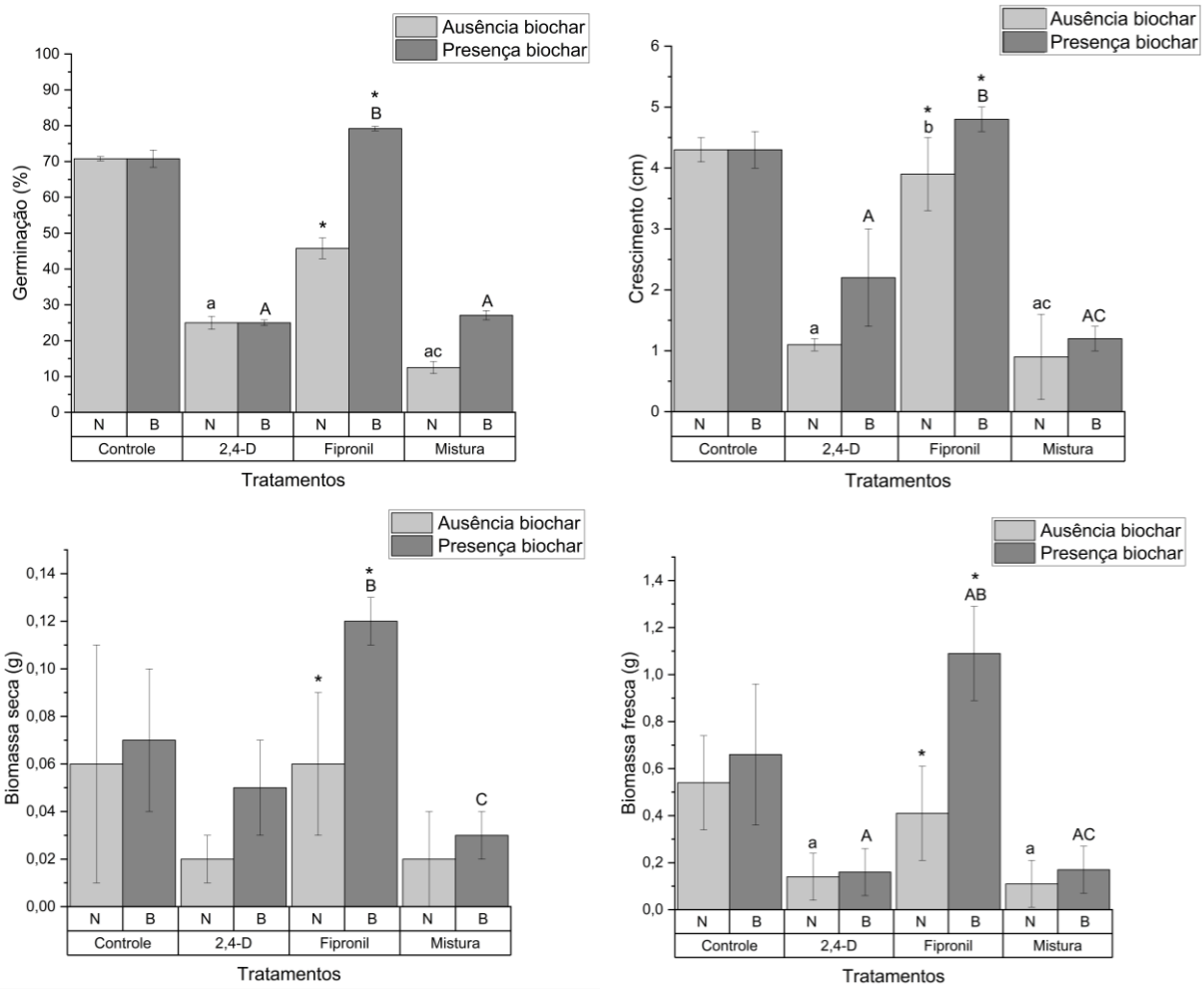
Houve diferença estatística significativa na quantidade de juvenis produzidos dos tratamentos 2,4-D (238 juvenis), fipronil (171 juvenis) e mistura (181 juvenis) sem biochar quando comparados com o controle (300 juvenis) sem biochar ($p < 0,05$). Os agrotóxicos isolados e em mistura (sem biochar) foram significativamente tóxicos para a reprodução da espécie, em comparação com o controle. Os tratamentos com o fipronil e mistura (sem biochar) também foram significativamente mais tóxicos quando comparados com o herbicida 2,4-D (ambos sem biochar) ($p < 0,05$), sendo, portanto, os tratamentos mais tóxicos para a reprodução da espécie. Diversos autores reportaram toxicidade dos agrotóxicos 2,4-D e fipronil para espécie de *E. crypticus*. Triques *et al.* (2021) observaram toxicidade do 2,4-D sobre a espécie na exposição de 37,6 mg i.a./kg, enquanto Zortéa *et al.* (2018) perceberam redução na sobrevivência e reprodução dos enquitreídeos em exposições de 10 mg i.a./kg de fipronil. Portanto, os agrotóxicos isolados e em mistura foram tóxicos para a espécie *E. crypticus*.

A reprodução da espécie foi maior no cenário com a presença do biochar ($p < 0,05$). Houve reprodução de 171 juvenis no tratamento com fipronil sem o biochar e de 246 organismos na presença do biochar, o que sugere que o biochar foi capaz de diminuir a toxicidade dos agrotóxicos para essa espécie. Os dados da quantificação indicaram que o biochar sorveu grande parte do fipronil do solo, o que pode ter reduzido a biodisponibilidade para os enquitreídeos. Outros autores também já obtiveram resultados promissores em relação à eficiência de sorção do biochar feito a partir da cana-de-açúcar (HUANG *et al.*, 2018; CUBA *et al.*, 2018; SILVA, 2015; AZEVEDO, 2016; RAMIREZ, 2018; BRITO *et al.*, 2020). Em relação ao experimento para análise dos efeitos do agrotóxico sobre a alimentação,

usando as *Bait lâminas*, verificou-se que todo o alimento foi consumido pelos organismos, não existindo, portanto, diferença estatística entre os tratamentos ($p > 0,05$).

Os endpoints observados para *E. sativa* no teste multiespécie foram germinação, crescimento, biomassa fresca e seca (Figura 14).

Figura 14. Resultados do teste de germinação, crescimento, massa fresca e seca da espécie de *E. sativa* nos microcosmos. Asterisco (*) indica diferença significativa no mesmo tratamento com e sem biochar. Letras correspondem a diferenças entre os tratamentos na ausência (letra minúscula) e presença de biochar (letra maiúscula). "A" indica diferença significativa em relação ao controle com biochar. "a" indica diferença significativa em relação ao controle sem biochar. "B" indica diferença significativa em relação ao tratamento 2,4-D com biochar. "b" indica diferença significativa em relação ao tratamento 2,4-D sem biochar. "C" indica diferença significativa em relação ao tratamento fipronil com biochar e "c" indica diferença significativa em relação ao tratamento fipronil sem biochar.



N: ausência de biochar; **B:** presença de biochar

Fonte: Autor (2023)

De acordo com os resultados de germinação da espécie *Eruca sativa*, é possível observar que não houve diferença estatística no tratamento controle com a presença e ausência

de biochar. Entretanto, ao comparar o controle sem biochar com os tratamentos com 2,4-D e mistura também sem biochar, percebe-se que há diferenças significativas ($p < 0,05$). Os valores de germinação no tratamento com 2,4-D e mistura foram de 25% e 15%, respectivamente, enquanto no controle foi de 70%. Resultados significativamente diferentes no tratamento mistura sem biochar (12%) ocorreram quando comparados ao tratamento com fipronil também na ausência do bichar (45,8%) ($p < 0,05$). Diversos trabalhos reportados na literatura mostram que o herbicida 2,4-D é nocivo para espécies de plantas não-alvo. Triques *et al.* (2021) mostraram em seu trabalho que metade da dose recomendada do herbicida foi capaz de causar severos efeitos para as espécies *Raphanus sativus* e *Allium cepa*, reduzindo os valores de germinação em 95% e 90%, respectivamente. Os autores Cassanego *et al.* (2010) explicam que, quando expostas em baixas concentrações (0,32 – 4,8 ml/L), o crescimento das células vegetais pode ser estimulado quebrando a dormência das sementes, considerando a interação do herbicida com os hormônios endógenos como ácido abscísico, auxinas, ácido giberélico e etileno. Entretanto, quando em altas concentrações, os herbicidas são capazes de inibir ou retardar a germinação de dicotiledônias e monocotiledôneas, afetando assim a sua germinação. A mistura de agrotóxicos também vem sendo estudada a fim de avaliar se os efeitos de agrotóxicos combinados são maiores ou menores de quando analisados de forma isolada. É possível perceber que o inseticida fipronil não causou efeito estatisticamente relevante na germinação das plantas quando comparado ao controle, percebido que o inseticida é designado para agir no sistema nervosos de insetos. Todavia, o tratamento mistura apresentou resultados estatisticamente relevantes. Moreira *et al.* (2020), Pinto *et al.* (2021) e Silva *et al.* (2020), já evidenciaram resultados mais severos nos cenários de exposição utilizando a mistura do 2,4-D e fipronil, assumindo que seus efeitos podem ser potencializados quando em conjunto.

É possível perceber também que, quando comparado ao controle com biochar, os tratamentos 2,4-D e mistura mostraram valores significativamente diferentes ($p < 0,05$). Enquanto obteve-se um valor de germinação de 70% no controle com biochar, foram obtidos valores dede 25% e 27% nos tratamentos 2,4-D e mistura, com efeitos significativos na germinação mesmo na presença do biochar ($p < 0,05$). O tratamento com fipronil e com biochar também foi significativo ao compará-lo com o tratamento 2,4-D na presença do biochar ($p < 0,05$). Em relação ao tratamento fipronil, na ausência do biochar, houve uma germinação de 45,8% das sementes, enquanto obteve-se um valor de 79,2% de germinação na presença do biocarvão. Tais resultados podem ser explicados devido às propriedades do

biochar, que proporcionam melhores condições para plantas terrestres. De acordo com Ogura *et al.* (2021), as propriedades do biochar (e.g., estrutura de poros, ASE, alto pH e alta CTC) melhoram a qualidade do solo, promovem aumento de nutrientes e capacidade de retenção hídrica, além de auxiliar a imobilização dos agrotóxicos no solo e o aumento da fertilidade e aeração. Alguns parâmetros físico-químicos do biochar favorecem o estabelecimento de plantas no solo, como o teor de carbono (52,6) e os nutrientes P (1,8 kg/kg) e K (5,1 g/kg). Outros autores utilizaram o biochar para melhorar o estabelecimento de culturas. Major *et al.* (2010, por exemplo, aumentaram a produtividade de milho utilizando doses de 0,8 e 20 mg/ha, enquanto Islami *et al.* (2011) ampliaram a produção de mandioca em 32% usando doses de 15 mg/ha.

Quanto ao crescimento da parte aérea de *E. sativa*, percebeu-se que todos os tratamentos sem biochar tiveram diferença significativa quando comparados com o controle na ausência do biochar ($p < 0,05$), com exceção do tratamento com fipronil. Enquanto no controle (sem biochar) houve um crescimento total de 4,3 cm, obteve-se comprimentos de 1,1 cm no tratamento com 2,4-D, de 3,9 cm no tratamento com fipronil e de 0,9 cm no tratamento com a mistura dos agrotóxicos. O crescimento no tratamento fipronil sem biochar (3,9 cm) foi maior quando comparado com o 2,4-D, com um crescimento de 1,1 cm. Ao comparar o tratamento da mistura dos agrotóxicos sem biochar (0,9 cm), percebeu-se uma diferença significativa quando comparado ao fipronil também sem biochar (3,9 cm) ($p < 0,05$). Esses resultados são semelhantes ao que é reportado na literatura referente ao 2,4-D e à mistura dos agrotóxicos serem mais tóxicos para espécies de plantas terrestres, notado o modo de ação de cada agrotóxico (TRIQUES *et al.*, 2021). Ogura *et al.* (2022) também não encontraram toxicidade significativa ao expor a espécie *Eruca sativa* a concentrações de fipronil (até 42,5 μg/L). Entretanto o herbicida 2,4-D causou alta toxicidade mesmo nas menores concentrações testadas (0,2 μg/L).

Nos ecossistemas ou em modelos ecossistêmicos mais complexos (representados por estudos em mesocosmos), outros organismos não-alvo podem estar expostos, devido à grande biodiversidade de fauna e flora. Portanto, se faz necessária uma análise sistêmica dos resultados, diante da diversidade e complexibilidade das condições reais. Ogura *et al.* (2022), por exemplo, não evidenciaram resultados significativos do fipronil para espécie *E. sativa*.

Entretanto, no mesmo estudo em mesocosmos, Pinto *et al.* (2021) e Silva *et al.* (2021) reportaram que, nas mesmas condições e concentrações, o fipronil se mostrou altamente tóxico para as espécies *Ceriodaphnia silvestrii* e *Hyalella meinerti*. Em relação às

comparações feitas nos tratamentos com biochar, percebeu-se que o crescimento da parte aérea do tratamento 2,4-D com biochar (2,2 cm) foi significativamente menor quando comparado ao controle com biochar (4,3 m) ($p < 0,05$). Já no tratamento do fipronil com o biochar (4,8 cm) houve um crescimento elevado quando comparado ao tratamento 2,4-D com biochar (2,2 cm). Ao comparar a mistura na presença do biochar com o tratamento fipronil (com biochar) as diferenças foram de 1,2 cm e 4,8 cm, respectivamente. Esses dados sugerem que o biochar foi benéfico para o crescimento da parte aérea da espécie *E. sativa*, observado as médias terem sido mais altas em todos os tratamentos com a presença do biocarvão. Além disso, o biochar mostrou resultados significativamente satisfatórios no tratamento com fipronil, uma vez que houve crescimento de 4,8 cm com o biochar e 3,8 cm sem o biochar. Milla *et al.* (2013) também observaram aumento na biomassa, largura das folhas, raiz e haste ao utilizar biocarvão de casa de arroz em solo cultivado com espinafre.

Em relação à biomassa fresca de *E. sativa*, os tratamentos 2,4-D (0,14 g) e mistura (0,11 g) sem biochar foram significativamente menores quando comparado com o controle, também sem biochar (0,54 g) ($p < 0,05$). Triques *et al.* (2021) também demostraram fitotoxicidade do agrotóxico 2,4-D e mistura (2,4-D + fipronil) na biomassa seca das espécies *R. sativus* (CE_{50}: 1,84 mg/kg) e *A. cepa* (CE_{50}: 3,11 mg/kg). Grossmann (2010) corrobora com essa comparação de resultados, explicando que os agrotóxicos ou agentes estressores prejudicam os estômatos das plantas, que tem como consequência o desequilíbrio na atividade de transpiração, diminuindo, assim, seu conteúdo de água. O autor ainda menciona que esse processo de desregulamentação do crescimento das plantas expostas a herbicidas auxínicos (mimetizam a auxina) está relacionado a um fenômeno conhecido como overdose de auxina nos tecidos vegetais. Esse processo pode levar a uma interação com diversos hormônios no tecido da planta, bem como um desequilíbrio na homeostase da auxina. Quando analisado os tratamentos na presença do biochar, em relação ao controle com biochar (0,6 g), todos os tratamentos foram significativamente diferentes ($p < 0,05$), sendo 2,4-D (0,16 g), fipronil (1,00 g) e mistura (0,10 g). A biomassa fresca no tratamento fipronil (1,00 g), na presença do biochar, foi significativamente maior quando comparado ao tratamento 2,4-D também na presença do biochar (0,16 g) ($p < 0,05$). Outra comparação a ser destacada é a diferença do tratamento mistura com o tratamento fipronil, ambos com biochar ($p < 0,05$). Ao comparar os valores da biomassa fresca no tratamento fipronil na ausência e presença do biochar, houve diferença significativa ($p < 0,05$), com valores de 0,4 g e 1,0 g na ausência e presença do biochar, respectivamente. Silva *et al.* (2019) também obtiveram resultados análogos ao

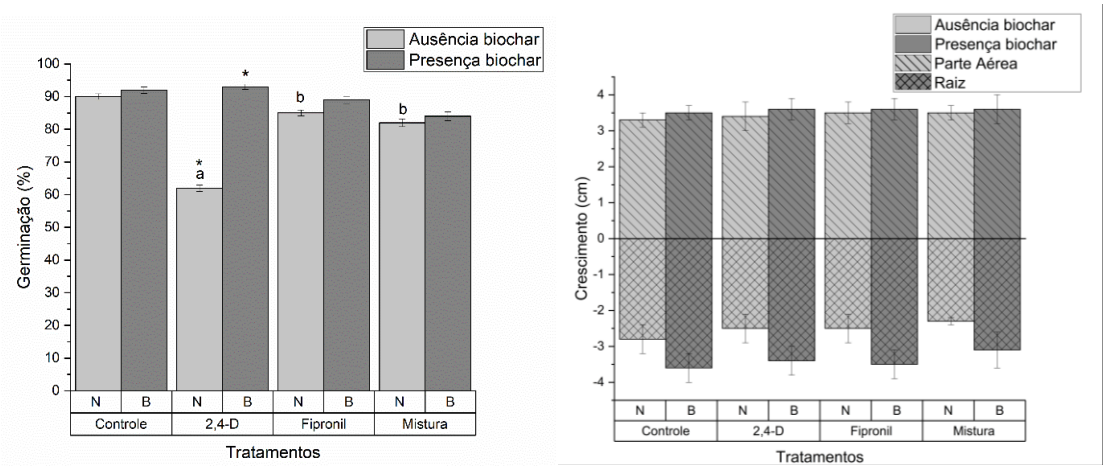
utilizar o biochar como condicionante do solo, para melhoria de parâmetros da espécie de alface *Lactuca sativa L.* Os autores concluíram que 5% de biochar foram suficientes para aumentar os níveis de biomassa fresca da parte aérea das plântulas de alface. Os autores atribuíram tais resultados à presença do biochar, o qual promove uma maior absorção dos nutrientes pelas plantas, e às funções da superfície reativa nas extremidades dos poros do biochar.

Para a biomassa seca de *E. sativa* houve diferenças significativas quando comparados os tratamentos fipronil (0,12 g) e 2,4-D (0,02 g), ambos com biochar ($p < 0,05$). Os valores encontrados na mistura (0,03 g) também são significativamente menores quando comparados com o tratamento do fipronil isolado (0,12 g), ambos com biochar ($p < 0,05$). Além disso, houve diferença significativa quando comparado a ausência e presença de fipronil, indicado pelo asterisco (*). Portanto, não houve influência significativa dos agrotóxicos (sem biochar) na biomassa seco da espécie *E. sativa*, mesmo diante de valores mais baixos nos tratamentos com 2,4-D e mistura. Entretanto, trabalhos como o de Triques *et al.* (2021) mostram que ¼ da dose recomendada do herbicida 2,4-D (1,117 mg/L) foi capaz de inferir efeitos negativos na biomassa seca da espécie *R. sativus*. Então, a adição do bichar no solo foi positiva em relação aos tratamentos sem biochar, em especial no tratamento com fipronil. Silva *et al.* (2019) explicam que o biochar exerce efeitos diretos e indiretos para espécies de plantas terrestres, como liberação de nutrientes e melhoras no pH, respectivamente. Portanto, sempre será necessário se atentar às características do biochar e do solo, ao estimar os efeitos positivos do biocarvão, uma vez que, em uso demasiado, o mesmo pode ser tóxicos para as plantas.

6.5.Teste de ecotoxicidade solo

Os gráficos da Figura 15, mostram os resultados dos testes com a espécie *E. sativa*.

Figura 15. Resultados dos testes de germinação e crescimento da espécie *E. sativa* com solo dos microcosmos. Asterisco (*) indica diferença significativa no mesmo tratamento com e sem biochar. Letras correspondem a diferenças entre os tratamentos na ausência (letra minúscula) e presença de biochar (letra maiúscula). "a" indica diferença significativa em relação ao controle sem biochar e "b" indica diferença significativa em relação ao tratamento 2,4-D sem biochar.



N: ausência de biochar; **B:** presença de biochar

Fonte: Autor (2023)

Quando comparado ao controle sem biochar (90%), o tratamento com 2,4-D (60%) teve seus resultados significativamente diferentes ($p < 0,05$). Os tratamentos fipronil (85%) e mistura (82%) (ambos com a ausência do biochar) também possuem valores de germinação significativamente diferentes quando comparados ao 2,4-D, sem o biochar (60%) ($p < 0,05$). Em relação à germinação de *E. sativa* com solo, com os resultados do teste em microcosmo foram similares em relação ao herbicida ($p > 0,05$). Ambos os testes mostram que o 2,4-D foi significativamente tóxico para a germinação da espécie em relação ao fipronil e ao controle (ambos sem biochar). Ao comparar os testes, foi possível perceber que os efeitos do fipronil e da mistura dos agrotóxicos são maiores nos testes em microcosmos. Autores como Daam *et al.* (2011), ressaltaram que estudos e ensaios laboratoriais de bancada são muito úteis na avaliação dos efeitos de substâncias xenobióticas sobre os organismos, sendo caracterizados por sua maior praticidade e agilidade e menores custos e variáveis em sua execução. Todavia, sabe-se que o compartimento ambiental está exposto a diversas variáveis e interferências externas (e.g., clima, umidade, chuva) e internas (e.g., relações entre espécies) e, por isso,

ensaios em micro e mesocosmos são aconselhados para uma visão mais sistêmica e realística dos resultados, tanto para extrapolação ou comparação com os ensaios laboratoriais (MOREIRA, 2021). No tratamento com 2,4-D, houve diferenças significativas ($p < 0,05$) na germinação, sendo de 60% sem o biochar e 93% com o biochar. Portanto, a presença do biochar influenciou a germinação da espécie no teste com solo para o tratamento 2,4-D, diferentemente do teste em microcosmo, do qual não houve diferença significativa na germinação na presença ou ausência de biochar. Essa diferença pode ser atribuída devido às condições diferentes adotadas para cada teste, uma vez que o teste em microcosmos teve duração de 28 dias na presença de luz em fotoperíodo de 12L:12E, enquanto o teste de germinação, apenas com o solo, teve duração de 5 dias na ausência de luz.

Em relação às análises de parte área e raiz, não houve diferença estatística dos dados ($p > 0,05$), mesmo diante dos valores iguais ou superiores encontrados em todos os tratamentos com a presença do biochar. Como ressaltado por Daam *et al.* (2011), aconselha-se então que sejam realizados testes em micro e mesocosmos para uma maior realidade e confiabilidade dos resultados, visto todas as interações e fatores internos e externos da natureza.

6.6. Teste de ecotoxicidade com amostras de elutriato

O elutriato produzido a partir do solo do microcosmo foi utilizado para simular os efeitos dos agrotóxicos para os organismos do ambiente aquático. Os parâmetros físicos e químicos analisados referentes ao elutriato estão dispostos na Tabela 11.

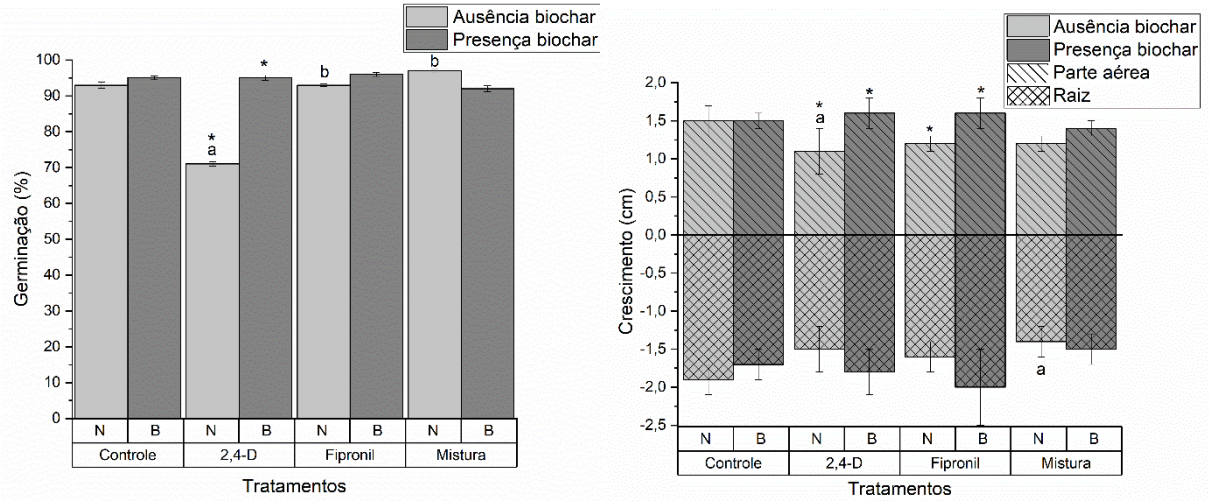
Tabela 11. Parâmetros físico-químicos do elutriato

Tratamento	Oxigênio dissolvido (mg/L)	pH	Condutividade elétrica (µS/cm)	Turbidez (FTU)
Branco	6,4	7,6	208,5	0,0
Controle	6,3	7,8	177,6	145,3
2,4-D	6,1	7,8	185,6	322,8
Fipronil	6,2	7,6	180,4	141,0
Mistura	6,3	7,6	185,6	262,3
Controle + biochar	7,4	6,8	163,0	366,5
2,4-D + biochar	7,2	6,1	172,1	286,0
Fipronil + biochar	7,2	7,4	161,6	274,8
Mistura + biochar	7,0	7,4	177,2	286,8

Fonte: Autor (2023)

Os resultados referentes ao teste de germinação e crescimento da espécie *E. sativa* com o elutriato estão dispostos na Figura 16.

Figura 16. Resultados testes de germinação e crescimento da espécie *E. sativa* com elutriato dos microcosmos. Asterisco (*) indica diferença significativa no mesmo tratamento com e sem biochar. Letras correspondem a diferenças entre os tratamentos na ausência (letra minúscula) e presença de biochar (letra maiúscula). "a" indica diferença significativa em relação ao controle sem biochar e "b" indica diferença significativa em relação ao tratamento 2,4-D sem biochar.



N: ausência de biochar; **B:** presença de biochar

Fonte: Autor (2023)

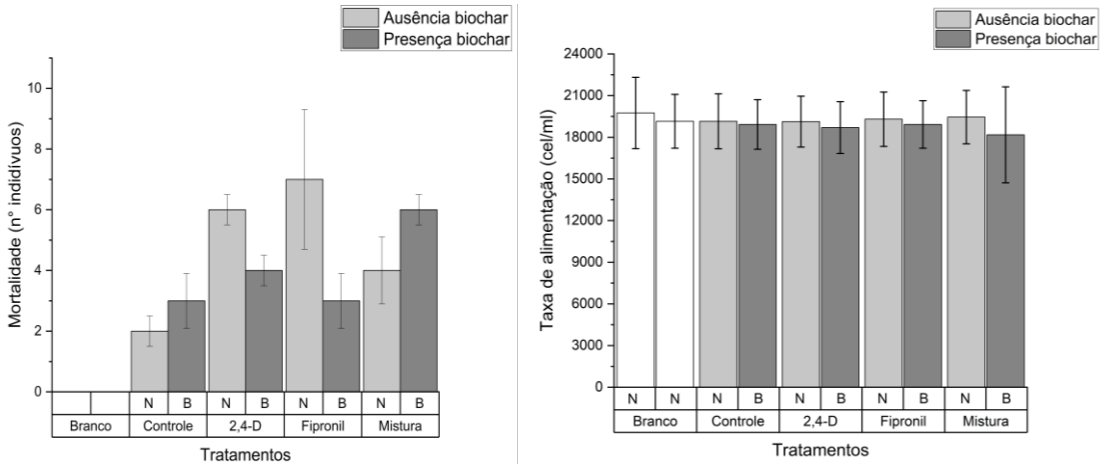
Os testes de germinação feitos em filtro de papel regados com o elutriato tiveram resultados significativos nos mesmos tratamentos do teste realizado com solo. Resultados significativos foram observados com o tratamento 2,4-D (70,8%) quando comparados com o controle (93,3%) (sem biochar) ($p < 0,05$). Os tratamentos fipronil (93,3%) e mistura (96,7%), ambos sem biochar, possuem valores estatisticamente diferentes quando comparado ao tratamento 2,4-D sem biochar (70,8%). Houve uma taxa de germinação de 70,8% sem o biochar e 95% com o biocarvão no tratamento 2,4-D ($p < 0,05$). Desse modo, o tratamento com 2,4-D se mostrou o mais tóxico dentre todos os cenários de exposição. O biochar, por sua vez, também se apresenta como uma possível alternativa de diminuição da toxicidade do herbicida 2,4-D para a espécie *E. sativa*.

Em relação ao crescimento da parte aérea e raiz dessa espécie, houve reduções significativas no comprimento da parte aérea no tratamento 2,4-D (1,1 cm) e da raiz no tratamento mistura (1,4 cm), quando comparados ao controle (1,5 cm de parte aérea e 1,9 cm de raiz), ambos sem biochar ($p < 0,05$). Diferenças significativas também foram identificadas na parte aérea das plantas, quando comparados a ausência e presença do biochar nos tratamentos 2,4-D e fipronil ($p < 0,05$). Para o tratamento 2,4-D, houve crescimento de 1,1 e

1,6 cm na ausência e presença do biochar, respectivamente. Já no tratamento com fipronil, houve um crescimento de 1,2 cm sem o biochar e 1,6 cm com o biochar. Os resultados aqui indicam mais uma vez um possível desequilibro na homeostase da auxina das plantas provocadas pelo herbicida 2,4-D isolado e em mistura, favorecendo a redução do corpo vegetal dos espécimes (GROSSMANN, 2010). É possível inferir também, a partir dos resultados, que o biochar influenciou de forma positiva o crescimento da parte aérea das espécies, nos tratamentos 2,4-D e fipronil. Freitas *et al.* (2022) também encontraram efeitos tóxicos do 2,4-D sob a espécie *E. sativa*, mesmo em concentrações baixas, como em 10,3 e 16,0 µg/L. Os autores discutiram também que, mesmo em baixa concentração, o herbicida tem potencial de gerar efeitos fitotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e letais em plantas terrestres.

O resultado referente aos testes de toxicidade aguda e pós-exposição realizados com a espécie aquática *D. similis* estão dispostos na Figura 17. O primeiro gráfico da figura 17 representa a mortalidade dos organismos e o segundo a taxa de alimentação mediante teste pós-exposição, nos respectivos cenários de exposição propostos.

Figura 17. Resultados dos testes realizado com espécie aquática *Daphnia similis.* Asterisco (*) indica diferença significativa no mesmo tratamento com e sem biochar. Letras correspondem a diferenças entre os tratamentos na ausência (letra minúscula) e presença de biochar (letra maiúscula).



N: ausência de biochar; **B:** presença de biochar; Densidade de alga inoculada: 3,2 ml/L

Fonte: Autor (2023)

O tratamento estatístico (Two-Way ANOVA) simples e com interação, mostraram que há diferenças significativa nos tratamentos em relação a presença e ausência dos agrotóxicos, desconsiderando a presença do biochar ($P<0,05$ para ambos os modelos). Todavia, ao aplicar o teste de comparações múltiplas (pós-hoc) de Tukey, modelo com interações, é possível

perceber que não há diferenças estatísticas entre os tratamentos ao analisar a presença e ausência do biochar. Isso significa que os valores de mortalidade diferem estatisticamente entre si nos tratamentos sem a presença do biochar, ou seja, no controle, 2,4-D, fipronil e mistura. Todavia o teste pós-hoc de Tukey mostrou que os resultados não são significativamente diferentes quando analisada a presença ou ausência do biochar. Portanto, foi realizado um teste pós-exposição a fim de avaliar possíveis interferências dos agrotóxicos na presença e ausência do biochar na taxa de alimentação dos organismos. Ambos os testes não apresentaram resultados significativos, sugerindo que tanto os agrotóxicos quanto o biochar, nas concentrações estudadas, não influenciaram a taxa de alimentação de *D. similis*. Esses resultados podem ser explicados uma vez que os analitos 2,4-D e fipronil estiveram abaixo do limite de quantificação instrumental de 0,5 µg L^{-1} para o fipronil, fipronil sulfeto e fipronil sulfona e de 1,0 µg L^{-1} para o 2,4-D.

Entretanto, é importante ressaltar que outros autores já comprovaram toxicidade dos agrotóxicos 2,4-D e fipronil para cladóceros e ao contrapor tais dados citados a seguir, percebe-se que os valores limites das concentrações quantificadas no presente trabalho são inferiores àquelas que causariam efeitos crônicos, por esse motivo optou-se pelo teste pós-exposição. Silva *et al.* (2020) encontraram valores de CE_{50}-48h para *C. silvestrii* de 169 ± 18 mg i.a./L e 3,9 ± 0,5 µg i.a./L para 2,4-D e fipronil, respectivamente. Nesse mesmo estudo, foram encontrados nos testes crônicos de reprodução, valores de CE_{50}-8d de 55 mg i.a./L para o 2,4-D e 1,6 µg i.a./L para o fipronil. Os autores concluíram que as concentrações mais altas de 2,4-D foram capazes de inibir totalmente a reprodução da espécie, e que o fipronil se mostrou 43x mais tóxico que o herbicida. Outros valores de CL_{50} para espécies de cladóceros foram reportadas na literatura. Para o 2,4-D, LC_{50}-48h no valor de 135 mg/L foram encontrados para espécie *D. magna* (EFSA, 2014), LC_{50}-48h de 36 mg/L mg/L para espécie *C. dubia* (ALEXANDER *et al*., 1985) e LC_{50}-48h 20 mg/L para espécie *D. lumholtzi* (GEORGE *et al.*, 1982). Para o fipronil, os valores de CL_{50} são menores, diante do modo de ação do inseticida. Silva *et al.* (2020) fizeram uma média dos valores reportados na literatura, sendo LC_{50}-48h de 132 µg/L para espécie *D. magna*, LC_{50}-48h no valor de 28 µg/L e 17 µg/L para espécie *C. dubia*. Já para a espécie de *C. reticulata e M. macrocopa* as médias calculadas foram de 9 e 29 µg/L, respectivamente.

Moreira *et al.* (2014) explicam que diferentes resultados encontrados utilizando os mesmos compostos e organismos são comuns uma vez que as condições dos testes em laboratório são distintas, como a mudança de temperatura, tempo de exposição, parâmetros da

água reconstituída de cultura (e.g., pH, dureza, condutividade elétrica) e fotoperíodo. Portanto, para maior compreensão dos resultados dos testes com a espécie *D. similis*, sugere-se que testes mais representativos sejam realizados nas mesmas condições dos testes adotados para essa pesquisa, para fins de comparação.

7. CONCLUSÕES

O biochar produzido a partir da palha da cana-de-açúcar possuiu capacidade de diminuir a ecotoxicidade de solos contaminados com os agrotóxicos 2,4-D e fipronil de forma isolada e em mistura. Houve diminuição da ecotoxicidade para as espécies de organismos terrestres não-alvos *E. sativa* e *E. crypticus*. Entretanto, como os resíduos dos agrotóxicos não foram detectados nas amostras de elutriato, não foi possível inferir sobre a influência do biochar na redução de toxicidade para *D. similis*.

Para *E. crypticus*, o fipronil, isolado e em mistura, foi capaz de gerar efeitos adversos na sobrevivência e na reprodução. O 2,4-D isolado e em mistura se mostrou significativamente tóxico para a espécie *E. sativa*, resultado já esperado devido ao modo de ação do agrotóxico. Entretanto, o biochar foi capaz de reduzir a toxicidade aos organismos bioindicadores em microcosmos e com as amostras de solo, reduzindo a letalidade e aumentando a reprodução de *E. crypticus* e promovendo crescimento da parte aérea, da raiz, além da biomassa fresca e seca de *E. sativa*. Destaca-se que os dados em microcosmo foram mais significativos quando comparados aos resultados dos testes com solo e elutriato, uma vez que consistem em testes mais realísticos e representativos.

A hipótese geral do trabalho (o biochar feito a partir da palha da cana-de-açúcar possui capacidade de diminuir a ecotoxicidade dos solos contaminados com os agrotóxicos Regent® 800 WG (i.a. fipronil) e DMA® 806 BR (i.a. 2,4-D), isolados e em mistura) foi aceita, uma vez que o biochar mostrou, através dos bioindicadores e análises químicas, a diminuição dos agrotóxicos no solo e redução da ecotoxicidade.

A primeira hipótese específica (os agrotóxicos Regent® 800 WG e DMA® 806 BR, isolados e em mistura, podem exercer efeitos tóxicos sob as espécies não-alvos de organismos *Enchytraeus crypticus* e *Eruca sativa* e *Daphnia similis*) foi aceita parcialmente. Isso em virtude dos efeitos comprovados dos agrotóxicos na sobrevivência, reprodução da espécie *E. crypticus* e crescimento e germinação da espécie *E. sativa* e a não detecção dos efeitos na espécie aquática *D. similis*.

A segunda hipótese da pesquisa (o biochar produzido a partir da palha da cana-de-açúcar possui capacidade de diminuir a ecotoxicidade de solos contaminamos com os agrotóxicos Regent® 800 WG e DMA® 806 BR) foi aceita, já que o biochar apresentou, na maioria dos casos, resultados estaticamente positivos para as espécies bioindicadoras.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No decorrer do trabalho, diversas limitações e sugestões foram percebidas, sendo assim, propõe-se para as próximas pesquisas que englobem a avaliação do biochar utilizando bioindicadores, que:

(1) sejam avaliadas diferentes temperaturas (>550°C) no processo de pirólise para uma mesma matéria prima na produção do biochar, a fim de avaliar e correlacionar as diferenças de temperaturas com os *endpoints* analisados;

(2) o perfil do solo seja avaliado (diferentes profundidades), mediante à forma de contaminação do experimento e ao comportamento ambiental dos contaminantes, uma vez que os agrotóxicos com baixa mobilidade podem ficar predominantemente na superfície do solo;

(3) seja realizado testes com os metabólitos dos agrotóxico fipronil, uma vez que, mesmo sabendo da sua toxidade, poucos são os conhecimentos em relação aos efeitos sobre as espécies aquáticas e terrestres;

(4) se considere a realização de testes em mesocosmos, em função da maior complexibilidade dos sistemas ambientais e das variáveis externas atuantes nos processos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, Z. *et al.* A critical review of mechanisms involved in the adsorption of organic and inorganic contaminants through biochar. **Arabian Journal of Geosciences**, v. 11, n. 16, p. 1-23, 2018.

ABNT. NBR 12713. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera)**, 2016.

AGROFIT - **Sistema de pesticidas fitossanitários**. Disponível em <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acessado em 16 out. 2020

AHMAD, M et al. Biochar as a sorbent for contaminant management in soil and water: a review. **Chemosphere**, v. 99, p. 19-33, 2014.

ALEXANDER HC, G. FM, M. MA (1985) Acute toxicity of four phenoxy herbicides to aquatic organisms. **Bull Environ Contam Toxicol** 35:314–321. https://doi.org/10.1007/bf01636516

ALLEN, Y., CALOW, P., BAIRD, D.J., 1995. A MECHANISTIC MODEL OF CONTAMINANT-INDUCED FEEDING INHIBITION IN DAPHNIA MAGNA, **Environmental Toxicology and Chemistry.** https://doi.org/https://doi.org/10.1002/etc.5620140923

ALVES. O. R. **Phytoremediation and ecotoxicological effects of iron mining tailings after the Fundão dam rupture in Mariana-MG**. 2020. 155. Tese (Doutorado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2020.

AMBRÓSIO, J. B. **Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de 2 classes de agrotóxicos utilizados em cultura de cana-de-açúcar no estado de São Paulo Brasil.** 137 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Programa De Pós-Graduação Em Ciências Biológicas – Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho". Rio Claro. 2012

ANDREI, E. (Coord.). **Compêndio de defensivos agrícolas**. 10.ed. São Paulo: Andrei, 2017.

ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILANCIA SANITÁRIA. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - **RDC Nº 294**, DE 29 DE JULHO DE 2019. Disponível em <https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-da-diretoria-colegiada-rdc-n-294-de-29-de-julho-de-2019-207941987>. Acessado: 06 nov. 2021

ANTUNES, S. C. et al. Structural effects of the bioavailable fraction of pesticides in soil: Suitability of elutriate testing. **Journal of Hazardous Materials**, v. 184, n. 1-3, p. 215-225, 2010.

ARANHA. A; ROCHA, L. **Repórter Brasil**. "Coquetel" com 27 agrotóxicos foi achado na água de 1 em cada 4 municípios. 2019. Disponível em: < https://reporterbrasil.org.br/2019/04/coquetel-com-27-agrotoxicos-foi-achado-na-agua-de-1-em-cada-4-municipios/>. Acessado em 06 nov. 2021.

ARSEGO, I. B. **Sorção dos herbicidas diuron e hexazinone em solos de texturas contrastantes**. 2009. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009. doi:10.11606/D.11.2009.tde-09092009-110016. Acesso em: 2022-11-29.

ASTM, 2007. ASTM D1762-84 - **Standard Test Method for Chemical Analysis of Wood**. https://doi.org/10.1520/D1762-84R13. 2007.

AZEVEDO, F. A; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. Editora RiMa e InterTox. 1 Ed. São Carlos. 2003.

AZEVEDO, M. M. P**ersistência e sorção/dessorção de herbicidas em solo condicionado com carvão de cana-de-açúcar**. Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2016.

BARBOSA, L. M. S. **Avaliação do desemprenho da cinza do bagaço de cana-de-açúcar na adsorção de fipronil**. Dissertação. Programa de pós-graduação em Engenharia Civil. Universidade Estadual "Júlio Mesquita Filho". Ilha Solteira. 2020.

BASHIR, S. *et al.* Comparative efficiency of wheat straw and sugarcane bagasse biochar reduces the cadmium bioavailability to spinach and enhances the microbial activity in contaminated soil. **International journal of phytoremediation**, v. 21, n. 11, p. 1098-1103, 2019.

BEESLEY, L. et al. A review of biochars' potential role in the remediation, revegetation and restoration of contaminated soils. **Environmental pollution**, v. 159, n. 12, p. 3269-3282, 2011.

BHARATIYA, R. et al. The pesticide fipronil injected into the substantia nigra of male rats decreases striatal dopamine content: A neurochemical, immunohistochemical and behavioral study. **Behavioural brain research**, v. 384, p. 112562, 2020.

BIELSKÁ, L. et al. Sorption, bioavailability and ecotoxic effects of hydrophobic organic compounds in biochar amended soils. **Science of the total environment**, v. 624, p. 78-86, 2018.

BORTOLUZZI, E. C. et al. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, p. 881-887, 2006.

BRASIL. Lei nº 6.938, de 31 de agosto de 1981. Dispõe sobre a **Política Nacional do Meio Ambiente**, seus fins e mecanismos de formulação e aplicação, e dá outras providências. 1981. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l6938.htm. Acessado em: 02 nov. 2021.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. **Diário Oficial da União**. Disponível em: < http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l7802.htm>. Acesso em: 15 out. 2021

BRASIL. Resolução N° 420, de 28 de dezembro de 2009. **Diário Oficial da União**. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas/wp-content/uploads/sites/17/2017/09/resolucao-conama-420-2009-gerenciamento-de-acs.pdf>. Acessado 30. out. 2021

BRASIL. Resolução nº 807, de 23 de janeiro de 2020. **Diário Oficial da União**. Edição: 17. Seção 1 Página: 46. Disponível em: < https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-n-807-de-23-de-janeiro-de-2020-239635261>. 23 jan. 2020. Acessado 27. out. 2021

BRITO, G, et al. High-performance of activated biocarbon based on agricultural biomass waste applied for 2, 4-D herbicide removing from water: adsorption, kinetic and thermodynamic assessments. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v. 55, n. 9, p. 767-782, 2020.

BROWN, G. G. et al. **Ecotoxicologia terrestre: métodos e aplicações dos ensaios com oligoquetas**. Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias. Manual Técnico. 2019. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/1115956/ecotoxicologia-terrestre-metodos-e-aplicacoes-dos-ensaios-com-oligoquetas>. Acessado em: 14 de dez. 2022

CASSANEGO, M. B. B.; DROSTE, A.; WINDISCH, P. G. Effects of 2, 4-D on the germination of megaspores and initial development of Regnellidium diphyllum Lindman (Monilophyta, Marsileaceae). **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, p. 361-366, 2010.

CETESB – COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Áreas contaminadas e reabilitadas no estado de São Paulo**. Disponível em: <https://cetesb.sp.gov.br/areas-contaminadas/wp-content/uploads/sites/17/2021/03/Areas-Contaminadas-2020.pdf>. Acesso: 30 out. 2021

CHAGURI, J. L. **Efeitos da exposição ao pesticida fipronil nas alterações pressóricas em ratos acordados**. 2016. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, Unesp, Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Biotecnologia. 2016.

CHAIB, J. G. **Produção de biochar por pirólise de resíduos verdes de um horto e avaliação do seu potencial no crescimento de *Lactuca sativa***. Tese de Doutorado. Programa de pós-graduação em Energias renováveis. Porto. 2019.

CHELINHO, S. *et al*. Integrated ecological risk assessment of pesticides in tropical ecosystems: a case study with carbofuran in Brazil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 31: 437-445, 2012.

CHEN, B.L., ZHOU, D.D., ZHU, L.Z. Transitional adsorption and partition of nonpolar and polar aromatic contaminants by biochars of pine needles with different pyrolytic temperatures. **Environmental Science and Technology** 42, 5137e5143. 2008.

CHRISTOFOLETTI, C. A. *et al*. O emprego de agrotóxicos na cultura de cana-de-açúcar. **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**, p. 51, 2017.

COELHO, R, D. Como Santa Catarina se tornou o primeiro estado a restringir agrotóxico que extermina abelhas. **Brasil de Fato**. Disponível em:

<https://www.brasildefato.com.br/2021/09/27/como-santa-catarina-se-tornou-o-primeiro-estado-a-restringir-agrotoxico-que-extermina-abelhas>. Acessado em 06 jan. 2022.

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento. **Safra de cana-de-açúcar no país aponta produção menor para o ciclo 2021/22.** Disponível em < https://www.conab.gov.br/ultimas-noticias/3998-safra-de-cana-de-acucar-no-pais-aponta-producao-menor-para-o-ciclo-2021-22>. Acessado em: 16 de outubro. 2021

CONTI, F. D. et al. Safety assessment of gasification biochars using Folsomia candida (Collembola) ecotoxicological bioassays. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 7, p. 6668-6679, 2018.

CONZ, R. F. **Caracterização de matérias-primas e biochars para aplicação na agricultura**. 2015. Tese de Doutorado. Programa de pós-graduação em Ciências. 133f. Universidade de São Paulo. 2015

CUBA, R. M. F. *et al*. Produção de biocarvão a partir de bagaço de cana-de-açúcar para remoção de glifosato (formulação comercial) em meio aquoso. Congresso Sul-Americana de resíduos Sólidos e Sustentabilidade. [...] **Anais.** Gramado. 2018.

DAAM, M. A. et al. Is it possible to extrapolate results of aquatic microcosm and mesocosm experiments with pesticides between climate zones in Europe? **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, n. 1, p. 123–126, 1 jan. 2011.

DO PRADO, C. C. A.; BONFÁ, M. R. L. **Estudo do metabolismo do fipronil por bactérias da coleção do laboratório de metagenômica-**UFGD.
European Food Safety Authority (EFSA) (2014) Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance 2,4-D. EFSA 12(9):3812

FAO – Organização das Ações Unidas para Agricultura. **Perspectivas Agrícolas 2015-2024**. Disponível em: < https://www.fao.org/3/i4761o/i4761o.pdf >. Acessado em 16 de outubro. 2021

FOX. J; WEISBERG S. (2019). An {R} Companion to Applied. **Regression, Third Edition. Thousand Oaks CA**: Sage. URL: https://socialsciences.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion/

FERNANDES, J. O. *et al*. Biochar Generated from Agro-Industry Sugarcane Residue by Low Temperature Pyrolysis Utilized as an Adsorption Agent for the Removal of Thiamethoxam Pesticide in Wastewater. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 232, n. 2, p. 1-13, 2021.

FONSECA, A. L. **Avaliação da qualidade da água na bacida do Rio Piracicaba/SP através de testes de toxicidade com invertebrados.** Doutorado—São Carlos: Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 1997.

FONSÊCA, M. C. **Avaliação da adsorção de fármacos presentes em amostras aquosas usando biocarvão de bagaço de cana-de-açúcar**. Dissertação. Mestrado em Química. Instituto de química Universidade Estadual Paulista. Araraquara. 2020.

FONTANETTI, C. S; BUENO, O. C. Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica. **Bauru, SP: Canal**, v. 6, p. 275, 2017.

FREITAS, I. B. F. et al. The Longitudinal Profile of a Stream Contaminated With 2, 4-D and its Effects on Non-Target Species. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 1, p. 131-141, 2022.

GEORGE J.P; HINGORANI HG; RAO K.S. Herbicide toxicity to fishfood organisms. **Environmental Pollution** (1982). Ser A, Ecol Biol 28:183–188. https://doi.org/10.1016/0143-1471(82)90074-5

GILLI, M. R. **Interferência no uso de maturadores associados aos nutrientes boro e magnésio na cultura da cana-de-açúcar.** Monografia. Curso de Agronomia. Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia. 2021.

GIORDANI, I. A. et al. Toxicidade de agrotóxicos de efeito fungicida e fungicida+ inseticida em Eisenia andrei. **Revista Ambiente & Água**, v. 15, 2020.

GODLEWSKA, P.; OK, Y. Sik; OLESZCZUK, P. The dark side of black gold: Ecotoxicological aspects of biochar and biochar-amended soils. **Journal of hazardous materials**, v. 403, p. 123833, 2021.

GOULART, B. V. *et al.* Matrix effect challenges to quantify 2,4-D and fipronil in aquatic systems. **Environmental Monitoring and Assessment**, 192:797, 2020.

GROSSMANN, K. Auxin herbicides: current status of mechanism and mode of action. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, v. 66, n. 2, p. 113-120, 2010.

GUPTA, S. et al. Carbonaceous inserts from lignocellulosic and non-lignocellulosic sources in cement mortar: preparation conditions and its effect on hydration kinetics and physical properties. **Construction and Building Materials**, v. 264, p. 120214, 2020.

HUANG, H. *et al*. Effects of biochar amendment on the sorption and degradation of atrazine in different soils. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, v. 27, n. 8, p. 643-657, 2018.

HUANG, H. et al. Effects of biochar amendment on the sorption and degradation of atrazine in different soils. **Soil and Sediment Contamination: An International Journal**, v. 27, n. 8, p. 643-657, 2018.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais. **Relatório de comercialização de agrotóxicos**. 2018. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acessado em 15 out. 2021.

IEA - Instituto de Economia Agronômica. **Relação de trocas entre defensivos e produtos agrícolas**. Disponível em < http://ciagri.iea.sp.gov.br/nia1/RelaTrocaDefensivos.aspx?cod_sis=20 >. Acessado em: 16 out. 2021

ISLAMI, T. et al. Biochar for sustaining productivity of cassava based cropping systems in the degraded lands of East Java, Indonesia. **Journal of Tropical Agriculture**, v. 49, p. 40-46, 2011.

JÄNSCH, S.; AMORIM, M. J.; RÖMBKE, J. Identification of the ecological requirements of important terrestrial ecotoxicological test species. **Environmental Reviews**, v. 13, n. 2, p. 51-83, 2005.

JUNIOR, V. B. P. **Estimativas, pelo método biológico, da sorção, lixiviação e de doses do diuron em diferentes solos**. 2022. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, Programa de Pós-Graduação em Fitotecnia. 2022

LACHER JR, T. E.; GOLDSTEIN, M. Tropical ecotoxicology: status and needs. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 16, n. 1, p. 100-111, 1997.

LIN, Y. et al. Water extractable organic carbon in untreated and chemical treated biochars. **Chemosphere**, v. 87, n. 2, p. 151-157, 2012.

LIMA, J. Z. et al. Biochar-pesticides interactions: An overview and applications of wood feedstock for atrazine contamination. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, p. 108192, 2022.

LOPES, J. R. A. **Transporte e interação do Imazapic em um argissolo amarelo sob adição de biocarvão**. Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia ambiental para obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental. Área de concentração: Controle e Remediação da Poluição. 57f. Acesso 29 de out. 2022

MAJOR, J. et al. Maize yield and nutrition during 4 years after biochar application to a Colombian savanna oxisol. **Plant and soil**, v. 333, n. 1, p. 117-128, 2010.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Relatório Produtos Formulados.** Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acessado em: 16 out. 2021.

MARGARIDO, T. C. S. et al. Biochemical biomarkers in Scinax fuscovarius tadpoles exposed to a commercial formulation of the pesticide fipronil. **Marine environmental research**, v. 91, p. 61-67, 2013.

MAROUANI, N. et al. Effects of oral administration of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) on reproductive parameters in male Wistar rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 1, p. 519-526, 2017.

MARQUES, C. J. G et al. Análise da potencialidade de contaminação hídrica subterrânea por agrotóxicos no cultivo de cana-de-açúcar no brasil. XI Congresso Brasileiro de Gestão Ambiental. **[Anais...]**. 2020. Acessado em: 30 out. 2021

MCWILLIAM, R. A.; BAIRD, D. J. Application of postexposure feeding depression bioassays with *Daphnia magna* for assessment of toxic effluents in rivers. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, n. 7, p. 1462-1468, 2002.

MCWILLIAM, R. A.; BAIRD, D. J. Postexposure feeding depression: a new toxicity endpoint for use in laboratory studies with Daphnia magna. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 21, n. 6, p. 1198-1205, 2002.

MIELKE, K. C. et al. Pyrolysis Temperature and Application Rate of Sugarcane Straw Biochar Influence Sorption and Desorption of Metribuzin and Soil Chemical Properties. **Processes**, v. 10, n. 10, p. 1924, 2022.

MILLA OV, R. EB, et al. Agronomic properties and characterization of rice husck and wood biochars and their effect on the growth of water spinach in a field test. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, 2013 vol.13 no.2 p. 251-266.

MMA – MINISTERIO DO MEIO AMBIENTE. **Recuperação de Áreas Contaminadas**. 2020. Disponível em: <file:///C:/Users/david/Downloads/ProgramaNacionaldeRecuperaodereasContaminadas.pdf>. Acessado em: 30 out. 2021

MONINI, M. S. D. C. *et al*. Cultura de cana-de-açúcar no brasil: manejo, impactos econômicos, sociais e ambientais. **Cana-de-açúcar e seus impactos: uma visão acadêmica**, 2017.

MORAES, S. L.; TEIXEIRA, C. E.; MAXIMIANO, A. M. S. Guia de elaboração de planos de intervenção para o gerenciamento de áreas contaminadas. **São Paulo: IPT/BNDS**, 2014.

MOREIRA R. A; MANSANO A, S; SILVA L. C O (2014) A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans Daphnia magna, Ceriodaphnia silvestrii and Macrothrix flabelligera. **Acta Limnol** Bras 26:1–8. https://doi.org/10.1590/S2179-75X2014000100002. 2014

MOREIRA, R. A. *et al*. Fipronil and 2, 4-D effects on tropical fish: Could avoidance response be explained by changes in swimming behavior and neurotransmission impairments? **Chemosphere**, v. 263, p. 127972, 2021.

MORRO, F. G. **Avaliação de agrotóxicos em amostras de solo e de morango de sistemas de produção agrícola convencional e agroecológico**. 114 fls. Dissertação de Mestrado. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. 2021.

NAKAGOME, F. K; NOLDIN, J. A; RESGALLA JR, C. Toxicidade aguda e análise de risco de herbicidas e inseticidas utilizados na lavoura do arroz irrigado sobre o cladócero Daphnia magna. **Pesticidas: revista de ecotoxicologia e meio ambiente**, v. 16, 2006.

NETO, J. G. M. **Conceitos de ecotoxicologia, toxicologia e contaminação ambiental**. Depa rtamento de fitossanidade. Universidade Estadual Paulista. UNESP. Jaboticabal, 2018. Acessado em: < https://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/fitossanidade/joaquimgoncalvesmachadonetto/1-aula-conceitos-ecotoxicologia.pdf>. Acessado: 06 nov. 2021

NOCELLI, R. C. F.; SOARES, S. M. M.; MONQUERO, P. A. Effects of herbicides on the survival of the Brazilian native bee Melipona scutellaris Latreille, 1811 (Hymenoptera: Apidae). **Planta Daninha**, v. 37, 2019.

NOVOTNY, E. H. et al. Determinação da área superficial específica de carvões por ressonância magnética nuclear em baixo campo (relaxometria). 2017. **Anais:** Encontro Brasileiro de Substâncias Húmicas e Matéria Orgânica Natural

NUNES, M. E. T.; ESPÍNDOLA, E. L. G. Sensitivity of *Eisenia andrei* (Annelida, Oligochaeta) to a commercial formulation of abamectin in avoidance tests with artificial substrate and natural soil under tropical conditions. **Ecotoxicology,** 21: 1063-1071, 2012.

OGURA, A. P. *et al*. A review of pesticides sorption in biochar from maize, rice, and wheat residues: Current status and challenges for soil application. **Journal of Environmental Management**, v. 300, p. 113753, 2021.

OGURA, A. P. et al. Irrigation with Water Contaminated by Sugarcane Pesticides and Vinasse Can Inhibit Seed Germination and Crops Initial Growth. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 82, n. 3, p. 330-340, 2022.

OGURA, A. P. et al. (2023) Phytotoxicity of 2,4-D and fipronil mixtures to three green manure species, **Journal of Environmental Science and Health**, Part B, DOI: 10.1080/03601234.2023.2178789. Acesso 06 de mar. 2023

OGURA, A. P. **Fitotoxicidade e fitorremediação de água e solos contaminados com os agrotóxicos 2,4-D e fipronil aplicados no cultivo de cana-de-açúcar.** Tese. Doutorado em Ciências da Engenharia Ambiental. Escola de Engenharia de São Carlos. Campus São Carlos. 2023

PEDRO, J. **Detecção da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do inseticida fipronil no organismo teste Allium cepa**. Dissertação. Mestrado em biologia celular e molecular. Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, São Carlos. Universidade Estadual Paulista, 2008.

PEGO, M. F. F. **Modificação superficial de carvão ativado utilizando o tratamento corona. 2016. 78 p**. Tese de Doutorado. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia da Madeira) -Universidade Federal de Lavras, Lavras.

PIGNATI, W. A. *et al*. Spatial distribution of pesticide use in Brazil: a strategy for Health Surveillance. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 3281-3293, 2017.

PINTO, T. J. S *et al*. Toxicity of fipronil and 2, 4-D formulations (alone and in a mixture) to the tropical amphipod Hyalella meinerti. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-14, 2021.

PINTO, T. J. S. *et al*. Impact of 2, 4-D and fipronil on the tropical midge Chironomus sancticaroli (Diptera: Chironomidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 209, p. 111778, 2021.

PINTO, T. J. S. *et al*. multi-generational exposure to fipronil, 2, 4-D, and their mixtures in Chironomus sancticaroli: Biochemical, individual, and population endpoints. **Environmental Pollution**, v. 283, p. 117384, 2021.

PIRES, F. R. et al. Fitorremediação de solos contaminados com tebuthiuron utilizando-se espécies cultivadas para adubação verde. **Planta Daninha**, v. 23, p. 711-717, 2005.

PIRES, I. C. S. A. et al. Biochar de palha de Cana-de-Açúcar: Caracterização e Estudo do Processo. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 4, 2018.

PORTRUNELI, N. **Efeito da exposição aguda do inseticida Fipronil e do herbicida 2, 4-D e mistura de ambos em curimbatá, Prochilodus lineatus (Teleósteo, Prochilodontidae)**. Dissertação. 74 fls. Programa de pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2020.

PRESTES, R. M; VINCENCI, K. L. Bioindicadores como avaliação de impacto ambiental. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 2, n. 4, p. 1473-1493, 2019.

PUBCHEM. National Library of Medicine National. Center for Biotechnology Information. **Fipronil.** 2021Disponível em: < https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3352>. Acessado em: 04 nov. 2022

PUBCHEM. National Library of Medicine National. Center for Biotechnology Information. **2,4-Dichlorophenoxyacetic acid**. 2021. Disponível em: < https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/1486#section=LogP>. Acessado em: 04 nov. 2022

PUGA, A. P. et al. Cadmium, lead, and zinc mobility and plant uptake in a mine soil amended with sugarcane straw biochar. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 22, p. 17606-17614, 2015.

RAMÍREZ, A. C. R. **Dinâmica do indaziflam em solos condicionados com biocarvão**. Tese. Programa de Pós-graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2018.

RODRIGUES, R. L *et al*. Estudo de carvão ativado alternativo para remediação com solos contaminados com fipronil. **Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável**. p. 1-388–416. 2019.

RUTHS, J. C; SIMCH, F. B. L. Vigilância em saúde de populações expostas a agrotóxicos: revisão de escopo. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e11410212330-e11410212330, 2021.

SANCHEZ, A. L. (2016). **Ecological risk assessment in pesticides contamination scenarios: from individuals to ecosystems responses**. Thesis (Ph.D. degree) - São Carlos School of Engineering, University of São Paulo, São Carlos, SP, Brazil. 2016.

SANTOS, C. C. A. et al. A fitorremediação como tratamento de água contaminada por glifosato. **Revista de Iniciação Científica da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 7, n. 2, 2018.

SERTOLI, L. **Caracterização de biocarvões: potencial agrícola e adsorção de zinco**. Tese de Doutorado. Instituto Agronômico. Programa de pós-graduação agricultura tropical e subtropical. Campinas. 2018. Acesso em: 10 jan. 2022

SIGNORELL A. et. al. (2022). **DescTools: Tools for descriptive statistics**. R package version 0.99.47

SILVA, F. H. K. P. et al. Agrotóxicos no Brasil: uma compreensão do cenário atual de utilização e das propriedades do solo que atuam na dinâmica e retenção destas moléculas. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 9, p. e7911931614-e7911931614, 2022.

SILVA, L. C. M *et al.* Acute and chronic toxicity of 2, 4-D and fipronil formulations (individually and in mixture) to the Neotropical cladoceran Ceriodaphnia silvestrii. **Ecotoxicology**, v. 29, n. 9, p. 1462-1475, 2019.

SILVA, M. R. F. **Condicionamento de um latossolo vermelho com carvão de biomassa de cana-de-açúcar na retenção do clomazone**. Dissertação. 123 fls. Programa de Pós-Graduação em Agroquímica. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa. 2015.

SOARES, M. B. et al. How does the biochar of sugarcane straw pyrolysis temperature change arsenic and lead availabilities and the activity of the microorganisms in a contaminated sediment? **Journal of Soils and Sediments**, v. 21, n. 9, p. 3185-3200, 2021.

SOARES, M. B; et al. Temporal changes in arsenic and lead pools in a contaminated sediment amended with biochar pyrolyzed at different temperatures. **Chemosphere,** v. 287, p. 132102, 2022.

SOARES, M. B. et al. Biochar aging: Impact of pyrolysis temperature on sediment carbon pools and the availability of arsenic and lead. **Science of The Total Environment**, v. 807, p. 151001, 2022.

SOUZA, A. T. **Aplicação de processos oxidativos avançados do tipo fenton para remediação de solo contaminado com atrazina**. 2020. Dissertação de Mestrado. 46 fls. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco. 2020.

STEFFEN, G. P. K; STEFFEN, R. B; ANTONIOLLI, Z. I. Contaminação do solo e da água pelo uso de agrotóxicos. **Tecno-logica**, v. 15, n. 1, p. 15-21, 2011.

TAVARES, S. R D. L. Técnicas de remediação. **Embrapa Solos-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2013. Joinville: Clube de Autores, 2013. cap. 2, p. 61-90.

TAYEB, W. et al. Hepatotoxicity induced by sub-acute exposure of rats to 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid-based herbicide “Désormone lourd”. **Journal of hazardous materials**, v. 180, n. 1-3, p. 225-233, 2010.

TOKHMEHCHIAN, S; MARASHI, S. K.; BABAEINEJAD, T. Evaluation of lead and nickel in wheat (Triticum aestivum L.) using sugarcane biochar. **Journal of Advances in Environmental Health Research**, v. 8, n. 3, p. 210-215, 2020.

TRIQUES, M. C. *et al*. Assessing single effects of sugarcane pesticides fipronil and 2, 4-D on plants and soil organisms. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 208, p. 111622, 2021.

ÚNICA – União da Agroindústria Canavieira de São Paulo. **Setor sucroenergético.** Disponível em <https://unica.com.br/setor-sucroenergetico/etanol/>. Acessado em 16 out. 2021.

USEPA - UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. Foreign Agricultural Service. **Sugar: World Markets and Trade.** Washington: USDA: FAS, nov. 2019. Disponível em: https://usda.library.cornell.edu/concern/publications/z029p472x?locale=en. Acesso em: 5 out. 2020.

USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Office of prevention, pesticides and toxic substances. **New pesticide fact sheet**. EPA-737-F-96-005 Washington, D.C, 1996. Disponível em: < http://fluoridealert.org/wp-content/pesticides/fipronil.epa.facts.may.1996.htm>. Acesso em 15 out. 2021.

USEPA - Environmental Protection Agency. United states department of agriculture. **Manual: Estimating Physical / Chemical and Environmental Fate Properties with EPI Suite**. USA/OOPT. 2012. Disponível em: https://www.epa.gov/tsca-screening-tools/epi-suitetm-estimation-program-interface. Acesso em: 02 nov. 2020.

USEPA - Environmental Protection Agency. United states department of agriculture. **Distributed Structure-Searchable Toxicity (DSSTox) Database**. USA/OOPT. 2020. Disponível em: https:< https://www.epa.gov/chemical-research/distributed-structure-searchable-toxicity-dsstox-database>. Acesso em: 02 nov. 2020.

USEPA. Environmental Protection Agency. **Taller nacional de introduccion a la evaluacion y manejo de riesgos**. Brasília. 1996.

VEIGA, D.P. B. **O impacto do uso do solo na contaminação por agrotóxicos das águas superficiais de abastecimento público**. 2017. Tese de Doutorado. 99 fls. Universidade de São Paulo. São Paulo. 2017.

VEIGA, P. A. et al. Upgrading from batch to continuous flow process for the pyrolysis of sugarcane bagasse: Structural characterization of the biochars produced. **Journal of Environmental Management**, v. 285, p. 112145, 2021.

VELKI, M. *et al*. Diuron and diazinon alter the behavior of zebrafish embryos and larvae in the absence of acute toxicity. **Chemosphere**, 180: 65-76, 2017.

VIANA, N. P. **Avaliação dos efeitos da exposição aguda aos agrotóxicos 2, 4 D e Fipronil em brânquias de Danio rerio**. Dissertação. 64 fls. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais. São Carlos, 2020.

WANG, X., Li, C., Li, Z., Yu, G., Wang, Y., 2019. Effect of pyrolysis temperature on characteristics, chemical speciation and risk evaluation of heavy metals in biochar derived from textile dyeing sludge. **Ecotoxicology and Environmental Safety** 168, 45–52. https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2018.10.022

WANG, Y. *et al*. Single and joint toxicity assessment of four currently used pesticides to zebrafish (*Danio rerio*) using traditional and molecular endpoints. **Chemosphere**, 192: 14-23, 2018.

ZORTEA, T. et al. Ecotoxicological effects of fipronil, neem cake and neem extract in edaphic organisms from tropical soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 166, p. 207-214, 2018.