



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**INFLUÊNCIA DE APLICAÇÕES DE PESTICIDAS NA
DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA ¹⁴C-2,4-D EM
DIFERENTES SOLOS**

MARCÍLIO AMARAL MARCONDES

**Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações.**

**Orientadora:
Dra. Mara M de Andréa**

**São Paulo
2001**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**INFLUÊNCIA DE APLICAÇÕES DE PESTICIDAS NA DEGRADAÇÃO DO
HERBICIDA ^{14}C -2,4-D EM DIFERENTES SOLOS**



MARCÍLIO AMARAL MARCONDES

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia Nuclear – Aplicações.

Orientadora:
Prof^a Dr^a Mara M. de Andréa

São Paulo

2001

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares pelos conhecimentos transmitidos através de seu corpo docente.

À Dr^a Mara Mercedes de Andréa pela predisposição na orientação deste trabalho, pelo conhecimento transmitido e pela paciência e compreensão.

Ao Instituto Biológico, nas pessoas Dr Luiz Carlos Luchini e Terezinha Bonanho Peres por permitirem que os experimentos fossem conduzidos no Laboratório de Ecologia de Agroquímicos do Centro de Proteção Ambiental.

Aos funcionários do Instituto Biológico pela amizade, apoio e incentivo. À Terezinha Bonanho Peres, Lia Emi Nakagawa, Rúbia Yuri Tomita, Maria Auxiliadora da Silva, Edlayne Gonzalez e Joana D'Arc Felício de Souza meus sinceros agradecimentos.

Às estagiárias Evânia Barbosa de Azevedo, Cecília Yoko Habiro, Manuela Castelli Fernandez e Ana Luiza Medori pela ajuda no decorrer dos experimentos.

À minha família pelo apoio concedido, pela compreensão e pela segurança que me ofereceram durante todo o trabalho.

À Solange Papini e Mara Marchetti pela amizade, sugestões e apoio.

Para todas pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram na execução deste trabalho.

E, por fim, a Deus que me concedeu forças para que eu concluísse o trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	4
2.1. Pesticidas	4
2.2. Pesticidas e Dissipação no Ambiente	5
2.3. Fatores que Influenciam na Dissipação de Pesticidas	7
2.3.1. <i>Natureza química e características do composto.....</i>	<i>7</i>
2.3.2. <i>Fatores ambientais</i>	<i>9</i>
2.3.2.1. <i>Matéria orgânica</i>	<i>9</i>
2.3.2.2. <i>pH</i>	<i>10</i>
2.3.2.3. <i>Temperatura.....</i>	<i>12</i>
2.4. 2,4-D: ação e dissipação.....	12
2.5. Aplicação da tecnologia nuclear na agricultura	17
2.5.1 <i>Fonte de Radiação.....</i>	<i>17</i>
2.5.1.1. <i>Melhoramento genético em plantas.....</i>	<i>17</i>
2.5.1.2. <i>Conservação de alimentos</i>	<i>18</i>
2.5.1.3. <i>Controle de pragas.....</i>	<i>18</i>
2.5.2. <i>Radiotraçadores</i>	<i>19</i>
3. MATERIAL E MÉTODOS	21

3.1.	Solo.....	21
3.2.	Pesticida.....	23
3.3.	Teste de Biomineralização	24
3.4.	Determinação de ¹⁴C-Resíduos Extraíveis.....	25
3.4.1.	<i>Testes de Recuperação de Extração do ¹⁴C-2,4-D.....</i>	<i>26</i>
3.4.1.1.	Metanol por Soxhlet – TR I.....	26
3.4.1.2.	Metanol por Soxhlet (solo acidificado) – TR II	27
3.4.1.3.	Sistema de solventes acetona:hexano por ultra-som – TR III	27
3.4.1.4.	Sistema de solventes água:acetonitrila:ácido acético por agitação – TR IV ..	28
3.4.1.5.	Cálculos	28
3.4.2.	<i>Extração e “Clean up” de ¹⁴C-Resíduos Extraíveis.....</i>	<i>29</i>
3.5.	Determinação de ¹⁴C-Resíduos Ligados	29
3.6.	Análise dos ¹⁴C-Resíduos Extraíveis	30
3.6.1.	<i>Por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....</i>	<i>30</i>
3.6.1.1.	Curva de calibração	30
3.6.1.2.	Análise das amostras	30
3.6.2.	<i>Por cromatografia em camada delgada (CCD).....</i>	<i>31</i>
3.7.	Análise Estatística dos Resultados	31
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
4.1	Solos	33
4.2.	Teste de Biomineralização	33
4.3.	Determinação de ¹⁴C-Resíduos Extraíveis.....	39
4.3.1.	<i>Testes de Recuperação de Extração de ¹⁴C-2,4-D.....</i>	<i>39</i>

3.4.2. Extração e "Clean up" de ^{14}C -Resíduos Extraíveis.....	40
4.4. Determinação de ^{14}C-Resíduos Ligados	46
4.5. Análise Química do ^{14}C-2,4-D por Métodos Cromatográficos	49
4.5.1. Curva de calibração de 2,4-D por CLAE.....	49
4.5.2. Análise das amostras por CLAE.....	50
4.5.3. Análise das amostras por CCD	52
5. CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de biodegradação de 2,4-D por <i>Alcaligenes eutrophus</i> proposto por PAUL & CLARK (1989).	16
Figura 2 – Esquema de aplicação dos pesticidas utilizados na plantação de algodão em Tatuí e São Paulo	22
Figura 3- Sistema fechado para coleta de $^{14}\text{CO}_2$ e ^{14}C -compostos voláteis.	25
Figura 4 – Esquema do estudo de dissipação do ^{14}C -2,4-D.	32
Figura 5 – Biomineralização de ^{14}C -2,4-D em amostras de solos tratados com diferentes pesticidas.....	35
Figura 6 – Produção de $^{14}\text{CO}_2$ detectada 6 semanas após aplicação do ^{14}C -2,4-D nas amostras de Tatuí	36
Figura 7 – Produção de $^{14}\text{CO}_2$ detectada 6 semanas após aplicação do ^{14}C -2,4-D nas amostras de São Paulo	37
Figura 8 – Recuperação de ^{14}C -resíduos extraíveis das amostras de solo após as 6 semanas do teste de biomineralização.....	40
Figura 9 – Curva de correlação entre as porcentagens de $^{14}\text{CO}_2$ e ^{14}C -resíduos extraíveis detectados nas amostras de solo de Tatuí.....	42
Figura 10 – Curvas de correlação entre as porcentagens de $^{14}\text{CO}_2$ e ^{14}C -resíduos extraíveis detectados nas amostras de solo de São Paulo.....	45
Figura 11 – Recuperação de ^{14}C -resíduos ligados das amostras de solo após as 6 semanas do teste de biomineralização.....	46
Figura 12 – Recuperação do radiocarbono como $^{14}\text{CO}_2$, ^{14}C -resíduos extraíveis e ^{14}C -resíduos ligados a partir da aplicação de ^{14}C -2,4-D em amostras de solo de Tatuí e São Paulo	47
Figura 13 – Curva de correlação entre ^{14}C -resíduos extraíveis (%) e ^{14}C -resíduos ligados (%) de ^{14}C -2,4-D nas amostras de solo de Tatuí.....	48
Figura 14 – Curva de correlação entre ^{14}C -resíduos extraíveis (%) e ^{14}C -resíduos ligados (%) de ^{14}C -2,4-D nas amostras de solo de São Paulo (área tratada e área não tratada).....	48
Figura 15 – Curva de calibração para análise quantitativa de 2,4-D por CLAE	49

Figura 16 – Análise por CLAE de extratos dos solos de Tatuí (A) e São Paulo (B) dopados com 2,4-D	50
Figura 17 – Resíduos de 2,4-D detectados por CLAE em solos tratados com outros pesticidas	51
Figura 18 – Radiovarredura de cromatograma de extrato do solo de Tatuí..	52
Figura 19 – Radiovarredura de cromatograma de extrato do solo de São Paulo.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais características do herbicida 2,4-D.....	13
Tabela 2 - Características físico-químicas e classificação dos solos de São Paulo e Tatuí.....	34
Tabela 3 – Recuperação do radiocarbono proveniente do ¹⁴ C-2,4-D por diferentes métodos de extração.....	39
Tabela 4 – Balanço total de [¹⁴ C]-recuperado nas amostras do solo de Tatuí	42
Tabela 5 – Balanço total de [¹⁴ C]-recuperado nas amostras do solo das subáreas de São Paulo	44
Tabela 6 – Resíduos de ¹⁴ C-2,4-D e ¹⁴ C-metabólito detectados por CCD de amostras de extratos do solo de Tatuí.....	54
Tabela 7 – Resíduos de ¹⁴ C-2,4-D e ¹⁴ C-metabólito detectados por CCD de amostras de extratos do solo (área não tratada e área tratada) de São Paulo	54

INFLUÊNCIA DE APLICAÇÕES DE PESTICIDAS NA DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA ^{14}C -2,4-D EM DIFERENTES SOLOS

Marcílio Amaral Marcondes

RESUMO

Apesar da importância da utilização de pesticidas para a produção de alimentos, seu uso indiscriminado pode provocar alterações na fertilidade do solo, pois eles podem estimular ou inibir a microbiota edáfica que atua diretamente sobre a ciclagem de materiais. Através do uso de técnicas radiométricas, o presente trabalho estudou a influência de aplicação de diversos pesticidas, conforme recomendado para cultura de algodão, sobre a bioatividade de dois diferentes solos (provenientes de São Paulo, SP e Tatuí, SP), tendo como parâmetros as medidas de biomineralização do ^{14}C -2,4-D (^{14}C -ácido 2,4-diclorofenoxiacético) e a formação de ^{14}C -compostos voláteis detectados através de sistema fechado. Estudou também a dissipação do ^{14}C -2,4-D nos solos sob influência dos outros pesticidas aplicados, através de determinação de ^{14}C -resíduos extraíveis, de ^{14}C -resíduos ligados e análises qualitativa e quantitativa dos ^{14}C -resíduos extraíveis por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por cromatografia em camada delgada (CCD). Em nenhum momento detectou-se produção de ^{14}C -compostos voláteis, mas observou-se tanto estímulo quanto inibição da atividade biomineralizadora de ambos solos após os diferentes tratamentos. Aplicações da mistura de deltametrina + paration metílico, por exemplo, estimularam significativamente a atividade biomineralizadora tanto do solo de Tatuí quanto do solo de São Paulo; entretanto, a aplicação de monocrotofós não apresentou qualquer influência. As aplicações de diferentes pesticidas também influenciaram a dissipação do ^{14}C -2,4-D, pois as quantidades de radiocarbono recuperadas como ^{14}C -resíduos extraíveis nas amostras dos dois tipos de solo tratados com outros pesticidas foram estatisticamente diferentes das amostras controles (não tratados). Por outro lado, verificou-se que a aplicação dos pesticidas não

influenciou a formação de ^{14}C -resíduos ligados. Este tipo de ^{14}C -resíduo foi formado em maior quantidade no solo mais rico em conteúdo orgânico (São Paulo). Apesar de após 6 semanas da aplicação do ^{14}C -2,4-D ter-se detectado radiocarbono não só como o próprio ^{14}C -2,4-D, mas também como um ^{14}C -metabólito nos dois tipos de solos e em todos os tratamentos, os resultados indicam que a dissipação do ^{14}C -2,4-D variou entre os solos e foi influenciada pelos tratamentos com outros pesticidas.

INFLUENCE OF PESTICIDE APPLICATIONS ON DEGRADATION OF THE HERBICIDE ^{14}C -2,4-D IN DIFFERENT SOILS

Marcílio Amaral Marcondes

ABSTRACT

Despite the importance of pesticide usage for the food production, its indiscriminated use may cause changes in the soil fertility, because pesticides influence soil microorganisms which are important for the biogeochemical cycles. The influence of applications of several pesticides, as recommended for cotton culture, was studied on the bioactivity of different soils (from São Paulo and Tatuí, SP) by using radiometric techniques and a closed system for detection of biomineralization of ^{14}C -2,4-D (^{14}C -2,4-dichlorophenoxyacetic acid) and production of ^{14}C -volatile compounds. The ^{14}C -2,4-D dissipation under influence of other pesticide applications was also studied by determination of ^{14}C -extractable residues, ^{14}C -bound residues and qualitative and quantitative analysis of the ^{14}C -extractable residues by high pressure liquid chromatography (HPLC) and thin layer chromatography (TLC). ^{14}C -volatile compounds were never detected but increases and decreases of biomineralization were detected in both soils after different treatments. The mixture of deltamethrin + methyl parathion increased significantly the bioactivity in both soils; nevertheless, monocrotophos did not have any influence. The applications of different pesticides have also influenced the ^{14}C -2,4-D dissipation, because the radiocarbon recovered as ^{14}C -extractable residues differed between the treated and untreated samples of both soils. On the other hand, the pesticide applications did not influence the production of ^{14}C -bound residues. This ^{14}C -residue was produced in larger amounts by the richest in organic matter soil (São Paulo). Although radiocarbon had been detected not only as ^{14}C -2,4-D but also as a ^{14}C -metabolite, in both soils and treatments, results indicate that the ^{14}C -2,4-D dissipation varied in the two studied soils and was influenced by treatments with others pesticides.

1. INTRODUÇÃO

Dentre as modificações ambientais antropogênicas observa-se a prática de cultivo de determinadas espécies de vegetais e criação de espécies de animais de interesse econômico.

Para aumentar a produtividade agrícola utiliza-se, em larga escala, fertilizantes que favorecem o desenvolvimento de organismos cultivados. Também são utilizados pesticidas, para controle das pragas que chegam a destruir cerca de 35% da produção potencial das plantações (PIMENTEL & ANDOW, 1984).

O uso de pesticidas tem merecido cada vez mais atenção, pois seu emprego indiscriminado e em larga escala pode provocar problemas de contaminação, tanto do ambiente quanto dos animais e do homem (HAQUE & FREED, 1975; PIMENTEL & ANDOW, 1984; MATALLO, 1997).

Os pesticidas podem atingir o solo direta ou indiretamente, e no ambiente edáfico, eles também podem alterar a atividade microbiana, estimulando-a, servindo como fonte de carbono e nitrogênio, ou inibindo-a, devido à sua toxicidade (BARTHA *et al.*, 1976). Sendo os microrganismos vitais para a fertilidade do solo e na degradação da matéria orgânica (BEELEN & DOELMAN, 1997), qualquer alteração na microbiota influenciaria indiretamente a fertilidade do solo.

Assim, há preocupação crescente quanto ao conhecimento do comportamento de pesticidas e seus resíduos nos diversos tipos de solo de países tropicais, porque a maioria das avaliações de seus efeitos foi feita nos países do hemisfério norte, que possuem diferentes condições climáticas e edáficas (NAKAGAWA, 1997).

Dentre os fatores que influenciam o comportamento de pesticidas nos solos, a estrutura química do composto deve ser cuidadosamente avaliada,

porque a presença ou ausência de anéis aromáticos, moléculas complexas, ou ainda, a presença de átomos de cloro oferecem maior ou menor recalcitrância do composto no ambiente (ATLAS & BARTHA, 1993; ANDRÉA *et al.*, 1994). Entende-se por compostos recalcitrantes aquelas substâncias cujas moléculas químicas apresentam ligações de maior estabilidade, sendo portanto de maior dificuldade de degradação química e/ou biológica (ATLAS & BARTHA, 1993) e, apresentado como consequência, maior persistência.

Em decorrência da possibilidade de contaminação de alimentos, solos e águas de lençóis freáticos ou de superfície há uma conscientização crescente da necessidade de se ampliar o conhecimento da dinâmica de substâncias biocidas e de suas influências no ambiente (RÜEGG, 1975; NAKAGAWA *et al.*, 1995).

Técnicas que utilizam radioisótopos como traçadores são de extrema utilidade para o estudo de dinâmica de agroquímicos, pois as técnicas radiométricas quando combinadas a outras técnicas convencionais oferecem a possibilidade de determinações precisas de quantidades muito pequenas em tempo relativamente curto (RÜEGG, 1975). Além disso, a propriedade física do radiotraçador permite discerni-lo do material em que está presente, possibilitando o rastreamento no ambiente e a avaliação da importância relativa dos processos de volatilização, lixiviação, adsorção e degradação dos agroquímicos (ANDRÉA, 1986). Entretanto, conforme L'ANNUZIATA (1979), embora o emprego de radiotraçadores permita a quantificação do ^{14}C -composto presente, o método não possibilita sua identificação química, isto é, não permite identificar se o ^{14}C -composto está em sua forma originalmente aplicada ou se ocorreu degradação. Desta forma, análises químicas complementares são executadas paralelamente para identificação química do ^{14}C -composto detectado. A metodologia efetuada se dá geralmente na seguinte seqüência: 1- extração com solventes dos ^{14}C -compostos presentes na amostra; 2- quantificação dos compostos por radiometria e técnicas analíticas convencionais; e 3- separação cromatográfica e identificação.

Além de quantificação e identificação de compostos presentes no solo, pode-se efetuar testes para avaliar-se quanto é perdido daquele ambiente, o que é grandemente auxiliado pelo uso de moléculas radiomarcadas. Os testes que envolvem a mineralização de pesticidas radiomarcados (degradação total da molécula com a produção de gás carbônico e água) fornecem dados sobre a cinética de degradação dos

compostos e medem o potencial de degradação total dos pesticidas mais estáveis (KLEIN & SCHEUNERT, 1985; NAKAGAWA *et al.*, 1995; PAREKH *et al.*, 1995). Este tipo de teste foi adotado como um parâmetro de avaliação de degradabilidade para o registro de agroquímicos no Brasil (SEMA, 1988).

Apesar de já haver vários trabalhos a respeito da dinâmica e influência de pesticidas nos diversos ambientes, os estudos de avaliação da ação combinada de diversas aplicações de diferentes compostos, como ocorre na prática agrícola do algodão, por exemplo, ainda são raros. Desta forma, pretende-se avaliar se há alteração da bioatividade de solos após aplicação dos pesticidas recomendados à cotonicultura tendo como parâmetro a biomineralização da molécula aromática do herbicida ^{14}C -2,4-D (^{14}C -ácido 2,4-diclorofenoxiacético); e também verificar se repetidas aplicações de diversos pesticidas influenciam na dissipação do herbicida ^{14}C -2,4-D em diferentes solos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Pesticidas

Definem-se como pesticidas “os compostos orgânicos ou inorgânicos utilizados para controlar ou erradicar, de maneira geralmente específica, as doenças e pragas de plantas e animais e os vetores transmissores de doenças no homem” (MESSIAS, 1998).

Esses compostos químicos são tão importantes que a redução drástica na sua utilização resultaria num aumento nos custos de produção, além da queda de qualidade dos produtos agropecuários (GUENZI, 1974).

Desde o início da civilização, o homem tem se esforçado em modificar o ambiente para aumentar a produtividade no cultivo de plantas e criação de animais. Entretanto, tais modificações ofereceram condições propícias para o aumento populacional de espécies prejudiciais a estes mesmos cultivos (CREMLYN, 1978).

Apesar de registros do uso de enxofre como fumigante em 79 d.C., somente no final do século XIX foram desenvolvidos métodos para controlar as pragas agrícolas (BARBERÁ, 1976; CREMLYN, 1978; HASSAL, 1982; SAMPAIO & GUERRA, 1991). Entretanto, foi no século XX que houve um aumento na utilização de agrotóxicos. A produção destes compostos orgânicos foi acentuada com a descoberta das propriedades inseticidas do DDT (dicloro-fenil-tricloroetano). Durante a II Guerra Mundial foram sintetizadas várias outras substâncias biocidas, como os inseticidas fosforados. Entre os anos de 1950 e 1955 foram desenvolvidos herbicidas derivados da uréia (HASSAL, 1982; SAMPAIO & GUERRA, 1991). Desde então, têm sido desenvolvidos pesticidas que são importantes na produção e armazenamento de alimentos.

2.2. Pesticidas e Dissipação no Ambiente

Compostos químicos utilizados para o controle de espécies indesejáveis em plantações dificilmente podem ser aplicados apenas e diretamente no organismo alvo. Desta forma, atingem também a planta e a superfície do solo (KEARNEY & HELLING, 1969; HARTLEY & GRAHAM-BRYCE, 1980). Os pesticidas também podem atingir o solo através da pulverização direta ou das partes verdes e da queda de folhas e frutos que receberam a aplicação (MUSUMECI, 1992).

Dentre as diferentes classes de pesticidas, os herbicidas merecem destaque devido a grande quantidade utilizada. Em 1998, da renda total obtida pela venda de agrotóxicos no Brasil, 53,5% correspondiam à comercialização de herbicidas (BARRETO, comunicação pessoal). Além disso, os herbicidas podem ser aplicados diretamente no solo, elevando-se os riscos de contaminação neste ambiente (BARBERÁ, 1976).

De acordo com ANDRÉA (1986), os resíduos de agrotóxicos ou seus metabólitos quando presentes no solo podem: “1- quando presentes em pequenas concentrações, ser absorvidos pelas plantas e incorporados à cadeia alimentar abaixo do nível de tolerância estabelecido; ou 2- estar presentes em concentrações fitotóxicas que comprometeriam o desenvolvimento de futuras plantações; ou ainda, 3- interagir com outros pesticidas ou resíduos que podem ocasionar um efeito fitotóxico sinérgico e/ou aumentar ou diminuir sua persistência no ambiente”.

Portanto, o comportamento dos pesticidas no solo resulta de numerosas interações entre eles e os componentes vivos e as partículas minerais e orgânicas do solo, assim como também de fatores ambientais (GREEN, 1974).

Dentre os fatores ambientais que regulam o comportamento dos pesticidas pode-se citar a quantidade de argila e matéria orgânica, pH e temperatura (LUCHINI, 1987; WALTON & ANDERSON, 1988; WALKER, 1989; LYDY *et al.*, 1990), e dentre as propriedades dos compostos cita-se sua: natureza química, capacidade de ionização, solubilidade em água, pressão de vapor, coeficiente octanol-água, retenção

no solo e meia-vida (PRAMER & BARTHA, 1980; ROBERTS, 1984; WALTON & ANDERSON, 1988; COATS, 1993; WEBER, 1994).

Os mecanismos de transferências puramente físicos – quando não há alteração do composto, e degradação – quando há alteração na estrutura molecular do pesticida – também determinam o comportamento dos pesticidas. Os principais processos de transferência são: deriva física, volatilização, adsorção/dessorção, absorção e lixiviação (LUCHINI, 1995). Como mecanismos de degradação são citados: degradação fotoquímica, microbiana, química e metabolismo vegetal e/ou animal (MESSIAS, 1998), que influenciam na dissipação e toxicidade do composto no ambiente.

Estudos do comportamento de pesticidas no ambiente têm como principais objetivos: descobrir os fatores que direta ou indiretamente influenciam sobre a eficácia de ação do produto sobre a praga; e descobrir as possíveis interações dos pesticidas com o meio, minimizando os possíveis efeitos adversos causados pelos agrotóxicos quando presentes no solo (LAVORENTI, 1996).

A prática agrícola também influencia na dissipação dos compostos químicos aplicados no ambiente. A calagem e a adubação – mineral ou orgânica – favorecem diretamente o desenvolvimento microbiano, devido ao aumento de pH e maior disponibilidade de nutrientes (MONTEIRO, 1997), respectivamente, que poderiam resultar na alteração do metabolismo e dos processos de degradação.

Portanto, a aplicação de pesticidas no ambiente, quando necessária, deve ser realizada após o levantamento de alguns conhecimentos básicos. É essencial que se conheça: 1 – a taxa de mobilidade do agrotóxico e, conseqüentemente, o transporte a outros ambientes (MONTEIRO, 1997); 2 – a taxa de degradação do pesticida sob as condições ambientais de aplicação (BARRIUSO & HOUOT, 1996); e 3 – a toxicidade do produto químico aos organismos, de forma a tentar-se a diminuição do risco de alterações em populações não alvo (MACEDO, 1997).

2.3. Fatores que Influenciam na Dissipação de Pesticidas

2.3.1. *Natureza química e características do composto*

A própria estrutura molecular dos compostos determina potencialidades de seu comportamento no ambiente. Assim, a presença de anéis aromáticos, átomos de cloro e grupamentos fenóis ou anilinas são importantes na fitotoxicidade e características químicas como ponto de ebulição, ponto de fusão, hidrossolubilidade, polaridade, entre outras (ANDRÉA, 1992).

A pressão de vapor é importante para avaliar o transporte de pesticidas para a atmosfera e, portanto, é a propriedade da molécula utilizada para a determinação da volatilização potencial do composto (BARBERÁ, 1976; LAVORENTI, 1996).

A solubilidade em água é um dos mais importantes parâmetros que influenciam no destino final e transporte do pesticida pela coluna de solo, pois moléculas hidrossolúveis são facilmente incorporadas no ciclo hidrológico e, por isso, apresentam maior potencial de contaminação de águas subterrâneas e/ou de superfície (LAVORENTI, 1996). Contudo, estas moléculas apresentam, em geral, baixa adsorção pelas partículas do solo e, desta forma, estão mais suscetíveis à degradação microbiana, podendo ser dissipadas rapidamente do ambiente.

A persistência do composto no ambiente não é determinada somente pela estabilidade química da molécula do pesticida, mas pela inter-relação de suas características químicas com os fatores ambientais. Por exemplo, substâncias quimicamente estáveis, com baixa pressão de vapor e pequena solubilidade em água tendem a ser mais persistentes no ambiente. Por outro lado, moléculas voláteis e hidrossolúveis têm sua persistência influenciada pela temperatura, tipo de solo e comunidade edáfica (HASSAL, 1982).

Entretanto, a persistência do pesticida no ambiente não diminui, obrigatoriamente, sua extractabilidade, pois os pesticidas clorados são

persistentes, mas não apresentam grande formação de resíduos ligados às partículas do solo, sendo facilmente extraídos com solventes orgânicos apropriados (ANDRÉA, 1992).

Compostos com átomos de cloro, assim como com anéis aromáticos na molécula, são, normalmente, mais persistentes no solo, pois estes conferem maior estabilidade à molécula do pesticida e, portanto, maior dificuldade de degradação tanto biológica quanto química ou física (ROBERTS, 1984; ANDRÉA, 1992).

Por outro lado, a presença de fenóis ou anilinas confere alto potencial de ligação das moléculas dos pesticidas com os componentes do solo, contribuindo na formação de resíduos não extraíveis, e concomitantemente, diminuindo sua extractabilidade e sua suscetibilidade às degradações bioquímicas e, conseqüentemente, dificultando sua degradação pelos microrganismos do solo (GREEN, 1974).

BAILEY & WHITE *apud* GREEN (1974) sugerem quatro fatores estruturais que determinam a característica química da molécula do pesticida e, portanto, influenciam na sua adsorção pelos colóides do solo: 1- natureza do grupo funcional, como álcool, cetona e ácido carboxílico; 2- natureza dos grupos substituintes, que podem alterar o comportamento dos grupos funcionais; 3- posição do grupo funcional na molécula; e 4- presença e magnitude de insaturação da molécula, que afeta no balanço lipofílico-lipofóbico.

Além disso, estes fatores são importantes para a elucidação dos mecanismos de adsorção dos pesticidas com as partículas do solo, pois a superfície das partículas de argila, por exemplo, pode apresentar cargas positivas ou negativas capazes de interagir com os pesticidas. Ou ainda, segundo revisão bibliográfica de ANDRÉA (1992), a argila pode estar encoberta pela matéria orgânica que possui sítios de adsorção ativos capazes de interagir também com os pesticidas.

2.3.2. Fatores ambientais

2.3.2.1. Matéria orgânica

A matéria orgânica é formada a partir de restos de plantas, animais e microrganismos em diversos estágios de degradação (BARTHA, 1980). Essa mistura de materiais pode ser dividida, basicamente, em duas partes: substâncias não húmicas e substâncias húmicas. Este segundo grupo de substâncias é composto por ácido húmico, ácido fúlvico e humina (MESSIAS, 1998). A matéria orgânica é fonte de nutrientes para a proliferação dos microrganismos do solo, e o aumento no número de microrganismos pode ocasionar maior degradação dos pesticidas (KHAN & BEHKI, 1990).

Conforme o modelo proposto por BARTHA (1980), a molécula de húmus possui um “núcleo” central heterocíclico e anéis quinoidais ligados uns aos outros por átomos de carbono. Ao núcleo se ligam substitutos como hidroxilas fenólicas e alcoólicas, grupos aminos, carboxil e carbonil. Alguns desses grupos funcionais permanecem livres e inativos e outros se ligam a aminoácidos, peptídeos, açúcares e enzimas ativas. Devido a esta estrutura complexa, com vários sítios ativos de adsorção, a matéria orgânica é considerada um material adsortivo ativo (ANDRÉA, 1992).

As substâncias húmicas também influenciam na retenção de calor e água no solo (MESSIAS, 1998) o que, por sua vez, pode influenciar a dissipação dos pesticidas, tanto por processos químicos quanto por processos biológicos. O aumento da temperatura favorece a dissipação dos pesticidas do solo por volatilização e o conteúdo de água favorece a disponibilidade de agrotóxicos hidrossolúveis aos microrganismos edáficos. Portanto, tanto a temperatura como o conteúdo água têm influências químicas e biológicas no solo. Além disso, tanto a temperatura quanto o conteúdo de água são fatores importantes que influenciam diretamente a atividade metabólica dos microrganismos do solo.

Segundo BENOIT *et al.* (1999) o destino de muitos pesticidas está relacionado com o teor de matéria orgânica presente no solo, porque ela influencia os processos de adsorção, biodegradação e transporte das moléculas dos

agrotóxicos e atividade biológica do solo. Em relação à adsorção de pesticidas, a matéria orgânica também tem influência, pois durante o processo de oxidação da própria molécula orgânica podem ser formados novos sítios de adsorção através da quebra das ligações argila-húmus e estes sítios podem reagir com os pesticidas. Observou-se, por exemplo, que o processo de adsorção da molécula de 2,4-D está associado ao conteúdo orgânico, pois diferentes tipos solos com maior porcentagem de matéria orgânica apresentaram maior adsorção do pesticida (LUCHINI, 1987).

A matéria orgânica também propicia aumento na taxa de degradação dos pesticidas (BOLAN & BASKARAN, 1996), pois favorece proliferação dos microrganismos e de sua atividade metabólica. O aumento da atividade microbiana pode influenciar o aumento da taxa de degradação do pesticida (KHAN & BEHKI, 1990; BOLAN & BASKARAN, 1996).

Verifica-se também que em solos com maior quantidade de matéria orgânica há alta formação de resíduos ligados ou não extraíveis de pesticidas. A formação de resíduos não extraíveis, isto é, resíduos que não são extraídos por processos exaustivos e com diferentes solventes e que se tornam ligados à matéria orgânica, pode estar associada ao fato da molécula do pesticida ligar-se aos sítios ativos da molécula do ácido húmico (BARTHA, 1980). Além disso, segundo revisão bibliográfica de ANDRÉA (1992), os materiais húmicos compõem uma estrutura molecular polimérica tipo peneira molecular. Uma das características desta estrutura proposta é que ela contém lacunas, de diferentes dimensões moleculares, que podem fixar os pesticidas e/ou seus compostos de degradação mecanicamente, influenciando diretamente na dissipação de pesticidas no solo.

Ainda, como produto de reação, alguns pesticidas que originalmente não possuíam aminas aromáticas, após se ligarem à matéria orgânica, podem sofrer ação microbiana e se transformarem em aminas aromáticas e se tornarem resíduos ligados (BARTHA, 1980).

2.3.2.2. pH

O pH influencia, direta ou indiretamente, e química ou biologicamente, o destino dos pesticidas no solo através da influência sobre taxa de

adsorção, velocidade e via de degradação, além de selecionar grupos de microrganismos (MENZIE, 1969; GRAY *et al.*, 1978; WALKER & WELCH, 1989; REINHARDT *et al.*, 1990; ANDRÉA *et al.*, 1997).

WALKER & WELCH (1989), por exemplo, afirmam que o pH do solo influenciou na degradação de alguns herbicidas. Verificaram que a meia-vida do triasulfuron foi de 33 e 120 dias em pH 5,8 e 7,4 respectivamente, enquanto a taxa de adsorção foi de 0,55 e 0,19, respectivamente para os mesmos valores de pH.

Herbicidas como atrazina e simazina são degradados mais rapidamente em pH ácidos (ANDRÉA *et al.*, 1997) e prometrina e metribuzin se degradam mais rapidamente em ambientes alcalinos (HANCE, 1979).

Além disso, a concentração de íons de hidrogênio exerce uma forte influência na fotodecomposição e na formação de metabólitos de pesticidas. Em condições ácidas o herbicida trifluralina foi fotodecomposto mais rapidamente, com a formação de metabólitos polares (2,3-dihidroxi-2-etil-7-nitro-1-propil-5-trifluorometilbenzimidazolina e 2-amino-6-nitro- α,α,α -trifluoro- p -toluidina). Porém em condições alcalinas (pH 11,0) formou-se o metabólito 2-etil-7-nitro-5-trifluorometilbenzimidazole, que não foi detectado em condições ácidas (MOILANEN *et al.*, 1974).

O pH também influencia na seleção de microrganismos. Em solos com pH menor que 5,0 há predominância de fungos em relação às bactérias, exceto pela presença de bactérias acidófilas. (GRAY *et al.*, 1978). Devido a esta seleção, o pH também influencia indiretamente na biodegradação de pesticidas no solo (GRAY *et al.*, 1978).

Trabalhos referentes à influência do pH dos solos sobre mudanças nos coeficientes de adsorção do 2,4-D apresentam variações em seus resultados. Na revisão bibliográfica de MESSIAS (1998) afirma-se que a taxa de adsorção do 2,4-D diminuiu conforme o pH. Entretanto no trabalho de CHEAH *et al.* (1997), o herbicida 2,4-D não apresentou variação no coeficiente de adsorção pelas partículas de solo quando houve alteração no conteúdo de argila, valor de pH ou temperatura.

2.3.2.3. Temperatura

Segundo GRAY *et al.* (1978), a temperatura do solo influencia na difusão de gases, metabolismo, adsorção e seleção de grupos de microrganismos. Com o aumento de temperatura, aumenta-se proporcionalmente a difusão de gases, a volatilização dos pesticidas e o metabolismo microbiano.

Mesmo a adsorção pode ser influenciada pela temperatura. Em solos minerais, baixas temperaturas proporcionam o aumento de adsorção de pesticidas pelas partículas de argila, enquanto a adsorção de pesticidas pela matéria orgânica aumenta com a elevação da temperatura (GRAY *et al.*, 1978).

A temperatura apresenta também influência na taxa de degradação dos pesticidas. ANDRÉA *et al.* (1997) verificaram o efeito direto do aumento de temperatura na degradação de atrazina. OU (1984) verificou que a taxa de degradação do 2,4-D foi reduzida quando a temperatura aumentou de 25° C para 35° C. Entretanto VEEH *et al.* (1996) observaram que o 2,4-D apresentou maior taxa de degradação na temperatura de 24° C quando comparadas a 10° C e 17° C.

A flutuação da temperatura também é responsável pela composição da comunidade microbiana do solo. OKAFOR *apud* GRAY *et al.* (1978) verificou que em solos tropicais, cujas temperaturas variavam entre 28° e 30° C, a quitina ali presente era colonizada principalmente por actinomicetos, nematódeos e protozoários, mas solos de clima temperado, com variação de temperatura entre 2° e 15° C, eram colonizados por fungos e bactérias.

2.4. 2,4-D: ação e dissipação

O 2,4-D, ou ácido 2,4-diclorofenoxiacético, é um herbicida pertencente ao grupo dos derivados fenoxiácidos (BARBERÁ, 1976) e é utilizado no cultivo de cana-de-açúcar, soja, milho, trigo, aveia, centeio, arroz e café (ANDREI, 1985) no controle de ervas-daninhas de folhas largas (OH & TUOVINEN, 1994).

Seu modo de ação se dá por absorção das raízes e transporte pela seiva, chegando em partes da planta onde o consumo de energia é maior, isto é, regiões de alta atividade metabólica, como os tecidos meristemáticos (BARBERÁ, 1976); portanto, sua máxima eficiência ocorre quando a erva-daninha está em crescimento.

As principais propriedades físico-químicas do 2,4-D estão apresentadas na Tab. 1, conforme WORTHING & HANCE (1991) e MESSIAS (1998).

Tabela 1 – Principais características do herbicida 2,4-D.

Nome químico (IUPAC)	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
Fórmula molecular	$C_8H_6Cl_2O_3$
Massa molar	221,04 g/mol
Ponto de fusão	133° - 137° C
pK _a	2,64 (ácido fraco)
Pressão de vapor (20°C)	$1,1 \cdot 10^{-2}$ Pa ($8 \cdot 10^{-6}$ mmHg)
Densidade relativa (30°C)	1,565
Solubilidade em água (25°C)	620 mg/L (praticamente insolúvel)
Solubilidade em solventes orgânicos	1.250 g/kg de etanol; 243 g/kg de éter etílico
DL ₅₀ oral (ratos)	375 mg/kg (moderadamente tóxico)
Classe toxicológica	II – medianamente tóxico
Modo de ação	Sistêmico seletivo

Os processos de dissipação do 2,4-D têm sido objeto de estudo há muito tempo. Em 1969 alguns processos de biodegradação da molécula do 2,4-D já haviam sido amplamente estudados (MENZIE, 1969). Além disso, também foram realizados trabalhos quanto à sua adsorção pelas partículas do solo e a influência de vários fatores sobre a sua dissipação no ambiente (LUCHINI, 1987; BASKARAN *et al.*, 1996; BENOIT *et al.*, 1996; BOLAN & BASKARAN, 1996; VIEIRA, 1996; BARRIUSO *et al.*, 1997; CHEAH *et al.*, 1997; MESSIAS, 1998).

Em geral, a taxa de adsorção do 2,4-D é baixa devido ao seu pK_a (Tabela 1), de tal forma que, quando presente no solo, a maior parte dele se encontra

na forma iônica (LUCHINI, 1987; CHEAH *et al.*, 1997; MESSIAS, 1998). O valor de pH do solo também exerce importante influência sobre o processo de adsorção do 2,4-D, pois valores de pH do solo acima do pK_a do herbicida favorecem a forma iônica do 2,4-D e, por isso, ele seria menos adsorvido pelas partículas de argila (CHEAH *et al.*, 1997). BOLAN & BASKARAN (1996) observaram que em solos cujo pH variava entre 5,2 e 6,1, o 2,4-D apresentava-se tanto na forma iônica quanto na forma não iônica; enquanto a forma iônica era adsorvida pela matéria orgânica, a forma não iônica era adsorvida não só pela matéria orgânica, mas também pelas partículas de argila. Os ânions de 2,4-D sofrem repulsão pelas partículas de argila devido à sua carga negativa (WEBER & WEED, 1974; LUCHINI, 1987; VIEIRA, 1996; CHEAH *et al.*, 1997). SCOTT & WEBER (1967) observaram que o aumento do conteúdo de argila não apresentou nenhum efeito significativo na atividade do 2,4-D.

Por outro lado, as substâncias húmicas apresentam diferentes influências sobre o processo de adsorção do 2,4-D. LUCHINI (1987) e CHEAH *et al.* (1997) observaram que o 2,4-D é mais adsorvido em solos com maior conteúdo de matéria orgânica. Contudo, BARRIUSO *et al.* (1997) afirmam que a adição de matéria orgânica, através de compostagem, não apresentou qualquer influência no mecanismo de adsorção.

O pH também influencia indiretamente na degradação do 2,4-D através de seleção de microrganismos, além da influência no processo de adsorção. O aumento na taxa de adsorção provoca redução na quantidade de 2,4-D na solução de solo disponível para sofrer ação da microbiota edáfica (WEED & WEBER, 1974; BOLAN & BASKARAN, 1996; BENOIT *et al.*, 1999).

A degradação microbiana também desempenha importante papel no destino e transporte do 2,4-D no ambiente (BOLAN & BASKARAN, 1996; VEEH *et al.*, 1996) e a biomineralização foi apontada por BENOIT *et al.* (1999) como a principal rota de descontaminação do solo.

Também o tipo de biomassa microbiana pode ser fator importante na capacidade potencial de determinado solo para degradar a molécula do 2,4-D (VOOS & GROFFMAN, 1997), pois uma biomassa edáfica diversificada apresenta maior variedade de enzimas que podem ser capazes de degradar a molécula do pesticida.

A biotransformação do 2,4-D, conforme BARBERÁ (1976) e MENZIE (1969), tem como principais processos: 1- β -oxidação; 2- rompimento da ligação éter – O – CH₂COOH; 3- degradação da cadeia lateral; e 4- hidroxilação do anel aromático.

Observou-se que o 2,4-D é degradado por uma variedade de microrganismos, tais como *Pseudomonas sp*, *Alcaligenes eutrophus*, *Nocardia sp* e *Aspergillus niger* (Fig. 1). Dentre os principais metabólitos produzidos, citam-se: 2,4-diclorofenol, 4-clorocatecol e clorohidroquinona (MENZIE, 1969; PAUL & CLARK, 1989).

A biodegradação do 2,4-D pode ser afetada também pela temperatura. OU (1984) e VEEH *et al.* (1996) afirmaram que há maior biodegradação entre 24°C e 25°C. Observaram também que o aumento ou diminuição da temperatura reduz a taxa de degradação do 2,4-D. Esta influência da temperatura pode ser decorrente de seu efeito direto sobre a atividade da microbiota edáfica, pois os microrganismos do solo são os principais responsáveis pela degradação do 2,4-D (BARRIUSO *et al.*, 1997)

Outra característica que pode influenciar no processo de degradação é a profundidade na coluna de solo onde se encontra a molécula do herbicida e, portanto, o volume de O₂. Uma das etapas de biodegradação enzimática de 2,4-D por *Arthrobacter sp* está relacionada com processos oxidativos e, por isso, quanto maior a profundidade em que a molécula de 2,4-D se encontra, menor será a sua taxa de degradação (VEEH *et al.*, 1996).

A aplicação de outros pesticidas também pode influenciar na degradação do 2,4-D em solos, como visto em FOURNIER *et al.* (1981), que detectaram decréscimo na biomineralização após aplicação de inseticidas organofosforados.

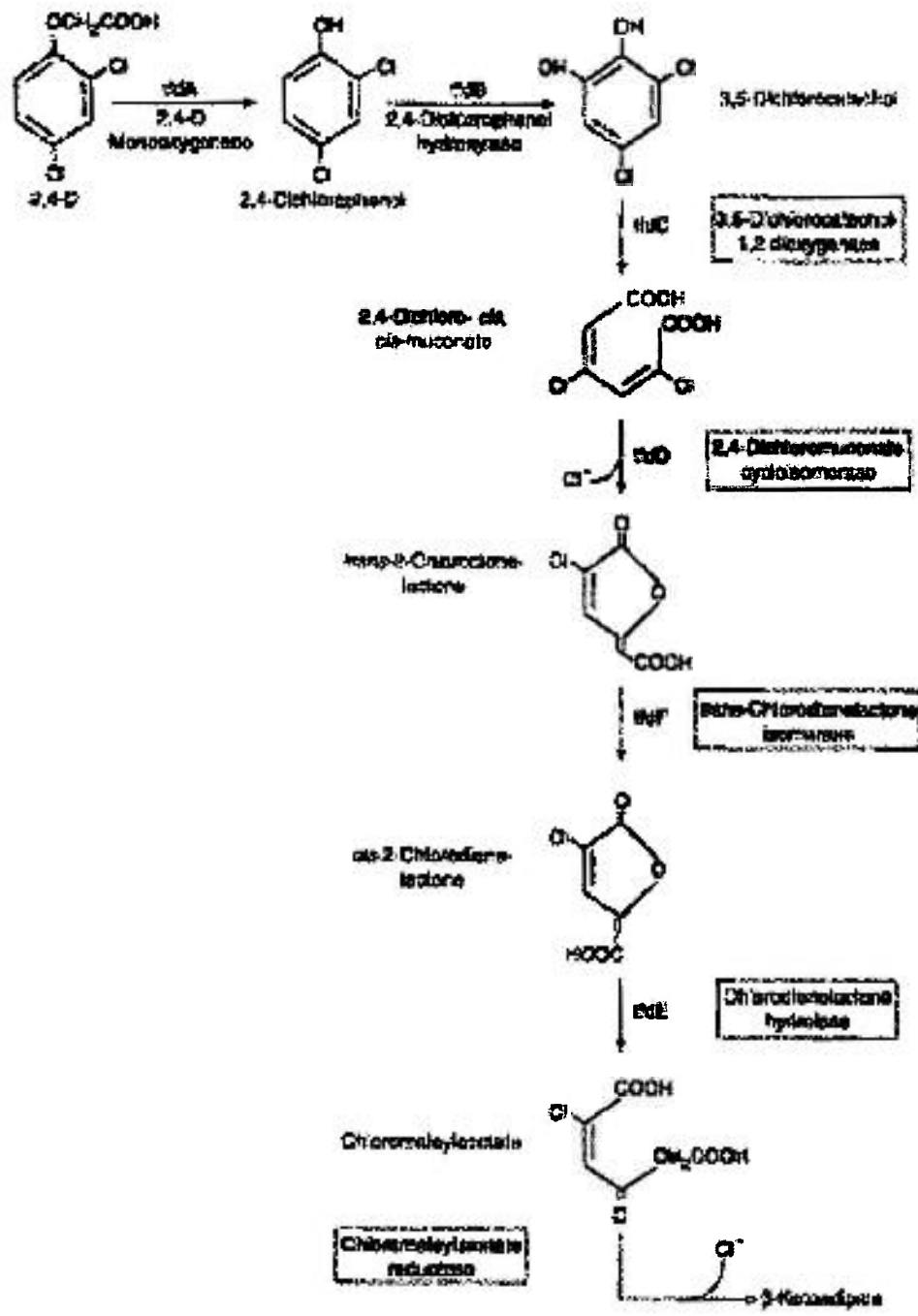


Figura 1 – Esquema de biodegradação de 2,4-D por *Alcaligenes eutrophus* proposto por PAUL & CLARK (1989).

2.5. Aplicação da tecnologia nuclear na agricultura

Várias são as possibilidades de aplicação da tecnologia nuclear na agricultura, quer seja na produção de alimentos, através de melhoramento genético de espécies, ou conservação dos mesmos. Atualmente, as técnicas nucleares são utilizadas para solucionar diversos problemas agrícolas, tais como:

- * Melhoramento genético de plantas de interesse econômico;
- * Conservação de alimentos estocados;
- * Controle de pragas;
- * Compreensão do mecanismo de absorção de adubos pelas plantas;
- * Medições da densidade da água em solos; e
- * Estudos de dissipação de pesticidas no ambiente.

A tecnologia nuclear pode ser empregada de dois modos principais: como fonte de radiação (^{60}Co e ^{127}Ra) e o uso de radioisótopos como traçadores (^{14}C , ^3H e ^{32}P) (MALAVOLTA, 1963; ROCHA *et al.*, 1976).

2.5.1 Fonte de Radiação

Desta forma a tecnologia nuclear é empregada para o melhoramento genético das plantas, conservação de alimentos e controle de pragas, por exemplo (MALAVOLTA, 1963). As fontes radioativas mais utilizadas são aquelas que emitem raios gama ou nêutrons, devido à maior penetrância dessas radiações (FERRAZ, 1972).

2.5.1.1. Melhoramento genético em plantas

Para melhoramento genético de plantas utilizam-se fontes de raios gama (^{60}Co , por exemplo) que possuem grande poder de penetração tanto no ar quanto em tecidos. Quando irradiadas com uma fonte de raios gama as sementes de plantas apresentam aumento na frequência de mutações. Destas mutações, apenas 5% podem ser

consideradas úteis e a maior parte é letal ou semi-letal. Entretanto, dentre as mutantes sobreviventes podem ser encontradas espécies resistentes à algum tipo de praga ou doença, ou ainda ser encontradas espécies que apresentam modificações fisiológicas e/ou morfológicas que favorecem seu cultivo (MALAVOLTA, 1963).

2.5.1.2. Conservação de alimentos

Os prejuízos econômicos decorrentes dos danos causados por insetos, roedores e fungos em alimentos armazenados têm apresentado graves conseqüências (WIENDL, 1975).

A irradiação de alimentos com raios gama é um método físico utilizado para a preservação de alimentos contra ação de microrganismos e insetos e contra a deterioração fisiológica, e apresenta a vantagem de não modificar as propriedades nutritivas dos alimentos (ZEEUW, 1976). Normalmente, o grão é irradiado com uma dose suficiente para sua desinfestação, inibindo a reprodução de insetos ou matando-os (WIENDL, 1975).

Além de preservar o alimento, a irradiação também oferece higienização dos produtos alimentícios, pois elimina patógenos como *Salmonella* e outras enterobactérias, e é um processo que consome menos energia que o congelamento (ZEEUW, 1976).

2.5.1.3. Controle de pragas

Através da irradiação com raios gama, a energia nuclear pode ser aplicada como método de controle quando utilizada para esterilização de insetos machos. A Técnica do Indivíduo Estéril (TEI) tem como objetivo a erradicação ou supressão de insetos, que provocam prejuízos econômicos, e consiste em esterilizar os insetos machos. Estes quando soltos copulam com fêmeas férteis, resultando em ovos inférteis, ocasionando desta forma a erradicação da praga (MALAVOLTA, 1963; SGRILLO & WIENDL, 1981).

Apesar de apresentar resultados efetivos, para que TEI seja inferida com possibilidade de sucesso, há a necessidade de obtenção de outras informações, como: 1 – possibilidade de criação dos insetos machos; 2 – a esterilização tem que ser feita num grande número de espécimes; e 3 – conhecimento sobre a dinâmica populacional da espécie considerada (SGRILLO & WIENDL, 1981)

2.5.2. Radiotraçadores

O uso de radioisótopos como elementos traçadores foi reconhecido no início do século por Hevesy e Paneth, quando utilizaram o radioisótopo do chumbo para determinação das solubilidades do cromato e sulfato de chumbo. Entretanto, estudos biológicos envolvendo técnicas radioativas só ocorreram dez anos depois, com o trabalho desenvolvido por Hevesy, que estudou a translocação do chumbo em plantas. (MALAVOLTA, 1963).

Segundo ROCHA *et al.* (1976), ao contrário das fontes radioativas, os radiotraçadores são aplicados e incorporados no meio biológico em estudo e depois observa-se o seu caminho no sistema biológico. Assim, o uso de radioisótopos como traçadores permite acompanhar a absorção e o transporte de substâncias em plantas, absorção de alimentos e outras substâncias em animais e, também permite estudar os mecanismos de dissipação de pesticidas no ambiente após sua aplicação, pois a propriedade física do radioisótopo não altera seu comportamento químico e permite o rastreamento do composto em estudo (MALAVOLTA, 1963; ANDRÉA, 1986). Além disso, segundo FÜHR (1991) e revisão bibliográfica de ANDRÉA (1986), os radiotraçadores facilitam a detecção de quantidades mínimas de resíduos de pesticidas em tempo relativamente curto e permitem a detecção de metabólitos ainda desconhecidos.

Os radiotraçadores utilizados são geralmente selecionados de acordo com suas finalidades, meia-vida e tipo de emissão, além de sua afinidade com o meio biológico em estudo (ROCHA *et al.*, 1976). Durante as quatro últimas décadas, o uso de radiotraçadores tem desempenhado um importante papel na elucidação do destino de pesticidas orgânicos no ambiente, sendo o radiocarbono (^{14}C) o mais utilizado, devido à sua meia-vida longa, que permite experimentos de longo prazo; e por ser emissor de

radiação beta de baixa energia, não necessita de equipamento de proteção pessoal sofisticado (ANDRÉA, 1986; FÜHR, 1991). Entretanto, mesmo com o emprego de radiotraçadores, a elucidação do mecanismo de dissipação dos pesticidas no ambiente só é possível pela integração de diversas áreas científicas, como química, fisiologia vegetal, pedologia, agronomia e microbiologia (FÜHR, 1991), além do uso conjunto de técnicas analíticas convencionais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Solo

Amostras de solo foram coletadas em duas diferentes áreas do Estado de São Paulo. A primeira área está localizada na região de Tatuí, na Estação Experimental do Instituto Agrônomo de Campinas e possui um longo histórico de aplicação de pesticidas recomendados ao cultivo. A segunda área está localizada na cidade de São Paulo, no campo experimental do Instituto Biológico, sem qualquer aplicação anterior de agroquímicos. Esta segunda área foi dividida em duas subáreas: uma que recebeu todos os pesticidas recomendados à cotonicultura, conforme aplicado em Tatuí, e outra que não recebeu a aplicação de qualquer pesticida.

Os solos foram tratados com pesticidas formulados recomendados para o cultivo de algodão, na seguinte ordem (por hectare) (Fig. 2): monocrotofós (1,0 L); dimetoato (0,5 L); dimetoato novamente (0,5 L); endosulfan (1,2 L); deltametrina (0,5 L); endosulfan (2,0 L); deltametrina (0,3 L); paration metílico (1,0 L); endosulfan (2,0 L) e carbaril (2,5 kg) no plantio de 1995/96. Trifluralina (2,0 L) foi aplicada entre as safras, e em 1996/97 aplicou-se: monocrotofós (1,0 L); monocrotofós novamente (1,0 L); endosulfan (1,25 L); paration metílico (1,2 L); endosulfan (1,2 L); paration metílico (1,0 L) + endosulfan (1,0 L); endosulfan (1,5 L) + paration metílico (1,5 L); endosulfan (2,0 L) + paration metílico (2,0 L); deltametrina (1,0 L); deltametrina novamente (0,25 L); endosulfan (1,2 L); e após a colheita, paration metílico (1,25 L) + deltametrina (0,25 L). Novamente aplicou-se trifluralina entre as safras, e no plantio de 1997/98, os solos receberam os seguintes tratamentos: diuron (4,0 kg); paration metílico (1,2 L); endosulfan (1,0 L); novamente endosulfan (1,0 L); endosulfan (1,0 L) + paration metílico (1,0 L); deltametrina (0,35 L); paration metílico (1,0 L); deltametrina (1,0 L); e paration metílico (2,5 L) + deltametrina (1,25 L).

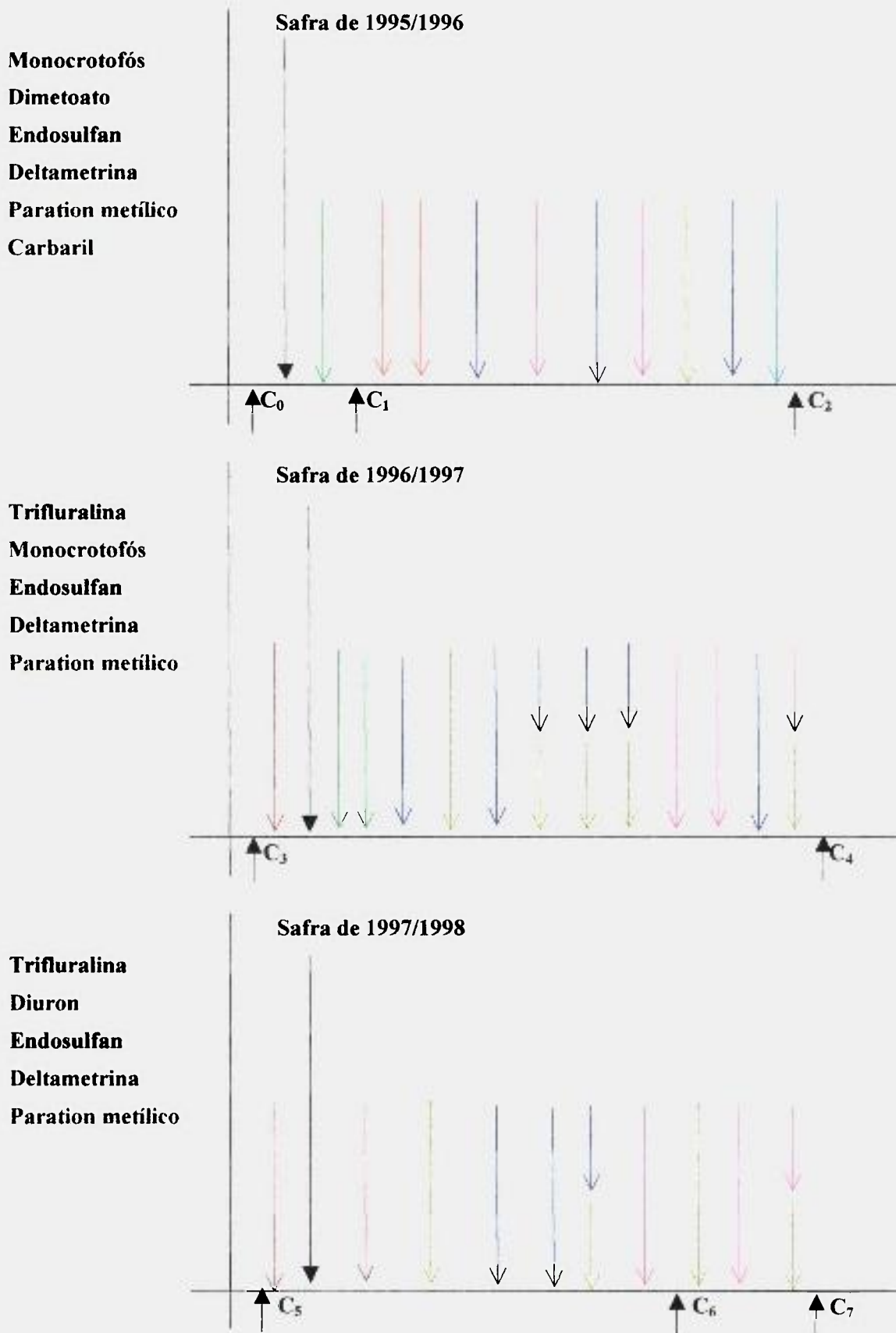


Figura 2 – Esquema de aplicação dos pesticidas utilizados na plantação de algodão em Tatuí e São Paulo

As amostras de solo foram coletadas dois dias após aplicação de diferentes pesticidas à profundidade de até 15 cm do perfil do solo, em diversas épocas conforme Fig. 2: antes da aplicação de qualquer pesticida (C_0), depois da primeira aplicação de monocrotofós (C_1), depois da aplicação de carbaril (C_2). Coletou-se também no período entre as safras de 1996/1997 (C_3), logo após a aplicação de deltametrina + paration metílico (C_4). Novamente entre as safras de 1997/1998 (C_5), após a primeira aplicação de deltametrina (C_6) e após aplicação da mistura deltametrina + paration metílico (C_7).

No laboratório, as amostras de solo foram passadas em peneira de malha de 2mm e armazenadas em congelador a, aproximadamente, -18°C . Para os estudos, as amostras foram transferidas para geladeiras permanecendo durante dois dias para descongelar, e a seguir, deixadas à temperatura ambiente antes do tratamento com ^{14}C -2,4-D.

Antes do início dos testes determinou-se o conteúdo de umidade de cada amostra de solo em balança "Moisture Analyser" (Mettler LJ 16) para padronização dos resultados em equivalente em peso seco. Além disso, verificou-se o conteúdo de umidade das amostras de solo no momento das coletas para padronização em 55% da capacidade máxima de retenção de água, de forma a reativar a atividade microbiana edáfica.

Para determinação da capacidade máxima de retenção de água, amostras dos dois tipos de solo foram mantidas à temperatura ambiente durante 3 dias. Três subamostras de 10 g, de cada tipo de solo, foram transferidas para funis de vidro e em cada subamostra foi adicionada água destilada, até que o volume escorrido através do solo fosse igual ao volume adicionado, então anotou-se o volume retido.

3.2. Pesticida

O ^{14}C -2,4-D, uniformemente marcado no anel, foi fornecido pela Agência Internacional de Energia Atômica, com atividade específica de

192,8 kBq μg^{-1} (5,21 $\mu\text{Ci } \mu\text{g}^{-1}$) e 83,9% de pureza radioquímica determinada no Laboratório de Ecologia de Agroquímicos do Instituto Biológico (São Paulo, SP), foi diluído em metanol.

O 2,4-D [(2,4-diclorofenoxi) ácido acético] técnico, com pureza química superior a 98% foi fornecido pela “Environmental Protection Agency” (EPA), dos Estados Unidos da América.

3.3. Teste de Biomineralização

A cada coleta de solo, triplicatas equivalentes a 25g de solo seco foram transferidas para balões de fundo redondo com capacidade de 500 mL. O conteúdo de umidade foi corrigido para 55% da capacidade máxima de retenção de água (CMRA) e as amostras foram mantidas em câmaras de temperatura controlada a aproximadamente 22°C durante uma semana, para reativação da microbiota edáfica.

Após o período de reativação da atividade microbiana, uma solução de 2,4-D em mistura com ^{14}C -2,4-D em metanol foi acrescentada em cada amostra de solo, correspondendo a 1 μg e 0,74 kBq (0,02 μCi) g^{-1} de solo. Os balões de vidro com as amostras de solo foram fechados com rolhas de borracha providas de duas saídas com torneiras de teflon e novamente mantidos à temperatura de aproximadamente 22°C por até 6 semanas.

A cada dois dias, as amostras foram conectadas a um sistema para coleta de ^{14}C -gases presentes na atmosfera interna do balão (Fig. 3). Os ^{14}C -produtos voláteis foram coletados em duas armadilhas de 15 mL de etilenoglicol monometiléter e o $^{14}\text{CO}_2$ foi coletado em duas armadilhas de 15 mL de solução de hidróxido de potássio (1 mol L^{-1}), conforme ANDRÉA & TOMITA (1994).

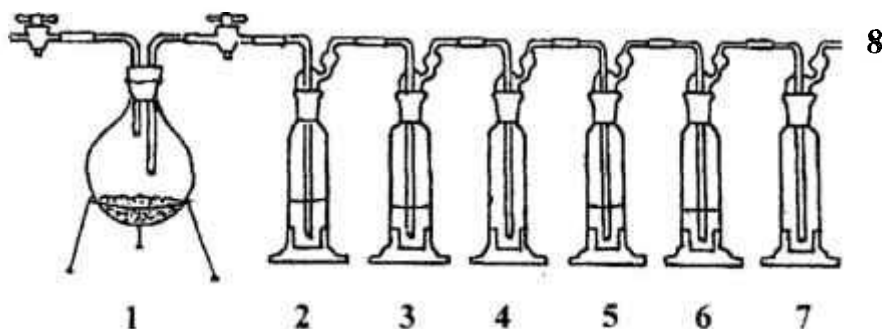


Figura 3- Sistema fechado para coleta de $^{14}\text{CO}_2$ e ^{14}C -compostos voláteis. (1- balão de vidro com amostra de solo; 2 e 3- etilenoglicol monometiléter; 4 e 7- frascos vazios para evitar refluxo; 5 e 6 hidróxido de potássio; e 8- bomba de vácuo). Fonte: ANDRÉA & TOMITA (1994).

Ao final de cada período de 7 dias, o radiocarbono presente em duas alíquotas de 1,0 mL de cada solução armadilha foi quantificado durante 10 minutos por contagem de cintilação em líquido pelo método de razão de canais com fonte externa, em aparelho Packard 1.600 TR, após a adição de líquido cintilador contendo 4 g de PPO (2,5-difeniloxazol) e 200 mg de POPOP [1,4-bis-2-(5-feniloxazol) benzeno] por litro de solução preparada com tolueno/Renex-95 na proporção 2:1 (v/v) (MESQUITA & RÜEGG, 1984). As soluções armadilhas também foram trocadas por outras recém-preparadas. Após 6 semanas o sistema foi desmontado para as análises quantitativas de ^{14}C -resíduos extraíveis e ^{14}C -resíduos ligados do solo.

3.4. Determinação de ^{14}C -Resíduos Extraíveis

Para determinação das melhores condições de extração do ^{14}C -2,4-D das amostras de solo, foram realizados testes de recuperação de alguns métodos de extração em amostras de solo não tratado com qualquer pesticida provenientes de São Paulo, da área não tratada (sem pesticidas), e amostras de solo de Tatuí coletadas em C_0 e que receberam aplicação apenas de solução de ^{14}C -2,4-D.

3.4.1. Testes de Recuperação de Extração do ^{14}C -2,4-D

Todas as amostras de solos dos testes de recuperação receberam aplicação de solução de ^{14}C -2,4-D em mistura com 2,4-D em metanol com atividade e concentração previamente conhecidas (0,74 kBq e $1 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo). Para determinação das condições de extração das amostras de solo fortificadas testou-se os seguintes solventes e métodos de extração:

- * TR I – com metanol por Soxhlet (16 horas)
- * TR II – com metanol por Soxhlet (solo acidificado)
- * TR III – com sistema de solventes acetona : hexano por ultra-som
- * TR IV – com sistema de solventes água : acetonitrila : ácido acético por agitação

3.4.1.1. Metanol por Soxhlet – TR I

Amostras de 75 g de cada tipo de solo receberam aplicação de solução de ^{14}C -2,4-D em mistura com 2,4-D em metanol, correspondendo a 0,74 kBq e $1 \mu\text{g.g}^{-1}$ de solo.

De cada amostra de solo tratado foram retiradas seis subamostras de 0,5g para combustão e verificação do ^{14}C -2,4-D aplicado inicialmente no solo. O $^{14}\text{CO}_2$ produzido pelo método de combustão em aparelho “Biological Oxidizer” OX 600, foi coletado em armadilhas contendo 12 mL de líquido cintilador e 3 mL de monoetanolamina, e então transferidas para frascos de cintilação para a quantificação do radiocarbono presente na amostra, conforme ANDRÉA *et al.* (1994).

Outras subamostras de 24 g de cada amostra de solo foram transferidas para cartuchos de celulose e extraídos com 150 mL de metanol por Soxhlet, durante 16 horas (2 ciclos de 8 horas cada).

Do volume total recuperado de cada amostra de extrato foram retiradas três alíquotas de 1,0 mL para quantificação do radiocarbono extraído por contagem de cintilação em líquido em aparelho Packard 1.600 TR, após adição de líquido cintilador de MESQUITA & RÜEGG (1984).

3.4.1.2. Metanol por Soxhlet (solo acidificado) – TR II

Em 35 g de solo proveniente da área não tratada de São Paulo aplicou-se solução de 2,4-D em mistura com ^{14}C -2,4-D em metanol, na mesma proporção que em TR I.

Novamente retiraram-se 6 subamostras de 0,5 g para a quantificação do radiocarbono realmente aplicado, pelo método de combustão.

Triplicatas de 10 g receberam 1,2 mL de ácido sulfúrico (18 mol L^{-1}), foram transferidas para cartuchos de celulose e extraídas com 150 mL de metanol por Soxhlet por 10 horas.

O radiocarbono extraído foi quantificado por contagem de cintilação em líquido de três alíquotas de 1,0 mL do volume final recuperado.

3.4.1.3. Sistema de solventes acetona:hexano por ultra-som – TR III

Em 35 g do solo proveniente da área controle de São Paulo aplicou-se solução de ^{14}C -2,4-D em mistura com 2,4-D em metanol, correspondendo também a $0,74 \text{ kBq}$ e $1 \mu\text{g.g}^{-1}$ de solo.

De cada amostra de solo, 6 sub-amostras de 0,5 g também foram retiradas para a quantificação do radiocarbono realmente aplicado pelo método de combustão.

Triplicatas de 10 g tiveram o pH ajustado para $\leq 1,0$ com uma solução de ácido sulfúrico : água (1:1 v/v) e então foram extraídas com (3x) 100 mL de solução de acetona : hexano (50:50 v/v) por ultra-som durante 5 minutos (LOPEZ-AVILA *et al.*, 1986).

Do volume total de extrato recuperado de cada amostra de solo foram retiradas três alíquotas de 1,0 mL para quantificação do radiocarbono extraído por contagem de cintilação em líquido.

3.4.1.4. Sistema de solventes água:acetonitrila:ácido acético por agitação – TR IV

Amostras de 65 g de cada tipo de solo receberam aplicação de solução de ^{14}C -2,4-D em mistura com 2,4-D em metanol, correspondendo também a 0,74 kBq e $1 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de solo e verificou-se a quantidade de radiocarbono realmente aplicado, por combustão conforme já descrito.

Triplicatas de 20 g de cada amostra de solo foram transferidas para frascos de vidro, com 500 mL de capacidade, nos quais foram adicionados 150 mL de solução aquosa de 30% de acetonitrila e 2,5% de ácido acético glacial. As amostras foram então agitadas em agitador mecânico durante 2 horas. A seguir, as amostras de solo permaneceram em contato com o sistema de solventes por mais 48 horas, foram novamente agitadas por mais 2 horas e centrifugadas à velocidade de 1.500 rpm durante 25 minutos (SMITH & MUIR, 1984).

O sobrenadante foi transferido para frascos de vidro e dele foram retiradas 3 alíquotas de 1,0 mL para quantificação do radiocarbono extraído por contagem de cintilação em líquido.

3.4.1.5. Cálculos

De cada extrato obtido pelos diferentes métodos de extração foram retiradas 3 alíquotas de 1,0 mL para quantificação do radiocarbono presente por contagem de cintilação em líquido após adição de líquido cintilador de MESQUITA & RÜEGG (1984).

Foram feitas as médias dos valores obtidos pela quantificação por cintilação em líquido do radiocarbono presente nas alíquotas e, então, o valor final foi multiplicado pelo volume total do extrato recuperado.

Os resultados brutos foram transformados em porcentagem em relação à quantidade de ^{14}C -2,4-D inicialmente aplicado e determinados através de quantificação do $^{14}\text{CO}_2$ produzido pelo método de combustão.

3.4.2. Extração e “Clean up” de ^{14}C -Resíduos Extraíveis

Após verificação da metodologia de extração mais eficiente, as amostras de solo contidas nos balões foram transferidas para frascos de vidro com capacidade de 500 mL e submetidas às condições de extração de TR IV, conforme SMITH & MUIR (1984).

Do extrato foram retiradas 3 alíquotas de 1,0 mL para quantificação do radiocarbono extraído por contagem de cintilação em líquido.

Após a quantificação do ^{14}C -extraível, o restante das amostras de extrato foi concentrado em rotavaporador à secura e depois ressuspendido em 50 mL de água filtrada em aparelho Milli Q “Academic”. Conforme BALINOVA (1993), adicionou-se a este volume de extrato ressuspendido 1,0 g de cloreto de sódio e o pH foi posteriormente ajustado para aproximadamente 2,0 com solução de ácido sulfúrico ($2,5 \text{ mol L}^{-1}$).

O volume total das amostras foi percolado em colunas C_{18} (octadecil), previamente condicionadas com 10 mL de metanol e depois com 10 mL de água destilada, sob vácuo, a um fluxo de 1 mL min^{-1} . A seguir percolaram-se mais 5 mL de água destilada. O eluato total foi descartado e a coluna foi seca sob vácuo durante 10 minutos (BALINOVA, 1993).

Quando seca, a coluna C_{18} de cada amostra foi percolada com 3,5 mL de metanol (grau HPLC) para eluição dos ^{14}C -resíduos extraíveis. Cada eluato foi depois concentrado com nitrogênio até volume final de 1,0 mL.

3.5. Determinação de ^{14}C -Resíduos Ligados

As amostras de solo extraído foram mantidas à temperatura ambiente para secagem e então 3 subamostras de 0,5 g de cada amostra de solo foram submetidas à combustão em “Biological Oxidizer” (OX-600), conforme descrito no item

3.4.1.1. para determinação dos resíduos de ^{14}C -2,4-D aplicados e ainda presentes no solo, isto é, não extraíveis ou ligados.

3.6. Análise dos ^{14}C -Resíduos Extraíveis

3.6.1. Por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

3.6.1.1. Curva de calibração

Seis soluções com diferentes concentrações de 2,4-D (7,5; 3,0; 2,0; 1,0, 0,5; e 0,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de metanol) foram preparadas para a determinação da quantidade mínima detectável pelo método e para obtenção da curva de calibração pelo método de MEYER & ZÜND (1993).

Quatro sub-amostras de 20 μL de cada solução padrão foram analisadas por cromatografia líquida “Shimadzu Liquid Chromatograph (LC-10AD)”, com forno para coluna “Shimadzu Column Oven” (CTO-10A) e detector de UV-VS “Shimadzu UV-VS Detector”(SPD-10AV), com as seguintes condições cromatográficas:

- * coluna: RP 18 (250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro)
- * comprimento de onda: 230 nm
- * fase móvel: água : acetonitrila : ácido acético (6 : 4 : 0,05)
- * fluxo: 1,5 mL min^{-1}
- * temperatura do forno: 30 °C
- * pressão: 154 bar

3.6.1.2. Análise das amostras

Três alíquotas de 20 μL de cada amostra dos extratos de solo foram injetadas nas mesmas condições utilizadas para determinação da curva de calibração.

3.6.2. *Por cromatografia em camada delgada (CCD)*

Para análise em cromatografia em camada delgada foram utilizadas cromatoplasas de alumínio revestidas com camada delgada de sílica-gel 60 F₂₅₄ (Merk). Cada cromatoplasa foi dividida em faixas onde foi aplicado o restante das amostras de extratos (aproximadamente 0,8 mL). Em cada placa, foi aplicada também solução padrão de 2,4-D com concentração de 10 mg mL⁻¹ de metanol, em duas diferentes faixas, para determinação e comparação dos R_f obtidos.

O sistema de solvente utilizado para o desenvolvimento da placa foi clorofórmio : ácido acético (9 : 1, v/v) à temperatura ambiente.

Quando secas, as placas foram observadas sob luz ultravioleta para verificação do R_f do 2,4-D padrão co-cromatografado com os extratos e depois submetidas à varredura em detector de radiação LB 2723 Berthold para verificação das áreas radioativas de cada faixa.

A sílica-gel correspondente às bandas radioativas foi raspada para quantificação do radiocarbono presente por contagem de cintilação em líquido, após adição de líquido cintilador de MESQUITA & RÜEGG (1984). Os resultados obtidos foram então convertidos em porcentagem em relação à atividade total recuperada em cada faixa da cromatoplasa.

3.7. **Análise Estatística dos Resultados**

Os dados brutos obtidos nos testes de biomineralização, determinação de ¹⁴C-resíduos extraíveis e de ¹⁴C-resíduos ligados foram submetidos à análise estatística pelo método de t-Student, com nível de significância de $p < 0,05$.

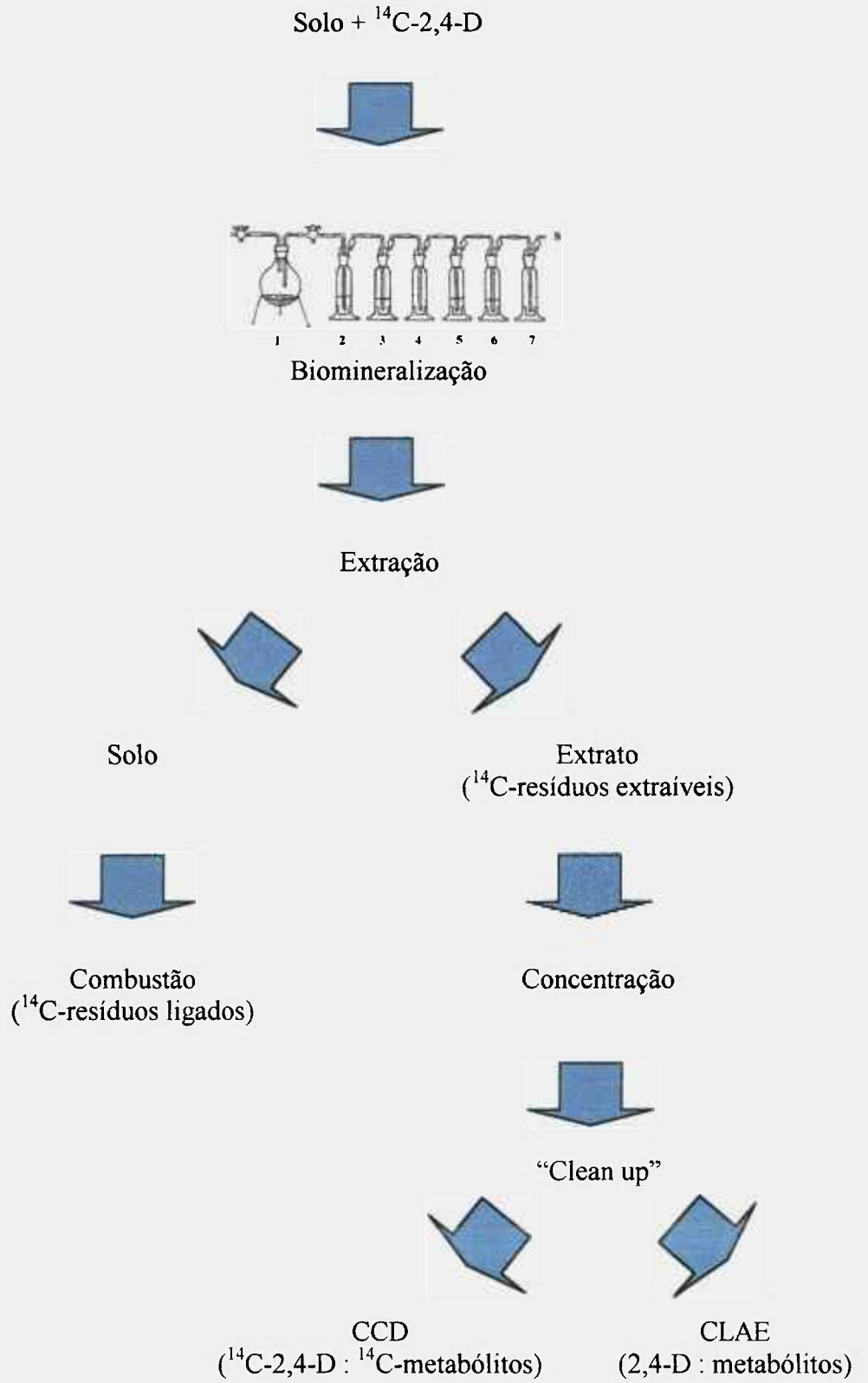


Figura 4 – Esquema do estudo de dissipação do ^{14}C -2,4-D.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Solos

A determinação das características físico-químicas dos solos foi efetuada pelo Departamento de Solos da Escola Superior de Agronomia “Luiz de Queiroz” e estão apresentadas na Tabela 2. Pôde-se observar que as características físico-químicas praticamente não variaram nas diferentes coletas de amostras de solo

4.2. Teste de Biomineralização

Em nenhuma das coletas detectou-se a formação de ^{14}C -produtos voláteis, independentemente da aplicação de outros pesticidas ou não. A ausência de volatilização do ^{14}C -2,4-D decorre do fato dele ter pressão de vapor 53 Pa a 160°C e ser considerado não volátil (WORTHING & HANCE, 1991). Além disso, o metabolismo edáfico destes solos sob os diferentes tratamentos também não produziu compostos voláteis.

Por outro lado, houve formação de $^{14}\text{CO}_2$ e também observou-se variação nessa produção conforme os tipos de solo e os pesticidas aplicados (Fig. 5).

Tabela 2 - Características físico-químicas e classificação dos solos de São Paulo e Tatuí

Solo	Areia	Silte	Argila	Matéria Orgânica	Fósforo	pH	Classificação textural
	——	%	——	— g dm ⁻³ —	mg dm ⁻³		
<i>Tatuí</i>							
C ₀	41	8	51	20	33	5,4	Argiloso
C ₁	*	*	*	*	*	*	*
C ₂	40	8	52	20	44	5,4	Argiloso
C ₃	41	8	51	21	72	4,9	Argiloso
C ₄	41	13	46	20	82	5,2	Argiloso
C ₅	39	8	53	19	22	5,7	Argiloso
C ₆	37	8	55	17	91	5,4	Argiloso
C ₇	37	10	51	17	37	5,7	Argiloso
<i>São Paulo com aplicação</i>							
C ₀	28	6	66	36	119	4,8	Muito argiloso
C ₁	*	*	*	*	*	*	*
C ₂	21	6	73	33	207	5,0	Muito argiloso
C ₃	18	13	69	33	206	4,9	Muito argiloso
C ₄	22	11	76	30	196	4,7	Muito argiloso
C ₅	18	8	74	30	199	5,1	Muito argiloso
C ₆	18	8	74	33	133	4,9	Muito argiloso
C ₇	13	8	79	28	91	4,9	Muito argiloso
<i>São Paulo sem aplicação</i>							
C ₀	28	6	66	36	119	4,8	Muito argiloso
C ₁	*	*	*	*	*	*	*
C ₂	24	7	69	33	202	5,3	Muito argiloso
C ₃	18	7	75	28	224	4,9	Muito argiloso
C ₄	16	11	73	32	266	5,0	Muito argiloso
C ₅	16	10	74	28	266	5,4	Muito argiloso
C ₆	20	10	70	29	228	5,4	Muito argiloso
C ₇	15	8	77	26	115	4,9	Muito argiloso

* - não determinado

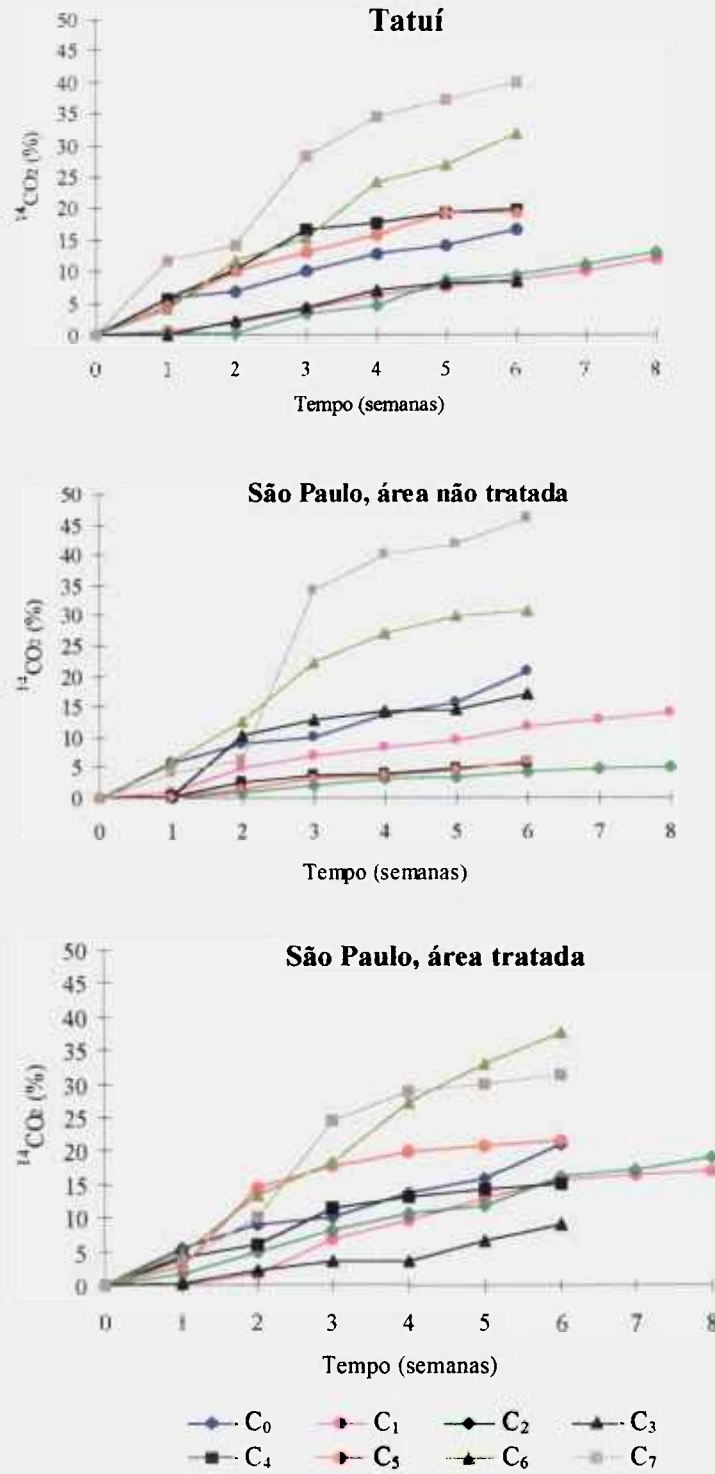


Figura 5 – Biomineralização de ¹⁴C-2,4-D em amostras de solos tratados com diferentes pesticidas

Na primeira semana de incubação observou-se apenas pequena produção de $^{14}\text{CO}_2$ nas três diferentes amostras de solo (Fig. 5). Essa pequena produção inicial, segundo VEEH *et al.* (1996), caracteriza a fase “lag” – período de adaptação necessário aos microrganismos para que eles produzam enzimas para a degradação do composto parental e seus metabólitos.

Para o solo de Tatuí, os períodos entre-plantios (C_0 , C_3 e C_5 , Fig. 2) foram considerados como controle das amostras de solo coletadas após aplicação dos pesticidas do plantio imediatamente posterior, pois não havia uma área testemunha.

Os resultados obtidos no solo de Tatuí em C_1 e C_2 (após aplicação de monocrotofós e carbaril, respectivamente) não apresentaram variação significativa em nível de 0,05% quando comparadas ao seu respectivo controle (C_0). Isto indica que estes dois pesticidas não influenciaram a atividade biomineralizadora da microbiota edáfica presente no solo de Tatuí (Fig. 6).

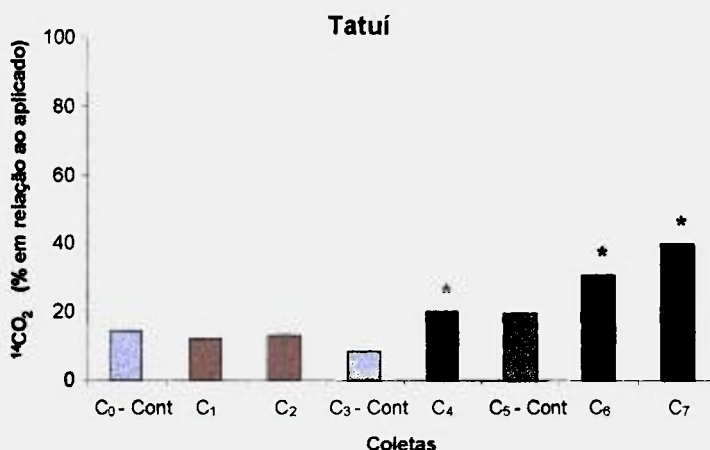


Figura 6 – Produção de $^{14}\text{CO}_2$ detectada 6 semanas após aplicação do ^{14}C -2,4-D nas amostras de Tatuí (Cont – coleta controle; * - amostras com valor de $p < 0,05$).

Entretanto, o mesmo solo (Tatuí) apresentou estímulo da atividade microbiana ao se comparar as amostras coletadas durante o período entre safras de 1996/1997 (C_3) e após aplicação de deltametrina + paration metílico (C_4). A produção total de $^{14}\text{CO}_2$ foi, respectivamente, de 8,3% e 19,9%. No período entre as safras de 1997/1998 (C_5 – controle) verificou-se produção de 19,4% de $^{14}\text{CO}_2$ e estímulo

significativo da atividade microbiana após aplicação da deltametrina (C_6) e, principalmente, após aplicação da mistura deltametrina + paration metílico (C_7), totalizando como $^{14}\text{CO}_2$, respectivamente, 31,9% e 39,9% do radiocarbono detectado (Fig. 5 e Fig. 6).

Verificou-se também alteração na produção de $^{14}\text{CO}_2$ nos diferentes tempos de coletas nas amostras de solo provenientes da área não tratada (controle) de São Paulo (Fig. 5 e Fig. 7). Esta variação indica possivelmente a influência dos fatores climáticos sobre a atividade microbiana do solo, já que as coletas foram realizadas em diferentes meses do ano e, portanto, sob diferentes condições climáticas.

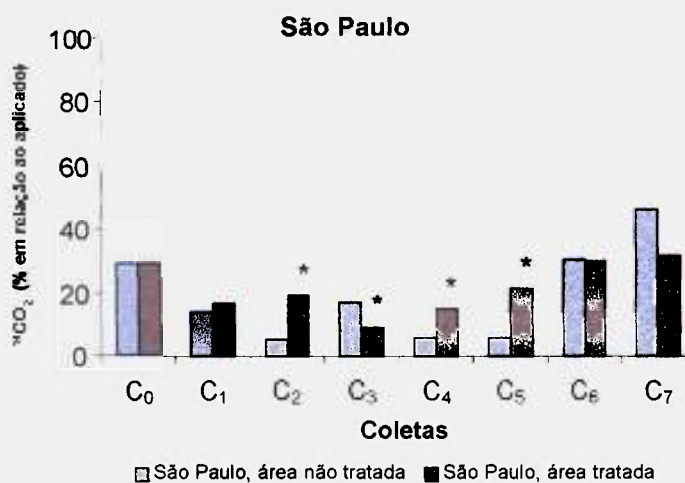


Figura 7 – Produção de $^{14}\text{CO}_2$ detectada 6 semanas após aplicação do ^{14}C -2,4-D nas amostras de São Paulo (* - amostras com valor de $p < 0,05$).

Mas, ao se comparar a produção de $^{14}\text{CO}_2$ na área tratada de São Paulo com a área não tratada pôde-se observar que a aplicação de monocrotofós (C_1) também não influenciou a atividade microbiana, conforme observado também em Tatuí. Porém, o carbaril (C_2) estimulou bioatividade apenas deste solo, pois, enquanto a área tratada apresentou produção de $^{14}\text{CO}_2$ de 19,1%, a área não tratada apresentou produção somente de 5,1% (Fig. 7).

Em C_3 (período entre as safras de 1996/1997) observou-se inibição da atividade edáfica na área tratada de São Paulo, pois o radiocarbono detectado como $^{14}\text{CO}_2$ totalizou 8,9%, enquanto na área não tratada (controle) detectou-se 17,0%

(Fig. 7). Embora PERES (2000) não tenha detectado resíduos de pesticidas nas amostras de solo coletadas na mesma área de estudo, a inibição da atividade biomineralizadora em C₃ pode ter sido decorrente dos tratamentos anteriores. Isto é, os pesticidas aplicados anteriormente podem ter selecionado um grupo de microrganismos que apresentou menor bioatividade do que a microbiota da área não tratada.

Também é interessante observar que em C₄ (após aplicação de deltametrina + paration metílico) as amostras de solo provenientes da área tratada apresentaram produção de 15,0% de ¹⁴CO₂ e as amostras provenientes da área não tratada apresentaram apenas 5,8%, indicando que a aplicação desta mistura estimulou significativamente a atividade microbiana (Fig. 7).

Em C₅ (período entre as safras de 1997/1998), apesar de não ter havido aplicação recente de qualquer composto, houve maior produção de ¹⁴CO₂ na área tratada (21,5%) em relação à área não tratada de São Paulo (6,1%) (Fig. 5 e 7). Isto pode ter sido ocasionado devido ao estímulo da atividade microbiana proporcionada pelas aplicações anteriores ou estímulo por resíduos ainda presentes no solo.

Os resultados obtidos a partir das amostras de solo coletadas em São Paulo em C₆ (após a aplicação de deltametrina) e C₇ (após a aplicação da mistura deltametrina + paration metílico) apresentaram diferença não significativa entre as áreas tratada e não tratada (Fig. 7). Entretanto, observou-se que a produção de ¹⁴CO₂ foi estimulada principalmente na área não tratada e, provavelmente, influenciada por condições climáticas.

A biomineralização do ¹⁴C-2,4-D foi geralmente maior no solo de São Paulo do que no solo de Tatuí. Isto pode ter ocorrido devido ao maior conteúdo de matéria orgânica presente no solo de São Paulo (Tab. 2), pois como a matéria orgânica representa fonte de nutrientes, ela proporciona aumento da biomassa e, conseqüentemente, maior atividade microbiana (BEELEN & DOELMAN, 1997). VOOS & GROFFMAN (1997) sugeriram a hipótese de que o tipo de população microbiana pode fornecer indicações para a capacidade de degradação dos pesticidas em solos. Além disso, solos com população diversificada e em grande número, como ocorre em solos com maior

conteúdo orgânico, seriam capazes de sustentar diversidade maior de reações que poderiam ser responsáveis pela degradação dos pesticidas.

MIWA & KUWATSUKA (1991) sugerem em seu trabalho que a diferença na degradação do 2,4-D entre os solos pode ser devida não somente às propriedades do composto, mas também ao tipo de população presente, e esta pode ser determinada pela quantidade de matéria orgânica presente nos solos.

De forma geral, observou-se que houve influência da aplicação de diferentes pesticidas sobre a atividade biomineralizadora nos dois tipos de solo sob as condições estabelecidas para este trabalho. Portanto, observou-se que a biomineralização da molécula aromática do ^{14}C -2,4-D pode ser utilizada como parâmetro de avaliação da influência de pesticidas sobre a microbiota edáfica.

4.3. Determinação de ^{14}C -Resíduos Extraíveis

4.3.1. Testes de Recuperação de Extração de ^{14}C -2,4-D

Testar as diversas metodologias apresentadas em artigos científicos nas condições e materiais que estão sendo utilizados é uma necessidade para se obter maior certeza dos resultados. Os resultados obtidos pelos diferentes testes de métodos de extração do ^{14}C -2,4-D estão apresentados na Tab. 3.

Tabela 3 – Recuperação do radiocarbono proveniente do ^{14}C -2,4-D por diferentes métodos de extração

Metodologia	Extraído		%	Remanescente no solo	
	São Paulo	Tatuí		São Paulo	Tatuí
TR I	71,91% ± 16,45%	75,40% ± 6,03%		41,91% ± 5,52%	30,18% ± 7,45%
TRII	76,89% ± 0,37%	-		26,98% ± 1,32%	-
TR III	52,26% ± 8,94%	-		46,90% ± 5,67%	-
TR IV	80,69% ± 0,84%	89,25% ± 1,61%		11,10% ± 0,09%	8,76% ± 0,49%

- não realizado

Observou-se que os métodos de extração exaustiva (TR I e TR II) não foram sempre os mais eficientes. Além disso, os resultados do TR IV, que consistiu no sistema de solventes água : acetonitrila : ácido acético para extração por agitação (SMITH & MUIR, 1984), confirmaram este método como o mais apropriado para extração do 2,4-D nos dois tipos de solo. Desta forma, optou-se por este método para extração das amostras do experimento porque a recuperação do radiocarbono aplicado foi maior, tanto para o solo de São Paulo quanto para o solo de Tatuí.

3.4.2. Extração e "Clean up" de ^{14}C -Resíduos Extraíveis

A quantidade de ^{14}C -resíduos extraíveis após as 6 semanas do estudo de biomineralização foi geralmente baixa em todas amostras de solo, exceto em Tatuí antes das aplicações (C_0) (Fig. 8). Trabalhos como o de BARRIUSO *et al.* (1997) também mostraram pequena recuperação de resíduos extraíveis após período de 8 meses de incubação, confirmando os resultados de dissipação do 2,4-D com o tempo.

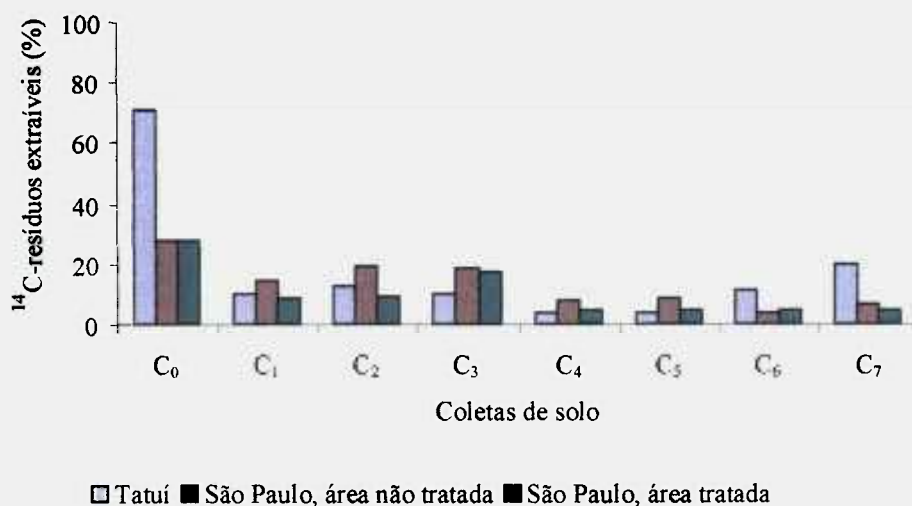


Figura 8 – Recuperação de ^{14}C -resíduos extraíveis das amostras de solo após as 6 semanas do teste de biomineralização.

Aplicações de monocrotofós (C_1) e carbaril (C_2) apresentaram influência significativa sobre a dissipação do ^{14}C -2,4-D no solo de Tatuí (Tab. 4), principalmente em relação à ^{14}C -resíduos extraíveis. Isto é, nas amostras de solo

coletadas no intervalo de safras do início do estudo (C_0 – controle) recuperaram-se 70,6% de ^{14}C -resíduos extraíveis e as amostras de solo em C_1 e C_2 totalizaram, respectivamente, apenas 10,1% e 12,7% (Fig.8). Isto pode ser resultado da inibição da microbiota pelas aplicações de monocrotofos e carbaril. A microbiota presente estaria atuando na degradação apenas parcial do composto com produção de metabólitos que se tornaram ligados às partículas do solo, pois inversamente à produção de $^{14}\text{CO}_2$, as quantidades de ^{14}C -resíduos ligados foram de 12,8%, 78,2% e 66,8% para as amostras de solo coletadas em C_0 , C_1 e C_2 , respectivamente (Tab. 4).

Amostras de solo tratadas com mistura de deltametrina + paration metílico apresentaram apenas 4,2% de ^{14}C -resíduos extraíveis enquanto nas respectivas amostras controle (C_3) totalizaram 9,9%. Isto indica que o tratamento com a mistura destes dois pesticidas influenciou na menor recuperação de ^{14}C -resíduos extraíveis de 2,4-D e pode estar relacionado com o estímulo da atividade biomineralizadora da microbiota verificado após aplicação da mistura de deltametrina + paration metílico (Tab. 4), durante o teste de biomineralização. Isto é, a aplicação da mistura deltametrina + paration metílico influenciou estimulando a atividade biomineralizadora da molécula aromática do ^{14}C -2,4-D e, conseqüentemente, diminuindo a quantidade de ^{14}C -resíduos extraíveis.

Quando comparam-se os resultados da quantidade de ^{14}C -resíduos extraíveis recuperados das amostras de solo do período entre as safras de 1997/1998 (C_5 – controle) com as amostras de solo coletadas após a aplicação de deltametrina (C_6) nota-se que eles diferiram, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Tab. 4). Isto significa que a aplicação de deltametrina no solo de Tatuí não influenciou na extractabilidade do ^{14}C -2,4-D.

Tabela 4 – Balanço total de [^{14}C]-recuperado nas amostras do solo de Tatuí (média das porcentagens + desvio padrão).

Tratamento	$^{14}\text{CO}_2$	$^{14}\text{C-R.E.}^a$	$^{14}\text{C-R.L.}^b$	$^{14}\text{C-Total}$
Antes da aplicação de pesticidas (C_0 – Controle)	14,4 ± 2,4	70,6 ± 0,8	12,8 ± 0,7	90,3 ± 1,3
Monocrotofós (C_1)	12,1 ± 1,5	10,1* ± 1,5	78,2* ± 13,5	99,2 ± 5,5
Carbaril (C_2)	13,1 ± 0,4	12,7* ± 2,8	66,8* ± 8,7	91,2 ± 3,7
Entre-plantios (C_3 – Controle)	8,3 ± 3,7	9,9 ± 0,8	75,7 ± 8,4	92,9 ± 4,0
Deltametrina + paration metílico (C_4)	19,9* ± 1,6	4,2* ± 0,1	67,9 ± 2,6	91,5 ± 1,3
Entre-plantios (C_5 – Controle)	19,4 ± 3,4	4,3 ± 0,9	72,3 ± 1,6	95,5 ± 2,0
Deltametrina (C_6)	30,5* ± 6,0	11,2 ± 5,3	47,5* ± 1,6	88,0 ± 4,3
Deltametrina + paration metílico (C_7)	39,9* ± 4,4	19,8* ± 1,7	32,9* ± 1,3	90,4 ± 2,2

a – $^{14}\text{C-R.E.} = ^{14}\text{C-Resíduos extraíveis}$

b – $^{14}\text{C-R.L.} = ^{14}\text{C-Resíduos ligados}$

* amostras com valor de $p < 0,05$

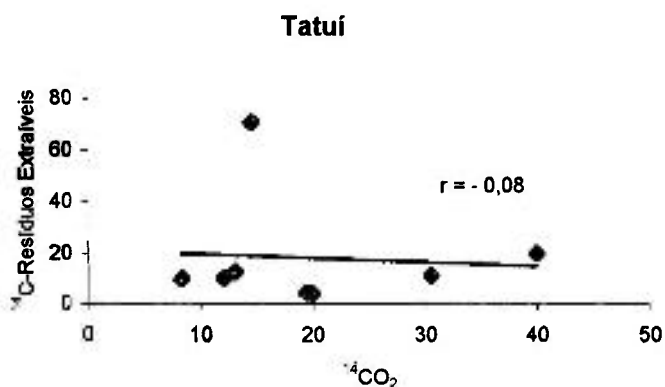


Figura 9 – Curva de correlação entre as porcentagens de $^{14}\text{CO}_2$ e ^{14}C -resíduos extraíveis detectados nas amostras de solo de Tatuí.

Entretanto, quando os resultados das amostras controle (C_5) foram comparados com os das amostras coletadas após aplicação da mistura deltametrina + paration metílico (C_7), observou-se maior quantidade de ^{14}C -resíduos extraíveis em C_7 (Fig. 8). Isto mostra que a aplicação somente de deltametrina (C_6) não influenciou a extractabilidade dos resíduos de $^{14}\text{C-2,4-D}$, porém quando a deltametrina foi misturada

com paration metílico houve influência sobre a quantidade de ^{14}C -resíduos extraíveis. É interessante observar também que a aplicação da mistura deltametrina + paration metílico influenciou significativamente tanto na atividade biomineralizadora quanto na quantidade de ^{14}C -resíduos extraíveis em C_4 e C_7 , pois os valores de p , nos dois testes, foram menores que 0,05. A maior produção de $^{14}\text{CO}_2$ observada nessas duas coletas foi provavelmente decorrente da maior quantidade de resíduos disponíveis à ação enzimática dos microrganismos edáficos.

Não houve correlação ($r = -0,08$) entre a quantidade total de $^{14}\text{CO}_2$ produzido pelo solo de Tatuí e a quantidade de ^{14}C -resíduos extraíveis detectada nas diferentes coletas (Fig. 9). Isto pode ter sido consequência das diferentes influências dos diferentes pesticidas sobre a dissipação do 2,4-D

A recuperação de ^{14}C -resíduos extraíveis foi geralmente menor nas amostras de solo provenientes da área de São Paulo com aplicação do que na área controle sem tratamento (Fig. 8). Essa menor recuperação de ^{14}C -resíduos extraíveis pode estar relacionada com a predominância de maior biomineralização do ^{14}C -2,4-D nas amostras tratadas durante o período total do experimento (Fig. 5).

Entretanto, diferenças significativas entre a recuperação de radiocarbono na forma de ^{14}C -resíduos extraíveis das amostras de solo de São Paulo subárea tratada e a subárea não tratada (controle) ocorreram após aplicação de carbaril (C_2) e após as duas aplicações de deltametrina + paration metílico (C_4 e C_7), indicando que a mistura destes pesticidas influenciou na dissipação do ^{14}C -2,4-D sob a forma de ^{14}C -resíduos extraíveis (Tab. 5).

Portanto, em ambos os solos (Tatuí e São Paulo) observou-se influência da mistura de deltametrina + paration metílico (C_4 e C_7) sobre os ^{14}C -resíduos extraíveis (Tab. 4 e Tab. 5). Mas quando o deltametrina foi aplicado sozinho não se observou qualquer influência. Isto indica que a mistura pode ter sido preferencialmente metabolizada pelos microrganismos que deixaram o 2,4-D disponível ou extraível.

Tabela 5 – Balanço total de [^{14}C]-recuperado nas amostras do solo das subáreas de São Paulo (média das porcentagens \pm desvio padrão).

Tratamento	$^{14}\text{CO}_2$		$^{14}\text{C-R.E.}^a$		$^{14}\text{C-R.L.}^b$		$^{14}\text{C-Total}$	
	ANT ^c	AT ^d	ANT ^c	AT ^d	ANT ^c	AT ^d	ANT ^c	AT ^d
Antes da aplicação de pesticidas (C ₀)	29,4 $\pm 10,3$	29,4 $\pm 10,3$	27,6 $\pm 1,2$	27,6 $\pm 1,2$	36,3 $\pm 0,9$	36,3 $\pm 0,9$	89,5 $\pm 4,5$	89,5 $\pm 4,5$
Monocrotofós (C ₁)	14,0 $\pm 1,3$	16,8 $\pm 2,4$	14,6 $\pm 4,2$	8,4 $\pm 2,8$	75,0 $\pm 4,3$	70,9 $\pm 3,6$	101,5 $\pm 3,2$	95,0 $\pm 3,5$
Carbaril (C ₂)	5,1* $\pm 1,7$	19,1* $\pm 3,4$	19,1* $\pm 2,6$	9,5* $\pm 1,1$	77,8* $\pm 1,0$	82,3* $\pm 4,1$	99,4 $\pm 2,0$	109,7 $\pm 1,7$
Entre-plantios (C ₃)	16,9* $\pm 3,4$	9,0* $\pm 1,1$	18,9 $\pm 1,7$	17,3 $\pm 2,7$	86,9 $\pm 2,1$	79,8 $\pm 1,7$	120,0 $\pm 3,0$	103,6 $\pm 1,5$
Deltametrina + paration metílico (C ₄)	5,8* $\pm 2,5$	15,1* $\pm 2,6$	8,3* $\pm 0,1$	4,7* $\pm 0,3$	81,1* $\pm 2,2$	74,3* $\pm 0,9$	94,0 $\pm 1,9$	93,4 $\pm 1,2$
Entre-plantios (C ₅)	6,1* $\pm 1,0$	21,5* $\pm 8,2$	8,8 $\pm 0,6$	4,6 $\pm 0,2$	85,1* $\pm 1,8$	69,2* $\pm 4,9$	98,7 $\pm 2,0$	94,7 $\pm 1,5$
Deltametrina (C ₆)	30,7 $\pm 9,2$	29,9 $\pm 15,7$	4,1 $\pm 0,6$	4,8 $\pm 0,2$	48,3 $\pm 1,9$	54,5 $\pm 4,4$	82,5 $\pm 3,5$	88,6 $\pm 3,8$
Deltametrina + paration metílico (C ₇)	46,1 $\pm 18,5$	31,4 $\pm 11,6$	6,5* $\pm 1,1$	4,4* $\pm 0,1$	46,8* $\pm 1,8$	51,8* $\pm 2,2$	98,5 $\pm 8,9$	87,0 $\pm 7,5$

a – $^{14}\text{C-R.E.} = ^{14}\text{C-Resíduos extraíveis}$

c – ANT = Área não tratada (controle)

* amostras com valor de $p < 0,05$

b – $^{14}\text{C-R.L.} = ^{14}\text{C-Resíduos ligados}$

d – AT – Área Tratada

Os resultados obtidos de $^{14}\text{CO}_2$ produzido e ^{14}C -resíduos extraíveis tiveram correlação positiva entre si ($r = 0,8$) para as amostras de solo provenientes da subárea sem tratamento de São Paulo. Entretanto, para a subárea tratada, o coeficiente de correlação foi de apenas 0,4. Isto é, praticamente não houve correlação entre os dois parâmetros. Assim como para o solo de Tatuí, os diferentes pesticidas parecem ter tido diferentes influências sobre a dissipação do 2,4-D (Fig. 9 e Fig. 10).

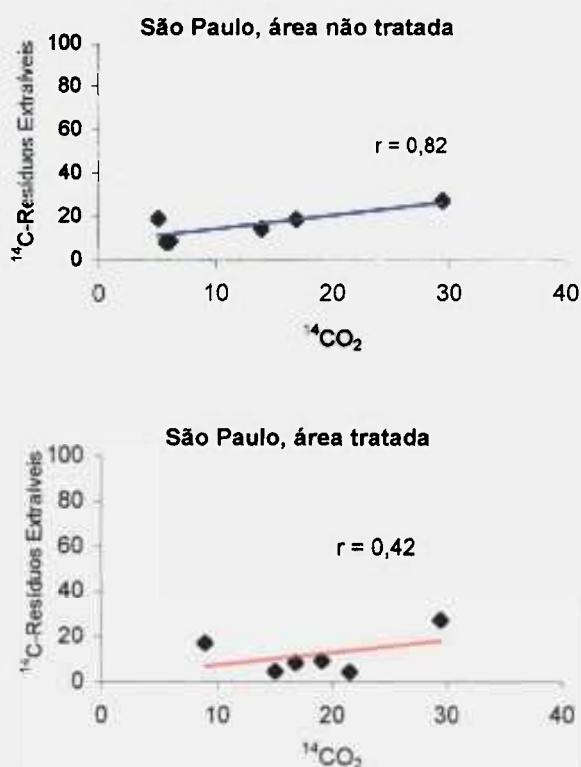


Figura 10 – Curvas de correlação entre as porcentagens de $^{14}\text{CO}_2$ e ^{14}C -resíduos extraíveis detectados nas amostras de solo de São Paulo.

Os resultados da quantidade de ^{14}C -resíduos extraíveis obtidos a partir das amostras de solo de São Paulo após aplicação de monocrotofos (C_1) e após a primeira aplicação de deltametrina (C_6) foram menores nas amostras tratadas com pesticidas. As diferenças entre eles e seus respectivos controles não foram estatisticamente significantes (Tab. 5). Portanto, tanto a aplicação de monocrotofos quanto a aplicação de apenas deltametrina não influenciaram a dissipação de ^{14}C -resíduos extraíveis (Fig. 8).

De forma geral, ao final das 6 semanas do estudo de biomineralização, as quantidades de radiocarbono detectados como ^{14}C -resíduos extraíveis foram sempre menores em todas as amostras de solo tratado (Tatuí e São Paulo) quando comparadas com as amostras controle, evidenciando influência da aplicação de pesticidas sobre a dissipação do herbicida 2,4-D em solos. (Fig. 8).

4.4. Determinação de ^{14}C -Resíduos Ligados

Houve grande formação de ^{14}C -resíduos ligados a partir da aplicação de ^{14}C -2,4-D em todos os solos e tratamentos após as 6 semanas de permanência do ^{14}C -2,4-D com as amostras de solo (Fig. 11).

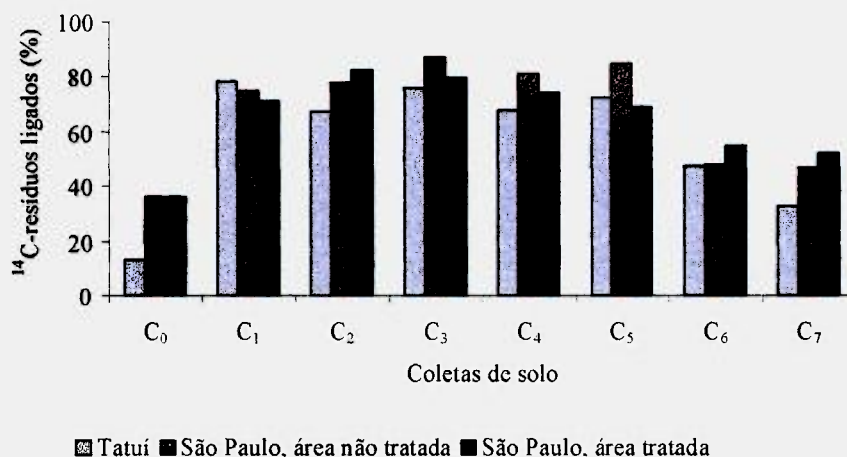


Figura 11 – Recuperação de ^{14}C -resíduos ligados das amostras de solo após as 6 semanas do teste de biomineralização

Observou-se que as amostras do solo de São Paulo geralmente apresentaram maior quantidade de ^{14}C -resíduos ligados do que as amostras do solo de Tatuí (Fig. 11 e Fig. 12). A formação de maior quantidade de resíduos ligados no solo de São Paulo do que no solo de Tatuí foi provavelmente ocasionada por influência do conteúdo de matéria orgânica, pois segundo BARTHA (1980), os pesticidas podem se ligar à molécula de húmus através dos sítios ativos presentes na estrutura molecular do ácido húmico e aí ficarem de tal forma ligados que os processos de extração não conseguem retirá-los.

Verificou-se correlação negativa ($r = - 0,97$) entre a quantidade de ^{14}C -resíduos extraíveis e ^{14}C -resíduos ligados tanto no solo de Tatuí (Fig. 13) como no solo de São Paulo ($r = - 0,76$ e $- 0,72$, respectivamente para área não tratada e área tratada no solo de São Paulo, Fig. 14). Isto indica que quanto maior a formação de resíduos ligados menor foi a quantidade de ^{14}C -resíduos disponíveis para serem extraídos.

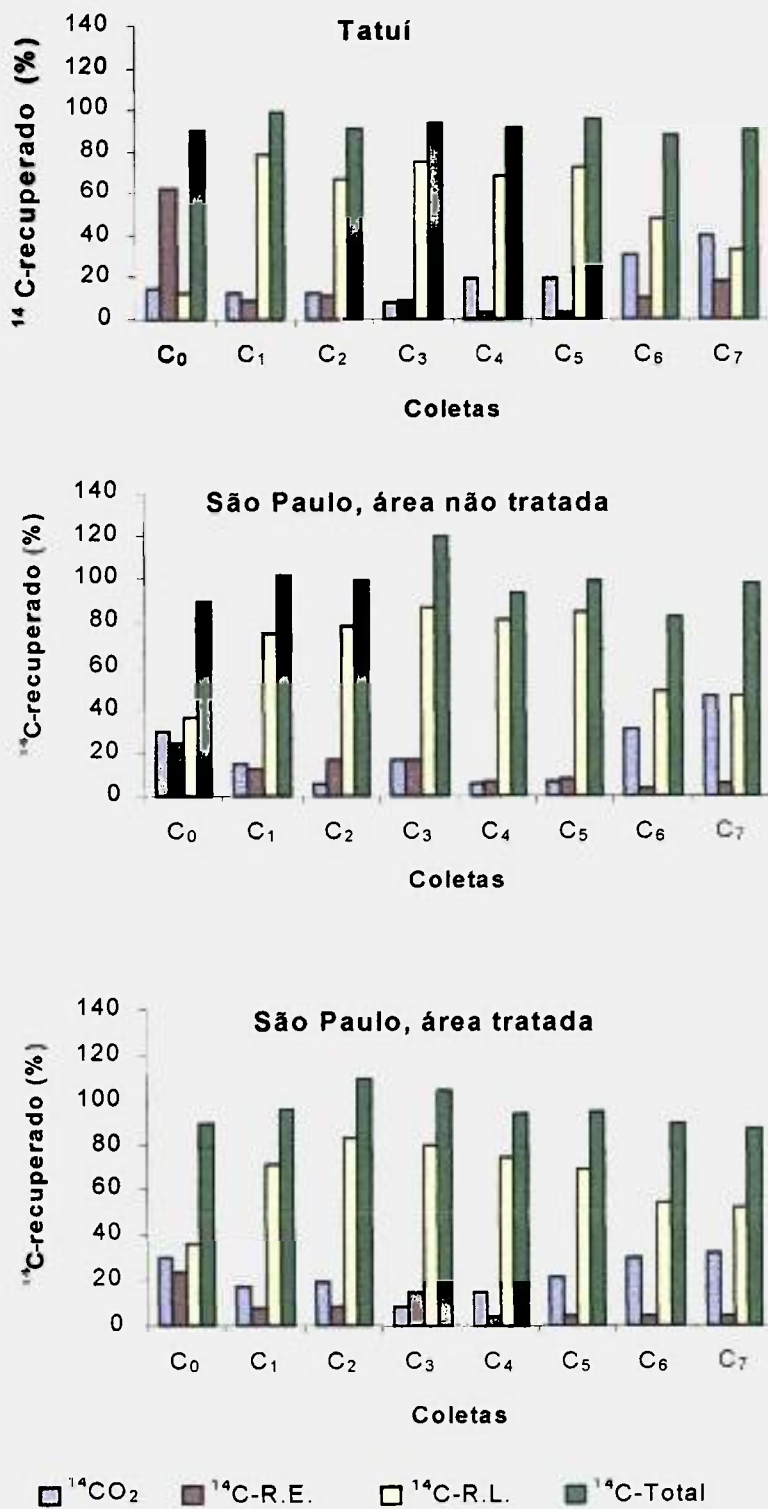


Figura 12 – Recuperação do radiocarbono como $^{14}\text{CO}_2$, ^{14}C -resíduos extraíveis e ^{14}C -resíduos ligados a partir da aplicação de ^{14}C -2,4-D em amostras de solo de Tatuí e São Paulo ($^{14}\text{C-R.E.}$ = ^{14}C -resíduos extraíveis; $^{14}\text{C-R.L.}$ = ^{14}C -resíduos ligados).

Grande quantidade de ^{14}C -resíduos ligados formados a partir de tratamento com 2,4-D também foi encontrada por BARRIUSO *et al.* (1997).

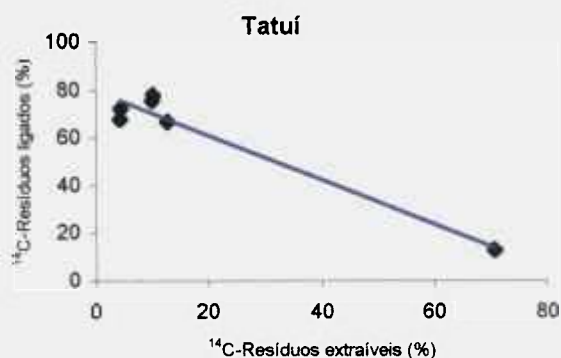


Figura 13 – Curva de correlação entre ^{14}C -resíduos extraíveis (%) e ^{14}C -resíduos ligados (%) de ^{14}C -2,4-D nas amostras de solo de Tatuí

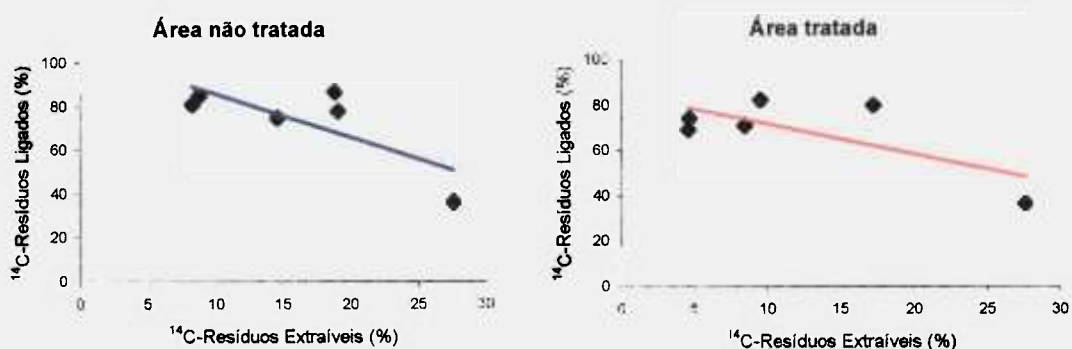


Figura 14 – Curva de correlação entre ^{14}C -resíduos extraíveis (%) e ^{14}C -resíduos ligados (%) de ^{14}C -2,4-D nas amostras de solo de São Paulo (área tratada e área não tratada).

Além disso, os dados obtidos mostraram diferenças significativas na quantidade de ^{14}C -resíduos ligados formados após a aplicação dos diversos pesticidas, tanto no solo de Tatuí quanto nas amostras provenientes das duas subáreas do solo de São Paulo (Tab. 4 e Tab. 5). Tais diferenças podem ser decorrentes da influência da aplicação dos diversos pesticidas sobre o estímulo da atividade biomineralizadora.

Observou-se ainda em ambos solos, que principalmente após aplicação da deltametrina (C₆) e após aplicação da mistura deltametrina + paration metílico (C₇), houve menor formação de ¹⁴C-resíduos ligados (Fig. 11). Concomitantemente, houve rápida e grande produção de ¹⁴CO₂ após os mesmos tratamentos (Fig. 12). Apesar de não ter sido observada influência sobre a quantidade de ¹⁴C-resíduos extraíveis, a rápida atividade biomineralizadora determinou que houvesse menor quantidade de ¹⁴C-resíduos disponíveis para se tornarem ligados.

4.5. Análise Química do ¹⁴C-2,4-D por Métodos Cromatográficos

4.5.1. Curva de calibração de 2,4-D por CLAE

As condições cromatográficas estabelecidas apresentaram limite de detecção de 0,27 µg mL⁻¹ e limite de quantificação de 0,54 µg mL⁻¹. A curva de calibração obtida (Fig. 15) apresentou coeficiente de correlação (r) de 0,9983, indicando linearidade entre as diferentes concentrações analisadas.

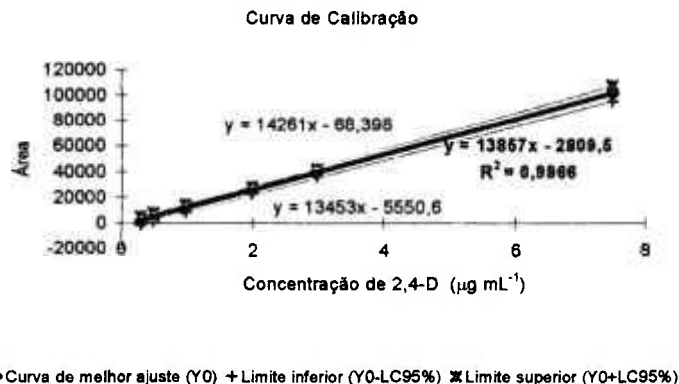


Figura 15 – Curva de calibração para análise quantitativa de 2,4-D por CLAE

4.5.2. Análise das amostras por CLAE

Cromatogramas de extrato de solo (Fig. 16) mostraram que o tempo de retenção típico do 2,4-D foi aproximadamente de 8,3 minutos nas condições de estudo. O tempo de retenção apresentado foi ideal para a separação do 2,4-D dos interferentes do solo presentes nas amostras de extrato.

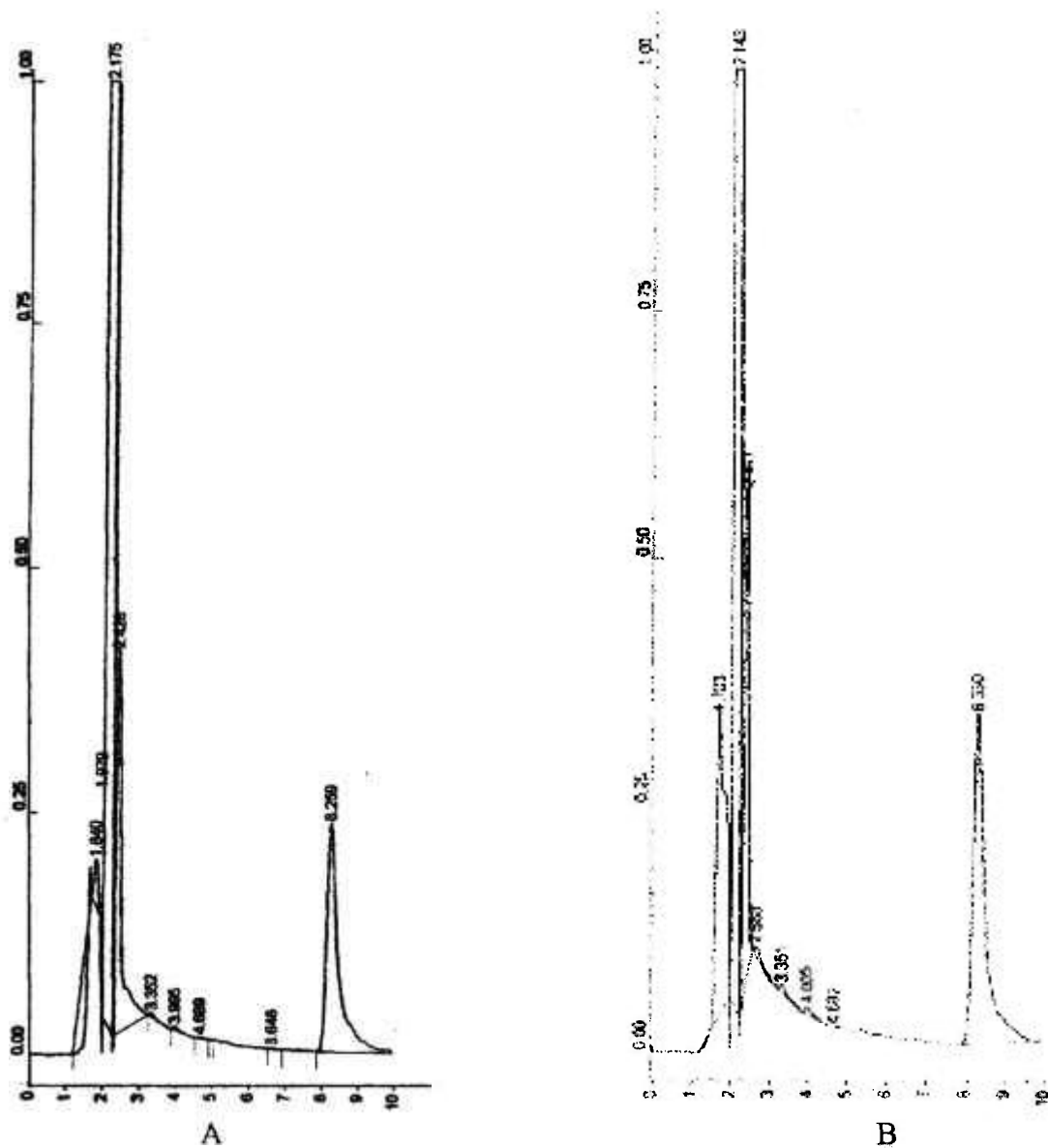


Figura 16 – Análise por CLAE de extratos dos solos de Tatui (A) e São Paulo (B) dopados com 2,4-D (Tempo de retenção do 2,4-D \cong 8,3 minutos)

Observou-se que ainda havia resíduos de ^{14}C -2,4-D presentes nas amostras de solo após o período de 6 semanas (Fig. 17). Estes resultados concordam com os dados apresentados por KIDD & JAMES (1991) que também encontraram resíduos de 2,4-D após 6 semanas. Contudo não foi possível detectar resíduos de 2,4-D na amostra proveniente da subárea de São Paulo sem tratamento em C₃ e nas amostras de Tatuí, tanto em C₃ quanto em C₄. Isto pode ter ocorrido porque a quantidade de resíduos de 2,4-D presentes nas amostras de solo estava abaixo do limite de detecção e quantificação ou por metabolismo intenso da microbiota edáfica presente em C₃ (período entre as safras de 1996/1997) e C₄ (após o tratamento com a mistura de deltametrina + paration metílico).

A Fig. 17 mostra o grau de contaminação das amostras de solo sob diferentes tratamentos. Como não se observou $p \leq 0,05$ em nenhuma coleta das diferentes amostras de solo, não houve diferenças significativas nas quantidades de 2,4-D extraídos após os diferentes tratamentos, exceto em C₃ (período entre safras 1996/1997) nas amostras do solo de São Paulo. Isto indica que as aplicações anteriores de outros pesticidas podem ter influenciado na recuperação de resíduos de 2,4-D só em C₃.

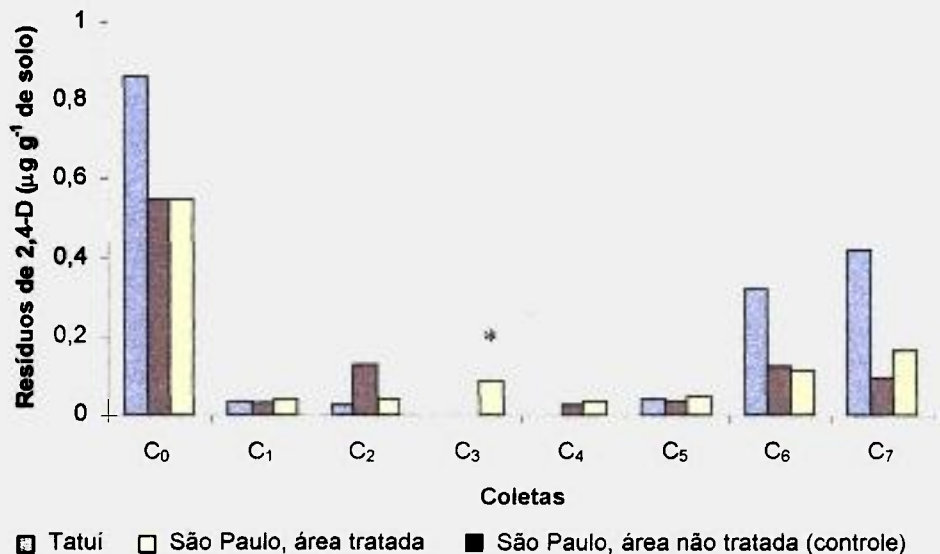


Figura 17 – Resíduos de 2,4-D detectados por CLAE em solos tratados com outros pesticidas ($\mu\text{g g}^{-1}$ de solo; * amostras com valor de $p < 0,05$).

4.5.3. Análise das amostras por CCD

Através da cromatografia em camada delgada, os resíduos extraíveis de ^{14}C -2,4-D foram separados de seu ^{14}C -metabólito, e identificados por meio de comparação do R_f do 2,4-D padrão co-cromatografado, sob luz ultravioleta.

Além disso, a radiovarredura nas cromatoplas detectou radioatividade na faixa de 0,31 a 0,37, correspondente ao R_f padrão de 2,4-D ($R_f = 0,35$), e também na faixa de R_f de 0,74 a 0,77, indicando a presença de um ^{14}C -metabólito nas amostras de extrato dos diferentes solos (Fig. 18 e Fig. 19).

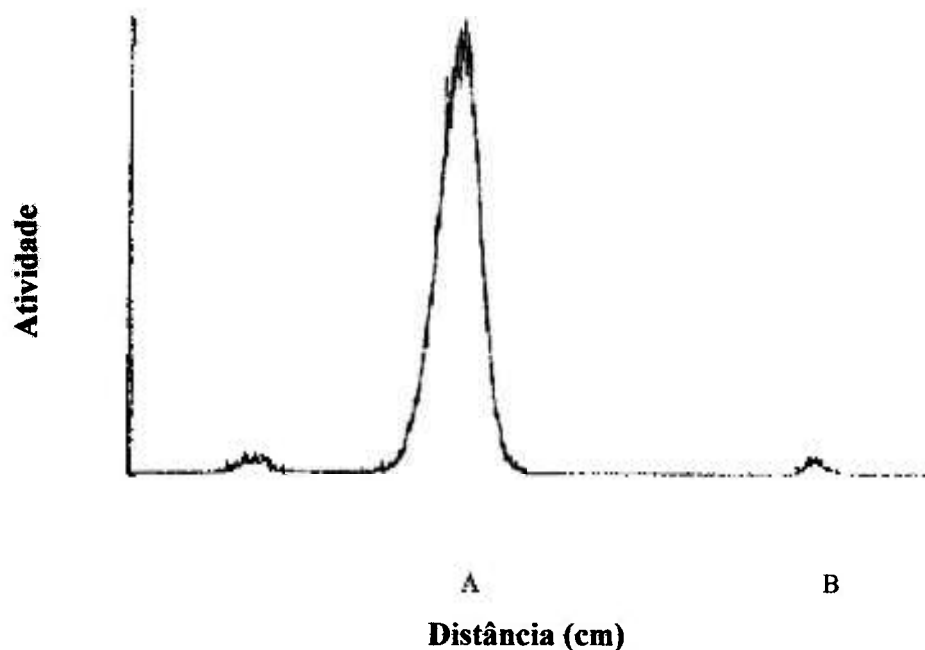


Figura 18 – Radiovarredura de cromatograma de extrato do solo de Tatuí. (Condições de análise: tempo de integração – 1 segundo; sensibilidade – 30 K; velocidade – 300 mm h⁻¹; A = ^{14}C -2,4-D; B = ^{14}C -metabólito).

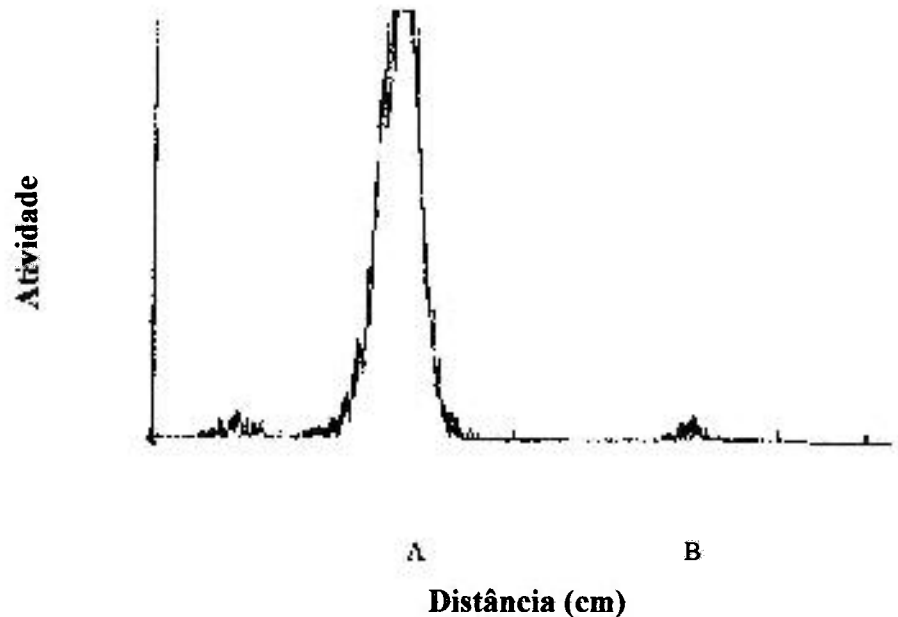


Figura 19 – Radiovarredura de cromatograma de extrato do solo de São Paulo. (Condições de análise: tempo de integração – 1 segundo; sensibilidade – 30 K; velocidade – 300 mm h⁻¹; A = ¹⁴C-2,4-D; B = ¹⁴C-metabólito).

A quantidade de radiocarbono detectado e identificado como ¹⁴C-2,4-D nas amostras do solo de Tatuí diferiram significativamente após aplicação de carbaril (C₂), pois observou-se somente 69,4% do radiocarbono como ¹⁴C-2,4-D, enquanto em sua amostra controle detectou-se 91,4% (Tab. 6). O tratamento com a mistura de deltametrina + paration metílico (C₄) também apresentou influência sobre a quantidade de resíduos extraíveis de ¹⁴C-2,4-D, pois observou-se que após este tratamento a quantidade de radiocarbono recuperado como ¹⁴C-2,4-D era de 52,7% e em sua amostra controle era de 32,8% (Tab. 6). Nos demais tratamentos não houve diferença significativa entre a porcentagem de resíduos de ¹⁴C-2,4-D detectados após tratamentos com diferentes pesticidas.

Já as quantidades de resíduos extraíveis identificados como ¹⁴C-2,4-D nas amostras do solo de São Paulo não apresentaram diferenças significativas entre a subárea tratada e a área controle (Tab. 7). Isto é, a aplicação de pesticidas não influenciou na quantidade de resíduos de ¹⁴C-2,4-D neste tipo de solo.

Tabela 6 – Resíduos de ^{14}C -2,4-D e ^{14}C -metabólito detectados por CCD de amostras de extratos do solo de Tatuí (% em relação à radioatividade detectada na cromatoplaca).

Tratamento	^{14}C -2,4-D		^{14}C -metabólito	
Antes da aplicação de pesticidas (C ₀ – Controle)	91,4 ± 0,8		3,8 ± 0,6*	
Monocrotofós (C ₁)	78,5 ± 15,5		-	
Carbaril (C ₂)	64,9 ± 4,4*		-	
Entre-plantios (C ₃ – Controle)	32,8 ± 5,8		-	
Deltametrina + paration metílico (C ₄)	52,7 ± 10,1*		9,5 ± 1,2*	
Entre-plantios (C ₅ – Controle)	60,5 ± 8,9		6,4 ± 0,3	
Deltametrina (C ₆)	80,2 ± 7,7		4,4 ± 2,1	
Deltametrina + paration metílico (C ₇)	91,0 ± 1,9		5,3 ± 0,6	
* amostras com valor de p < 0,05		-- não detectado		

Tabela 7 – Resíduos de ^{14}C -2,4-D e ^{14}C -metabólito detectados por CCD de amostras de extratos do solo (área não tratada e área tratada) de São Paulo (% em relação à radioatividade detectada na cromatoplaca).

Tratamento	^{14}C -2,4-D		^{14}C -metabólito	
	ANT ^a	AT ^b	ANT ^a	AT ^b
Antes da aplicação de pesticidas (C ₀)	89,6 ± 1,9	89,6 ± 1,9	3,7 ± 0,03	3,7 ± 0,03
Monocrotofós (C ₁)	51,5 ± 8,7	51,5 ± 5,9	-	-
Carbaril (C ₂)	68,4 ± 5,6	54,1 ± 6,2	-	11,2 ± 1,3*
Entre-plantios (C ₃)	40,5 ± 5,6	36,1 ± 15,8	33,7 ± 0,7*	-
Deltametrina + paration metílico (C ₄)	68,1 ± 5,2	59,7 ± 7,0	-	6,9 ± 0,2*
Entre-plantios (C ₅)	75,4 ± 22,0	68,4 ± 4,9	9,4 ± 1,0	2,9 ± 1,1*
Deltametrina (C ₆)	66,1 ± 2,3	64,2 ± 5,2	-	3,1 ± 0,2*
Deltametrina + paration metílico (C ₇)	78,4 ± 5,6	67,1 ± 7,2	1,9 ± 0,9*	-
a – ANT = Área não tratada (controle)		b – AT – Área Tratada		
* amostras com valor de p < 0,05		-- não detectado		

Observou-se influência da aplicação de pesticidas também sobre a formação do ^{14}C -metabólito nas amostras de solo de Tatuí. Após os tratamentos com monocrotofós (C_1) e com carbaril (C_2) não detectou-se o ^{14}C -metabólito, mas sua amostra controle apresentou 3,8% como o ^{14}C -metabólito (Tab. 6). Entretanto, depois do tratamento com a mistura de deltametrina + paration metílico (C_4) detectou-se o ^{14}C -metabólito somente nas amostras tratadas e não no respectivo controle (Tab. 6). Isto indica que a aplicação de pesticidas pode inibir ou estimular o metabolismo responsável pela degradação parcial do 2,4-D.

Nas amostras do solo de São Paulo verificou-se a presença do ^{14}C -metabólito tanto na área tratada quanto na área não tratada (Tab. 7). Entretanto, observou-se que os tratamentos com carbaril (C_2), mistura de deltametrina + paration metílico (C_4) e somente com deltametrina (C_6) estimularam a produção do ^{14}C -metabólito, pois além da área tratada apresentar maior quantidade deste ^{14}C -resíduo do que a área não tratada, as diferenças apresentaram $p < 0,05$ (Tab. 7). Já nos dois períodos entre safras (C_3 e C_5) observou-se menor quantidade do metabólito na área tratada (0,0% e 2,9%, respectivamente) do que na área controle (33,7% e 9,4%, respectivamente). Isto pode ter sido consequência de todos os tratamentos anteriores sobre o metabolismo responsável pela degradação parcial do 2,4-D.

Os resultados obtidos mostram que a aplicação dos diferentes pesticidas utilizados na cotonicultura também pode influenciar a quantidade de resíduos extraíveis de 2,4-D e na sua degradação parcial, já que um ^{14}C -metabólito de 2,4-D foi detectado após os diferentes tratamentos.

5. CONCLUSÕES

1. A dissipação do 2,4-D variou conforme o tipo de solo e foi influenciada tanto pelos tratamentos com outros pesticidas, como pelos fatores ambientais.
2. A mineralização do ^{14}C -2,4-D variou conforme o tipo de solo, sendo que de forma geral, as amostras do solo de São Paulo apresentaram maior formação de $^{14}\text{CO}_2$ do que as do solo de Tatuí, por causa do conteúdo de matéria orgânica. Também verificou-se influência de aplicações de diferentes pesticidas na mineralização do ^{14}C -2,4-D nos dois tipos de solos e, por isso pode-se afirmar que este tipo de estudo serve como parâmetro de bioatividade do solo.
3. Não houve influência da aplicação de pesticidas na formação de ^{14}C -compostos voláteis em ambos tipos de solo e independentemente do tratamento com outros pesticidas, pois nenhum ^{14}C -composto volátil foi detectado.
4. Independentemente do tipo de solo ou de tratamento, a maior quantidade do radiocarbono aplicado como ^{14}C -2,4-D foi recuperada como ^{14}C -resíduos ligados. Mas o tipo de solo influenciou esta formação porque ela predominou sempre no solo de São Paulo que é mais rico em matéria orgânica, independentemente do tratamento com outros pesticidas.
5. Os ^{14}C -resíduos extraíveis apresentaram correlação negativa com os ^{14}C -resíduos ligados formados em ambos tipos de solo e independentemente dos tratamentos. Isto é, quanto maior foi a quantidade de ^{14}C -resíduos extraíveis detectados menor foi a formação de ^{14}C -resíduos ligados.

6. A aplicação dos outros pesticidas influenciou na extractabilidade do ^{14}C -2,4-D em ambos tipos de solo, pois após alguns tratamentos (carbaril e mistura de deltametrina + paration metílico) verificou-se menor recuperação do radiocarbono como ^{14}C -resíduos extraíveis nas amostras tratadas do que nas amostras controle.
7. A aplicação de outros pesticidas influenciou não somente na quantidade de resíduos de 2,4-D extraíveis em todas as amostras de solo, mas também na quantidade de seu metabólito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRÉA, M.M. *Metabólitos tóxicos do dissulfoton: comportamento em feijoeiro, no solo e em solução nutriente*. Piracicaba: 1986. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- ANDRÉA, M.M. *Formação e bioliberação de resíduos ligados de [¹⁴C] Lindano e [¹⁴C] Paration em dois solos brasileiros*. São Paulo: 1992. Tese (Doutoramento) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo.
- ANDRÉA, M.M.; LUCHINI, L.C.; MELLO, M.H.S.H.; TOMITA, R.Y.; MESQUITA, T.B.; MUSUMECI, M.R. Dissipation and degradation of DDT, DDE and Parathion in Brazilian soils. *J. Environ. Sci. and Health*, v. B29, n. 1, p. 121-132, 1994.
- ANDRÉA, M.M. & TOMITA, R.Y. Volatilização de [¹⁴C]-DDT e [¹⁴C]-Paration do solo mantido a 45°C. **Resumos 7ª RAIB** - Reunião Anual do Instituto Biológico. Resumo 036, p. 18, São Paulo, SP. 1994.
- ANDRÉA, M.M.; MATALLO, M.B.; TOMITA, R.Y.; LUCHINI, L.C. Effect of temperature on dissipation of [¹⁴C]-Atrazine in a Brazilian soil. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 32, n. 1, p. 95-100, 1997.
- ANDREI, E. *Compêndio de defensivos agrícolas: guia prático de produtos fitossanitários para uso agrícola*. São Paulo: Andrei, 1985.
- ATLAS, R.M. & BARTHA, R. *Microbial Ecology: Fundamentals and applications*. Redwood City, California: The Benjamin/Cummings, 1993.
- BALINOVA, A. Solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatographic analysis for monitoring herbicides in drinking water. *J. Chromatogr.*, v. 643, p. 203-207, 1993.
- BARBERÁ, C. *Pesticidas agrícolas*. Barcelona, Espanha: Omega, 1976.
- BARRETO, R. Comunicação pessoal.

- BARRIUSO, E.; HOUOT, S. Rapid mineralization of the s-Triazine ring of Atrazine in soils in relation to soil management. *Soil Biol. Biochem.*, v. 28, p. 1341-1348, 1996.
- BARRIUSO, E.; HOUOT, S.; SERRA-WITTLING, C. Influence of compost addition to soil on the behaviour of herbicides. *Pestic. Sci.*, v. 49, p. 65-75, 1997.
- BARTHA, R. Pesticide residues in humus. *A.S.M. News*, v. 46, n. 7, p. 356-360, 1980.
- BARTHA, R.; LANZILOTTA, R.P.; PRAMER, D. Stability and effects of some pesticide in soil. *Appl. Microbio.*, v. 15, p. 434-444, 1976.
- BASKARAN, S.; BOLAN, N.S.; RAHMAN, A.; TILLMAN, R.W. Non-equilibrium sorption during movement of pesticides in soils. *Pestic. Sci.*, v. 46, p. 333-343, 1996.
- BEELEN, P.; DOELMAN, P. Significance and application of microbial toxicity tests in assessing ecotoxicological risks of contaminants in soil and sediment. *Chemosphere*, v. 34, n. 3, p. 455-499, 1997.
- BENOIT, P.; BARRIUSO, E.; HOUOT, S.; CALVET, R. Influence of the nature of soil organic matter on the sorption-desorption of 4-Chlorophenol, 2,4-Dichlorophenol and the herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). *Euro. J. Soil Sci.*, v. 47, p. 567-578, 1996.
- BENOIT, P.; BARRIUSO, E.; SOULAS, G. Degradation of 2,4-D, 2,4-Dichlorophenol, and 4-Chlorophenol in soil after sorption on humified and nonhumified organic matter. *J. Environ. Quality*, v. 28, p. 1127-1135, 1999.
- BOLAN, N.S.; BASKARAN, S. Biodegradation of 2,4-D herbicide as affected by its adsorption-desorption behaviour and microbial activity of soils. *Aust. J. Soil Res.*, v. 34, p. 1041-1053, 1996.
- CHEAH, U.B.; KIRKWOOD, R.C.; LUM, K.Y. Adsorption, desorption and mobility of four commonly used pesticides in Malaysian agricultural soils. *Pestic. Sci.*, v. 50, p. 53-63, 1997.
- COATS, J.R. What happens to degradable pesticides? *Chemtech*. 1993.

- CREMLYN, R. *Pesticides: preparation and mode of action*. Chichester, New York: John Wiley & Sons, 1978.
- FERRAZ, E.S.B. Aplicações da energia nuclear para o desenvolvimento da agricultura brasileira. Piracicaba, São Paulo: CENA/USP/CNEN. 1972
- FOURNIER, J.C.; MASSENOT, D.; DROGOUT, C. Effect of various pesticides of the degradation of 2,4-D, Isoproturon and Propamocarb. Importance of some experimental conditions. *Proceedings EWRs Symp. Theory and Practice of the Use of Soil Applied Herbicides*. 1981. p. 103-110.
- FÜHR, F. Radiotracers in pesticides studies – Advantages and limitation. *Ci. e Cult.* v. 43, p. 211-216, 1991.
- GRAY, T.R.G.; JONES, J.G.; WRIGHT, S.J.L. Microbial aspects of soil, plant, aquatic, air, and environments. In: HILL, I.R.; WRIGHT, S.J.L. *Pesticide microbiology: microbial aspects of pesticide behaviour in the environment*. London: Academic, 1978.
- GREEN, R.E. Pesticide – clay – water interactions. In: GUENZI, W.D. *Pesticide in soil and water*. Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America, 1974.
- GUENZI, W.D. *Pesticide in Soil and Water*. Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America, 1974. p. 1-2.
- HANCE, R.J. Effect of pH on degradation of atrazine, dichlorprop, linuron and propyzamide in soil. *Pestic. Sci.*, v. 10, p. 83-86, 1979.
- HAQUE, R.; FREED, V.H. *Environmental Dynamics of Pesticides*. New York: Plenum, 1975.
- HARTLEY, G.S.; GRAHAM-BRYCE, I.J. *Physical principles of pesticide behaviour: the dynamics of applied pesticides in local environment in relation to biological response*. London: Academic, 1980. V. 1.
- HASSAL, K.A. *The Chemistry of Pesticides: their metabolism, mode of action and uses in crop protection*. London: The Macmillan, 1982.

- KEARNEY, P.C.; HELLING, C.S. Reactions of pesticides in soil. *Residue Reviews*, v. 25, n. 25, p. 25-42, 1969.
- KHAN, S.U.; BEHKI, R.M. Effects of *Pseudomonas* species on the release of bound ^{14}C -residues from soil treated with [^{14}C] Atrazine. *J. Agric. Food Chem.*, v. 38, n. 11, p. 2090-2093, 1990.
- KIDD, H.; JAMES, D.R. (Ed.) *The Agrochemicals Handbook*. Cambridge: The Royal Soc. of Chemistry, 1991.
- KLEIN, W.; SCHEUNERT, I. Biotransformation Process. Appraisal of tests to predict the environmental behaviour of chemicals. In: SHEEHAN, P.; KORTE, F.; KLEIN, W.; BOUDEAU, P. (Ed.). New York: John Wiley & Sons, 1985. p. 195-211.
- L'ANNUNZIATA, M.F. *Radiotracers in Agricultural Chemistry*. London: Academic, 1979.
- LAVORENTI, A. Comportamento de herbicidas no meio ambiente. *Anais –Workshop de biodegradação*. Embrapa. Campinas, 14-16 de outubro de 1996.
- LOPEZ-AVILA, V.; HIRATA, P.; KRASKA, S.; TAYLOR, J.H. Determination of Dicamba and 2,4-D in water and soil by isotope dilution GC/MS. *J. Agric. Food Chem.*, v. 34, n. 3, p. 530-535, 1986.
- LUCHINI, L.C. *Adsorção-dessorção dos herbicidas paraquat, diuron e 2,4-D em seis solos brasileiros*. Piracicaba: 1987. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.
- LUCHINI, L.C. *Degradação do inseticida paration etílico em diversas matrizes ambientais por meio da radiação ionizante gama (γ) do cobalto-60*. São Carlos: 1995. Tese (Doutoramento) – Departamento de Química e Física Nuclear, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- LYDY, M.J.; LOHNER, T.W.; FISHER, S.W. Influencing of pH, temperature and sediment type on the toxicity, accumulation and degradation of parathion in aquatic systems. *Aquatic Toxicology*, v. 17, p. 27-44, 1990.

- MACEDO, E.C. Utilização do método "Artisol" na avaliação da ecotoxicidade de defensivos agrícolas. *O Biológico*, v. 59, p. 97-99, 1997.
- MALAVOLTA, E. *Introdução aos estudos com radioisótopos em agricultura*. Curso Latino Americano de Radioisótopos na Agricultura. Centro Nacional de Energia Nuclear na Agricultura. Piracicaba, ESALQ, 1963.
- MATALLO, M.B. *Estudio comparado de la degradación y transporte de enantiómeros de plaguicidas en el medio ambiente*. Córdoba: 1997. Tese (Doutoramento) – Escuela Técnica Superior de Ingeniero Agrónomos y Montes. Departamento de Química Agrícola y Edafología, Universidad de Córdoba.
- MENZIE, C.M. *Metabolism of Pesticides*. Washington: Bureau of Sport Fisheries and Wildlife, 1969.
- MESQUITA, T.B.; RÜEGG, E.F. Influência de agentes tensoativos na detecção da radiação beta. *Ci. e Cult.*, v. 36, n. 3, p. 446-450, 1984.
- MESSIAS, R.A. *Estudos de adsorção/dessorção e biodegradação de simazina e 2,4-D incorporados em turfa e poliuretana*. São Carlos: 1998. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- MEYER, P.C.; ZÜND, R.E. *Statistical Methods in Analytical Chemistry*. New York, N.Y.: John Wiley & Sons, 1993.
- MIWA, N.; KUWATSUKA, S. Characteristics of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D)-degrading microorganisms isolated from different soils. *Soil Sci. Plant Nutr.*, v. 37, n. 4, p. 575-581, 1991.
- MOILANEN, K.W.; CROSBY, D.G.; SODERQUIST, C.J.; WONG, A.S. Dynamic aspects of pesticide photodecomposition. In: HAQUE, R.; FREED, V.H. *Environmental dynamics of pesticides*. New York: Plenum, 1974. p. 135-167.
- MONTEIRO, R.T.R. Degradação de pesticidas. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) *Microbiologia ambiental*. Jaguariúna-Brasil: EMBRAPA-CNPMA, 1997. p. 107-124.

- MUSUMECI, M.R. Defensivos agrícolas e sua interação com a microbiota do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. *Microbiologia do solo*. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 341-360.
- NAKAGAWA, L.E. *Comportamento do herbicida atrazina em solo, formação e liberação de resíduos ligados*. São Paulo: 1997. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Ecologia Geral do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- NAKAGAWA, L. E.; LUCHINI, L. C.; MUSUMECI, M. R.; ANDRÉA, M. M. Comportamento de atrazina em solos brasileiros em condições de laboratório. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 30, n. 4, p. 471-476, 1995.
- OH, K.H. & TUOVINEN, O.H. Microbial treatment of fertilizer solid waste material containing phenoxyalkanoic herbicides 2,4-D and MCPP. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, v. 61, p. 299-305, 1994.
- OU, L.T. 2,4-D degradation and 2,4-D degrading microorganisms in soils. *Soil Science*, v. 137, p. 100-107, 1984.
- PAREKH, N.R.; HARTMANN, A.; CHARNAY, M.P.; FOURNIER, J.C. Diversity of carbofuran-degrading soil bacteria and detection of plasmid-encoded sequences homologous to the mde gene. *FEMS Microbiology Ecology*, p. 149-153, 1995.
- PAUL, E.A. & CLARK, F.E. *Soil Microbiology and Biochemistry*. San Diego, California: Academic Press, 1989.
- PERES, T.B. *Efeito da aplicação de pesticidas na atividade microbiológica do solo e na dissipação do ¹⁴C-paration metílico*. São Paulo: 2000. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo.
- PIMENTEL, D.; ANDOW, D. Pest management and pesticide impacts. *Insect Science Applic.*, v. 5. n. 3, p. 141-149, 1984.
- PRAMER, D.; BARTHA, R. How pesticides affect the soil. *The Ecologist*, v. 10, n. 3, p. 83-86, 1980.

- REINHARDT, C.F.; EHLERS, J.G.; NEL, P.C. Persistence of atrazine as affected by selected soil properties. *S. Afr. J. Plant Soil*, v. 7, n. 3, p. 182-187, 1990.
- ROBERTS, T.R. Non-extractable pesticides residues in soil and plants. *Pure & Appl. Chem.*, v. 56, n. 7, p. 945-946, 1984.
- ROCHA, A.F.G.; MACIEL, O.S.; GVION, R. Traçadores Radioativos. In: ROCHA, A.F.G. *Medicina Nuclear*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1976. p.111 – 133.
- RÜEGG, E.F. Técnicas de radioisótopos para estudar os efeitos residuais de pesticidas em plantas alimentícias. *O Biológico*, Ano 41, n. 12, p. 341-345, 1975.
- SAMPAIO, D.P.A.; GUERRA, M.S. *Receituário agrônomo*. 2 ed. São Paulo: Globo, 1991. p 19-213.
- SCOTT, D.C.; WEBER, J.B. Herbicide phytotoxicity as influenced by adsorption. *Soil Science*, v. 104, p. 151-158, 1967.
- SEMA – Secretaria Especial do Meio Ambiente. Teste E.1. Teste de biomineralização. Ministério da Habitação, Urbanismo e Meio Ambiente, IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente. 1988.
- SGRILLO, R.B.; WIENDL, F.M. Alguns efeitos da radiação gama em machos adultos da broca da cana-de-açúcar, *Diatraea saccharalis*. *Energ. Nucl. Agric.* v. 3, n. 1, p. 44-54. 1981.
- SMITH, A.E.; MUIR, D.C.G. Determination of extractable and nonextractable radioactivity from small field plots 45 and 95 weeks after treatment with [¹⁴C]dicamba, (2,4-dichloro[¹⁴C]phenoxy) acetic acid, [¹⁴C]trallate, and [¹⁴C]trifluralin. *J. Agric. Food Chem.*, v. 32, n. 3, p. 588-593, 1984.
- VEEH, R.H.; INSKEEP, W.P.; CAMPER, A.K. Soil depth and temperature effects on microbial degradation of 2,4-D. *J. Environ. Quality*, v. 25, p. 5-12, 1996.
- VIEIRA, E.M. *Estudo da adsorção/dessorção do herbicida 2,4-D no solo e nas substâncias húmicas*. São Carlos: 1996. Tese (Doutoramento) – Departamento de Química e Física Nuclear, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

- VOOS, G.; GROFFMAN, P.M. Relationships between microbial biomass and dissipation of 2,4-D and dicamba in soil. *Biol. Fertil. Soils*, v. 24. p. 106-110, 1997.
- WALKER, A. Factors influencing the variability in pesticide persistence in soils. *Aspects Appl. Biology*, v. 21, p. 159-172, 1989.
- WALKER, A.; WELCH, S.J. The relative movement and persistence in soil of chlorsulfuron, metsulfuron-methyl and trisulfuron. *Weed Res.*, v. 29, p. 375-383, 1989.
- WALTON, B.T.; ANDERSON, T.A. Structural properties of organic chemicals as predictors of biodegradation and microbial toxicity in soils. *Chemosphere*, v. 17, n. 8, p. 1501-1507, 1988.
- WEBER, J.B. Properties and behaviour pesticides in soil. In: HONEYCUTT, R.C.; SCHABACKER, D.J. *Mechanisms of pesticide movement into ground water*. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1994. p. 15-17.
- WEBER, J.B.; WEED, S.B. Effects of soil on the biological activity of pesticides. In: GUENZI, W.D. *Pesticide in soil and water*. Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America, 1974. p. 223-256.
- WEED, S.B.; WEBER, J.B. Pesticide – organic matter interactions. In: GUENZI, W.D. *Pesticide in soil and water*. Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America, 1974. p. 39-66.
- WIENDL, F.M. A desinfestação de grãos e produtos armazenados por meio de radiações ionizantes. *Energ. Nucl. Agric.* 1975.
- WORTHING, C.R.; HANCE, R.J. *The pesticide manual*. 9 ed. Great Britain: The British Crop Protection Council, 1991. p. 218-219.
- ZEEUW, D.D. Use of nuclear energy to preserve man's food. *International Atomic Energy Agency Bulletin*. Vienna: International Energy Agency, v. 18, p 7-12, 1976.