



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

EFEITO DA APLICAÇÃO DE PESTICIDAS NA ATIVIDADE
MICROBIOLÓGICA DO SOLO E NA DISSIPAÇÃO
DO ¹⁴C-PARATION METÁLICO

TEREZINHA BONANHO PERES

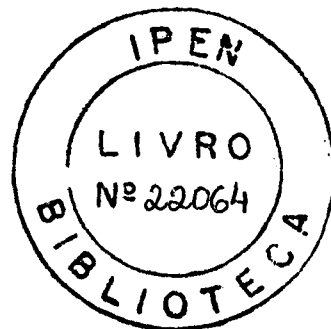
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Mestre em Ciências na Área de Tecnologia
Nuclear - Aplicações.

Orientadora:
Dra. Mara Mercedes de Andréa

São Paulo
2000

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES
Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**EFEITO DA APLICAÇÃO DE PESTICIDAS NA ATIVIDADE
MICROBIOLÓGICA DO SOLO E NA DISSIPAÇÃO DO ¹⁴C-PARATION
METÍLICO**



TEREZINHA BONANHO PERES

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

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

SÃO PAULO

2000

Dedico esta dissertação à minha mãe Ana Tereza,
aos meus filhos Wagner e Simone
e ao meu neto Luiz Arthur,
pelo apoio e carinho.

À colega e amiga
Mara Marchetti
pelo constante apoio, incentivo e discussão
durante todas as fases deste trabalho:
meu agradecimento especial.

AGRADECIMENTOS

A Dra. Mara Mercedes de Andréa pelo incentivo, amizade e orientação deste trabalho.

Ao Dr. Luiz Carlos Luchini pelo incentivo, amizade e pelas sugestões nas análises cromatográficas utilizadas neste trabalho.

Ao Dr. Marcus Barifouse Matallo pelo apoio no estabelecimento das condições de operação do cromatógrafo líquido de alta eficiência.

Ao Marcílio Amaral Marcondes pela amizade e colaboração em várias etapas da realização deste trabalho.

A Solange Pappini pelas sugestões, apoio e amizade.

Ao João Batista da Silva Netto pelo apoio e dedicação durante o experimento de campo.

As colegas e amigas Joana D'Arc Felício de Souza e Edlayne Gonzalez pelo apoio e incentivo.

Aos estagiários Ricardo Gava, Evânia Barbosa de Azevedo, Cecília Yoko Habiro e Manuela Castelli Fernandez pela amizade e colaboração.

Ao Instituto Biológico pela oportunidade concedida para a realização da dissertação de mestrado.

Ao IPEN pelos conhecimentos adquiridos que contribuíram para o meu crescimento profissional.

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

A todos que de modo direto ou indireto contribuíram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1 – INTRODUÇÃO	1
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1 - História da origem dos pesticidas	4
2.2 - Impacto dos pesticidas sobre o ecossistema	6
2.3 - Atividade microbiológica	8
2.4 - Efeito da aplicação de pesticidas na atividade microbiana do solo	10
2.5 - Efeito de microrganismos na degradação de pesticidas	13
2.6 - Degradação do ¹⁴ C-paration metílico	14
2.7 - Técnicas nucleares no estudo de pesticidas no meio ambiente	15
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 – PESTICIDAS	17
3.1.1 - Tratamento do solo com pesticidas formulados	17
3.1.2 - Pesticidas radiomarcados	19
3.1.2.1 – Soluções estoque de pesticidas radiomarcados	19
3.1.3 - Soluções estoque de pesticidas grau técnico	22
3.1.4 - Soluções de trabalho	22
3.1.4.1 - Soluções para elaboração de curvas-padrão	22
3.1.4.2 - Soluções para estudo de recuperação dos métodos de extração e de <i>clean up</i>	23
3.1.4.3 - Solução e tratamento do solo para o estudo de dissipação do ¹⁴ C-paration metílico	23
3.2 – SOLO	24
3.2.1 - Coleta de solo para estudo do efeito das diferentes aplicações na atividade microbiológica	24
3.2.2 - Coleta de solo para o estudo da dissipação do ¹⁴ C-paration metílico	24

3.2.3 – Determinação do teor de umidade do solo	25
3.3 – ANÁLISE DE MULTI-RESÍDUOS	25
3.3.1 - Recuperação dos métodos de extração	25
3.3.2 - Recuperação do método de <i>clean up</i>	27
3.3.3 - Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	27
3.3.3.1 - Condições de análise do monocrotofós	28
3.3.3.2 - Condições de análise da deltametrina	28
3.3.3.3 - Condições de análise do carbaril	28
3.3.4 - Análise por cromatografia gás-líquido (CG)	29
3.4 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA DO SOLO	29
3.4.1 - Atividade da enzima desidrogenase	29
3.4.2 - Atividade da enzima arilsulfatase	30
3.4.3 - Atividade da enzima arginina deaminase	31
3.5 - DISPONIBILIDADE DO NITROGÊNIO NO SOLO	32
3.5.1 – Determinação de nitrogênio por digestão e destilação	32
3.6 - ESTUDO DA DISSIPAÇÃO DO ¹⁴ C-PARATION METÍLICO	34
3.6.1 - Detecção de resíduos extraíveis, ligados e lixiviação	34
3.6.2 - Quantificação do radiocarbono por contagem de cintilação em líquido	35
	36
4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1 - RESÍDUOS DE PESTICIDAS NO SOLO TRATADO COM VÁRIOS PESTICIDAS	39
4.2 - ATIVIDADE MICROBIANA	46
4.3 - DISPONIBILIDADE DE NITROGÊNIO NO SOLO	55
4.4 - DISSIPAÇÃO DO ¹⁴ C-PARATION METÍLICO	57
	62
5 - CONCLUSÕES	
	63
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	

LISTA DE FIGURAS

N° da Figura	Legenda	Página
01	Representação da área estudada.	18
02	Aplicações de pesticidas e coletas de amostras (C).	20
03	Esquema de recuperação dos métodos de extração e de <i>clean up</i> .	26
04	Esquema de extração e <i>clean up</i> das amostras de solo provenientes do campo de cultivo de algodão.	26
05	Diagrama esquemático das metodologias de determinação de diferentes atividades enzimáticas do solo.	32
06	Diagrama esquemático da determinação do nitrogênio do solo.	33
07	Diagrama esquemático do estudo da dissipação do ¹⁴ C-paration metílico em solo.	35
08	Curva padrão de monocrotofós por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com limites de confiança de 95%.	41
09	Curva padrão de carbaril por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com limites de confiança de 95%.	41
10	Curva padrão de deltametrina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com limites de confiança de 95%.	41
11	Curva padrão do endosulfan I por cromatografia gás-líquido (CG) com limites de confiança de 95%.	42
12	Curva padrão do endosulfan II por cromatografia gás-líquido (CG) com limites de confiança de 95%.	42
13	Curva padrão do endosulfan sulfato por cromatografia gás-líquido (CG) com limites de confiança de 95%.	42
14	Curva padrão da trifluralina por cromatografia gás-líquido (CG) com limites de confiança de 95%.	43
15	Curva padrão do dimetoato por cromatografia gás-líquido (CG) com limites de confiança de 95%.	43
16	Curva padrão do paration metílico por cromatografia gás-líquido (CG) com limites de confiança de 95%.	43

17	Curva padrão de formazan em diferentes concentrações para quantificação da atividade da enzima desidrogenase por espectrofotometria (485 nm).	47
18	Curva padrão de p-nitrofenol em diferentes concentrações para quantificação da atividade da enzima arilsulfatase por espectrofotometria (420 nm).	47
19	Curva padrão de cloreto de amônio em diferentes concentrações para quantificação da atividade da enzima arginina deaminase por espectrofotometria (630 nm).	47
20	Atividade da desidrogenase em amostras de solo.	54
21	Atividade da arilsulfatase em amostras de solo.	54
22	Atividade da arginina deaminase em amostras de solo.	55
23	Conteúdo de nitrogênio presente no solo da subárea sem tratamento.	56
24	Conteúdo de nitrogênio presente no solo da subárea tratada com diferentes pesticidas.	57
25	Distribuição do radiocarbono proveniente de ^{14}C -paration metílico da subárea sem tratamento.	58
26	Distribuição do radiocarbono proveniente de ^{14}C -paration metílico da subárea tratada com vários pesticidas.	58
27	Meia-vida do ^{14}C -paration metílico em solo.	60

LISTA DE TABELAS

Nº da Tabela	Legenda	Página
01	Condições do solo nos momentos das coletas.	36
02	Características físicas e químicas do solo Gley Húmico sob plantio de algodão da subárea com aplicação.	37
03	Características físicas e químicas do solo Gley Húmico sob plantio de algodão da subárea sem tratamento.	38
04	Recuperação dos métodos de extração e <i>clean up</i> de extratos de solo tratado com ¹⁴ C-pesticidas.	40
05	Determinação quantitativa de resíduos de pesticidas em solo por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).	44
06	Determinação quantitativa de resíduos de pesticidas em solo por cromatografia gás-líquido (CG).	45
07	Atividade da enzima desidrogenase em solo do campo experimental do Instituto Biológico sob plantio de algodão (média ± desvio padrão).	49
08	Atividade da enzima arilsulfatase em solo do campo experimental do Instituto Biológico sob plantio de algodão (média ± desvio padrão).	50
09	Atividade da enzima arginina deaminase em solo do campo experimental do Instituto Biológico sob plantio de algodão (média ± desvio padrão).	52
10	Recuperação do radiocarbono aplicado como ¹⁴ C-paration metílico em solo sob condições de campo - subárea sem tratamento com outros pesticidas.	61
11	Recuperação do radiocarbono aplicado como ¹⁴ C-paration metílico em solo sob condições de campo - subárea com tratamento com diferentes pesticidas.	61

EFEITO DA APLICAÇÃO DE PESTICIDAS NA ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA DO SOLO E NA DISSIPAÇÃO DO ^{14}C -PARATION METÍLICO

Terezinha Bonanho Peres

RESUMO

Algumas culturas, como o algodão, necessitam de aplicações de diferentes pesticidas no combate de doenças e pragas. Estes compostos atingem o solo e podem afetar a atividade da microbiota ali presente. Como os microrganismos atuam sobre a ciclagem de nutrientes, mudanças em suas atividades podem afetar a fertilidade dos solos. Neste trabalho, estudou-se a influência de várias aplicações de pesticidas na atividade microbiológica de solo, das camadas de 0-15 cm e de 15-30 cm de profundidade do perfil. Estudou-se também a dissipação do inseticida ^{14}C -paration metílico sob influência dos outros pesticidas. O estudo da influência dos pesticidas sobre os microrganismos foi realizado em área do campo experimental do Instituto Biológico, que foi subdividida em duas subáreas, ambas sob plantio de algodão. Nestas subáreas foram enterrados tubos de PVC, e aplicou-se ^{14}C -paration metílico diluído no composto técnico sobre a superfície do solo contido nos tubos. Uma das subáreas recebeu todos os tratamentos com pesticidas recomendados para a cultura do algodão, além da solução de ^{14}C -paration metílico. A outra subárea recebeu apenas ^{14}C -paration metílico na superfície do solo dos tubos. A estimativa da atividade microbiológica do solo das duas subáreas foi realizada através de medidas da atividade das enzimas desidrogenase, arilsulfatase e arginina deaminase. Além disso, mediu-se também a disponibilidade de nitrogênio total do solo. A dissipação do ^{14}C -paration metílico foi estudada através de recuperação do radiocarbono por extração e combustão do solo extraído, e quantificação por técnicas radiométricas.

EFFECT OF PESTICIDE APPLICATIONS ON SOIL MICROBIAL ACTIVITY AND ON ¹⁴C-METHYL PARATHION DISSIPATION

Terezinha Bonanho Peres

ABSTRACT

Some crops, as cotton, need different pesticide applications to control pests and diseases. These compounds reach soil and may affect the soil microbial activity. As the microorganisms play important role on the nutrient cycling, changes in their activities may affect the soil fertility. The influence of several pesticides on soil microbial activity of the 0-15 cm and 15-30 cm depth of the soil profile, and the ¹⁴C-methyl parathion dissipation was studied under influence of other pesticide applications. The influence of pesticides on the microorganisms was followed in an experimental area of the Instituto Biológico, that was divided in two subareas, both under cotton crop. Columns of PVC were buried in both subareas and a solution of ¹⁴C-methyl parathion diluted in the technical compound was applied on the soil surface of each column. One subarea received all the recommended pesticides for the cotton crop besides the ¹⁴C-methyl parathion. The other subarea received only ¹⁴C-methyl parathion solution on the columns soil surface. The soil microbial activity of both subareas was estimated by measurements of dehydrogenase, arylsulfatase and arginine deaminase enzymes. Further, the availability of total nitrogen in the soil was also measured. The dissipation of ¹⁴C-methyl parathion was studied by radiocarbon recovery in soil extracts and combustion of extracted soil and quantification by radiometric techniques.

1. INTRODUÇÃO

Pesticidas são usados na agricultura para controle de pragas que afetam a produção agrícola. Seu uso tem aumentado muito nas últimas décadas, visando o aumento da produção de alimentos, através da redução de perdas provocadas por pragas e doenças.

Com as restrições ao uso de pesticidas organoclorados devido à observação de sua alta persistência no ambiente, o uso dos organofosforados começou a ser feito mais intensamente, embora a maioria dos organofosforados seja bastante tóxica agudamente (ANDRÉA *et al.*, 1980; VICINO, 1993).

Na agricultura, os pesticidas atingem o solo diretamente, pela incorporação na superfície para eliminação de ervas daninhas e pragas do próprio solo, e também através do tratamento de sementes. Podem ainda atingir o solo indiretamente, através da pulverização das partes aéreas das plantas e pela queda de frutos e folhas que receberam aplicações de pesticidas (KHAN, 1991).

Em contacto com o solo, estes compostos podem sofrer processos de transporte tais como lixiviação, volatilização, adsorção e escoamento superficial, podendo também sofrer processos de transformação como: degradação química, hidrólise, fotólise, hidroxilação, etc., e/ou degradação por microrganismos (LUCHINI, 1995). Assim, dependendo do tipo de transformação, estes pesticidas e/ou seus metabólitos podem ter diferentes destinos no ecossistema: sofrer mineralização total, permanecer por longo tempo no solo, atingir águas subterrâneas, ou ser bioacumulado através da cadeia alimentar.

Além disso, como os pesticidas são biologicamente ativos, sua persistência no solo pode ocasionar problemas em decorrência de interações com os ecossistemas naturais e seus componentes biológicos, podendo afetar a microbiota. Os microrganismos podem ter seu crescimento e metabolismo estimulados ou inibidos pela presença de resíduos de pesticidas. Conseqüentemente, podem ocorrer alterações na ciclagem de nitrogênio,

carbono e enxofre por exemplo, e portanto, a fertilidade do solo pode ser também alterada (SCHUSTER & SCHRÖDER, 1990).

Para avaliar alterações na atividade biológica dos solos, vários trabalhos realizados basearam-se na estimativa da atividade enzimática, além de algumas reações fisiológicas, como a redução do ferro III em condições anaeróbias (ZELLES *et al.*, 1986) e na determinação de nitrogênio liberado por ação microbiana no solo (TABATABAI & BREMNER, 1970; NANNIPIERI, 1984), que medem a atividade microbiana no solo no momento das coletas. Medidas da disponibilidade do nitrogênio do próprio solo, independentemente da ação enzimática, também são importantes para verificação do grau de disponibilidade do elemento para as plantas e podem ser determinadas para se acompanhar possíveis alterações no conteúdo de matéria orgânica do solo (CAMARGO *et al.*, 1986).

Embora a maioria dos trabalhos tenha estudado o efeito de parâmetros isolados após a aplicação de apenas um pesticida, para se ter uma visão mais realista do que ocorre na agricultura é necessário o conhecimento do efeito de diferentes substâncias ativas aplicadas, pois muitas culturas exigem tratamento intensivo com vários compostos, como ocorre no cultivo do algodão onde esta é uma prática comum (GRIDI-PAPP *et al.*, 1992).

A bioatividade do solo pode ser estimada através da atividade de enzimas. A desidrogenase, por exemplo, reflete a bioatividade geral de uma grande parte da comunidade microbiana (TREVORS, 1984). Como esta enzima está envolvida nos processos oxidativos das células microbianas, medidas de sua atividade indicam o metabolismo microbiano no solo. Outra enzima de solo é a arilsulfatase que catalisa a hidrólise de ésteres sulfatos, que compõem uma das formas orgânicas do enxofre que ocorre em alta concentração na superfície do solo. Acredita-se que esta enzima seja a responsável pela ciclagem do enxofre no solo (AL-KHAFAJI & TABATABAI, 1979) através dos processos de mineralização liberando sulfato, forma em que o enxofre é assimilado pelas plantas (KLOOSE *et al.*, 1999). A arginina deaminase é outra enzima importante pois participa de reações de amonificação, que é o processo que libera amônia de compostos nitrogenados presentes na matéria orgânica do solo. Este processo parece ser uma característica geral de microrganismos (ALEF & KLEINER, 1986).

A atividade biológica da microbiota não só é importante para a fertilidade dos solos, como também o é sobre a degradação de pesticidas, conforme foi demonstrado em vários trabalhos (FLASHINSKI & LICHTENSTEIN, 1974; KATAN & LICHTENSTEIN, 1977; MICK & DAHM, 1970; SIDARAMAPPA *et al.*, 1973).

Estudos do comportamento e da influência de pesticidas no ambiente requerem análises sensíveis e precisas, de tal forma que se possa detectar as mudanças na forma e na quantidade dos compostos no ambiente e nas condições em estudo. Assim, técnicas analíticas têm sido desenvolvidas com esta finalidade, mas a técnica utilizando pesticidas radiomarcados com carbono-14 tornou-se predominante e indispensável, pois facilita a detecção de quantidades muito pequenas de pesticidas em menor espaço de tempo de análise, além de permitir rastreamento do ^{14}C -pesticida em todos os segmentos do ambiente em estudo, por longo período de tempo (ANDRÉA, 1992).

Este trabalho avalia o efeito de repetidas aplicações de diferentes pesticidas usados para o controle de pragas na cultura do algodão, sobre a atividade microbiológica do solo, através de medidas da atividade das enzimas desidrogenase, arilsulfatase, arginina deaminase, e sobre o nitrogênio total no solo. Também verifica a influência das aplicações dos vários pesticidas na degradação do ^{14}C -paration metílico que é um dos compostos recomendados.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 História da origem dos pesticidas

A agricultura moderna utiliza grandes quantidades de insumos agrícolas visando o aumento da produtividade e a melhor qualidade dos produtos cultivados. Entre estes produtos, merecem destaque os pesticidas que são usados para o controle das pragas durante o plantio e armazenamento. Os pesticidas são xenobióticos e tóxicos, por isso sua introdução no ambiente deve ser observada em relação aos aspectos de poluição ambiental.

O controle de pragas na agricultura é muito antigo. Os primeiros relatos datam de 2.000 anos antes de Cristo, quando os sumérios usaram compostos sulfurados para controlar insetos e ácaros. No século XVII, a nicotina foi utilizada pela primeira vez como inseticida vegetal, e, no primeiro quarto do século XIX, estabeleceu-se o uso das piretrinas naturais como praguicidas em vegetais. Em 1886 descobriu-se o efeito inseticida do ácido cianídrico; em 1892, do arseniato de cobre e, em 1907, do arseniato de cálcio (GONZÁLEZ, 1996). A maioria dos primeiros pesticidas utilizados nas lavouras no início do século era constituída de sais inorgânicos, como sais à base de flúor, antimônio, bário, boro, cádmio, chumbo, mercúrio, arsênio e cobre, muito estáveis no meio ambiente, além de alguns produtos naturais extraídos de plantas, como a nicotina, piretrina, rotenona e outros (CREMLYN, 1978; PASCHOAL, 1979; COUTO, 1995). O primeiro inseticida sintético, o éter ditiocianodietílico, foi utilizado em 1929 (GONZÁLEZ, 1996).

Com a revolução industrial, principalmente, durante e após a II Guerra Mundial, o uso de produtos químicos no controle de pragas teve um grande avanço. A procura de agentes químicos para fins militares levou à síntese de inúmeros compostos organoclorados com propriedades biocidas (COUTO, 1995).

Em 1940, Paul Müller relatou propriedades inseticidas do DDT (diclorodifeniltricloroetano) sintetizado por Zeidler em 1874 (BROOKS, 1974) que

constituiu-se como o primeiro inseticida organoclorado. Iniciou-se assim, a época dos pesticidas orgânicos sintéticos. Em 1942 foram descobertas as propriedades do BHC (hexaclorociclohexano) sintetizado pelo químico inglês Michael Faraday em 1825 (ETO, 1976). Durante a II Guerra Mundial, Sanders na Inglaterra, e Schrader na Alemanha, estudaram a toxicidade dos compostos organofosforados. Em 1937, Schrader encontrou atividade inseticida em alguns compostos organofosforados (ETO, 1976; ADDOR, 1994) utilizados como arma militar. O seu uso como tal não chegou a ocorrer, porém, após a guerra, o composto passou a ser comercializado como inseticida agrícola (ZAMBRONE, 1986). Nesta época surgiram os herbicidas fenoxiácidos, muito mais eficientes do que os herbicidas derivados do ácido tricloracético, os mais antigos herbicidas. Estes novos herbicidas eram aplicados em concentrações variando entre 250 a 4.000 g ingrediente ativo (i.a)/ha e os derivados do ácido tricloroacético em concentrações de 55 a 255 kg ia/ha (BROWN & KEARNEY, 1991).

Em 1953 o primeiro inseticida carbâmico, o carbaril (N-metil α -naftilcarbamato) foi sintetizado e mostrou-se muito menos tóxico para mamíferos quando comparados com os organofosforados (LARINI, 1999).

Atualmente encontram-se no mercado pesticidas de diferentes grupos químicos tais como os organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides, com diferentes propriedades e formas de atuação. Os organoclorados e organofosforados atuam por contacto, ingestão e fumigação; geralmente são estáveis, tóxicos, lipossolúveis, acumulam-se na cadeia alimentar e são muito persistentes no ambiente. Embora os compostos organofosforados sejam geralmente muito tóxicos para o homem, degradam-se mais rapidamente no ambiente e não são bioacumulados. Os carbamatos assemelham-se aos fosforados quanto à sua degradação no ambiente. A forma de ação destes compostos é também por contacto e ingestão (PASCHOAL, 1979).

Em 1985 os compostos organoclorados tiveram seu uso restringido no Brasil, pela Portaria nº 329 do Ministério da Agricultura (GELMINI *et al.*, 1986) por persistirem no ambiente e por serem bioacumulados na cadeia alimentar (AIROLDI, 1997).

A utilização de pesticidas em todo território nacional tem crescido muito nos últimos anos, e o Estado de São Paulo ocupa o primeiro lugar no uso destes produtos. Suas

vendas cresceram de US\$ 830 milhões em 1986 para US\$ 1.790 milhões em 1996 (LARINI, 1999).

2.2 Impacto dos pesticidas sobre o ecossistema

O uso de pesticidas pode levar à contaminação do ambiente e alterar as condições ecológicas presentes. Por isso, buscam-se soluções para minimizar estes efeitos indesejáveis através da substituição de certos pesticidas por outros com menor capacidade de contaminação (MATALLO, 1997), além de se estudar seus efeitos no ambiente onde são aplicados, de forma a racionalizar o uso e minimizar os efeitos.

A aplicação de pesticidas nas culturas termina por atingir o solo diretamente através de pulverizações e fumigações, bem como indiretamente, pela queda de folhas e frutos tratados. Além disso, estes produtos podem ser lixiviados contaminando ambientes aquáticos (LUCHINI, 1995).

Do ponto de vista ambiental, o pesticida deveria eliminar os organismos-alvo sem atuar nos demais seres que se encontram no ambiente, e então ser degradado e dissipado do meio ambiente (HELTBOLD, 1974). Entretanto, nem sempre isto acontece. O período de ação efetiva de um pesticida e de sua permanência no solo estabelecem sua persistência no ambiente (ALEXANDER, 1977). A persistência de um produto químico no solo é parâmetro importante na avaliação da qualidade ambiental. Resíduos de pesticidas têm sido encontrados em regiões sem aplicações prévias ou recentes; SEIDEL & LINDNER (1995), por exemplo, encontraram resíduos de HCB, PCB, lindano e dieldrin entre outros, em solos austríacos à concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$. No Brasil, ZUIN (1997) detectou pentaclorofenol e hexaclorobenzeno em águas naturais de superfície de áreas contaminadas por resíduos de organoclorados.

A persistência do ^{14}C -DDT, ^{14}C -DDE e ^{14}C -paration foi estudada em condições brasileiras por ANDRÉA *et al.* (1994 a). Os autores encontraram meia-vida acima de 200 semanas para o ^{14}C -DDT, 88 semanas para o ^{14}C -DDE e 12 semanas para o ^{14}C -paration.

NAKAGAWA *et al.* (1996) estudaram a mobilidade e a degradação da ^{14}C -atrazina em colunas de dois tipos de solo. Detectaram resíduos de atrazina e produtos de degradação na água lixiviada dos dois solos estudados. Em experimento de lisímetros com rotação de cultura de milho-feijão, plantas de milho com 14 dias absorveram o herbicida nos dois tipos de solo.

Características químicas da molécula, forma e quantidade de aplicações, assim como as condições ambientais são fatores que influenciam a persistência de pesticidas no ambiente (RACKE, 1990). Outros fatores decorrentes dessas características, determinam diferentes comportamentos, como a adsorção aos colóides do solo (LUCHINI, 1987), volatilização e biodegradação (ANDRÉA & WIENDEL, 1995; RACKE & COATS, 1990), e são também fatores importantes no comportamento do pesticida no ambiente.

Os pesticidas persistentes são aqueles que, em geral, ou encontram-se adsorvidos à matéria orgânica do solo, e, dependendo de sua solubilidade em água, podem permanecer por longos períodos no solo, ou não podem ser metabolizados por microrganismos (PARR, 1974).

Além da estrutura química da molécula do pesticida, as propriedades físico-químicas do solo, o conteúdo de matéria orgânica, teor de argila e pH são fatores importantes que influenciam na dissipação dos pesticidas. Coincidentemente, são fatores que influenciam a microbiota e por isso a dissipação de muitos pesticidas é atribuída, principalmente, aos microrganismos do solo. Populações microbianas podem inclusive adaptar-se à presença de pesticida, quer por seleção de espécies ou mudanças em seu sistema enzimático, de forma que ocorra degradação mais rápida do composto (KEARNEY & KAUFMAN, 1976).

A preocupação mundial com a preservação do ambiente e com a qualidade do solo tem gerado muitos trabalhos com o objetivo de se obter informações sobre o uso de parâmetros biológicos que possam ser utilizados como indicadores da qualidade do solo, uma vez que as práticas agrícolas podem causar mudanças no ambiente edáfico. A qualidade do solo tem sido definida como a capacidade de um solo de maximizar a produção biológica do ecossistema e minimizar a degradação ambiental (KLOOSE *et al.*, 1999).

2.3 Atividade microbiológica

O solo é um sistema descontínuo e heterogêneo composto por um número inestimável de microhabitats, micro ambientes ou microcosmos, cada qual com uma comunidade microbiana variável em função das características químicas, físicas e biológicas prevalentes no decorrer do tempo (NANNIPIERI *et al.*, 1990).

Os microrganismos do solo e suas enzimas são importantes na degradação da matéria orgânica proveniente de plantas e animais, e na liberação de nutrientes e traços de elementos de origem mineral necessários para o desenvolvimento das plantas (NANNIPIERI *et al.*, 1990; SCHINNER *et al.*, 1996). Por isso, a manutenção da atividade biológica do solo é de extrema importância.

A prática agrícola exige conhecimentos sobre parâmetros que possam estimar a fertilidade e poluição do solo, o que vem estimulando os microbiologistas de solo a encontrarem critérios simples para a determinação e estimativa da atividade biológica do solo.

A atividade microbiológica do solo pode ser estimada através de algumas reações fisiológicas dos microrganismos tais como respiração, atividade de algumas enzimas, processos de nitrificação e outros. Estas medidas representam a taxa potencial máxima da atividade enzimática, devido às condições pré-estabelecidas de incubação do ensaio, tais como pH, temperatura e concentração do substrato (NANNIPIERI *et al.*, 1990).

As estimativas de atividades enzimáticas, juntamente com informações sobre outros processos metabólicos específicos, aumentam o conhecimento sobre o efeito de pesticidas, práticas agrícolas e fatores climáticos sobre a atividade microbiológica do solo (SKUJINS, 1978; ALEF & NANNIPIERI, 1995).

DICK & TABATABAI (1993) relataram que, já em 1950 viu-se que a atividade enzimática poderia ser utilizada como indicadora da fertilidade do solo e, SCHINNER *et al.* (1996) citam vários métodos para determinação de processos metabólicos de organismos vivos do solo, entre eles a determinação da atividade das enzimas

desidrogenase, arilsulfatase e arginina deaminase. ALEF & NANNIPIERI (1995) fazem uma revisão sobre a utilização da atividade enzimática em estudos microbiológicos do solo e sugerem que medidas da atividade enzimática do solo juntamente com outros parâmetros metabólicos podem fornecer informações sobre o efeito de agroquímicos na atividade microbiológica do solo.

Medidas da atividade da desidrogenase no solo e em outros sistemas biológicos têm sido usadas como estimativas da atividade microbiana total, pois ela é uma enzima intracelular relacionada com os processos de fosforilação oxidativa (TREVORS, 1984; BENITEZ *et al.*, 1999). Sua atividade é verificada principalmente na redução do cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a trifenil formazan (TPF). O TPF é um composto insolúvel em água e de coloração rósea em metanol, podendo assim, ser quantificado por espectrofotometria no comprimento de onda de 485 nm (CASIDA *et al.*, 1964; TREVORS, 1984). STEVENSON (1959) estudou a atividade da desidrogenase e encontrou correlação entre a formação de cloreto de trifenil formazan (TPF) e a respiração microbiana. ROSSEL *et al.* (1997) descreveram vários fatores que podem influenciar na atividade da desidrogenase tais como, estocagem da amostra, período e condições de incubação, efeito do oxigênio, pH, temperatura, adição de substratos orgânicos, etc. Além disso, fizeram uma revisão relacionando o impacto de produtos químicos na atividade da desidrogenase, pois a atividade desta enzima está correlacionada com a biomassa microbiana e, ocasionalmente, com o número de microrganismos.

Outras atividades enzimáticas também se baseiam em processos que liberam nutrientes da matéria orgânica para a solução do solo e para as plantas. Dentre esses nutrientes tem-se o enxofre, um elemento essencial para o crescimento e atividade de organismos. Mais de 90% do enxofre total presente na superfície do solo encontra-se na forma orgânica (GERMIDA *et al.*, 1992), como ésteres sulfatos. As enzimas sulfatases são as que catalisam a hidrólise desses ésteres, e acredita-se que sejam as responsáveis pela ciclagem do enxofre no solo através da liberação de sulfatos (SO_4^-), forma assimilável pelas plantas (AL-KHAFAJI & TABATABAI, 1979; SPEIR & ROSS, 1978; KLOOSE *et al.*, 1999). A oxidação do enxofre no solo é realizada predominantemente por microrganismos.

O nitrogênio é outro elemento importante para a nutrição de plantas. Embora

compostos nitrogenados, como nitrato e amônio possam ser usados como fonte de nitrogênio para as plantas, a assimilação do nitrogênio mineral a partir da atmosfera e posterior transformação em nitrogênio orgânico, ocorre somente quando este nitrogênio já está reduzido na forma de amônia (NH_3^+). As plantas não assimilam nitrogênio em alto estado de oxidação, como NO_2 , por exemplo. Ademais, quando o nitrato é absorvido por plantas superiores ou microrganismos, ele é primeiramente reduzido à forma de amônia, e esta redução é catalisada por um grupo de enzimas chamadas nitrato redutases (FERNANDES, 1978). Por outro lado, o nitrogênio orgânico deve ser mineralizado para nitrogênio inorgânico para que ocorra assimilação. Neste sentido, ABDELAL (1979) descreve as várias etapas da reação catalisada por microrganismos, onde o produto final do catabolismo do substrato arginina, mediado pela enzima arginina deaminase, é o amônio.

ALEF & KLEINER (1987a, b) enriqueceram amostras de solo com arginina e verificaram que a taxa de liberação de amônia foi linear por várias horas e reduzida pelo tratamento com tolueno, um biocida sobre microrganismos. Encontraram correlação significativa com o conteúdo de carbono, mas não encontraram correlação com pH, conteúdo de amônia, com a porcentagem de argila ou número de microrganismos. Além disso, verificaram que a amônia liberada a partir da arginina dependeu de microrganismos vivos, independentemente das condições aeróbias ou anaeróbias.

LIN & BROOKS (1999) detectaram produção de amônia e nitrato após tratamento do solo com solução de arginina. Os autores relacionaram a produção de amônio e nitrato com conteúdo de adenosina trifosfato (ATP), com as medidas de biomassa e liberação de CO_2 , através de respiração induzida; concluíram que a mineralização da arginina parece ser um método seguro e rápido para se estimar a biomassa microbiana.

2.4 Efeito da aplicação de pesticidas na atividade microbiana do solo

Os pesticidas podem ter efeitos diretos nos microrganismos do solo, nos quais podem não somente provocar a morte como também alterar suas taxas de crescimento e processos metabólicos, como mudanças na reprodução e no comportamento das espécies

(EDWARDS, 1978).

Ensaio de campo para se verificar o efeito de pesticidas no solo são, na prática, muito difíceis, especialmente porque existe grande diversidade biológica em locais muito próximos, o que ocasiona grande variação nos resultados. Vários ensaios indiretos têm sido realizados, tais como, determinação de pesticidas ao longo da cadeia alimentar, determinação de coeficiente de partição e modelos matemáticos de ecossistemas também podem ser utilizados, assim como as propriedades físico-químicas dos pesticidas podem representar recursos para prever sua distribuição física no ambiente. (MORIARTY, 1975).

Muitas pesquisas têm sido direcionadas para o conhecimento da complexidade das interações de pesticida-microrganismos do solo (TU, 1981; TU, 1995; TOPP *et al.*, 1997) e descrevem diferentes parâmetros para avaliar o efeito de pesticidas sobre os microrganismos.

A revisão de literatura de TOPP *et al.* (1997) demonstra que o efeito potencial de pesticidas pode ser estimado por diferentes parâmetros, tais como, biomassa microbiana, contagem da população de fungos e bactérias do solo, taxa de respiração, taxa de nitrificação, incorporação de substratos radiomarcados e atividade de enzimas do solo.

HUND *et al.* (1988) enfatizaram a necessidade de se estudar vários parâmetros para avaliação dos efeitos da aplicação de compostos sobre a microbiota do solo. Os autores estudaram seis parâmetros: a quantidade de trifosfato de adenosina (ATP), amonificação da arginina, redução do Ferro III e liberação de calor para avaliar a atividade microbiana de dois solos e detectar efeitos dos pesticidas ioximil (herbicida), tiram (fungicida) e cloreto de mercúrio (fungicida). Concluíram que um só parâmetro não é suficiente para se verificar os efeitos na microbiota do solo.

YENTUMI & JOHNSON (1986) estudaram o efeito de repetidas aplicações dos inseticidas carbofuran e carbosulfan; dos fungicidas iprodione, vinclozolin e MCPA e dos herbicidas simazina e paraquat na microbiota do solo. Com uma aplicação de carbofuran não detectaram qualquer efeito na biomassa microbiana, porém, encontram redução significativa na biomassa com uma aplicação de carbosulfan. Também encontraram grande

redução da biomassa após aplicação do fungicida vinclozolin e menor com o iprodione. Não detectaram efeito de aplicação única dos herbicidas simazina e paraquat sobre a microbiota do solo, mas encontraram diminuição significativa da biomassa com repetidas aplicações de paraquat.

As atividades das enzimas desidrogenase e urease foram avaliadas por TU (1981) em solo após tratamento com diferentes pesticidas. O autor verificou que as atividades das enzimas desidrogenase e urease foram afetadas pela aplicação dos diferentes pesticidas de maneira diferenciada, isto é, alguns pesticidas inibiram as enzimas e outros estimularam. O autor concluiu que os pesticidas afetaram a atividade microbiana do solo. O mesmo autor em 1995 (TU, 1995) estudou cinco pesticidas (amitraz, ciflutrin, imidacloropirid, tebupirinfós e aztec) e verificou que somente o ciflutrin e imidacloroprid inibiram a oxidação do enxofre.

SCHUSTER & SCHRÖDER (1990) encontraram diferentes respostas da microbiota do solo, baseados na biomassa microbiana, amonificação e nitrificação após aplicação de pesticidas em diferentes tipos de solo.

A atividade microbiana de solo sob plantio de algodão sob condições brasileiras foi avaliada por ANDRÉA *et al.* (2.000 a), através da atividade da enzima desidrogenase, pelo processo de oxi-redução do ferro e pela biomassa microbiana através do índice de respiração. Verificaram que o tratamento do solo com pesticidas produziu efeitos nítidos na atividade microbiológica do solo, mas estes efeitos foram transitórios. ANDRÉA *et al.* (2.000 b) avaliaram o efeito do herbicida haloxifop metil na atividade microbiológica de um solo durante 64 dias de incubação. Só detectaram efeito inibitório na atividade da desidrogenase até 14 dias e a partir daí, estímulo até os 64 dias. Concluíram que, como o haloxifop metil é rapidamente transformado para a forma ácida (haloxifop), o haloxifop metil provavelmente só afetou diretamente na respiração no primeiro dia, e então, a forma ácida produziu efeito estimulativo na respiração e efeito inibitório na desidrogenase.

2.5 Efeito de microrganismos na degradação de pesticidas

Se por um lado os microrganismos são afetados pela aplicação de pesticidas, eles também possuem diferentes habilidades para metabolizar esses pesticidas. Vários tipos de reações estão envolvidas no metabolismo de pesticidas por microrganismos, tais como oxidação, hidrólise, dealquilação, etc. (HILL, 1978). Os pesticidas podem servir como fontes de carbono, nitrogênio e energia, ou ser um substrato para co-metabolismo (FOURNIER *et al.*, 1997). O metabolismo microbiano de pesticidas tem sido descrito extensivamente (HILL, 1978; AISLABIE & LLOYD-JONES, 1995).

Assim, verificou-se que os microrganismos não só têm papel importante na ciclagem de compostos orgânicos naturais, como também mostraram-se eficientes na metabolização de produtos sintéticos, como por exemplo, a hidrólise do paration (MUNNECKE & HSIEH, 1976).

SOULAS (1993) em estudo realizado com o herbicida 2,4-D demonstrou evidências da existência de diferentes grupos fisiológicos da comunidade microbiana do solo que são responsáveis pela mineralização do 2,4-D. VOOS & GROFFMAN (1997) avaliaram a relação entre a biomassa microbiana e a dissipação do 2,4-D e do dicamba por microrganismos do solo e verificaram relação entre o tamanho da biomassa microbiana e a degradação dos dois herbicidas.

No Brasil, MUSUMECI & RÜEGG (1984) estudaram o comportamento do fungicida metalaxil em amostras de Latossolo Roxo não esterilizadas e em amostras de solo esterilizadas. Verificaram degradação do fungicida apenas em solo não esterilizado.

ANDRÉA *et al.* (1990) estudaram a bio-mineralização do DDT em solo, sob condições climáticas brasileiras utilizando ^{14}C -DDT e verificaram que praticamente não ocorreu volatilização e bio-mineralização do DDT a CO_2 durante o período de estudo, mas detectaram pequena metabolização do DDT a DDE.

NAKAGAWA (1997), também no Brasil, constatou que microrganismos do gênero *Pseudomonas putida* provenientes de um solo Gley Húmico foram capazes de quebrar o

anel triazínico da molécula do herbicida atrazina.

2. 6 Degradação do ^{14}C -paration metílico

O paration metílico [o,o -dimetil o-(p-nitrofenil) fosforotioato] é um inseticida usado na agricultura e saúde pública como substituto do paration etílico, que foi banido de alguns países, devido a sua alta toxicidade para mamíferos (SHARMILA *et al.*, 1989).

Os pesticidas organofosforados inclusive o paration metílico, são rapidamente metabolizados em tecidos de plantas e animais mas, até recentemente, informações sobre seu destino nos ambientes edáfico e aquático eram limitadas. Embora o paration metílico tenha meia vida relativamente curta, existe sempre o risco potencial de contaminação de lençóis freáticos pela lixiviação, pelo descarte de embalagens ou por derramamento accidental. Entretanto, a degradação do paration metílico e seu destino no ambiente não têm sido amplamente avaliados como no caso do paration etílico (OU & SHARMA, 1989).

KISHK *et al.* (1976) verificaram que a autoclavagem do solo bloqueou completamente o processo de hidrólise do paration metílico em solo, provando a influência de microrganismos no processo. Os autores encontraram também evidências de que o paration metílico foi hidrolisado enzimaticamente no solo.

FUHREMANN & LICHTENSTEIN (1978), estudando o comportamento de paration metílico radiomarcado, recuperaram 99,7% do composto como resíduo extraível imediatamente após o tratamento do solo. Mas, após um período de incubação de apenas 14 dias já haviam sido formados 32,2 % de resíduos não extraíveis ou ligados e somente 18,6% do radiocarbono foram extraídos. Portanto, houve uma recuperação de 50,8% do radiocarbono aplicado após 14 dias. O que prova que grande parte da quantidade inicialmente aplicada também foi perdida por processos que envolveram formação de produtos voláteis.

GILE & GILLET (1981) estudaram a distribuição do ^{14}C -paration metílico em dois tipos de solo após aplicação foliar, em experimentos conduzidos em microcosmos. Os

autores verificaram que o tipo de solo e o aumento do fluxo de ar alteraram o balanço de massa e a distribuição de resíduos de paration metílico dentro dos microcosmos.

O destino do ^{14}C -paration metílico foi também acompanhado por GERSTL & HELLING (1985). Os autores detectaram apenas 54% do radiocarbono inicialmente aplicado, após 49 dias de incubação no solo, sendo que, 13% encontravam-se na forma de resíduos extraíveis e 87% como resíduos ligados. A seguir, incubaram este mesmo solo por mais 70 dias após adição de substratos orgânico e inorgânico. Os autores verificaram que os resíduos presentes foram mineralizados a CO_2 .

2.7 Técnicas nucleares no estudo de pesticidas no ambiente

Em 1923, Havesy mostrou a possibilidade da utilização de radioisótopos naturais em estudos biológicos (FRIED, 1976). Porém somente após 1945, com o desenvolvimento dos reatores nucleares, os radioisótopos se tornaram disponíveis à pesquisa e passaram a ser usados como traçadores (LUCHINI, 1995).

Os primeiros trabalhos neste campo de uso de radioisótopos como traçadores foram feitos em estudos de absorção de chumbo por raízes de plantas e, a partir de então, difundiu-se a aplicação de radioisótopos na ciência de plantas e solo. As técnicas radiométricas em estudos do comportamento de pesticidas no ambiente vêm sendo utilizadas há mais de 40 anos (FÜHR, 1991).

A utilização da tecnologia nuclear em estudos relacionados com a agricultura tem resultado em avanço no conhecimento sobre o comportamento de pesticidas através do rastreamento de pesticidas radiomarcados e seus metabólitos em todos os seguimentos do ambiente (ANNUNZIATA, 1979; ANDRÉA, 1986).

As técnicas que envolvem o uso de isótopos radioativos, particularmente pesticidas marcados com carbono-14, são simples, muito precisas e constituem instrumento de avaliação da distribuição destes compostos em plantas ou em pequenos animais através das técnicas de auto-radiografia. Esta técnica também pode ser utilizada para determinação da

pureza radioquímica dos produtos radiomarcados, através da exposição das placas de cromatografia em camada delgada de sílica gel (TLC) onde eles foram aplicados a filmes de raio-X (ANNUNZIATA, 1979). Devido à rapidez, eficiência na detecção de baixas concentrações e precisão com que se obtém resultados, as técnicas radiométricas, utilizando-se compostos radiomarcados são muito eficientes também para se estabelecer metodologia de análise de extração de pesticidas e *clean up* de extratos (LUCHINI *et al.*, 1999).

A utilização de pesticidas radiomarcados permite também estudos de translocação e metabolismo destes compostos em solo, plantas e animais, com importantes informações sobre o produto na cadeia alimentar (ANDRÉA *et al.*, 1994 b). Estudos de biodegradabilidade em solo podem ser realizados baseados na quantificação de $^{14}\text{CO}_2$ proveniente do pesticida radiomarcado ao solo resultando em informações sobre sua persistência no solo (ANDRÉA *et al.*, 1990).

Além de estudos de laboratório, o comportamento de pesticidas marcados com [^{14}C] pode ser acompanhado no campo através de experimentos realizados em lisímetros, onde a quantificação do radiocarbono presente no solo e água de chuva lixiviada mostra a distribuição do produto na coluna de solo ao longo de tempo e em plantas cultivadas (LUCHINI *et al.*, 1993).

Portanto, a técnica permite determinações relativamente rápidas e bastante precisas das quantidades do ^{14}C -pesticida aplicado ou de seus ^{14}C -produtos de transformação.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

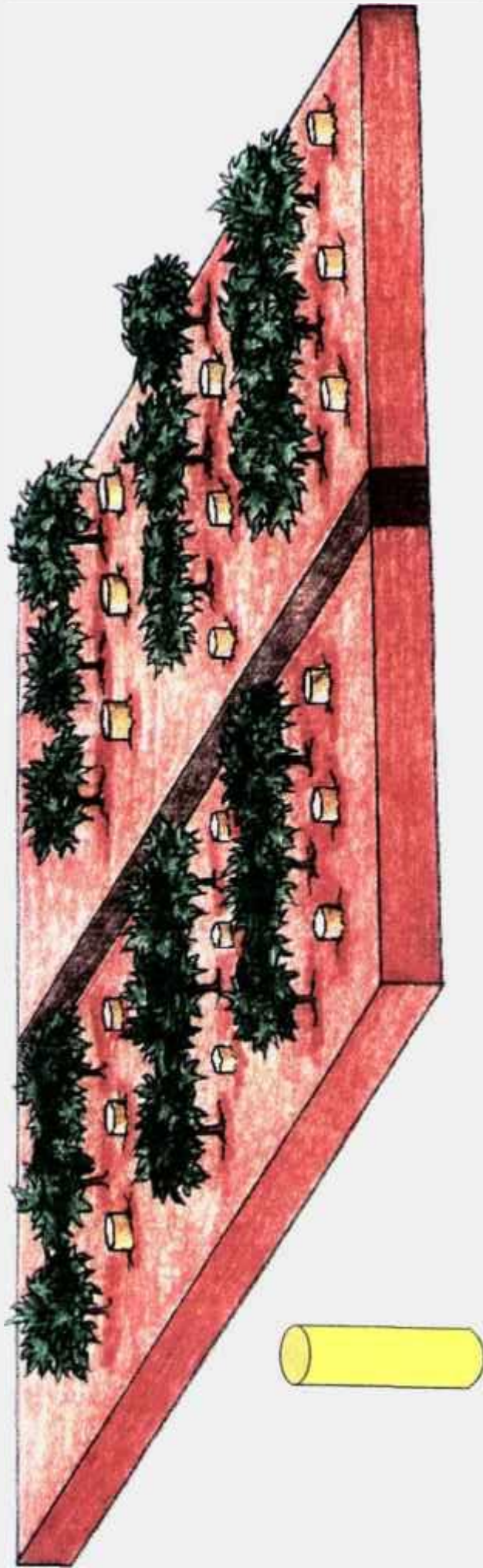
Solo de área delimitada (63 m²) do campo experimental do Instituto Biológico, sem histórico prévio de aplicações de pesticidas, foi previamente calado até pH aproximadamente 7, conforme recomendado para plantio de algodão (GRIDI-PAPP *et al.*, 1992) e subdividida em duas subáreas. Uma das subáreas recebeu todos os tratamentos com pesticidas recomendados para controle de pragas do algodão, e a outra subárea foi utilizada como controle, não tendo sido tratada. Além disso, para o estudo de dissipação de ¹⁴C-paration metílico, 36 tubos de PVC medindo 5 cm de diâmetro por 50 cm de comprimento, abertos nas duas extremidades, foram enterrados em ambas as subáreas do campo experimental 6 meses antes do início dos experimentos (18 em cada subárea), para que o solo contido nos tubos entrasse em equilíbrio com o solo do restante da área. Para evitar transbordamento da água de chuva de dentro dos tubos para o restante do campo experimental, 3 cm dos tubos permaneceram acima da superfície do solo. Estes tubos foram mantidos abertos durante todo o experimento (Fig. 1).

De forma a reproduzir as condições reais da cultura do algodão, o plantio e a aplicação dos pesticidas foram feitos de acordo com as recomendações da Estação Experimental do Instituto Agrônômico de Campinas, em Tatuí - SP que planta algodão há vários anos.

3.1 - PESTICIDAS

3.1.1 Tratamento do solo com pesticidas formulados

As soluções dos pesticidas formulados para tratamento da cultura do algodão foram preparadas por diluição em água, conforme a dose recomendada. Os princípios



Tubo de PVC
(5 cm x 50 cm)

Subárea tratada com vários
pesticidas e solo dos tubos de PVC
tratado com ^{14}C - paration metílico

Área sem
tratamento

Subárea não tratada e solo dos
tubos de PVC tratado com
 ^{14}C - paration metílico

Figura 1 – Representação da área estudada.

ativos dos pesticidas foram aplicados na seguinte ordem (em L ha⁻¹): monocrotofós (1,0); dimetoato (0,5); novamente dimetoato (0,5); endosulfan (1,2); deltametrina (0,5); endosulfan (2,0); deltametrina (0,3); paration metílico (1,0); endosulfan (2,0) e carbaril (2,5 kg ha⁻¹) no plantio de 1995/96. O herbicida trifluralina (2,0) foi aplicado entre os plantios, e no plantio de 1996/97 foram feitas aplicações de: monocrotofós (1,0); novamente monocrotofós (1,3); endosulfan (1,25); paration metílico (1,2); endosulfan (1,2); endosulfan (1,0) + paration metílico (1,0); endosulfan (1,5) + paration metílico (1,5); endosulfan (2,0) + paration metílico (2,0); deltametrina (2,0); deltametrina (0,25); endosulfan(1,2) e paration metílico (1,25) + deltametrina (0,25) (Fig.2).

3.1.2 Pesticidas radiomarcados

Soluções de ¹⁴C-pesticidas e respectivos pesticidas grau técnico foram utilizadas para realização dos testes de recuperação dos métodos de extração e de *clean up* dos extratos de solo.

3.1.2.1 Soluções estoque de pesticidas radiomarcados

3.1.2.1.1 Solução estoque de monocrotofós [dimetil(E)-1-metil-2-(metilcarbamoil)vinilfosfato] marcado na posição [di-¹⁴C-O-metil] com atividade específica de 4,3 MBq mg⁻¹ (116,2 µCi mg⁻¹), pureza radioquímica 97%, fornecido pelo laboratório “Internationale Isotope München”, foi preparada em acetona, resultando em solução com atividade de 370 kBq mL⁻¹ (10 µCi mL⁻¹).

3.1.2.1.2 Solução estoque de ¹⁴C-paration metílico (0,0-dimetil 0-4-nitrofenilfosfato) marcado uniformemente no anel benzênico, com atividade específica de 1,07 GBq mmol⁻¹ (28,9 mCi mmol⁻¹), pureza radioquímica de 98%, fornecido pelo laboratório “Internationale Isotope München”, foi preparada em

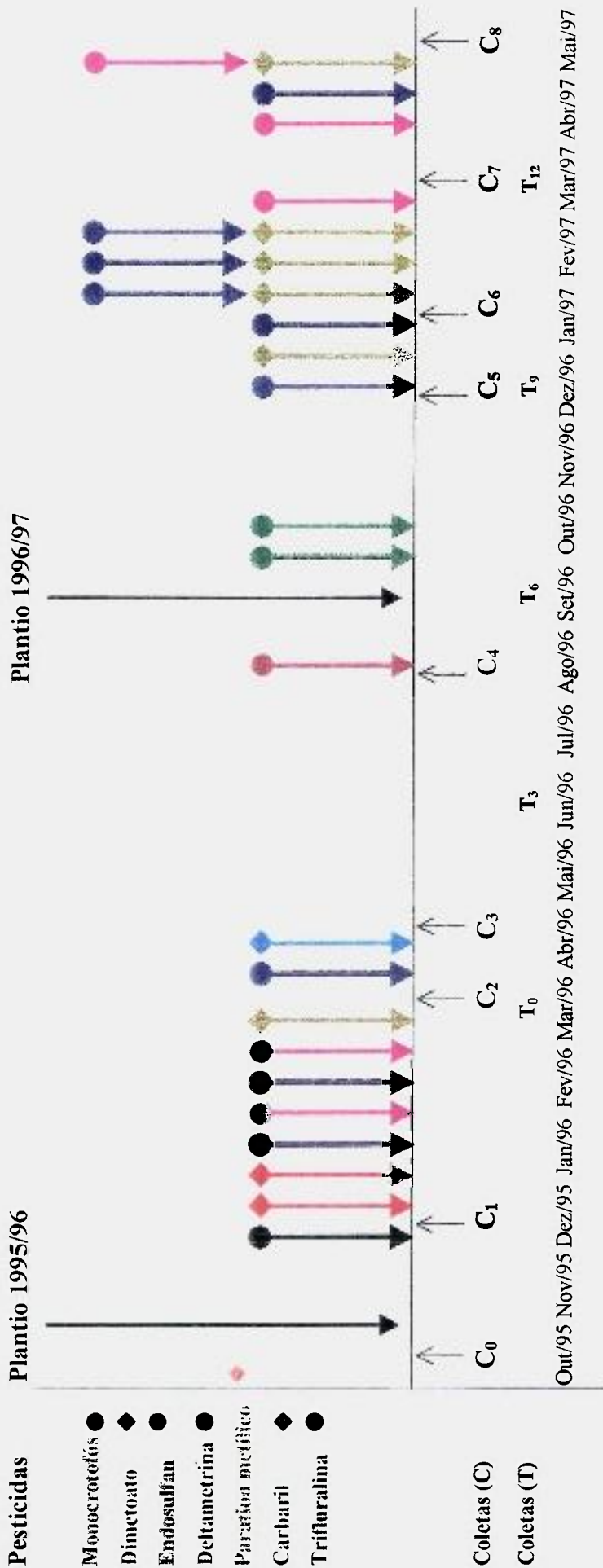


Figura 2 - Aplicações de pesticidas, coleta de solo dos tubos (T) e coletas de solo do campo (C).

hexano, resultando em solução com atividade de $1,04 \text{ MBq mL}^{-1}$ ($28 \text{ } \mu\text{Ci mL}^{-1}$).

1.2.1.3 Solução estoque de deltametrina [(S)- α ciano-3-fenoxibenzil (1R)-cis-3-(2,2-dibromovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxilato] marcada na posição [7- ^{14}C , benzil] com atividade específica de $651,2 \text{ MBq mmol}^{-1}$ ($17,6 \text{ mCi mmol}^{-1}$), pureza radioquímica de 98%, fornecida pelo laboratório “Internationale Isotope München”, foi preparada em hexano, resultando em solução com atividade de $1,11 \text{ MBq mL}^{-1}$ ($30 \text{ } \mu\text{Ci mL}^{-1}$).

3.1.2.1.4 Solução estoque de ($\alpha + \beta$) endosulfan (1,4,5,6,7,7-hexacloro-8,9,10-trinorborn-5-en-2,3-ilenebismetileno sulfito), marcado na posição [2,3- ^{14}C], com atividade específica de $1,887 \text{ GBq mg}^{-1}$ ($50,92 \text{ mCi mg}^{-1}$), pureza radioquímica de 95%, adquirido do laboratório “Institute of Isotopes of the Hungarian Academy of Sciences”, foi preparada em diclorometano resultando em solução com 926 kBq mL^{-1} ($25,03 \text{ } \mu\text{Ci mL}^{-1}$).

3.1.2.1.5 Solução estoque de ^{14}C -carbaril (1-naftil metilcarbamato) marcada na posição 1-naftil, com atividade específica de $292,3 \text{ MBq mmol}^{-1}$ ($7,9 \text{ mCi mmol}^{-1}$) pureza radioquímica de 98%, adquirido da Sigma Chemical Company, foi preparada em acetona, resultando em solução com 185 kBq mL^{-1} ($5 \text{ } \mu\text{Ci mL}^{-1}$).

3.1.2.1.6 Solução estoque de ^{14}C -trifluralina (α,α,α -trifluor-2,6-dinitro-N,N-dipropil-p-toluidina) marcada no anel benzênico, com atividade específica de $453,62 \text{ MBq mg}^{-1}$ ($12,26 \text{ } \mu\text{Ci mg}^{-1}$), pureza radioquímica 98,5%, adquirida da Eli Lilly and Company, foi preparada em hexano, resultando em solução com $371,11 \text{ kBq mL}^{-1}$ ($10,03 \text{ } \mu\text{Ci mL}^{-1}$).

A pureza radioquímica dos compostos foi confirmada no Laboratório de

Ecologia de Agroquímicos do Centro de Proteção Ambiental do Instituto Biológico, através de cromatografia em camada delgada. Para isto, aplicou-se 10 μL de cada solução em placas de cromatografia em camada delgada de sílica gel 60A F₂₅₄ (Merck), juntamente com seus respectivos padrões técnicos. Os sistemas de solventes de desenvolvimento dos cromatogramas usados para cada pesticida foram: acetato de etila/ácido acético (9:1 v/v) para o monocrotofos e dimetoato; acetato de etila/diclorometano (1:1 v/v) para o paration metílico; hexano/acetona (4:1 v/v) para a deltametrina e carbaril; hexano/clorofórmio/acetona (9:3:1 v/v) para o endosulfan; e tolueno/diclorometano (1:1 v/v) para a trifluralina. Após o desenvolvimento das cromatoplasas nos sistemas de solvente adequados, o R_f de cada composto foi determinado por visualização sob lâmpada ultravioleta. As cromatoplasas foram também submetidas à varredura em analisador linear de radioatividade (Berthold II LB 2728) e as áreas radioativas foram raspadas, removidas e suas atividades quantificadas por espectrometria de cintilação em líquido (Packard 1600 TR) após adição de solução cintiladora contendo 4g de PPO (2,5 - difeniloxazol), 200mg de POPOP [1,4-bis-2-(5-feniloxazol) benzeno] por Litro de tolueno.

3.1.3 Soluções estoque de pesticidas grau técnico.

Soluções dos mesmos compostos porém grau técnico fornecidos pelos fabricantes, com pureza química maior que 95% (com exceção do herbicida trifluralina com 75,53%), foram preparadas em metanol na concentração de 10 mg mL⁻¹. Diluições destas soluções foram utilizadas na realização das curvas de calibração, e também nos ensaios para a recuperação dos métodos de extração e *clean up* dos extratos.

3.1.4 Soluções de trabalho

3.1.4.1 Soluções para elaboração de curvas-padrão

Para elaboração de curvas-padrão em cromatógrafo líquido de alta

eficiência - CLAE (Shimadzu LC - 10 AD) e em cromatógrafo à gás - CG (Varian 3.400), prepararam-se soluções em metanol, nas seguintes concentrações: 1.000; 500; 250; 100; 50; 25; 5; 2,5; 1,0; 0,5; 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a partir das soluções estoque de cada pesticida (item 3.1.3).

3.1.4.2 Soluções para estudo de recuperação dos métodos de extração e *clean up*

Utilizando-se solução de 1,0 mg mL^{-1} de cada pesticida grau técnico e as respectivas soluções estoque dos pesticidas radiomarcados, prepararam-se soluções de cada pesticida, com concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e atividade de 6,25 kBq mL^{-1} (0,17 $\mu\text{Ci mL}^{-1}$) de monocrotofos; 4,07 kBq mL^{-1} (0,11 $\mu\text{Ci mL}^{-1}$) de trifluralina; 19,35 kBq mL^{-1} (0,52 $\mu\text{Ci mL}^{-1}$) de deltametrina; 4,40 kBq mL^{-1} (0,12 $\mu\text{Ci mL}^{-1}$) de endosulfan; 6,77 kBq mL^{-1} (0,18 $\mu\text{Ci mL}^{-1}$) de carbaril e 6,51 kBq mL^{-1} (0,18 $\mu\text{Ci mL}^{-1}$) de paration metílico.

3.1.4.3 Solução e tratamento do solo para o estudo de dissipação do ^{14}C -paration metílico

A solução de tratamento com ^{14}C -paration metílico foi preparada em hexano, a partir das soluções estoque de paration metílico grau técnico e ^{14}C -paration metílico, de forma a conter 0,12 mg mL^{-1} e atividade de 29,6 kBq mL^{-1} (0,8 $\mu\text{Ci mL}^{-1}$).

O tratamento com o ^{14}C -paration metílico foi feito por aplicação de 5 mL desta solução na superfície do solo contido nos tubos de PVC de ambas as áreas, no momento recomendado para sua aplicação (imediatamente antes de C.2 na Fig.2).

3.2 - SOLO

As condições de pH, umidade e temperatura do solo foram verificadas diretamente no campo no momento da coleta, utilizando-se um equipamento portátil (Takemura DM-5).

Amostras de solo foram também analisadas no decorrer dos experimentos quanto à granulometria e algumas propriedades físico-químicas, pelo Departamento de Solos e Nutrição de Plantas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"- ESALQ/USP.

3.2.1 Coleta de solo para estudo do efeito das diferentes aplicações na atividade microbiológica

Amostras de solo das duas subáreas (tratada e não tratada com os diferentes pesticidas) foram coletadas nas profundidades de 0-15 cm e de 15-30 cm do perfil do solo para a avaliação da atividade microbiológica. O solo foi levado para o laboratório, onde foi peneirado em malha de 2 mm, colocado em sacos plásticos frouxamente fechados para permitir a troca de gases, e armazenado em geladeira a 4°C, por não mais que 3 meses, até o momento das análises.

3.2.2 Coleta de solo para o estudo da dissipação do ¹⁴C-paration metílico

Três tubos de PVC foram coletados nas duas subáreas 0; 3; 6; 9 e 12 meses após a aplicação de ¹⁴C-paration metílico. Os tubos foram cortados em duas secções de 0-15 cm e de 15-50 cm; o solo de cada secção foi homogeneizado e armazenado em freezer a -17 °C, até o momento das análises.

3.2.3 Determinação do teor de umidade do solo

No momento das análises, triplicatas de amostras de aproximadamente 3,0 g de solo de cada secção tiveram a umidade natural determinada em dessecador infravermelho (Mettler LJ 16), a 120°C por 20 minutos, para posterior correção de todos os cálculos e resultados em relação ao peso seco do solo.

3.3 - ANÁLISE DE MULTI-RESÍDUOS

3.3.1 Recuperação dos métodos de extração

Triplicatas de amostras de 10 g de solo naturalmente úmido da área do campo experimental sem tratamento com pesticidas foram adicionadas de 1,0 mL de solução de cada pesticida grau técnico ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) e seu correspondente radiomarcado com atividades entre 4,07 kBq (0,11 μCi) e 19,24 kBq (0,52 μCi) por mililitro de solução (item 3.1.4.2).

Para confirmação da radioatividade realmente aplicada a cada amostra, triplicatas de subamostras de 100 mg de cada amostra de solo fortificado foram submetidas à combustão em “Biological Oxidizer” (OX 600 Harvey Instrument), por 4 minutos. A radioatividade proveniente da combustão dos solos foi quantificada em espectrômetro de cintilação líquida (Packard 1600 TR).

O restante do solo foi extraído com 150 mL de metanol por Soxhlet durante 8 horas e, para determinação da recuperação do método de extração, o ^{14}C -extraível foi quantificado através de espectrometria de cintilação em líquido de triplicatas de alíquotas de 1 mL dos extratos.

O solo extraído também foi submetido à combustão para verificação da quantidade de radiocarbono não extraído (Figs. 3 e 4).

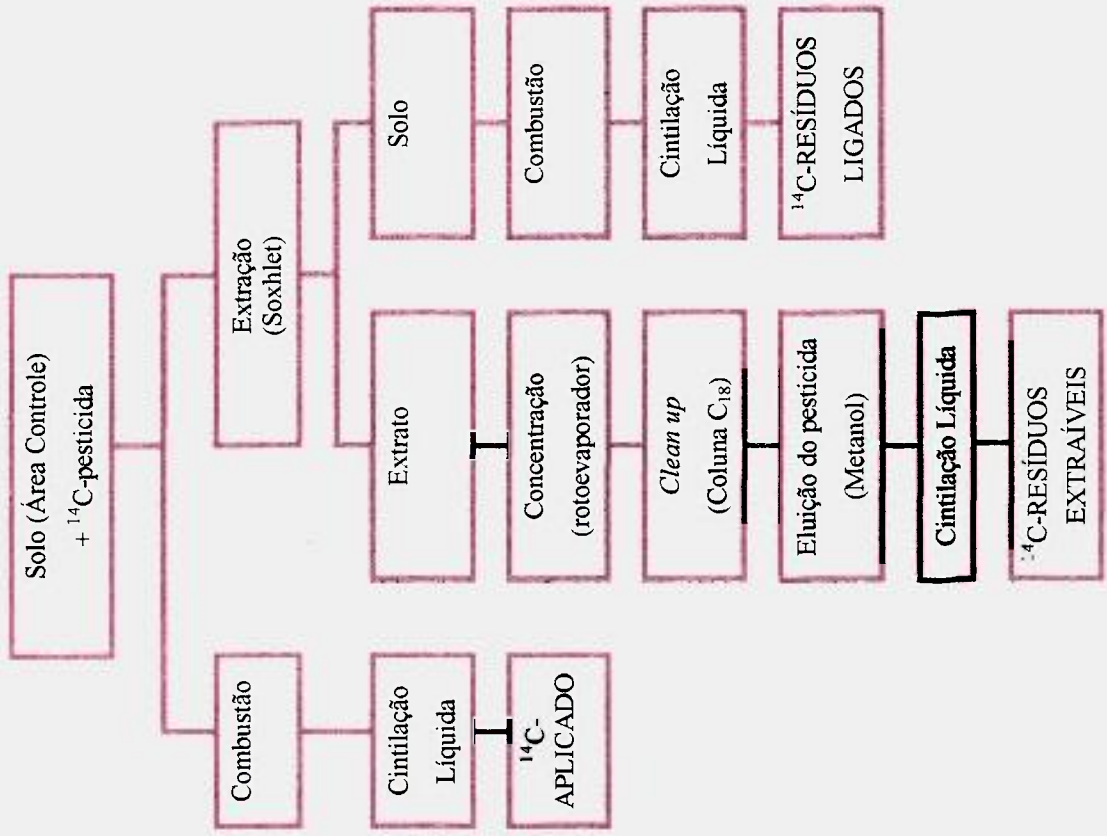


Figura 3 - Esquema de recuperação dos métodos de extração e *clean up*.

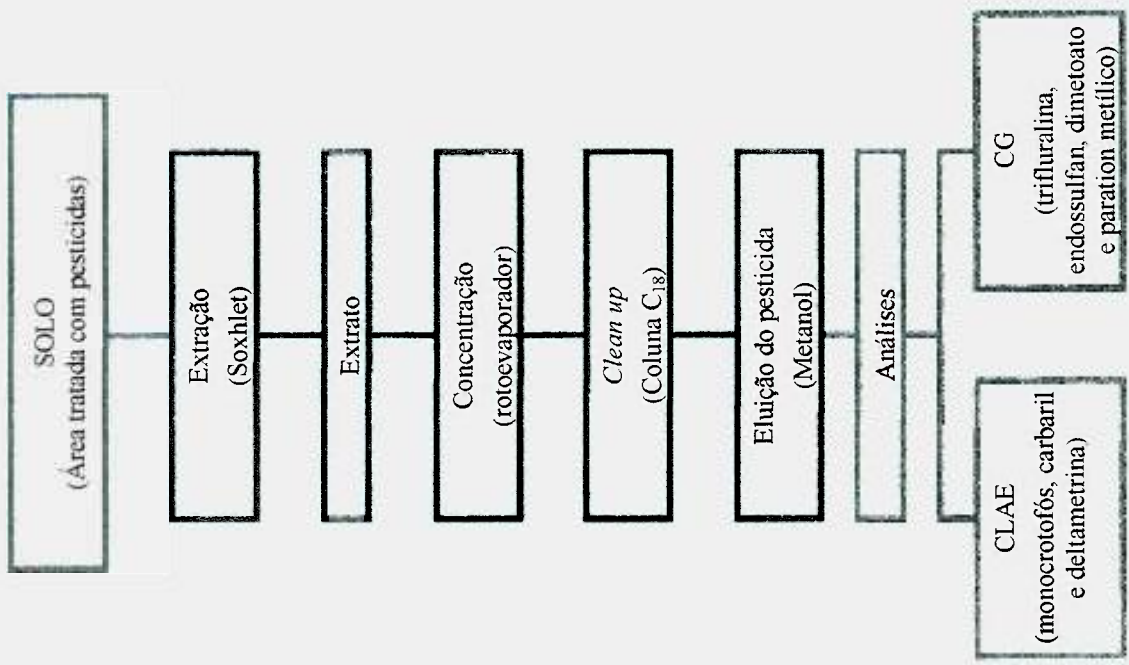


Figura 4 - Esquema de extração e *clean up* das amostras de solo proveniente do campo de cultivo de algodão.

3.3.2 *Recuperação do método de clean up*

O método de *clean up* utilizou 100 mL dos extratos que foram concentrados em rotoevaporador (Büchi 461) até a *secura* e os resíduos foram ressuspensos quantitativamente com 2 mL de metanol.

Os extratos concentrados foram totalmente transferidos para colunas contendo 500 mg de octadecil-sílica (C₁₈) previamente condicionadas com (2x) 3,0 mL de água ultra-pura (MilliQ) e (2x) 4,0 mL de metanol grau pesticida, e então eluídos com (2x) 5,0 mL de metanol. Os extratos eluídos foram coletados em balões de fundo redondo, concentrados em rotoevaporador até a *secura* e ressuspensos quantitativamente com 2,0 mL de metanol.

A radioatividade presente nos extratos após o *clean up* foi determinada através de espectrometria de cintilação em líquido de triplicatas de 100 µL dos eluatos após adição de líquido cintilador.

Os resultados obtidos foram corrigidos para o equivalente em peso seco de solo e relacionados com a quantidade adicionada às amostras fortificadas.

3.3.3 *Análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)*

As amostras de extrato de solo da área tratada do campo experimental foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimadzu LC-10AD) com detector UV/Visível, equipado com coluna de fase reversa medindo 4,6 mm d.i. x 15 cm de comprimento e empacotada com octadecil-sílica (C₁₈) como fase estacionária, para detecção de monocrotofos, deltametrina e carbaril.

3.3.3.1 Condições de análise do monocrotófos

Comprimento de onda (λ) = 230 nm

Fase móvel = metanol/água

Fluxo = 0,5 mL minuto⁻¹

Temperatura da coluna = 30 °C

Tempo de retenção = 5,8 minutos

3.3.3.2 Condições de análise da deltametrina

Comprimento de onda (λ) = 230 nm

Fase móvel = acetonitrila/água (7:3) - água acidificada a pH 3,0 com
ácido ortofosfórico

Fluxo = 1,5 mL minuto⁻¹

Temperatura da coluna = 30 °C

Tempo de retenção = 11,5 minutos

3.3.3.3 Condições de análise do carbaril

Comprimento de onda (λ) = 254 nm

Fase móvel = acetonitrila /água (50:50) - água acidificada a pH 3,0 com
ácido ortofosfórico

Fluxo = 0,6 mL minuto⁻¹

Temperatura da coluna = 30 °C

Tempo de retenção = 6,9 minutos

3.3.4 Análise por cromatografia gás-líquido (CG)

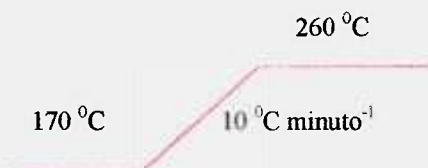
Os extratos de solo também foram analisados por cromatógrafo gás-líquido (Varian 3400), com detector de captura de elétrons (ECD) e coluna capilar, para identificação e quantificação de paration metílico, trifluralina, dimetoato e endosulfan.

Condições do cromatógrafo

Temperaturas : Injetor - 220 °C e Detector - 300 °C

Coluna capilar : 30 m x 0,53 mm d.i., fase: DB 17 e filme: 1,0 µm

Volume de injeção : 1 µL



A temperatura da coluna foi programada para variar de 170 °C a 260 °C, à taxa de 10 °C minuto⁻¹.

3.4 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA DO SOLO

A atividade microbiológica foi avaliada através da determinação da atividade das enzimas desidrogenase, arilsulfatase e arginina deaminase do solo das profundidades de 0-15 e 15-30 cm, de ambas subáreas do campo experimental.

3.4.1 Atividade da enzima desidrogenase

As determinações da atividade da desidrogenase foram feitas em triplicatas de 3,0 g de solo imediatamente após as coletas de solo no campo e o método usado foi

basicamente o de FRIEDEL *et al.* (1994). As amostras de solo foram colocadas em frascos cônicos onde adicionou-se 1,0 mL de solução de glicose (30 mg mL^{-1}), 0,5 mL de solução de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 3 %, e 5,0 mL de solução “tris-buffer” $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH entre 7,6 e 7,8. Os frascos contendo solos e reagentes foram tampados e incubados a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 horas, para que ocorresse a reação de redução do TTC pela enzima, resultando no cloreto de trifenilformazan.

Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 15 minutos, e o sobrenadante foi dispensado. O formazan presente no solo foi extraído duas vezes com 10 mL de acetona, através de agitação de 30 e 15 minutos, respectivamente. As amostras foram então centrifugadas, o sobrenadante foi coletado e elevado a 30 mL com acetona. A quantificação foi efetuada por comparação dos valores dos extratos com curva de várias concentrações de formazan, através de leitura em espectrofotômetro (Hitachi - U 1100) na região da luz visível, no comprimento de onda de 485 nm (Fig.5).

3.4.2 Atividade da enzima arilsulfatase

As estimativas da atividade da arilsulfatase foram determinadas através de produção de p-nitrofenol após hidrólise do p-nitrofenilsulfato de potássio adicionado como substrato (TABATABAI & BREMNER, 1970).

Triplicatas de amostras de 2,0 g de solo de cada camada das duas subáreas foram colocadas em erlemeyer de 50 mL; receberam 4,0 mL de solução tampão acetato recém preparada com pH 5,8 e 1,0 mL de solução de p-nitrofenilsulfato de potássio ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$). Os controles foram similarmente preparados, porém o solo não recebeu o p-nitrofenilsulfato de potássio. Após o período de incubação de 1 hora a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, adicionou-se 1,0 mL de solução de p-nitrofenilsulfato de potássio aos controles, e 25 mL de água destilada às amostras e também nos controles. Após alguns minutos de agitação manual, as misturas foram filtradas em papel de filtro Whatman nº 42.

Para quantificação do p-nitrofenol, produto da hidrólise do p-nitrofenilsulfato

de potássio pela enzima, utilizou-se 6,0 mL dos filtrados, nos quais adicionou-se 4,0 mL de solução de NaOH ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$). A adição da base desenvolve a cor amarela, característica da presença de p-nitrofenol em meio alcalino. A quantificação do p-nitrofenol presente no filtrado foi verificada em espectrofotômetro (Hitachi - U 1100), na região do visível a 420 nm, através de comparação das leituras obtidas nos extratos com uma curva padrão de p-nitrofenol, previamente preparada (Fig.5).

3.4.3 *Atividade da enzima arginina deaminase*

A ação da arginina deaminase foi estimada através da adição 2,0 mL de solução de L-arginina ($2,0 \text{ g L}^{-1}$) às triplicatas de 5,0 g de solo naturalmente úmido, conforme ALEF & KLEINER (1986). As misturas solo/substrato foram preparadas em Erlenmeyers de 100 mL tampados frouxamente, para permitir a troca de gases dentro dos frascos. A seguir as amostras foram incubadas a $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 horas. Os controles, em triplicata, foram similarmente preparados, porém, imediatamente congelados a $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$; desta forma, a microbiota dos controles não tinha atividade. Após o período de incubação, adicionou-se 18,0 mL de solução de KCl ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$) a todas as amostras, inclusive aos controles. Os Erlenmeyers contendo solo e reagentes foram mantidos sob agitação horizontal por 30 minutos, e em seguida as misturas foram filtradas em papel de filtro Whatman nº 42.

Para determinação da concentração de NH_4^+ liberado pela arginina deaminase, adicionou-se 3,0 mL da solução de KCl ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$), 2,0 mL da solução de fenolato de sódio ($0,12 \text{ mol L}^{-1}$), 1,0 mL da solução de nitroprussiato de sódio ($0,17 \text{ mmol L}^{-1}$), 1,0 mL de solução contendo 25 mL de hipoclorito de sódio (15% de cloro ativo) e 5,0 g de NaOH, por litro de solução, a cada 1,0 mL do filtrado. Após 30 minutos, devido à presença de NH_4^+ resultante da reação do NH_4Cl com o nitroprussiato na presença de fenolato de sódio, desenvolve-se coloração azul. A variação de intensidade da cor azul foi quantificada em espectrofotômetro (Hitachi - U 1100) na região do visível a 630 nm (Fig.5). Os resultados obtidos na extração foram comparados com curva padrão de NH_4Cl previamente preparada com concentrações conhecidas.

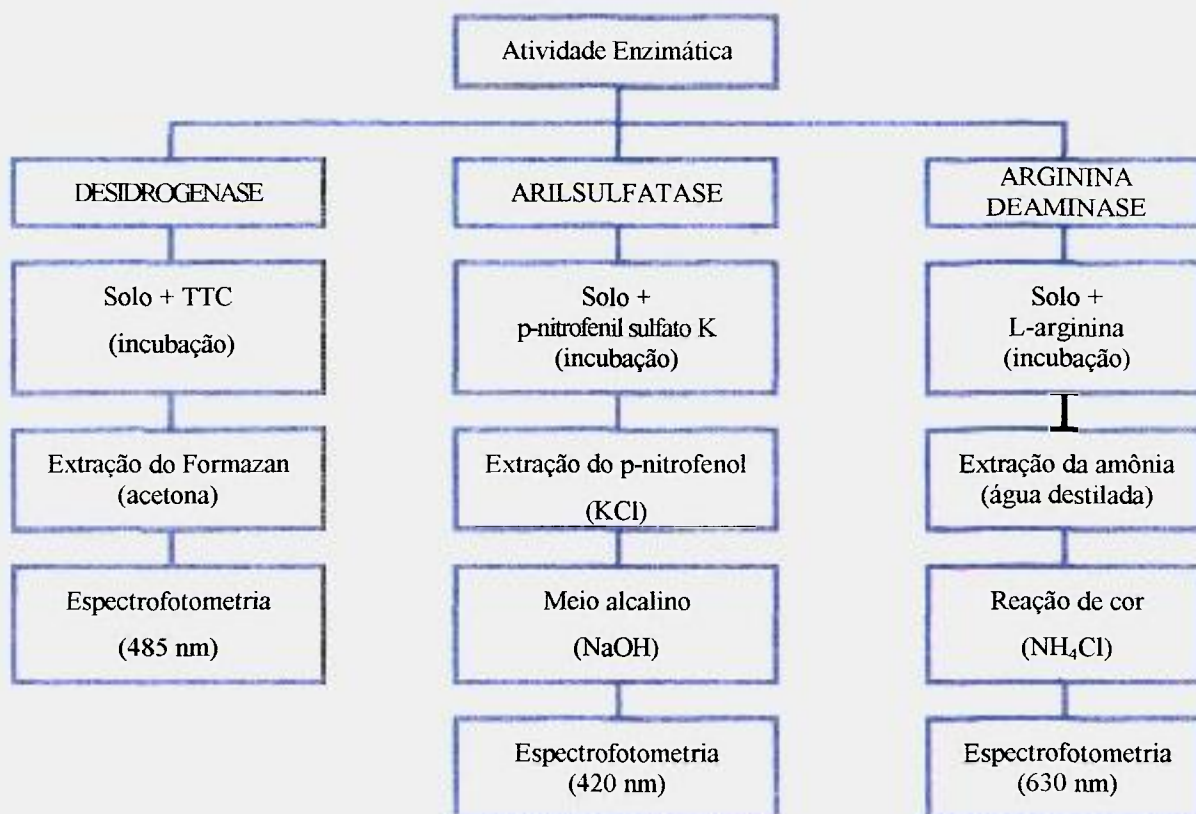


Figura 5 - Diagrama esquemático das metodologias de determinação de diferentes atividades enzimáticas do solo.

3.5 - DISPONIBILIDADE DE NITROGÊNIO NO SOLO

3.5.1 Determinação de nitrogênio por digestão e destilação

A quantificação do nitrogênio presente no solo (Fig.6) foi realizada pelo método de Kjeldahl (CAMARGO *et al.*, 1986), utilizando-se amostras de 3,0 g de solo das duas profundidades, provenientes de cada subárea externa aos tubos de PVC, e após os diferentes tratamentos. As amostras receberam 15 mL de solução ácida de sulfatos (90 g de Na_2SO_4 , 9 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ e 300 mL de H_2SO_4 , por litro de solução), e foram digeridas por aquecimento lento em balões Kjeldahl de 100 mL. Após resfriamento, adicionou-se 25 mL de água destilada, 2 gotas de solução xaroposa de cloreto férrico e 20 mL de solução de NaOH (30%).

Retirou-se 12 g da mistura digerida e transferiu-se para balão de destilação

Kjeldahl de 500 mL, adicionou-se 2 mL de solução de NaOH (30%) e procedeu-se à destilação por aquecimento. Um Erlenmeyer contendo 25 mL de solução de ácido bórico (4%) e 5 gotas de indicador misto (1,0 g de bromocresol e 2,0 g de vermelho de metila por litro de etanol) foi conectado na saída do destilador para receber a amônia destilada, que após reação com ácido bórico resultou em NH_4^+ .

Após a destilação da amônia, trocou-se o Erlenmeyer por outro contendo nova solução de ácido bórico com indicador, adicionou-se 0,2 g de liga de Devarda à mistura digerida que foi novamente destilada, para determinação do nitrato (NO_3^-).

Cada destilado foi titulado com solução de H_2SO_4 ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$) e os cálculos foram corrigidos para peso seco de solo. O teor de nitrogênio total na amostra de solo foi obtido através da soma das concentrações encontradas como NH_4^+ e NO_3^- .

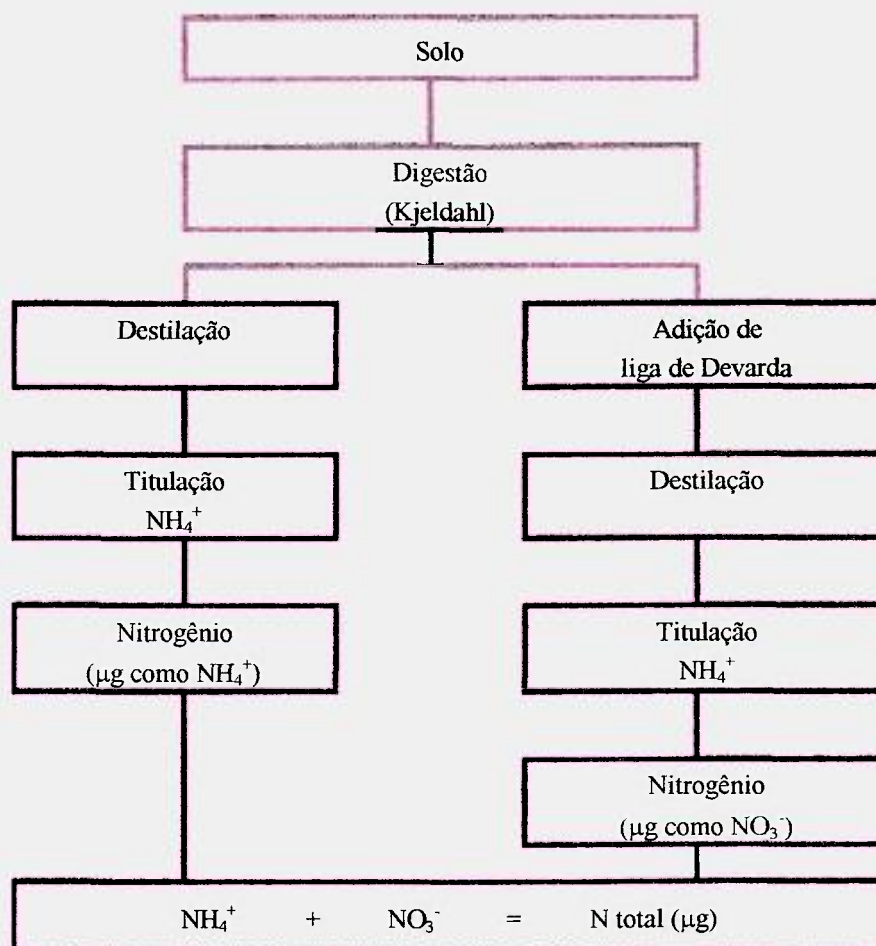


Figura 6 - Diagrama esquemático da determinação do nitrogênio do solo.

3.6 - ESTUDO DA DISSIPAÇÃO DO ^{14}C -PARATION METÍLICO

3.6.1 *Detecção de resíduos extraíveis, ligados e lixiviação*

A dissipação do ^{14}C -paration metílico nas colunas de solo contido nos tubos de PVC foi determinada durante o período de um ano. O radiocarbono foi quantificado em relação à lixiviação, extração e formação de resíduos não extraíveis ou ligados ao solo, nas camadas de 0-15 cm e de 15-50 cm de profundidade do solo dos tubos das duas subáreas (tratada com ^{14}C -paration metílico e os diferentes pesticidas, e a outra que recebeu apenas ^{14}C -paration metílico).

A lixiviação do ^{14}C -paration metílico e a quantidade de ^{14}C -presente em cada tempo de coleta foram acompanhadas através da quantificação da presença de radioatividade nas duas camadas de solo. Esta quantificação foi determinada através de combustão de triplicatas de 0,5 g de solo de cada secção. O $^{14}\text{CO}_2$ resultante da combustão foi quantificado por contagem de cintilação em líquido, conforme descrito anteriormente (item 3.3.1).

Para determinação da quantidade de resíduos extraíveis, triplicatas de 50 g de solo das secções que continham radioatividade foram extraídas com 150 mL de metanol por Soxhlet, durante 8 horas. O volume recuperado foi anotado e a radioatividade presente nos extratos foi quantificada por contagem de cintilação em líquido de alíquotas de (3x) 1 mL dos extratos.

Posteriormente, três subamostras de 0,5 g de cada amostra de solo extraído e seco ao ar foram submetidas à combustão seca, de acordo com ANDRÉA *et al.* (1994a), para determinação de resíduo não extraível ou resíduo ligado (Fig.7).

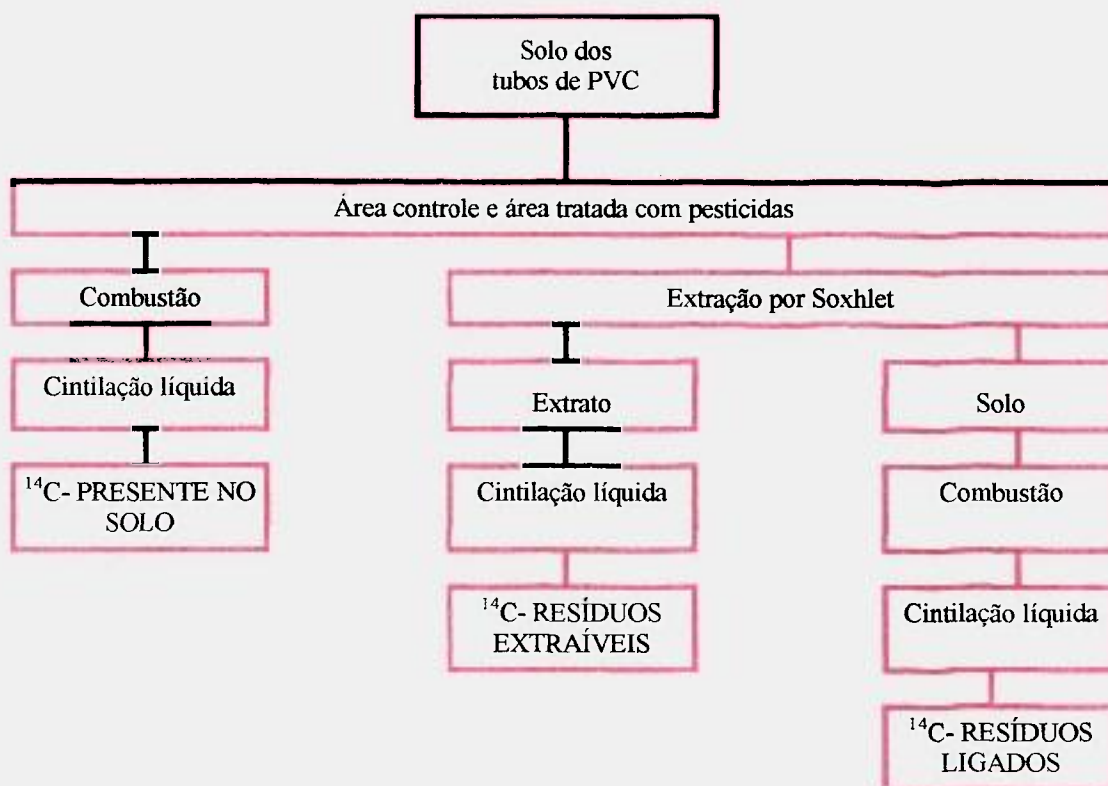


Figura 7 - Diagrama esquemático do estudo da dissipação do ^{14}C -paration metílico em solo.

3.6.2 Quantificação do radiocarbono por contagem de cintilação em líquido

A radioatividade presente nos extratos foi quantificada por contagem de cintilação em líquido, por 10 minutos, em espectrômetro de cintilação em líquido (Packard 1600-TR), pelo método de razão de canais com fonte externa. Três alíquotas de 1,0 mL dos extratos foram misturadas com 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 amostras provenientes da combustão seca foram coletadas na solução cintiladora acima descrita, porém, acrescida de metanol na proporção de 6:4 (v/v) de solução cintiladora/metanol (ANDRÉA *et al.*, 1994a).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados aqui relatados referem-se aos estudos feitos no período de novembro de 1995 (C.0) a maio de 1997 (C.8; Fig.2).

As condições do solo nos momentos das coletas estão apresentadas na Tabela 1, na qual se observa uma pequena variação no pH, entre 6,1 e 7,0. A umidade do solo apresentou valor máximo de 81,6% em dezembro de 1995 (C.1) e a menor umidade do solo (4,2 %) foi observada em maio de 1997 (C.8). A temperatura máxima do solo foi 26,2 °C em março de 1996 e o menor valor observado foi 16,8 °C em abril de 1996. Tanto temperatura como umidade máximas coincidiram com os meses de verão.

Quanto às análises das características físico-químicas das duas profundidades do solo nos diferentes tempos de coleta, verificou-se que praticamente não houve alteração no conteúdo de matéria orgânica, pois a variação foi de 24 a 36 g dm⁻³ na subárea tratada (Tab.2) e 26 a 36 g dm⁻³ na subárea controle (Tab.3). A variação no pH das amostras analisadas no Departamento de Solos e Nutrição de Plantas da ESALQ também foi muito pequena, com valores muito próximos nas duas subáreas, isto é, entre 4,4 e 5,1 na subárea tratada e entre 4,4 e 5,3 na subárea controle (Tabs. 2 e 3).

Tabela 1 - Condições do solo nos momentos das coletas.

Parâmetros do solo	Coletas								
	C.0 nov/95	C.1 dez/95	C.2 mar/96	C.3 abr/96	C.4 ago/96	C.5 dez/96	C.6 jan/97	C.7 mar/97	C.8 mai/97
pH	6,4	6,8	6,4	6,6	6,4	6,1	6,3	6,1	7,0
Umidade (%)	73,0	81,6	67,7	61,8	67,0	67,5	70,5	69,5	4,2
Temperatura (°C)	21,5	22,0	26,2	16,8	18,1	25,1	25,4	23,4	18,9

C.0 = antes de qualquer aplicação de pesticida; C.1 = após aplicação de monocrotofôs no plantio 1995/96; C.2 = após aplicações de dimetoato (2x), endossulfan, deltametrina, endossulfan, deltametrina e paration metílico; C.3 = endossulfan e carbaril; C.4 = entre plantios 96/97; C.5 = trifluralina e monocrotofôs (2x); C.6 = endossulfan, paration metílico e endossulfan; C.7 = após três aplicações da mistura endossulfan + paration metílico e uma de deltametrina; C.8 = deltametrina, endossulfan e mistura de paration metílico + deltametrina.

Tabela 2 - Características físicas e químicas do solo Gley Húmico sob plantio de algodão da subárea com aplicação de pesticidas.

Coleta	pH	M.O.	Areia	Silte	Argila	Classe Textural
			%			
C.0						
0 - 15 cm	4,8	36	28	6	66	muito argiloso
15 - 30 cm	4,4	26	14	5	81	muito argiloso
C.1						
0 - 15 cm	-	-	-	-	-	-
15 - 30 cm	-	-	-	-	-	-
C.2						
0 - 15 cm	5,1	36	25	5	70	muito argiloso
15 - 30 cm	4,6	32	15	7	78	muito argiloso
C.3						
0 - 15 cm	5,0	33	21	6	73	muito argiloso
15 - 30 cm	4,8	33	19	6	75	muito argiloso
C.4						
0 - 15 cm	4,9	33	18	13	69	muito argiloso
15 - 30 cm	4,8	28	18	9	73	muito argiloso
C.5						
0 - 15 cm	5,0	31	-	-	-	muito argiloso
15 - 30 cm	4,6	26	-	-	-	muito argiloso
C.6						
0 - 15 cm	5,0	33	-	-	-	muito argiloso
15 - 30 cm	4,5	28	-	-	-	muito argiloso
C.7						
0 - 15 cm	4,9	24	-	-	-	muito argiloso
15 - 30 cm	4,6	27	-	-	-	muito argiloso
C.8						
0 - 15 cm	4,7	30	13	11	76	muito argiloso
15 - 30 cm	4,4	26	14	11	75	muito argiloso

C.0 = antes de qualquer aplicação de pesticida; C.1 = após aplicação de monocrotofós no plantio 1995/96; C.2 = após aplicações de dimetoato (2x), endossulfan, deltametrina, endossulfan, deltametrina e paration metílico; C.3 = endossulfan e carbaril; C.4 = entre plantios 96/97; C.5 = trifluralina e monocrotofós (2x); C.6 = endossulfan, paration metílico e endossulfan; C.7 = após três aplicações da mistura endossulfan + paration metílico e uma de deltametrina; C.8 = deltametrina, endossulfan e mistura de paration metílico + deltametrina.

M.O. = matéria orgânica ($g\ dm^{-3}$)

- = não analisado

Tabela 3 - Características físicas e químicas do solo Gley Húmico sob plantio de algodão da subárea sem aplicação de pesticidas.

Coleta	pH	M.O.	Areia	Silte	Argila	Classe Textural
				%		
C.0						
0 - 15 cm	4,8	36	28	6	66	muito argiloso
15 - 30 cm	4,4	26	14	5	81	muito argiloso
C.1						
0 - 15 cm	-	-	-	-	-	-
15 - 30 cm	-	-	-	-	-	-
C.2						
0 - 15 cm	5,3	33	24	6	70	muito argiloso
15 - 30 cm	4,6	30	19	4	77	muito argiloso
C.3						
0 - 15 cm	5,3	33	24	7	69	muito argiloso
15 - 30 cm	4,8	33	17	7	76	muito argiloso
C.4						
0 - 15 cm	4,9	28	18	7	75	muito argiloso
15 - 30 cm	4,6	30	14	11	75	muito argiloso
C.5						
0 - 15 cm	4,9	34	-	-	-	muito argiloso
15 - 30 cm	4,6	26	-	-	-	muito argiloso
C.6						
0 - 15 cm	5,0	33	-	-	-	muito argiloso
15 - 30 cm	4,5	27	-	-	-	muito argiloso
C.7						
0 - 15 cm	4,6	29	-	-	-	muito argiloso
15 - 30 cm	5,0	33	-	-	-	muito argiloso
C.8						
0 - 15 cm	5,0	32	16	11	73	muito argiloso
15 - 30 cm	4,8	30	12	10	78	muito argiloso

C.0 = antes de qualquer aplicação de pesticida; C.1 = após aplicação de monocrotofós no plantio 1995/96; C.2 = após aplicações de dimetoato (2x), endosulfan, deltametrina, endosulfan, deltametrina e paration metílico; C.3 = endosulfan e carbaril; C.4 = entre plantios 96/97; C.5 = trifluralina e monocrotofós (2x); C.6 = endosulfan, paration metílico e endosulfan; C.7 = após três aplicações da mistura endosulfan + paration metílico e uma de deltametrina; C.8 = deltametrina, endosulfan e mistura de paration metílico + deltametrina.

M.O. = matéria orgânica (g dm⁻³)

- = não analisado

4.1 - RESÍDUOS DE PESTICIDAS NO SOLO TRATADO COM VÁRIOS PESTICIDAS

O método de extração dos pesticidas do solo com metanol mostrou-se bastante eficiente, pois recuperou cerca de 91% de monocrotofós, 92% de endosulfan, 75% de deltametrina, 89% de paration metílico, 80% de carbaril e 100% de trifluralina (Tab.4). Também a recuperação do método de *clean up* dos extratos foi eficiente, de aproximadamente 85% para o monocrotofós, 98% para o endosulfan, 95% para a deltametrina, 95% para o carbaril, 87% para o paration metílico e 60% para a trifluralina (Tab.4).

As análises das soluções padrões por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) apresentaram linearidade nas faixas de concentrações de 0,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para monocrotofós e carbaril e de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para deltametrina (Figs. 8, 9 e 10). O limite de detecção foi de 3,37 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para monocrotofós, 2,80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para carbaril e 141,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para deltametrina, conforme cálculos pelo método de MEIER & ZÜND (1993).

As Figs. 11, 12, 13, 14, 15 e 16 mostram as curvas de calibração utilizadas para as determinações dos isômeros endosulfan I, endosulfan II que compõem o inseticida organoclorado endosulfan; de seu metabólito - o endosulfan sulfato; do herbicida trifluralina e dos inseticidas organofosforados dimetoato e paration metílico por cromatografia gasosa (CG). As retas obtidas apresentaram linearidade próxima de 1, nos intervalos de 0,1 a 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para todos os pesticidas analisados.

A presença de resíduos dos pesticidas aplicados foi analisada por CLAE e CG de extratos da camada de 0-15 cm do perfil do solo das mesmas coletas analisadas para verificação de atividade enzimática (Tabs. 5 e 6).

Resíduos de pesticidas começaram a ser detectados somente nos extratos de solo coletado após aplicação de paration metílico (C.2) nos quais detectaram-se resíduos de deltametrina ($0,92 \pm 0,21 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo; Tab.5) aplicada anteriormente; resíduos do próprio paration metílico ($0,16 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo), de um dos isômeros do endosulfan, o

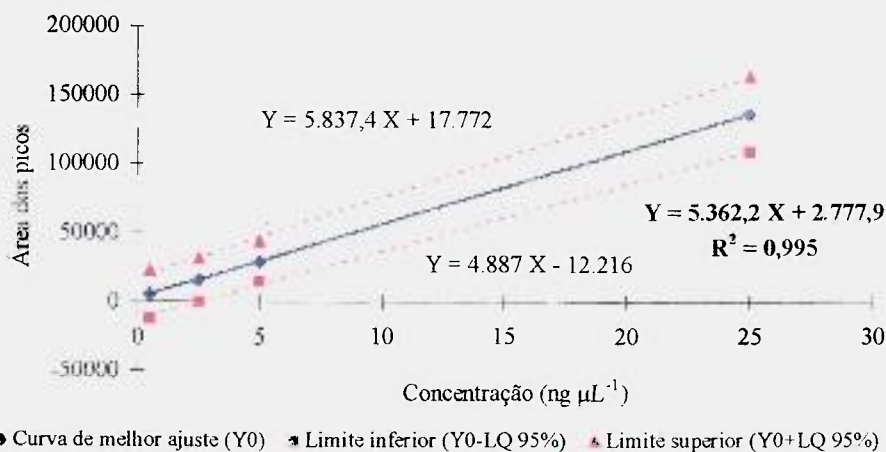
endosulfan I ($0,21 \pm 0,08 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo) e do metabólito do endosulfan, o endosulfan sulfato ($0,06 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo). Portanto, observou-se não só a persistência, como também a degradação de alguns pesticidas anteriormente aplicados.

Tabela 4 - Recuperação dos métodos de extração e *clean up* de extratos de solo tratado com ^{14}C -pesticidas.

Método \ Pesticidas	Extração (porcentagem \pm desvio padrão)	<i>Clean up</i>
Monocrotofós	$90,8 \pm 2,4$	$84,9 \pm 5,3$
Endosulfan	$91,7 \pm 2,5$	$98,0 \pm 5,5$
Deltametrina	$75,1 \pm 9,9$	$94,7 \pm 3,1$
Paration metílico	$88,5 \pm 3,7$	$87,4 \pm 4,6$
Carbaril	$80,1 \pm 3,7$	$94,7 \pm 8,5$
Trifluralina	$100,1 \pm 9,2$	$60,0 \pm 6,0$

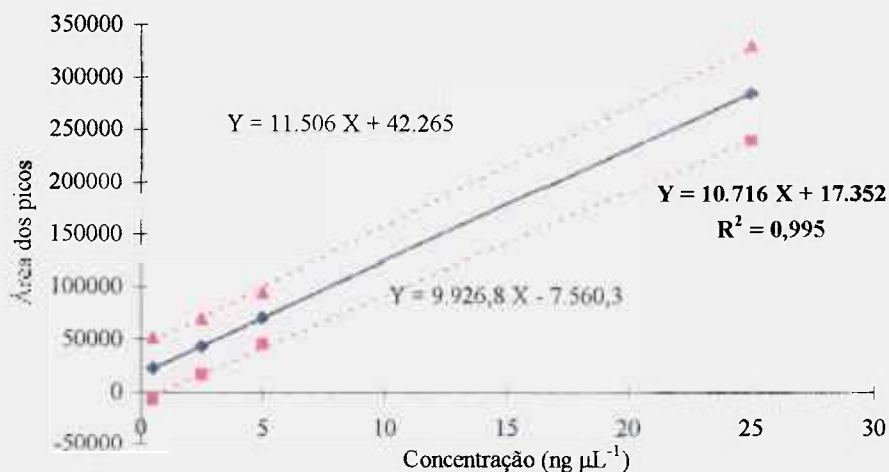
Resíduos de carbaril em quantidades abaixo do limite de quantificação ($0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram detectados apenas nos extratos de solo coletado imediatamente após sua aplicação (C.3; Tab.5). Isto significa que o tempo de persistência do carbaril foi muito curto neste solo. Detectou-se também neste tempo de coleta (C.3), resíduos de paration metílico ($0,29 \pm 0,02 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo; Tab.6).

Outros resíduos foram detectados somente por CG e os resultados das análises dos extratos de solo coletado após duas aplicações seguidas de monocrotofós (C.5) apresentaram apenas resíduos de trifluralina, paration metílico e do metabólito endosulfan sulfato (Tab.6) provenientes de aplicações anteriores. Como o monocrotofós não foi detectado mesmo logo após duas aplicações, pode-se afirmar que o inseticida não é persistente. O mesmo pode ser afirmado no caso do inseticida dimetoato.



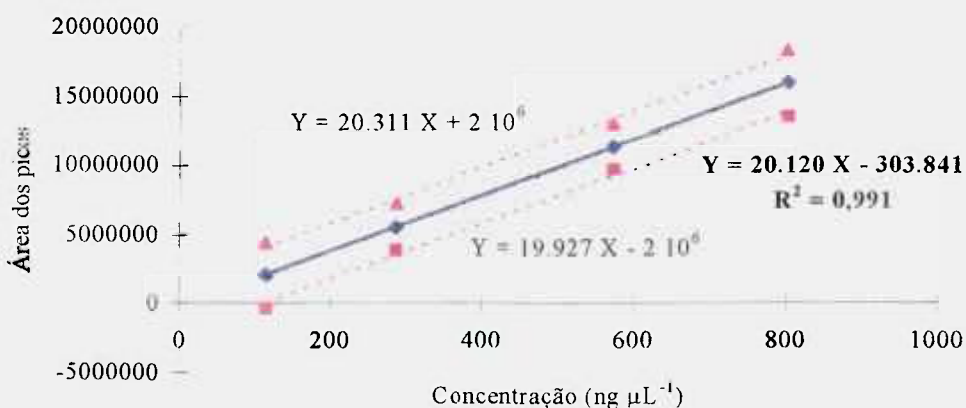
◆ Curva de melhor ajuste (Y0) ■ Limite inferior (Y0-LQ 95%) ▲ Limite superior (Y0+LQ 95%)

Figura 8 – Curva padrão de monocrotofós por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com limites de confiança de 95%.



◆ Curva de melhor ajuste (Y0) ■ Limite inferior (Y0-LQ 95%) ▲ Limite superior (Y0+LQ 95%)

Figura 9 – Curva padrão de carbaril por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com limites de confiança de 95%.



◆ Curva de melhor ajuste (Y0) ■ Limite inferior (Y0-LQ 95%) ▲ Limite superior (Y0+LQ 95%)

Figura 10 – Curva padrão de deltametrina por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com limites de confiança de 95%.

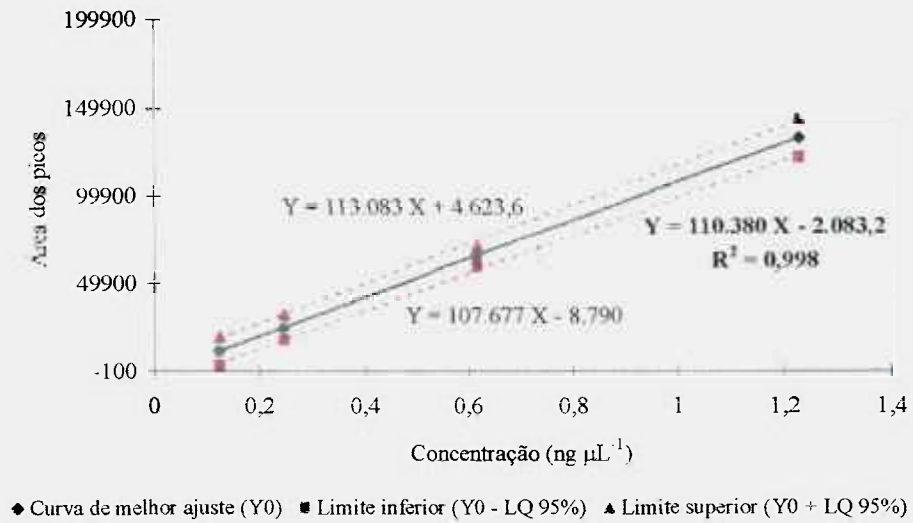


Figura 11 – Curva de calibração do endossulfan I por cromatografia gás-líquido (CG) com limites de confiança de 95%.

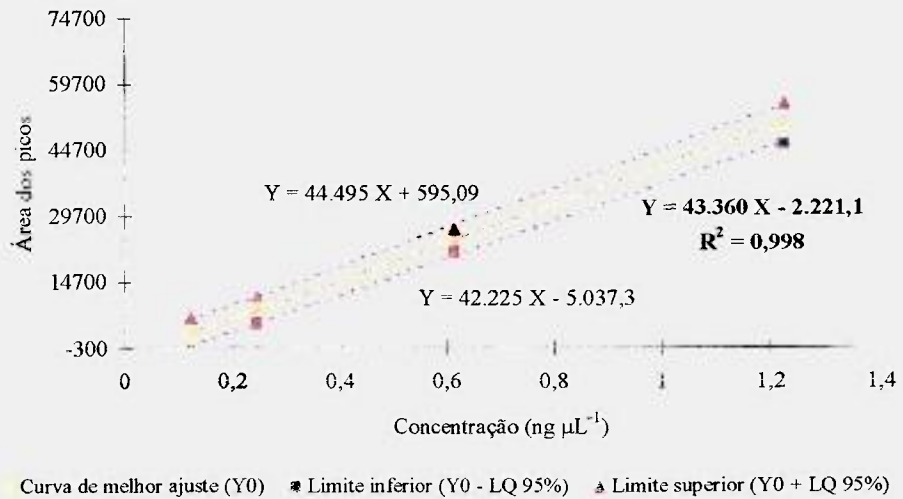


Figura 12 – Curva de calibração do endossulfan II por cromatografia gás-líquido (CG) com limites de confiança de 95%.

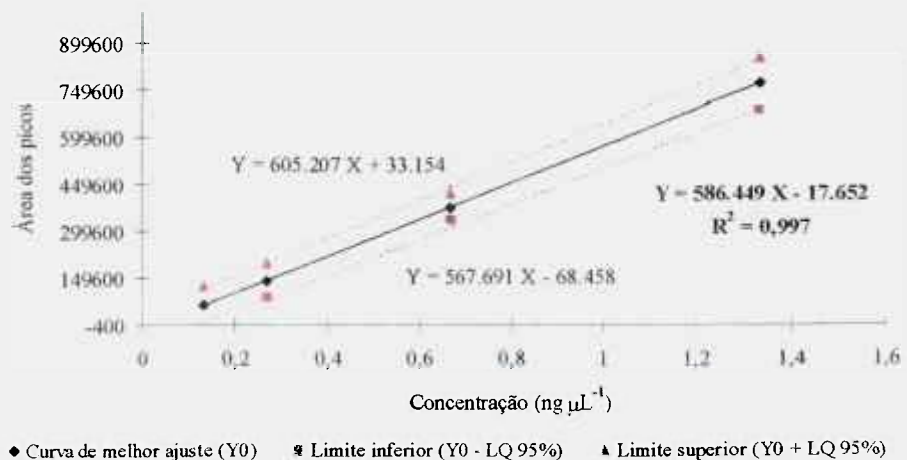
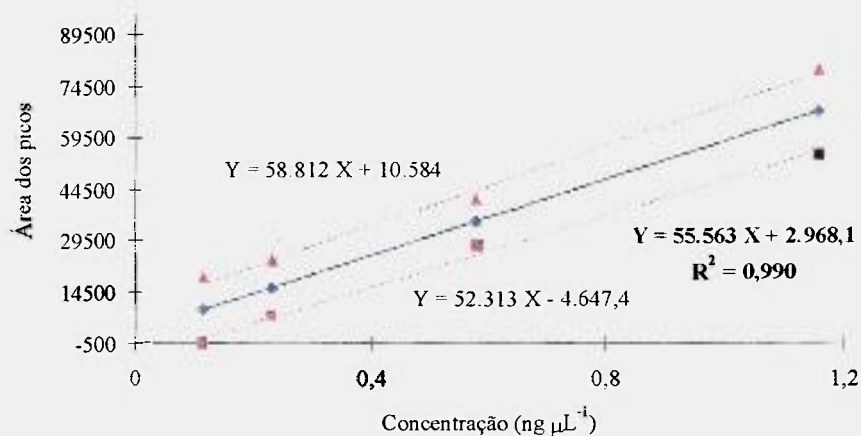
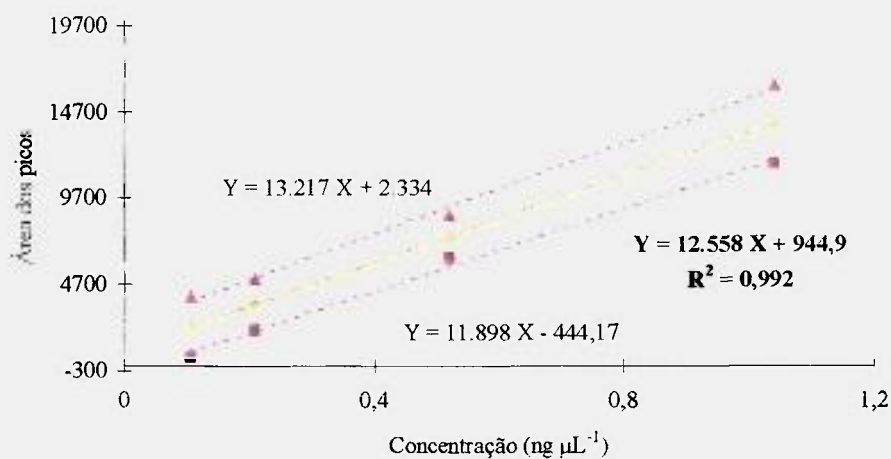


Figura 13 – Curva de calibração do endossulfan sulfato por cromatografia gás-líquido (CG) com limites de confiança de 95%.



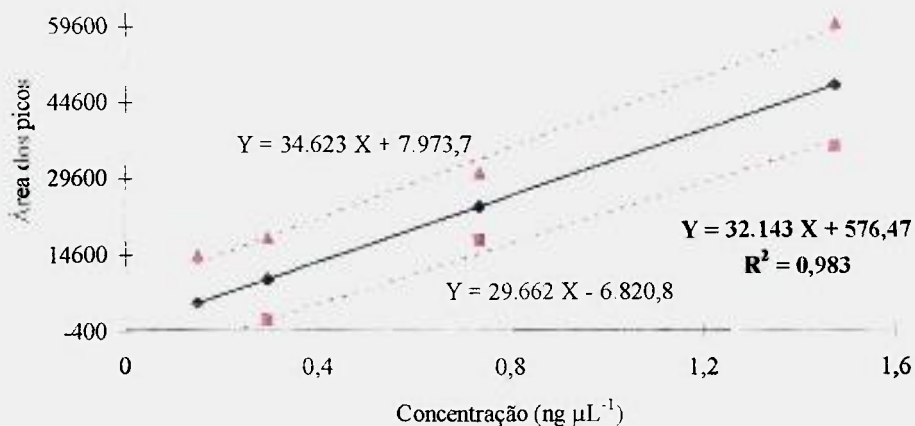
◆ Curva de melhor ajuste ■ Limite inferior ($Y_0 - LQ 95\%$) ▲ Limite superior ($Y_0 + LQ 95\%$)

Figura 14 – Curva de calibração da trifluralina por cromatografia gás-líquido (CG) com limites de confiança de 95%.



◆ Curva de melhor ajuste (Y0) ■ Limite inferior ($Y_0 - LC 95\%$) ▲ Limite superior ($Y_0 + LQ 95\%$)

Figura 15 – Curva de calibração do dimetoato por cromatografia gás-líquido (CG) com limites de confiança de 95%.



◆ Curva de melhor ajuste (Y0) ■ Limite inferior ($Y_0 - LQ 95\%$) ▲ Limite superior ($Y_0 + LQ 95\%$)

Figura 16 – Curva de calibração do paration metílico por cromatografia gás-líquido (CG) com limites de confiança de 95%.

Tabela 5 – Determinação quantitativa de resíduos de pesticidas em solo por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Pesticidas Aplicados	Taxa de Aplicação (g m ⁻²)	Compostos Detectados			
		Coleta	Monocrotofós	Carbaril (µg g ⁻¹ solo)	Deltametrina
		C.0	*	*	*
Monocrotofós	0,040	C.1	–	–	–
Dimetoato	0,095		–	–	–
Endosulfan	0,042		–	–	–
Deltametrina	0,001		–	–	–
Endosulfan	0,070		–	–	–
Deltametrina	6,8 10 ⁻⁴		–	–	–
Paration metílico	0,060	C.2	*	*	0,92 ± 0,21
Endosulfan	0,070		–	–	–
Carbaril	0,250	C.3	*	+	*
Entre plantios		C.4	–	–	–
Trifluralina	0,190		–	–	–
Monocrotofós	0,040		–	–	–
Monocrotofós	0,052	C.5	*	*	*
Endosulfan	0,044		–	–	–
Paration metílico	0,072		–	–	–
Endosulfan	0,042	C.6	*	*	*
Endosulfan + Paration metílico	0,035 + 0,06		–	–	–
Endosulfan + Paration metílico	0,053 + 0,09		–	–	–
Endosulfan + Paration metílico	0,070 + 0,120		–	–	–
Deltametrina	0,0051	C.7	–	–	–
Deltametrina	6,3 10 ⁻⁴		–	–	–
Endosulfan	0,042		–	–	–
Paration metílico + Deltametrina	0,070 + 6,3 10 ⁻⁴	C.8	*	*	*

* não detectado

– não analisado

+ detectado qualitativamente

Tabela 6 - Determinação quantitativa de resíduos de pesticidas em solo por cromatografia gás-líquido (CG).

Pesticidas Aplicados	Taxa de Aplicação (g m ⁻²)	Coleta	Compostos Detectados					
			Dimetoato	Trifluralina	Paration Metílico	Endosulfan I	Endosulfan II	Endosulfan Sulfato
			(µg g ⁻¹ solo)					
		C.0	*	*	*	*	*	*
Monocrotofós	0,040	C.1	-	-	-	-	-	-
Dimetoato	0,095		-	-	-	-	-	-
Endosulfan	0,042		-	-	-	-	-	-
Deltametrina	0,001		-	-	-	-	-	-
Endosulfan	0,070		-	-	-	-	-	-
Deltametrina	6,8 10 ⁻⁴		-	-	-	-	-	-
Paration metílico	0,060	C.2	-	*	0,16 ± 0,02	*	0,21 ± 0,08	0,06 ± 0,02
Endosulfan	0,070		-	-	-	-	-	-
Carbaril	0,250	C.3	-	*	0,29 ± 0,02	*	*	*
Entre plantios		C.4	-	-	-	-	-	-
Trifluralina	0,190		-	-	-	-	-	-
Monocrotofós	0,040		-	-	-	-	-	-
Monocrotofós	0,052	C.5	-	0,01 ± 0,01	0,16 ± 0,04	*	*	0,03 ± 0
Endosulfan	0,044		-	-	-	-	-	-
Paration metílico	0,072		-	-	-	-	-	-
Endosulfan	0,042	C.6	-	*	0,08 ± 0,01	0,21 ± 0,03	0,44 ± 0,04	0,06 ± 0,01
Endosulfan + Paration metílico	0,035 + 0,06		-	-	-	-	-	-
Endosulfan + Paration metílico	0,053 + 0,09		-	-	-	-	-	-
Endosulfan + Paration metílico	0,070 + 0,120		-	-	-	-	-	-
Deltametrina	0,0051	C.7	-	-	-	-	-	-
Deltametrina	6,3 10 ⁻⁴		-	-	-	-	-	-
Endosulfan	0,042		-	-	-	-	-	-
Paration metílico + Deltametrina	0,070 + 6,3 10 ⁻⁴	C.8	-	*	0,96 ± 0,31	*	0,51 ± 0,09	0,08 ± 0,01

* não detectado

- não analisado

+ detectado qualitativamente

Resíduos de paration metílico, endosulfan I, endosulfan II e do endosulfan sulfato foram também detectados nos extratos de solo coletados após a aplicação de endosulfan (C.6; Tab.6). Já na coleta após aplicação da mistura paration metílico + deltametrina (C.8), não foram detectados resíduos de deltametrina, demonstrando que também este inseticida é pouco persistente no solo. Dados da literatura relatam que a maioria dos piretróides é rapidamente e completamente degradada a CO₂ na maioria dos tipos de solo (HENRICK, 1995).

Finalmente, detectou-se ainda neste tempo de coleta (C.8) além de resíduos de paration metílico, o isômero endosulfan II e o metabólito endosulfan sulfato como resíduos do endosulfan aplicado anteriormente (Tab.6). Sabe-se que o endosulfan é mais recalcitrante por apresentar átomos de cloro em sua estrutura química (ATLAS & BARTHA, 1993).

4.2 - ATIVIDADE MICROBIANA

A atividade microbiana do solo foi avaliada através de medidas de atividade das enzimas desidrogenase, arilsulfatase e arginina deaminase por comparação dos resultados obtidos com curvas-padrão de diferentes concentrações dos produtos das reações substrato-enzima. Desta forma, os resultados do solo foram comparados com a curva de formazan para medida da atividade da desidrogenase (Fig.17); de p-nitrofenol para arilsulfatase (Fig.18) e de cloreto de amônio para a arginina deaminase (Fig.19). Os resultados referentes ao solo encontram-se nas Tabelas 7, 8 e 9.

Comparando-se os resultados da atividade da desidrogenase do solo da subárea sob tratamentos com pesticidas com os da subárea sem tratamentos (Tab.7), observou-se que a enzima foi estimulada após aplicação de monocrotofós (C.1), nas duas camadas. Já após aplicação do paration metílico (C.2), as quantidades de formazan detectado se aproximaram dos valores de C.0 (antes das aplicações de pesticidas) na camada de 0-15 cm, mas diminuíram na camada de 15-30 cm. Entretanto, isto também ocorreu na subárea sem tratamento, indicando que as variações podem ter ocorrido por influências climáticas. Após a aplicação do carbaril (C.3), a atividade desta enzima foi inibida na camada de 0-15

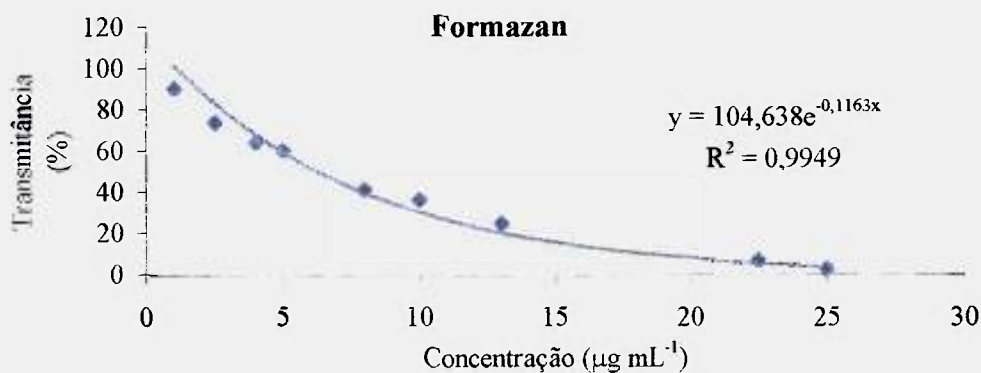


Figura 17 -- Curva padrão de formazan em diferentes concentrações para quantificação da atividade da enzima desidrogenase por espectrofotometria (485 nm).

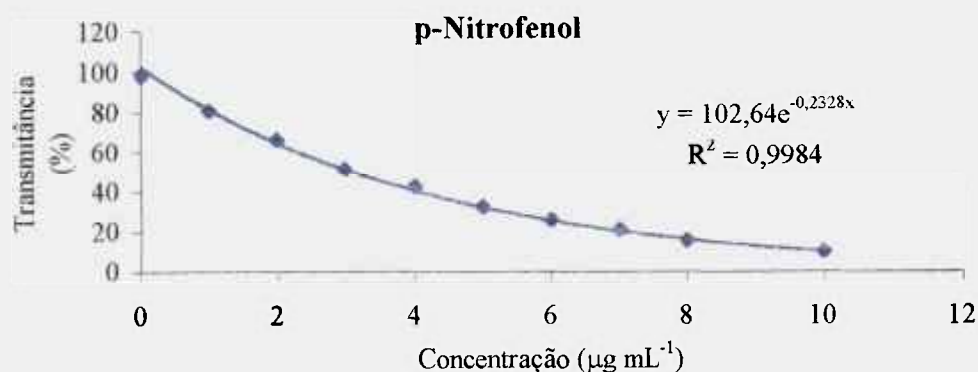


Figura 18 -- Curva padrão de p-nitrofenol em diferentes concentrações para quantificação da atividade da enzima arilsulfatase por espectrofotometria (420 nm).

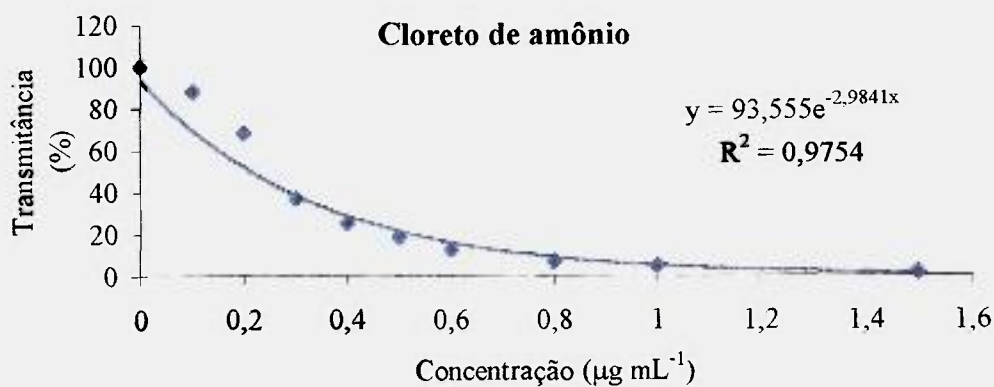


Figura 19 -- Curva padrão de cloreto de amônio em diferentes concentrações para quantificação da atividade da enzima arginina deaminase por espectrofotometria (630 nm).

cm e bastante estimulada camada de 15-30 cm no solo tratado (Tab.7).

No período entre os plantios 1996/97 (C.4) ocorreu um estímulo da atividade da desidrogenase na camada de 0-15 cm, provavelmente devido ao preparo do solo para o novo plantio, quando o solo foi revolvido e, portanto, foi aerado. Após a aplicação de monocrotofós (C.5), houve uma inibição na atividade desta enzima tanto em relação às coletas anteriores, como em relação ao solo sem tratamento (Tab.7). Esta inibição pode ter sido devida à presença dos resíduos de trifluralina, paration metílico e um dos metabólitos do endosulfan – o endosulfan sulfato (C.5; Tab.6) que foram aplicados anteriormente e detectados através das análises cromatográficas. A aplicação de endosulfan (C.6) e a presença de seus resíduos e de seu metabólito, além de resíduos de paration metílico (Tab.6), também estimularam a atividade da desidrogenase na camada 0-15 cm. O deltametrina (C.7) também estimulou, mas a mistura paration metílico + deltametrina (C.8) e resíduos de paration metílico (Tab.6) e de endosulfan e seu metabólito inibiram a atividade da desidrogenase.

Observou-se, portanto, que a aplicação de pesticidas e resíduos que permaneceram no solo influenciaram ora inibindo, ora estimulando a atividade oxidativa dos microrganismos. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por TU (1981) que encontrou maior atividade da desidrogenase duas semanas após o uso de vários pesticidas, além de estreptomicina. O autor sugere que alguns pesticidas podem estimular o metabolismo da enzima, enquanto outros podem inibi-lo, como encontrado neste trabalho, onde observou-se nitidamente: inibição por carbaril (C.3; Tab.7) e estímulo após aplicação de monocrotofós (C.1; Tab.7) e endosulfan (C.6; Tab.7).

Quanto à atividade da enzima arilsulfatase (Tab.8) observou-se também estímulo nas duas camadas de solo após a aplicação de monocrotofós (C.1), principalmente comparando-se com a subárea sem tratamento. Já a aplicação de paration metílico (C.2) e a presença de endosulfan e seu metabólito (Tab.6) inibiram a atividade desta enzima quando se compara com os valores obtidos na coleta anterior. Entretanto, a atividade da arilsulfatase, ao contrário da atividade da desidrogenase, foi pouco estimulada e apenas na camada de 0-15 cm após aplicação de carbaril (C.3; Tab.8) onde detectou-se também resíduo de paration metílico (Tab.6), quando se compara com o valor da coleta anterior e muito estimulada em relação ao solo sem tratamento.

Tabela 7 - Atividade da enzima desidrogenase em solo do campo experimental do Instituto Biológico sob plantio de algodão (média \pm desvio padrão).

Subárea e Profundidade	FORMAZAN ($\mu\text{g g}^{-1}$ de solo seco)								
	C.0	C.1	C.2	C.3	C.4	C.5	C.6	C.7	C.8
Com tratamentos									
0 - 15 cm	134,18 \pm 25,41	258,77 \pm 16,87	167,96 \pm 11,16	87,73 \pm 10,25	178,66 \pm 6,06	118,87 \pm 11,98	192,99 \pm 20,93	105,13 \pm 12,59	59,63 \pm 8,50
15 - 30 cm	73,19 \pm 12,19	137,72 \pm 10,98	31,48 \pm 0,12	119,04 \pm 18,64	107,76 \pm 5,25	83,70 \pm 9,70	62,85 \pm 18,14	31,48 \pm 13,58	69,79 \pm 7,59
Sem tratamento									
0 - 15 cm	134,18 \pm 25,41	218,67 \pm 19,45	107,45 \pm 4,743	110,09 \pm 5,54	147,64 \pm 26,66	144,23 \pm 21,64	94,59 \pm 6,83	90,66 \pm 7,61	115,73 \pm 16,39
15 - 30 cm	73,19 \pm 12,19	100,84 \pm 3,02	25,77 \pm 2,57	45,34 \pm 7,67	51,13 \pm 7,62	102,49 \pm 12,24	43,87 \pm 2,85	53,69 \pm 11,02	100,71 \pm 4,66

C.0 = antes de qualquer aplicação de pesticida; C.1 = após aplicação de monocrotofos no plantio 1995/96; C.2 = após aplicação de dimetoato, endosulfan, deltametrina, endosulfan e paration metílico; C.3 = após aplicação de endosulfan e carbaril; C.4 = entre os plantios 96/97; C.5 = após aplicação de trifluralina e monocrotofos no plantio 96/97; C.6 = após aplicação de endosulfan, paration metílico e endosulfan; C.7 = após três aplicações da mistura endosulfan + paration metílico e uma aplicação de deltametrina; C.8 = após aplicação de deltametrina, endosulfan e mistura de paration metílico + deltametrina

Tabela 8 - Atividade da enzima arilsulfatase em solo do campo experimental do Instituto Biológico sob plantio de algodão (média \pm desvio padrão).

Subárea e Profundidade	p-NITROFENOL ($\mu\text{g g}^{-1}$ de solo seco)								
	C.0	C.1	C.2	C.3	C.4	C.5	C.6	C.7	C.8
Com tratamentos									
0-15 cm	7,35 \pm 1,41	11,61 \pm 0,67	4,80 \pm 1,64	5,09 \pm 0,91	4,87 \pm 0,15	5,51 \pm 1,84	9,26 \pm 0,83	3,77 \pm 0,35	5,28 \pm 0,44
15-30 cm	3,91 \pm 0,44	7,26 \pm 1,44	3,04 \pm 2,35	2,80 \pm 1,56	4,78 \pm 0,46	3,30 \pm 0,49	6,10 \pm 0,32	2,64 \pm 0,17	2,98 \pm 0,48
Sem tratamento									
0-15 cm	7,35 \pm 1,41	3,40 \pm 2,68	3,78 \pm 1,27	0,75 \pm 0,07	2,37 \pm 0,90	9,76 \pm 2,89	3,66 \pm 0,65	3,55 \pm 0,16	4,55 \pm 0,13
15-30 cm	3,91 \pm 0,44	4,87 \pm 2,01	1,01 \pm 0,31	2,86 \pm 0,28	0,73 \pm 0,07	4,38 \pm 0,42	1,99 \pm 0,32	2,60 \pm 0,06	3,10 \pm 0,01

C.0 = antes de qualquer aplicação de pesticida; C.1 = após aplicação de monocrotofos no plantio 1995/96; C.2 = após aplicação de dimetoato, endosulfan, deltametrina, endosulfan, deltametrina e paration metílico; C.3 = endosulfan e carbaril; C.4 = entre plantios 96/97; C.5 = trifluralina e monocrotofos no plantio 96/97; C.6 = endosulfan, paration metílico e endosulfan; C.7 = após três aplicações da mistura endosulfan + paration metílico e uma de deltametrina; C.8 = deltametrina, endosulfan e mistura de paration metílico + deltametrina.

No período entre os plantios 96/97 (C.4) e comparando-se as duas subáreas, observou-se que a concentração de p-nitrofenol foi aproximadamente duas vezes maior na subárea tratada em relação à subárea sem tratamento na camada de 0-15 cm e 4 vezes maior que na camada de 15-30 cm. A aplicação de monocrotofós (C.5) e a presença de resíduos de vários pesticidas (Tab.6) inibiram a atividade desta enzima quando comparada com a atividade da subárea sem tratamento, pois detectou-se concentração de p-nitrofenol de 5,5 e 9,8 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo nas subáreas tratada e não tratada, respectivamente, na camada de 0-15 cm. Mais uma vez pode ter ocorrido a influência de resíduos de pesticidas anteriormente aplicados (Tab.6) na atividade da enzima arilsulfatase, como ocorreu com a atividade da desidrogenase. Após aplicação de endosulfan (C.6) e a presença de resíduos de diferentes pesticidas (Tab.6), novamente observou-se resposta similar à da desidrogenase, isto é, houve nítido estímulo da atividade da arilsulfatase, principalmente na camada de 0-15 cm, onde detectou-se 9,3 μg na subárea sob tratamento e apenas 3,7 μg de p-nitrofenol g^{-1} de solo na subárea que não recebeu endosulfan (Tab.8). Entretanto, diferentemente da desidrogenase, a deltametrina (C.7) inibiu a atividade da arilsulfatase nas duas camadas e a aplicação da mistura paration metílico + deltametrina (C.8) e os resíduos de endosulfan (Tab.6) provocaram pequeno estímulo na camada de 0-15 cm. Portanto, os pesticidas influenciaram diretamente as diferentes enzimas.

Observou-se ainda que os pesticidas paration metílico e deltametrina, quando aplicados em mistura (C.8) provocaram um pequeno estímulo da arilsulfatase na camada superficial e quando aplicados isoladamente (C.2 e C.7) atuaram inibindo a atividade desta enzima. Note-se porém, que em C.2 detectaram-se resíduos de endosulfan e do metabólito endosulfan sulfato. Comparando-se os resultados das duas subáreas, observou-se efeito estimulador após aplicação de monocrotofós (C.1) em ambas as camadas. Porém, já na coleta seguinte [aplicação de paration metílico (C.2, Fig. 2) e com a presença de resíduos de endosulfan e endosulfan sulfato (Tab.6) os valores obtidos foram próximos nas duas subáreas, o que indica que o estímulo do monocrotofós foi temporário e os resíduos detectados não influenciaram.

Em relação à arginina deaminase (Tab.9) observou-se também que sua atividade foi estimulada na área sob tratamento já após a primeira aplicação de monocrotofós (C.1; Tab.9). Continuou sendo estimulada por paration metílico (C.2; Tab.9) e os resíduos de endosulfan (Tab.6); por carbaril (C.3; Tab.9) e resíduos de paration metílico, até o período

Tabela 9 - Atividade da enzima arginina deaminase em solo do campo experimental do Instituto Biológico sob plantio de algodão (média \pm desvio padrão).

Subárea e Profundidade	CLORETO DE AMÔNIO ($\mu\text{g g}^{-1}$ de solo seco hora $^{-1}$)								
	C.0	C.1	C.2	C.3	C.4	C.5	C.6	C.7	C.8
Com tratamentos									
0 - 15 cm	0,050 $\pm 0,001$	0,123 $\pm 0,007$	0,281 $\pm 0,012$	0,367 $\pm 0,049$	0,584 $\pm 0,156$	0,053 $\pm 0,051$	0,011 $\pm 0,005$	0,045 $\pm 0,022$	0,116 $\pm 0,048$
15 - 30 cm	0,025 $\pm 0,002$	0,004 $\pm 0,002$	0,259 $\pm 0,003$	0,285 $\pm 0,120$	0,299 $\pm 0,133$	0,040 $\pm 0,031$	0,001 $\pm 0,000$	0,045 $\pm 0,022$	0,165 $\pm 0,015$
Sem tratamento									
0 - 15 cm	0,050 $\pm 0,001$	0,061 $\pm 0,044$	0,037 $\pm 0,021$	0,065 $\pm 0,034$	0,285 $\pm 0,085$	0,212 $\pm 0,055$	0,007 $\pm 0,006$	0,052 $\pm 0,053$	0,197 $\pm 0,017$
15 - 30 cm	0,025 $\pm 0,002$	0,050 $\pm 0,03$	0,038 $\pm 0,020$	0,047 $\pm 0,046$	0,393 $\pm 0,069$	0,232 $\pm 0,138$	0,010 $\pm 0,002$	0,034 $\pm 0,006$	0,039 $\pm 0,016$

C.0 = antes de qualquer aplicação de pesticida; C.1 = após aplicação de monocrotofos no plantio 1995/96; C.2 = após aplicação de dimetoato, endosulfan, deltametrina, endosulfan e paration metílico; C.3 = endosulfan e carbaril; C.4 = entre os plantios 96/97; C.5 = trifluralina e monocrotofos no plantio 96/97; C.6 = endosulfan, paration metílico e endosulfan; C.7 = após três aplicações da mistura endosulfan + paration metílico e uma de deltametrina; C.8 = deltametrina, endosulfan e paration metílico + deltametrina.

entre os plantios de 1996/97 (C.4; Tab.9), principalmente na camada de 0-15 cm. Entretanto, a atividade desta enzima foi bastante inibida após o tratamento com monocrotofós no segundo plantio em ambas camadas de solo (C.5; Tab.9). Esta diferença pode ter ocorrido pela influência de resíduos de trifluralina, paration metílico e do endosulfan sulfato. Comparando-se as duas subáreas observou-se que a quantidade de NH_4^+ liberado pela atividade da arginina deaminase foi geralmente bem maior na subárea tratada com diferentes pesticidas, o que indica efeito estimulador dos pesticidas sobre esta enzima. Isto está de acordo com TU (1970) que, ao estudar solo tratado com inseticida, encontrou aumento na concentração de nitrogênio amoniacal, e com LANDI *et al.* (1995) que verificaram variação na concentração de N-amoniacal em solo tratado com vários pesticidas. A exceção ocorreu apenas após as duas aplicações de monocrotofós (C.5; Tab.9) no 2º plantio, mas nesta coleta detectaram-se resíduos de paration metílico, trifluralina e endosulfan sulfato.

Notou-se que a atividade das enzimas foi em geral maior na camada de 0-15 cm dos solos (Figs. 20, 21 e 22), como era de se esperar da camada mais rica em matéria orgânica onde a comunidade microbiana é mais numerosa e mais ativa (CARDOSO, 1992; CERRI *et al.*, 1992). Excetua-se a atividade da desidrogenase após aplicação de carbaril (C.3; Tab.7 e Fig.20) e a presença de seus resíduos assim como de paration metílico na subárea que recebeu tratamento com vários pesticidas. Excetua-se também a atividade da arilsulfatase no solo da subárea que não recebeu nenhuma aplicação de pesticidas (Tab.8 e Fig.21) nas coletas correspondentes às aplicações de monocrotofós (C.1) e de carbaril (C.3), nos quais as atividades enzimáticas foram maiores na camada de 15-30 cm. Isto poderia ter sido causado pela lixiviação de resíduos de monocrotofós da camada superficial para a mais profunda, devido à sua grande hidrosolubilidade (ETO, 1976).

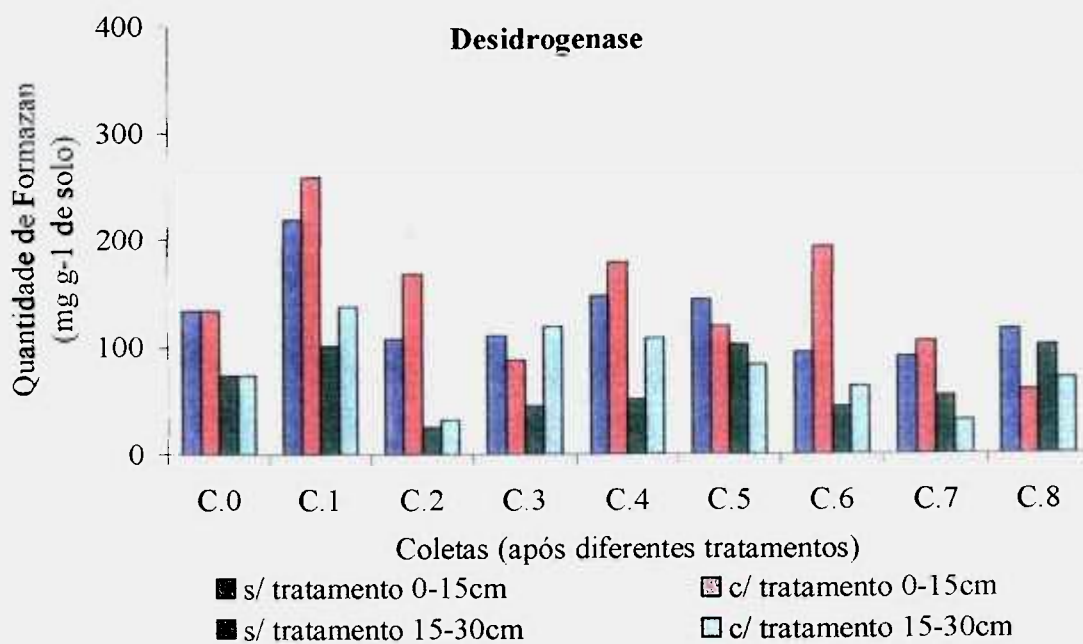


Figura 20 – Atividade da desidrogenase em amostras de solo.

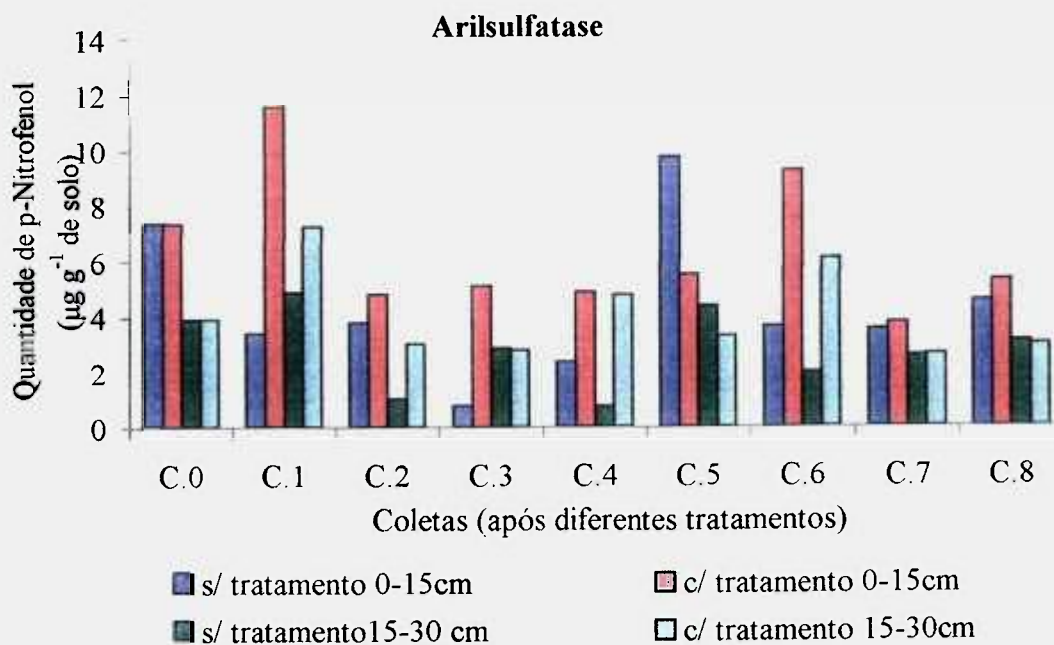


Figura 21 - Atividade da arilsulfatase em amostras de solo.

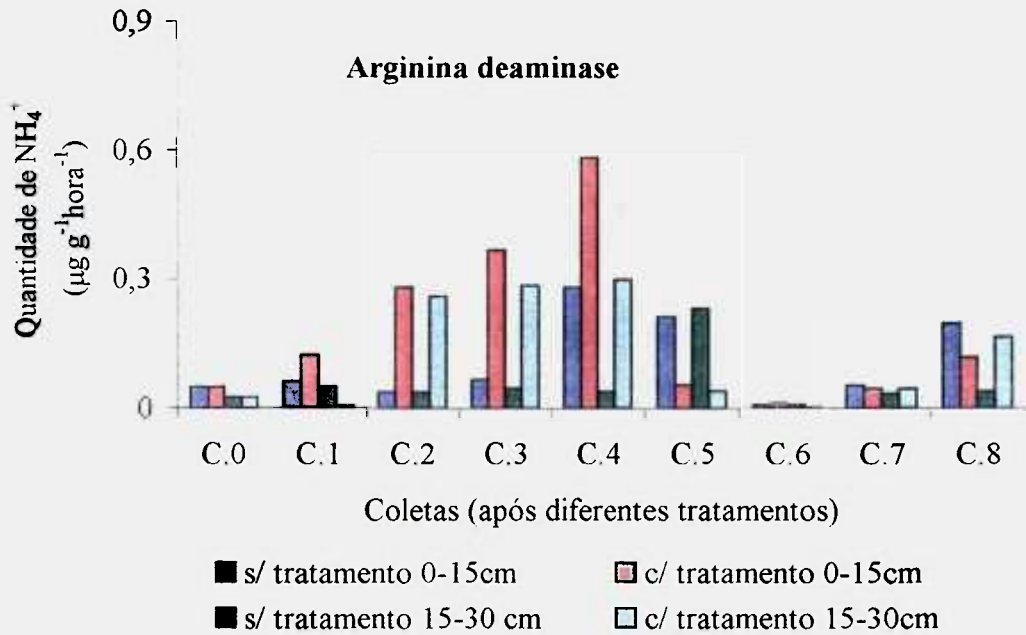


Figura 22 – Atividade da arginina deaminase em amostras de solo.

4.3 - DISPONIBILIDADE DE NITROGÊNIO NO SOLO

Os resultados do conteúdo de nitrogênio presente no solo como NH_4^+ e NO_3^- independentemente da atividade enzimática podem ser observados nas Figs. 23 e 24.

As concentrações de NH_4^+ e NO_3^- presentes no solo das duas camadas foram sempre muito pequenas (de 0,025 a 0,097 μg de NH_4^+ g^{-1} de solo e de 0,008 a 0,113 μg de NO_3^- g^{-1} de solo), e também variaram após as diferentes aplicações de pesticidas (Figs. 23 e 24). Entretanto, aumentos nas concentrações tanto de NH_4^+ como de NO_3^- foram detectados nas duas camadas, principalmente após a aplicação de monocrotofós (C.1; Fig.23). Mas, de modo geral, somente as concentrações de NH_4^+ foram afetadas na camada de 0-15 cm onde verificou-se estímulo, principalmente após aplicação de monocrotofós (C.1), entre plantios (C.4), trifluralina e monocrotofós (C.5) e três aplicações da mistura endosulfan + paration metílico e deltametrina (C.7). As quantidades de NO_3^- foram inibidas principalmente entre plantios (C.4), após aplicação de paration metílico e endosulfan (C.6) e após aplicação de deltametrina, endosulfan e mistura de paration metílico + deltametrina (C.8). Na camada de 15-30 cm notou-se aumentos nas concentrações de NH_4^+ e NO_3^- apenas após aplicação de monocrotofós (C.1); nas outras coletas as variações foram muito pequenas (Figs. 23 e

24). Domsch & Schröder (1986), em citação de SCHUSTER & SCHRÖDER (1990), também observaram aumento na quantidade de nitrogênio mineralizado no solo após aplicação de biocidas, e Malkomes & Wöhler (1983) também citados por SCHUSTER & SCHRÖDER (1990) encontraram diminuição na quantidade de nitrogênio mineralizado, após aplicação de aretit (comumente conhecido como dinoseb) em diferentes solos. Estas diferenças podem ser atribuídas aos diferentes tipos de solo e influência dos diferentes pesticidas utilizados.

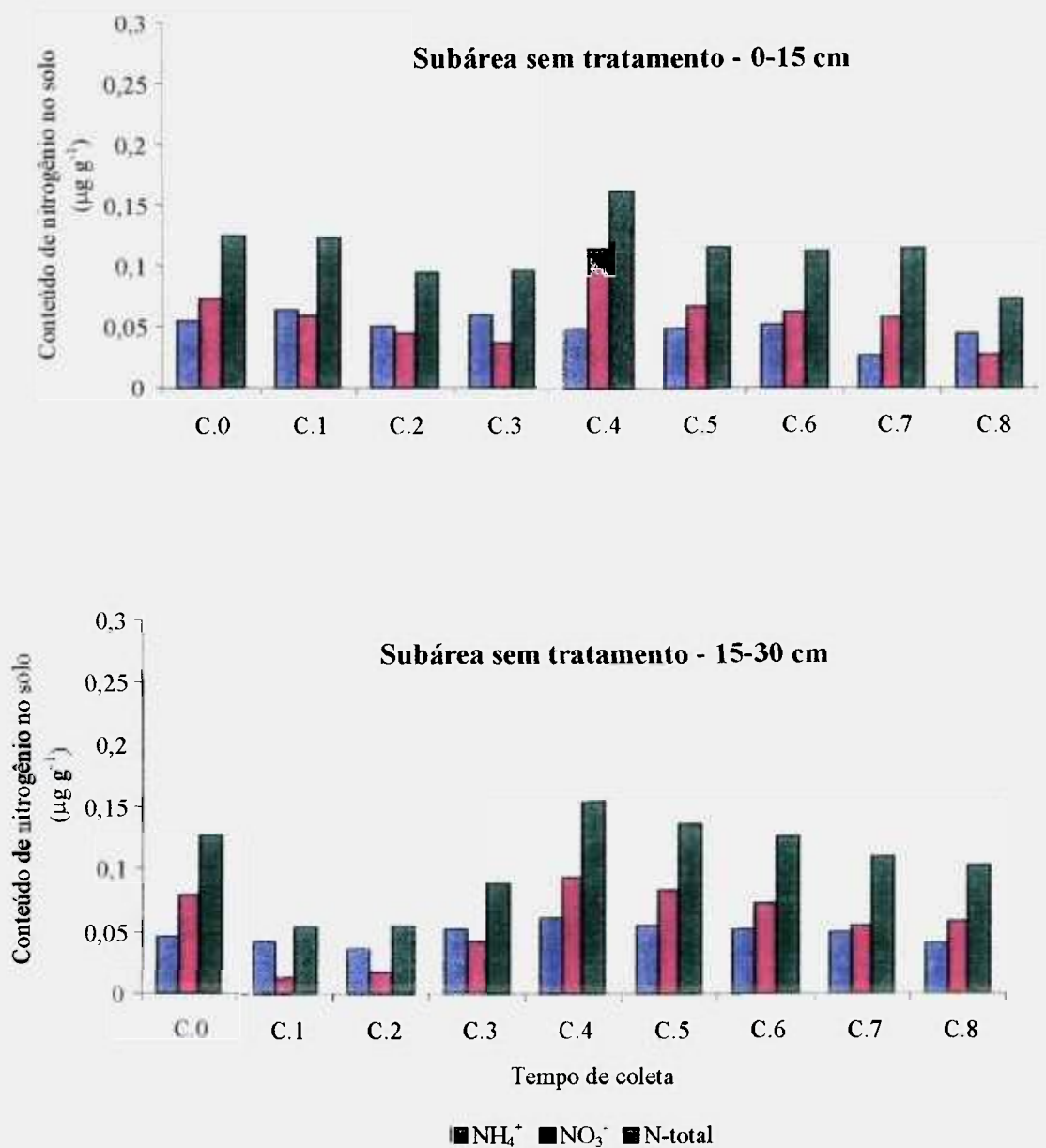


Figura 23 - Conteúdo de nitrogênio presente no solo da subárea sem tratamento.

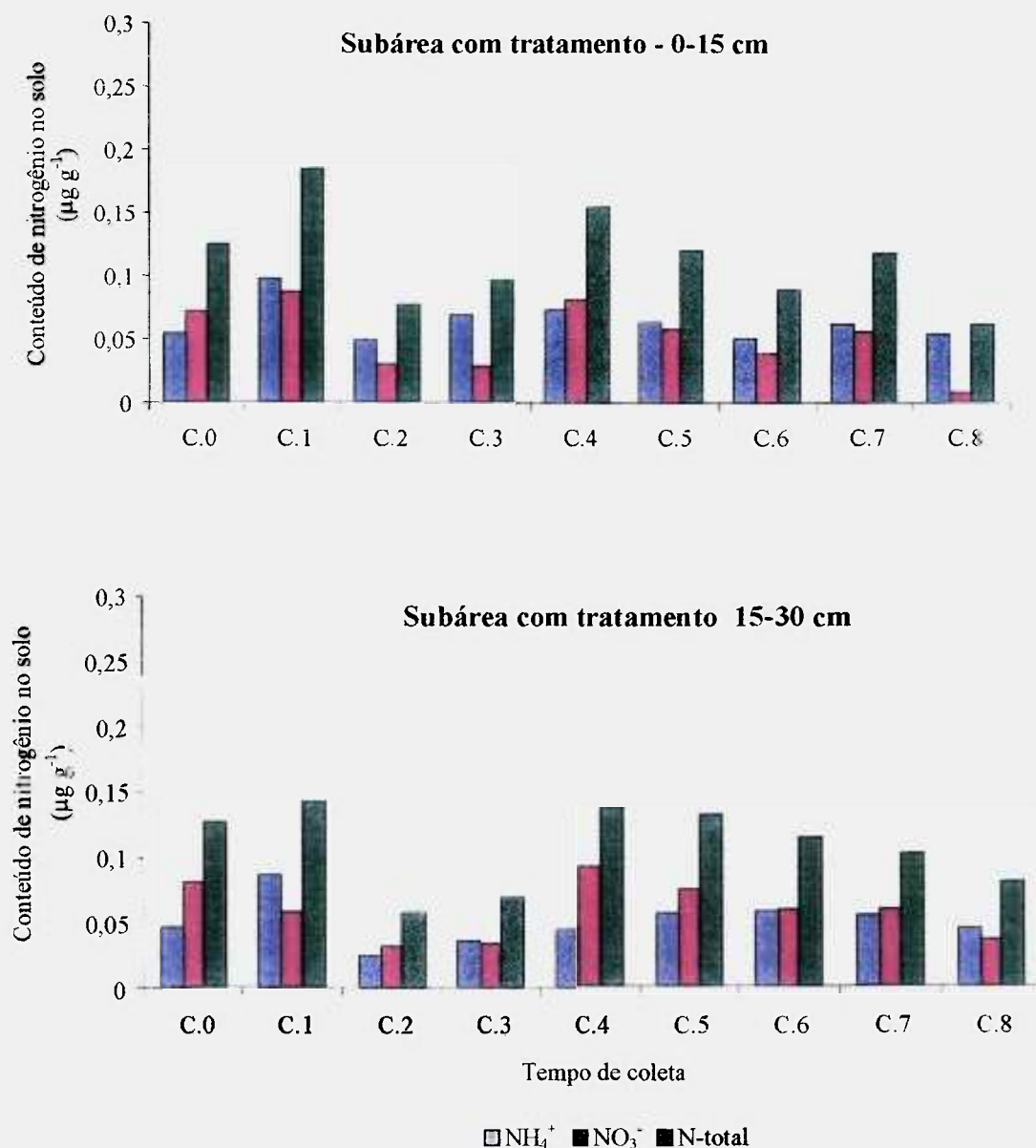


Figura 24 - Conteúdo de nitrogênio presente no solo da subárea tratada com diferentes pesticidas.

4.4 - DISSIPAÇÃO DO ¹⁴C-PARATION METÍLICO

A análise por combustão de amostras das duas camadas de solo do interior dos tubos demonstrou que toda radioatividade proveniente do ¹⁴C-paration metílico foi encontrada sempre só na camada mais superficial (0-15 cm) em todos os tempos de coleta. Isto demonstra que não houve lixiviação do paration metílico e que a dissipação ocorreu a partir da camada de superfície (Figs. 25 e 26).

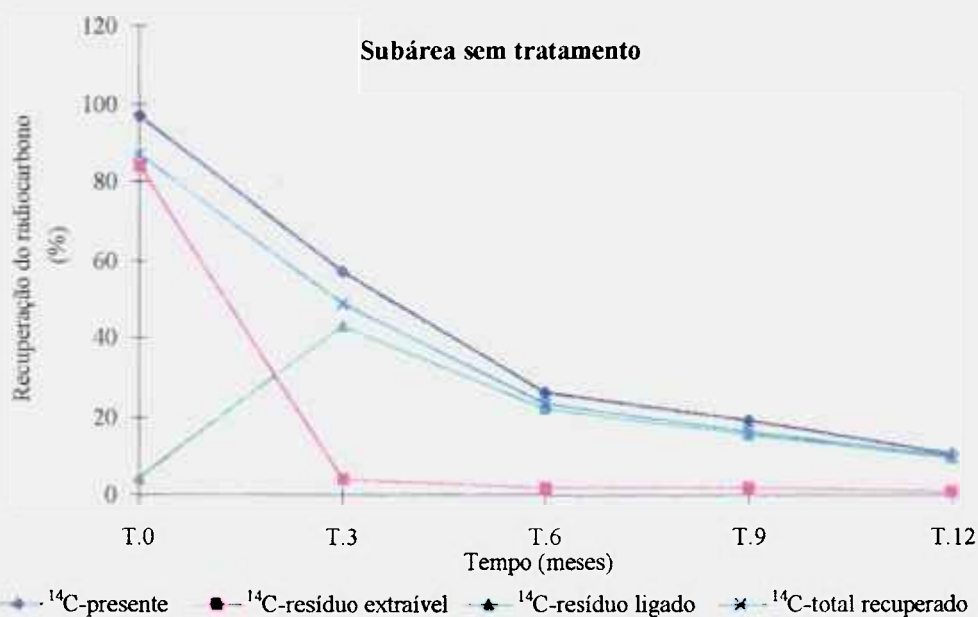


Figura 25 - Distribuição do radiocarbono proveniente de ^{14}C -paration metílico da subárea sem tratamento; camada de 0-15 cm.

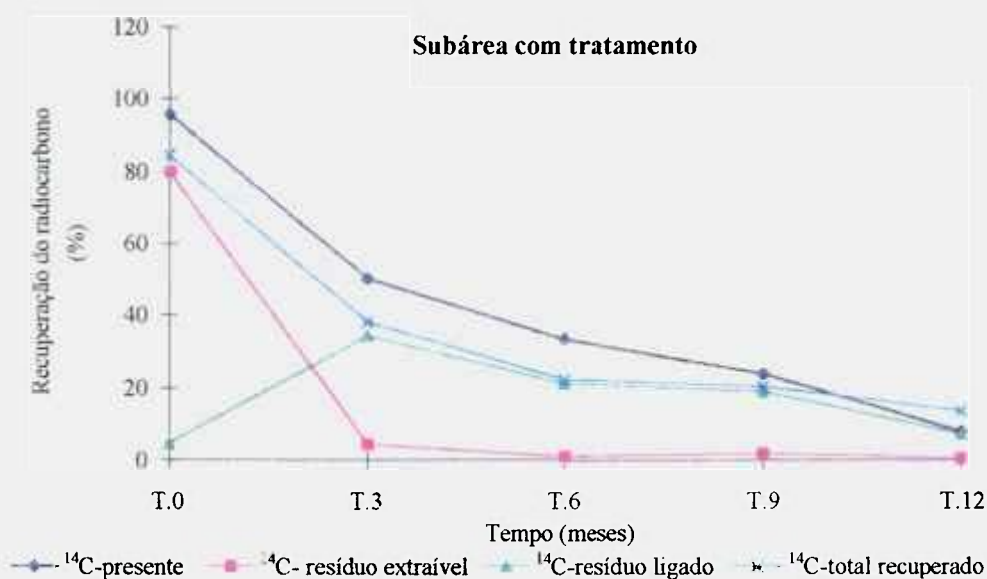


Figura 26 - Distribuição do radiocarbono proveniente de ^{14}C -paration metílico da subárea tratada com vários pesticidas; camada de 0-15 cm.

Imediatamente após o tratamento do solo com ^{14}C -paration metílico (T.0) aproximadamente 97 % e 96 % do radiocarbono aplicado nas duas subáreas (Tabs. 10 e 11) foram recuperados por combustão. Este radiocarbono estava distribuído em 84,1 % como resíduos extraíveis e 4,6 % como resíduos não extraíveis ou ligados na subárea sem

tratamento (Tab. 10) e em 79,7 % como resíduos extraíveis e 4,9 % (Tab. 11) como resíduos ligados na subárea que já havia recebido tratamento com monocrotofos, dimetoato, endossulfan e deltametrina (equivalente a C.2; Fig.2).

Em apenas três meses (período entre as coletas C.3 e C.4; Fig.2) somente 57,0 % e 50,1 % do radiocarbono foram recuperados nas duas subáreas. Entretanto, ainda neste período, a formação de resíduos ligados aumentou de 4,7 % para 43,3 % na subárea controle e de 4,9 % para 34,2 % na subárea tratada com vários pesticidas (Tabs. 10 e 11).

Seis meses após o tratamento com ^{14}C -paration metílico (T.6 - período entre plantios 96/97) recuperou-se apenas 25,9 % e 33,5 % do radiocarbono respectivamente nas duas subáreas, controle e tratada. Neste tempo de coleta, os resíduos ligados diminuíram de 43,3 % para 22,0 % na subárea controle e de 34,23 % para 21,5 % na subárea tratada (Tabs. 10 e 11), e os resíduos extraíveis de 3,9 % para 1,8 % na subárea controle e de 4,4 % para 0,73 % na subárea tratada (Tabs. 10 e 11). Isto pode ter ocorrido por dissipação do radiocarbono para a atmosfera, através de volatilização de produtos de degradação formados no período e por mineralização a $^{14}\text{CO}_2$ destes produtos e do próprio ^{14}C -paration metílico.

Um ano após a aplicação do ^{14}C -paration metílico (correspondente a C.7; Fig.2), somente 10,3 % da radioatividade total aplicada foram recuperados na subárea controle e 7,8 % na subárea tratada (Tabs. 10 e 11). Os resíduos foram detectados principalmente como resíduos ligados (aproximadamente 9 % e 7 %, nas subáreas controle e tratada), um reservatório de disponibilidade lenta (KHAN, 1991) e, portanto, representam pequeno risco poluidor. A formação de resíduos ligados a partir de paration metílico é conhecida e foi observada por vários autores. LICHTENSTEIN *et al.* (1977) também recuperaram apenas 7,0 % do radiocarbono aplicado em solo como paration metílico após 28 dias, sendo 43,0 % destes na forma de resíduos ligados. FUHREMANN & LICHTENSTEIN (1978) encontram 32,2 % como resíduos ligados e somente 18,6 % de extraíveis em apenas 14 dias e apontaram a mineralização do ^{14}C -paration metílico como um dos fatores de perda do radiocarbono.

Uma possível explicação para a alta dissipação do paration metílico no solo poderia ser a ocorrência de hidrólise enzimática deste pesticida no solo, como verificado por.

KISHK *et al.* (1976), principalmente em solo com pH 7, e no presente estudo, o pH encontrado no solo das duas subáreas variou entre 6,1 e 7,0 durante o experimento (Tab.1).

Outros autores estudaram a influência de diferentes fatores na degradação do paration metílico. Já em 1964, LICHTENSTEIN & SCHULZ (1964) verificaram que a umidade e os microrganismos do solo influenciaram na persistência deste inseticida. YARON (1978) apresentou uma revisão de literatura que aponta outros fatores que influenciam na degradação de pesticidas organofosforados. Entre estes citam-se: estrutura e saturação da argila por cátions, sais livres, matéria orgânica e solução do solo, além de fatores ambientais como temperatura e umidade do solo.

A dissipação do ^{14}C -paration metílico foi calculada através do $[^{14}\text{C}]$ detectado e está representada na Fig.27, onde se observa que sua meia-vida foi similar nas duas subáreas, sendo de 3,7 meses na subárea sem tratamento e 3,6 meses na subárea tratada. A rápida dissipação do paration metílico também foi observada por GERSTL & HELLING (1985) que encontraram apenas 54 % do radiocarbono aplicado como ^{14}C -paration metílico, após 49 dias.

Portanto, a aplicação de diferentes pesticidas não influenciou na dissipação do ^{14}C -paration metílico que foi um dos pesticidas utilizados no tratamento. Entretanto, não se sabe se os outros pesticidas isoladamente foram influenciados pelos outros tratamentos, isto é, se ocorreu ação sinérgica ou maior dissipação de alguns dos outros compostos.

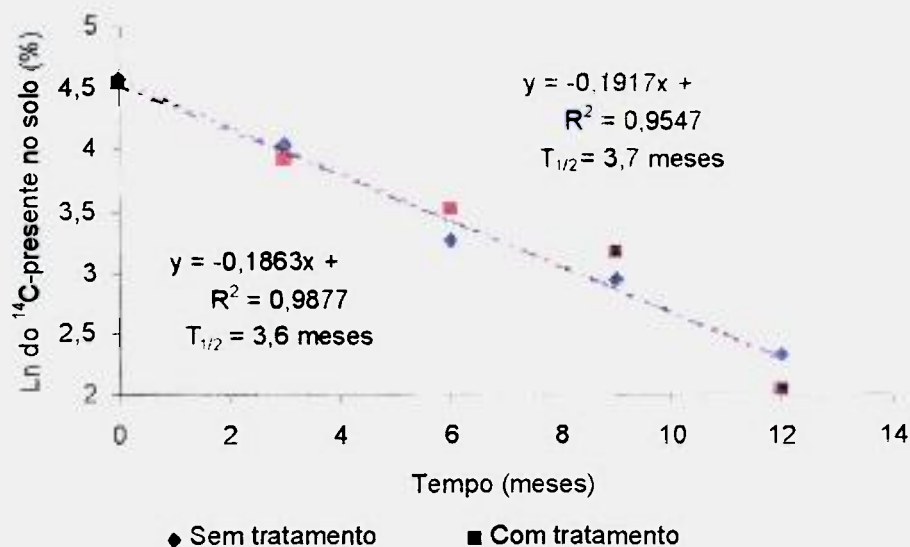


Figura 27 – Meia-vida do ^{14}C -paration metílico em solo.

Tabela 10 – Recuperação do radiocarbono aplicado como ^{14}C -paration metílico em solo sob condições de campo – Subárea sem tratamento com outros pesticidas*; camada 0-15 cm.

Época da Coleta	Tempo (meses)	^{14}C -presente	Resíduo Extraível	Resíduo Ligado	Total Recuperado
			(%)		
Mar/96	0	97,07 ± 0,53	84,11 ± 1,96	4,65 ± 3,67	87,29 ± 2,20
Jun/96	3	56,97 ± 18,34	3,91 ± 3,43	43,28 ± 9,29	47,19 ± 10,13
Set/96	6	25,92 ± 7,09	1,81 ± 1,59	22,00 ± 6,36	23,81 ± 6,88
Dez/96	9	19,07 ± 8,31	1,78 ± 1,39	15,16 ± 7,09	16,94 ± 7,92
Mar/97	12	10,27 ± 8,80	0,78 ± 0,37	9,29 ± 8,56	10,07 ± 4,72

* Atividade aplicada como ^{14}C -paration metílico = 150 kBq por tubo.

Tabela 11 – Recuperação do radiocarbono aplicado como ^{14}C -paration metílico em solo sob condições de campo – Subárea com tratamento com diferentes pesticidas*; camada 0-15 cm.

Época da coleta	Tempo (meses)	^{14}C -presente	Resíduo Extraível	Resíduo Ligado	Total Recuperado
			(%)		
Mar/96	0	95,84 ± 9,42	79,71 ± 3,91	4,89 ± 1,32	84,60 ± 3,42
Jun/96	3	50,12 ± 19,32	4,40 ± 0,98	34,23 ± 12,46	38,63 ± 11,49
Set/96	6	33,50 ± 28,34	0,73 ± 0,49	21,52 ± 3,91	22,25 ± 4,11
Dez/96	9	23,47 ± 11,49	1,71 ± 1,22	18,83 ± 7,59	20,54 ± 8,31
Mar/97	12	7,82 ± 8,06	0,49 ± 0,25	7,09 ± 7,33	7,58 ± 3,79

* Atividade aplicada como ^{14}C -paration metílico = 150 kBq por tubo.

5. CONCLUSÕES

A atividade microbiana do solo, estimada através de atividade enzimática, foi influenciada pela aplicação de diferentes pesticidas. Alguns pesticidas inibiram e outros estimularam a atividade de enzimas. Entre os pesticidas aplicados, o monocrotofós foi o único que estimulou todos os parâmetros estudados, isto é, a atividade das enzimas desidrogenase, arilsulfatase, arginina deaminase e a concentração de nitrogênio do solo. Entretanto, o estímulo provocado pelo monocrotofós foi temporário. Quando resíduos de trifluralina, paration metílico e do metabólito endosulfan sulfato estavam presentes como resíduos no solo, a atividade das três enzimas foi inibida.

De modo geral, as concentrações de nitrogênio mineralizado foram muito baixas e as aplicações de pesticidas pouco alteraram as concentrações de NH_4^+ e NO_3^- do solo.

A persistência no solo variou com o tipo de pesticida e neste sentido, dimetoato e monocrotofós foram os menos persistentes.

A aplicação de diferentes pesticidas não influenciou na dissipação do ^{14}C -paration metílico, pois a meia vida do ^{14}C -paration metílico foi semelhante nas duas subáreas: 3,7 meses na subárea controle e 3,6 meses na subárea tratada com vários pesticidas além do ^{14}C -paration metílico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - ABDELAL, A.T. Arginine catabolism by microorganisms. In: STARR, M.P.; INGRAHAM, J.L.; RAFFEL, S. (Eds.). *Annual review of microbiology*. Palo Alto, California: Annual Reviews, 1979. V. 33. p. 139-169.
- 2 - ADDOR, R.W. Insecticides. In: GODFREY, C.R.A. (Ed). *Agrochemical from natural products*. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 1-62.
- 3 - AIROLDI, F.P.S. *Determinação de pentaclorofenol e hexaclorobenzeno em solo contaminado por resíduos industriais*. São Carlos: 1997. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- 4 - AISLABIE, J.; LLOYD-JONES, G. A review of bacterial degradation of pesticides. *Aust. J. Soil Res.*, v. 33, p. 925-942, 1995.
- 5 - ALEF, K.; KLEINER, D. Arginine ammonification, a simple method to estimate microbial activity potentials in soils. *Soil Biol. Biochem.*, v. 18, n. 2, p. 233-235, 1986.
- 6 - ALEF, K.; KLEINER, D. Applicability of arginine ammonification as indicator of microbial activity in different soil. *Biol. Fertil. Soils*, v. 5, p. 148-151, 1987a.
- 7 - ALEF, K.; KLEINER, D. Estimation of anaerobic microbial activities in soil by arginine ammonification and glucose-dependent CO₂ - production. *Soil Biol. Biochem.*, v. 19, n. 6, p. 683-686, 1987b.
- 8 - ALEF, K.; NANNIPIERI, P. Enzyme activities. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Eds.). *Methods in applied Soil Microbiology and Biochemistry*. London:

Academic, 1995. p. 311-312.

- 9 - ALEXANDER, M. Ecological interrelation. In: ALEXANDER, M. (Ed.). *Introduction to soil microbiology*. New York: John Wiley & Sons, 1977. p. 405-456.
- 10 - AL-KHAFAJI, A.A.; TABATABAI, M.A. Effects of trace elements on arylsulfatase activity in soils. *Soil Sci.*, v. 127, p. 129-133, 1979.
- 11 - ANDRÉA, M.M.; LORD, K.A.; BROMILOW, R.H.; RÜEGG, E.F. Degradação do paration [^{14}C] em dois solos do Estado de São Paulo. *R. Bras. Ci. Solo*, v. 4, p. 75-78, 1980.
- 12 - 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.
- 13 - ANDREA, M.M.; RÜEGG, E.F.; MELLO, M.H.S.H.; TOMITA, R.Y. Bio-degradação do ^{14}C -DDT em solo. *Arq. Inst. Biol.*, v.57, n. 1/2, p. 21-24, 1990.
- 14 - ANDRÉA, M.M. *Formação e bio-liberação de resíduos-ligados de [^{14}C]-lindano e [^{14}C]-paration em dois solos brasileiros*. São Paulo: 1992. Tese (Doutoramento) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo.
- 15 - ANDRÉA, M.M.; LUCHINI, L.C.; MELLO, M.H.S.H. de; TOMITA, R.Y.; MESQUITA, T.B.; MUSUMECI, M.R. Dissipation and degradation of DDT, DDE and paration in Brazilian soils. *J. Environ. Sci. Health*, v. B 29, n. 1, p. 121-132, 1994 a.
- 16 - ANDRÉA, M.M.; TOMITA, R.Y.; LUCHINI, L.C.; MUSUMECI, M.R. Laboratory studies on volatilization and mineralization of ^{14}C -p-p'-DDT in soil, release of bound residues and dissipation from solid surfaces. *J. Environ. Sci. Health*, v. B

- 29, n. 1, p. 133-139, 1994 b.
- 17 - ANDRÉA, M.M.; WIENDL, F.M. Formation and biorelease of bound residues of pesticides in two Brazilian soils. II. [^{14}C] - paration. *Pesq. Agropec. Bras.*, v. 30, n. 5, p. 695-700, 1995.
- 18 - ANDRÉA, M.M.; PERES, T.B.; LUCHINI, L.C.; PETTINELLI, A.Jr. Impact of long-term pesticide application on some soil biological parameters. *J. Environ. Sci. Health*, v. B 35, n. 3, p. 297-307, 2.000 a.
- 19 - ANDRÉA, M.M.; PERES, T.B.; MATALLO, M.B. Effect of haloxyfop-methyl on some soil biological parameters. In: THIRD INTERNATIONAL WEED SCIENCE CONGRESS, June 6-11, 2000 b, Foz do Iguassu. *Abstracts of the IWSC*. Oregon, USA: International Weed Science Society, 2000 b. p.127.
- 20 - ANNUNZIATA, M.F.L. *Radiotracer in agricultural chemistry*. London: Academic, 1979.
- 21 - ATLAS, R.B.; BARTHA, R. Microbial interactions with xenobiotic and inorganic pollutants. In: ATLAS, R.B.; BARTHA, R. (Eds). *Microbial ecology - fundamentals and applications*. 3. ed. Redwood City, California: The Benjamin/Cummings, 1992. p. 383-416.
- 22 - BENITEZ, E.; NOGALES, R.; ELVIRA, C.; MASCIANDARO, G.; CECCANTI, B. Enzyme and earthworm activities during vermicomposting of carbaryl-treated sewage sludge. *J. Environ. Qual.*, v. 28, p. 1099-1104, 1999.
- 23 - BROOKS, G.T. *Chlorinated insecticides technology and application*. Cleveland, Ohio: CRC, 1974.
- 24 - BROWN, H.M.; KEARNEY, P.C. Plant biochemistry, environmental properties and global impact of the sulfonylureas herbicides. In: BAKER, D.R.; FENYES, J.G.;

- MOBERG, W.K. (Eds). *Synthesis and chemistry of agrochemicals II*. Washington: American Chemical Society, 1991.
- 25 - CAMARGO, O.A. de ; MONIZ, A.C. ; JORGE, J.A. ; VALADARES, J.M.A.S. Métodos de análises química, mineralógica e física de solos. *Boletim Técnico do Instituto Agronômico*, v. 106, p. 94, 1986.
- 26 - CARDOSO, E.J.B.N. Ecologia microbiana do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Eds.). *Microbiologia do solo*. Campinas: SBPC, 1992. p. 33-39.
- 27 - CASIDA JUNIOR, L.E.; KLEIN, D.A.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.*, v. 98, p. 371-376, 1964.
- 28 - CERRI, C.C.; ANDREUX, F.; EDUARDO, B.P. Ecologia microbiana do solo. In: CARDOSO, E.J.B.N.; TSAI, S.M.; NEVES, M.C.P. (Eds.). *Microbiologia do solo*. Campinas: SBPC, 1992. p. 73-89.
- 29 - COUTO, M.B.S. *Metodologia para análise de herbicidas clorofenoxiacéticos e clorofenóis em amostras de água*. Rio de Janeiro: 1995. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- 30 - CREMLYN, R. *Pesticides: preparation and mode of action*. Chichester: John Wiley & Sons, 1978.
- 31 - DICK, W.A.; TABATABAI, M.A. Significance and potential use of soil enzymes. In: MITTING JUNIOR, F.B. (Ed.). *Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management*. New York, N.Y.: Marcel Dekker, 1993. p. 95-127.
- 32 - EDWARDS, C.A. Pesticides and the micro-fauna of soil and water. In : HILL, I.R.; WRIGTH, J.L. (Eds.). *Pesticide microbiology*. Microbiological aspects of

- pesticide behaviour in the environment. London: Academic, 1978. p. 603-622.
- 33 - ETO, M. *Organophosphorus pesticides: organic and biological chemistry*. Cleveland, Ohio: CRC, 1976.
- 34 - FERNANDES, M.S. *Absorção e metabolismo de nitrogênio em plantas*. Itaguaí: Universidade Rural do Rio de Janeiro, 1978 (Boletim Técnico, n.1).
- 35 - FLASHINSKI, S.J.; LICHTENSTEIN, E.P. Metabolism of dyfonate by soil fungi. *Can. J. Microbiol.*, v. 20, p. 399-411, 1974.
- 36 - FOURNIER, J.C.; SOULAS, G.; PAREKH, N.R. Main microbial mechanisms of pesticide degradation in soils. In: TARRADELLAS, J.; BITTON, G.; ROSSEL, D. (Eds). *Soil ecotoxicology*. Boca Raton: CRC, 1997. p. 85-116.
- 37 - FRIED, M.I. Historical introduction to the use of nuclear techniques for food and agriculture. *International Atomic Agency Bulletin*, v. 18, suppl., p. 4-12, 1976.
- 38 - FRIEDEL, J.K.; MÖLTER, K.; FISCHER, W.R. Comparison and improvement of methods for determining soil dehydrogenase activity using triphenylterazolium chloride and idonitrotetrazolium chloride. *Biol. Fertil. Soils*, v. 18, p. 291-296, 1994.
- 39 - FÜHR, H. Radiotracers in pesticide studies. Advantages and limitations. *Cienc. e Cult.*, v. 43, n. 3, p. 211-216, 1991.
- 40 - FUHREMANN, T.W.; LICHTENSTEIN, P. Release of soil-bound methyl ¹⁴C-parathion residues and their uptake by earthworms and plants. *J. Agric. Food Chem.*, v.26, n. 3, p. 605-610, 1978.
- 41 - GELMINI, G.A.; NOVO, J.P.S.; ZAMARIOLLI, D.P. Coletânea de portarias e informações gerais sobre defensivos agrícolas e receituário agrônômico. Governo

do Estado de São Paulo. Secretaria de Agricultura e Abastecimento. Coordenadoria de Assistência Técnica Integral. Impresso especial CATI, Campinas, 1986.

- 42 - GERMIDA, J.J.; WAINWRIGHT, M.; GUPTA, V.S.R. Biochemistry of sulfur cycling in soil. In: STOTZKY, G.; BOLLAG, J.-M. (Eds.). *Soil biochemistry*. New York, N.Y.: Marcel Dekker, 1992. V.7. p. 1-53.
- 43 - GERSTL, Z.; HELLING, C. Fate of bound methyl parathion in soil as affected by agronomic practices. *Soil Biol. Biochem.*, v. 17, n. 5, p. 667-673, 1985.
- 44 - GILE, J.D.; GILLET, J.W. Transport and fate of organophosphate insecticides in a laboratory model. *J. Agric. Food Chem.*, v. 29, p. 616-621, 1981.
- 45 - GONZÁLEZ, C. de la C. *Metodología para determinación de residuos de plaguicidas en agua: aplicación al acuífero de La Vega de Granada*. Granada (Espanha): 1996. Tese (Doutoramento) - Departamento de Ciencias de la Tierra y Química Ambiental de la Estación Experimental del Zaidín, Universidad de Granada.
- 46 - GREAVES, M.P. Side-effects testing: an alternative approach. In: SOMERVILLE, L.; GREAVES, M.P. (Eds.). *Pesticide effects on soil microflora*. London: Taylor & Francis, 1987. p. 185-190.
- 47 - GRIDI-PAPP, I.L.; CIA, E.; FUZATTO, M.G.; SILVA, N.M.; FERRAZ, C.A.M.; CARVALHO, N.; CARVALHO, L.H.; SABINO, N.P.; KONDO, J.I.; PASSOS, S.M.G.; CHIAVEGATO, E.J.; CAMARGO, P.P.; CAVALERI, P.A. *Manual do produtor do algodão*. São Paulo: Bolsa de Mercadorias & Futuros, 1992.
- 48 - HELTBOLD, A.E. Persistence of pesticides in soil. In: GUENZI, W.D. (Ed.). *Pesticides in soil & water*. Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America, 1974. p. 203-220.

- 49 - HENRICK, C.A. Pyrethroids. In: GODFREY, C.R.A. (Ed.). *Agrochemical from natural products*. New York: Marcel Dekker, 1995. p. 63-144.
- 50 - HILL, I.R. Microbial transformation of pesticides. In: HILL, I.R.; WRIGTH, J.L. (Eds.). *Pesticide microbiology*. Microbiological aspects of pesticide behaviour in the environment. London: Academic, p. 137-202, 1978.
- 51 - HUND, K.; ZELLES, L.; SCHEUNERT, I.; KORTE, F. A critical estimation of methods for measuring side-effects of chemicals on microorganisms in soils. *Chemosphere*, v. 17, n. 6, p. 1183- 1188, 1988.
- 52 - KATAN, J.; LICHTENSTEIN, E.P. Mechanisms of production of soil-bound residues of [¹⁴C]-parathion by microorganisms. *J. Agric. Food Chem.*, v. 25, n. 6, p. 1404-1408, 1977.
- 53 - KEARNEY, P.C.; KAUFMAN, D.D. Degradation by microorganisms. In: KEARNEY, P.C.; KAUFMAN, D.D. (Eds.). *Herbicides – Chemistry, degradation and mode of action*. New York: Marcel Dekker, 1976. p. 35-50.
- 54- KHAN, S.U. Bound (nonextractable) pesticide degradation products in soils. Bioavailability to plants. In: SOMASUNDARAM, L.; COATS, J.R. (Eds.). *Pesticide transformation products: fate and significance in the environment*. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1991. p. 108-121 (ACS Symposium Series, 459).
- 55 - KISHK, F.M.; EL-ESSAKI, T.; ABDEL-GHAFAR, S.; ABOU-DONIA, M.B. Hidrolisis of methyl-parathion in soil. *J. Agric. Food Chem.*, v. 24, n. 2, p. 305-307, 1976.
- 56 - KLOOSE, S.; MOORE, J.M. & TABATABAI, M.A. Arylsulfatase activity of microbial biomass in soil as affected by cropping systems. *Biol. Fertil. Soils*, v. 29, p. 46-54, 1999.

- 57 - LANDI, L.; BADALUCCO, L.; NANNIPIERI, P. Changes in inorganic N and CO₂ evolution in soil induced by L-methionine-sulphoximine. *Soil Biol. Biochem.*, v. 27, n. 10, p. 1345-1351, 1995.
- 58 - LARINI, L. *Toxicologia dos praguicidas*. São Paulo: Manole, 1999.
- 59 - LICHTENSTEIN, E.P.; SCHULZ, K.R. The effects of moisture and microorganisms on the persistence and metabolism of some organophosphorous insecticides in soils, with special emphasis on parathion. *J. Econ. Entomol.*, v. 57, n. 5, p. 618-627, 1964.
- 60 - LICHTENSTEIN, E.P.; KATAN, J.; ANDEREGG, B.N. Binding of "persistent and nonpersistent" ¹⁴C-labeled insecticides in agricultural soil. *J. Agric. Food Chem.*, v. 25, n. 1, p. 43-47, 1977.
- 61 - LIN, Q.; BROOKES, P.C. Arginine ammonification as a method to estimate soil microbial biomass and microbial community structure. *Soil Biol. Biochem.*, v. 31, p. 1985-1997, 1999.
- 62 - LUCHINI, L.C. *Adsorção 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.
- 63 - LUCHINI, L.C.; COSTA, M.C.; OSTIS, S.B.; MUSUMECI, M.R.; NAKAGAWA, L.E.; ANDRÉA, M.M.; MATALLO, M.B. Behaviour of diuron in a sand clay soils from São Paulo state, Brazil. In: IX SIMPOSIUM PESTICIDE CHEMISTRY. DEGRADATION AND MOBILITY OF XENOBIOTICS, October 11-13, 1993, Piacenza. *Proceedings of the IX Symposium Pesticide Chemistry*. Lucca: Biagini, 1993. p.127-133.
- 64 - LUCHINI, L.C. *Degradação do inseticida paration etílico em diversas matrizes ambientais por meio de radiação ionizante gama (γ) do Cobalto-60*. São Carlos:

1995. Tese (Doutoramento) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- 65 - LUCHINI, L.C.; PERES, T.B.; ANDRÉA, M.M. Monitoring of pesticides in a cotton crop soil. *J. Environ. Sci. Health*, v. B 35, n. 1, p. 51-59, 1999.
- 66 - MATALLO, M.B. *Estudio comparado de la degradación y transporte de enantiomeros de plaguicidas en el medio ambiente*. Córdoba (Espanha): 1997. Tese (Doutoramento) - Departamento de Química Agrícola y Edafología - Escola Técnica Superior de Ingenieros Agronomos y Montes, Universidade de Córdoba.
- 67 - MEIER, P.C.; ZÜND, R.E. *Statistical methods in analytical chemistry*. New York, N.Y.: John Wiley & Sons, 1993.
- 68 - MESQUITA, T.B.; RÜEGG, E. F. Influência de agentes tensoativos na detecção da radiação beta. *Ci. e Cult.*, v. 35, n.3, p. 446-450, 1984.
- 69 - MICK, D.L.; DAHM, P.A. Metabolism of parathion by two species of *Rhizobium*. *J. Econ. Ent.*, v. 63, p. 1155-1159, 1970.
- 70 - MORIARTY, F. Exposure and residues. In: MORIARTY, F. (Ed). *Organochlorine insecticides: persistent organic pollutants*. London: Academic, 1975.
- 71 - MUNNECKE, D.M.; HSIEH, D.P. Pathways of microbial metabolism of parathion. *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 31, n.1, p. 63-69, 1976.
- 72 - MUSUMECI, M.R.; RÜEGG, E.F. Degradação microbiana do fungicida metalaxil no solo. *Fitopatol. Bras.* n. 9, p. 583-591, 1984.
- 73 - NAKAGAWA, L.E; LUCHINI, L.C.; MUSUMECI, M.R.; MATALLO, M.B. Behaviour of atrazine in soils of tropical zone. Degradation, mobility and uptake of residues from soils in a crop rotation system (maize/beans). *J. Environ. Sci. Health*, v. B 31, n. 2, p. 203-224, 1996.

- 74 - NAKAGAWA, L.E. *Comportamento do herbicida atrazina em solo: formação e liberação de resíduos ligados*. São Paulo: 1997. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Ecologia Geral, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.
- 75 - NANNIPIERI, P. Microbial biomass and activity measurements in soil: ecological significance. In: KLUG, M.J.; REDDY, C.A. (Eds.). *Current perspectives in microbial ecology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1984. p. 515-521.
- 76 - NANNIPIERI, P.; GRECO, S.; CECCANTI, B. Ecological significance of the biological activity in soil. In: BOLLAG, J.M.; STOTZKY, G. (Eds.). *Soil biochemistry*. New York, N.Y.: Marcel Dekker, 1990. V.6 . p. 293-355.
- 77 - OU, L.T.; SHARMA, A. Degradation of methyl parathion by a mixed bacterial culture and a *Bacillus sp.* isolated from different soils. *J. Agric. Food Chem.*, v. 37, p. 1514-1518, 1989.
- 78 - PARR, J.F. Effects of pesticides on microorganisms in soil and water. In: GUENZI, W.D. (Ed.). *Pesticides in soil & water*. Madison, Wisconsin: Soil Science Society of America, 1974. p. 315-386.
- 79 - PASCHOAL, A.D. *Pragas, praguicidas e a crise ambiental: problemas e soluções*. Rio de Janeiro, R.J.: Fundação Getúlio Vargas, 1979.
- 80 - RACKE, K.D. Persistence in the soil microbial system. In: RACKE, K.D.; COATS, J.R. (Eds.). *Enhanced biodegradation of pesticides in the environment*. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1990. p. 1-12 (ACS Symposium Series 426).
- 81 - RACKE, K.D.; COATS, J.R. Enhanced biodegradation of pesticides in midwestern

- corn soils. In: RACKE, K.D.; COATS, J.R.(Eds.). *Enhanced biodegradation of pesticides in the environment*. Washington, D.C.: American Chemical Society, 1990. p. 82-97 (ACS Symposium Series 426).
- 82 - ROSSEL, D.; TARRADELLAS, J.; BITTON, G.; MOREL, J.L. Use of enzymes in soil ecotoxicology: a case for dehydrogenase and hydrolytic enzymes. In: TARRADELLAS, J.; BITTON, G.; ROSSEL, D. (Eds). *Soil ecotoxicology*. Boca Raton: CRC, 1997. p. 179-206.
- 83 - SCHINNER, F.; ÖHLINGER, R.; MARGESIN, R. *Methods in soil biology*. Berlin: Springer-Verlag, 1996.
- 84 - SCHUSTER, E.; SCHRÖDER, D. Effects of sequentially-applied pesticides on non-target soil microorganisms: field experiments. *Soil Biol. Biochem.*, v. 22, n. 3, p. 367-373, 1990.
- 85 - SEIDEL, V.; LINDNER, W. Evaluation of a supercritical fluid extraction method for hexachlorobenzene from artificially spiked and naturally contaminated oil seed and soil sample. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, v. 59, p. 1-13, 1995.
- 86 - SHARMILA, M.; RAMANAND, K.; SETHUNATHAN, N. Effect of yeast extract on the degradation of organophosphorus insecticides by soil enrichment and bacterial cultures. *Can. J. Microbiol.*, v. 35, p. 1105-1110, 1989.
- 87 - SIDARAMAPPA, R.; RAJARAM, K.P.; SETHUMATHAN, N. Degradation of parathion by bacteria isolated from flooded soil. *Appl. Microbiol.*, v. 26, p. 846-849, 1973.
- 88 - SKUJINS, J. History of abiotic soil enzyme research. In: BURNS, R.G. (Ed). *Soil enzymes*. London: Academic, 1978. p. 1-49.
- 89 - SOULAS, G. Evidence for the existence of different physiological groups in the microbial community responsible for 2,4-D mineralization in soil. *Soil Biol.*

- Biochem.*, v. 25, n. 4, p. 443-449, 1993.
- 90 - SPEIR, T.W.; ROSS, D.J. Soil phosphatase and sulphatase. In: BURNS, R.G. (Ed.). *Soil enzymes*. London: Academic, 1978. p. 197-250.
- 91 - STEVENSON, J.L. Dehydrogenase activity in soils. *Can. J. Microbiol.*, v. 5, p. 229-235, 1959.
- 92 - TABATABAI, M.A.; BREMNER, J.M. Arylsulfatase activity of soil. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.*, v. 34, p. 225-229, 1970.
- 93 - TABATABAI, M.A. Soil enzymes. In: PACE, A.L.; MILLER, R.H.; KEENEY, D.R. (Eds.). *Methods of soil analysis*. Part 2. Chemical and microbiological properties. 2. ed. Agronomic monograph, n° 9. Madison, Wisconsin: SSA, 1982. p. 903-947.
- 94 - TOPP, E.; VALLAEYS, T.; SOULAS, G. Microbial degradation and effects on microorganisms. In: ELSAS, J.D. van; TREVORS, J.T.; WELLINGTON, E.M.H. (Eds.). *Modern soil microbiology*. New York, N.Y.: Marcel Dekker, 1997. p. 546-575.
- 95 - TREVORS, J.T. Dehydrogenase activity in soil: a comparison between the INT and TTC assay. *Soil Biol. Biochem.*, v. 16, n. 6, p. 673-674, 1984.
- 96 - TU, C.M. Effect of four organophosphorus insecticides on microbial activities in soil. *Appl. Microbiol.*, v. 19, p. 479-484, 1970.
- 97 - TU, C.M. Effects of some pesticides on enzyme activities in an organic soil. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*, v. 27, p. 109-114, 1981.
- 98 - TU, C.M. Effect of five insecticides on microbial and enzymatic activities in sandy soil. *J. Environ. Sci. Health*, v. B 30, n. 3, p. 289-306, 1995.

- 99 - VICINO, J.R. *Extração em fase sólida de pesticidas organofosforados e organoclorados em matrizes aquosas*. São Carlos: 1993. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.
- 100 - 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.
- 101 - YARON, B. Chemical conversion of pesticides in the soil medium: the organophosphates. In: GEISBÜHLER, H. (Ed.). Part 3. *IUPAC Advances in pesticide science*. Zurich: Pergamon, 1978. p. 577-585.
- 101 - YENTUMI, S.D.; JOHNSON, D.B. Changes in soil microflora in response to repeated application of some pesticides. *Soil Biol. Biochem.*, v. 18, n. 6, p. 629-635, 1986.
- 101 - ZAMBRONE, F.A.D. Perigosa família. *Ciência Hoje*, v. 4, n. 22, p. 44-47, 1986.
- 102 - ZELLES, L.; SCHEUNERT, I.; KORTE, F. Comparison of methods to test chemicals for side effects on soil microorganisms. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, v. 12, p. 53-69, 1986.
- 103 - ZUIN, V.G. *Determinação de pentaclorofenol e hexaclorobenzeno em águas naturais de superfície de áreas afetadas por resíduos de organoclorados*. São Carlos: 1997. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.