**DISTRIBUIÇÃO DO HERBICIDA ^{14}C -ATRAZINA NA MATÉRIA
ORGÂNICA DE DOIS SOLOS E REMOBILIZAÇÃO DE SEUS
RESÍDUOS LIGADOS EM ÁCIDOS FÚLVICOS**

MARIA DE FÁTIMA DA SILVA PINTO PEIXOTO

Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. ARQUIMEDES LAVORENTI

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Quieroz", Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia, Área de Concentração:
Solos e Nutrição de Plantas.

PIRACICABA

Estado de São Paulo – Brasil

Novembro - 1998

ERRATA

Tese de Doutorado “Distribuição do herbicida ^{14}C -atrazina na matéria orgânica de dois solos e remobilização de seus resíduos ligados em ácidos fúlvicos”

Página	Linha	Onde se lê	Alterar para
2	3	detectados somente após	detectados após
10	17	bacterianas como	bacterianas
13	26	permaneceram após	permaneceram na matriz após
14	19	com ^{14}C marcado	marcadas com ^{14}C
18	11	principal responsável pela	principal sitio de
18	17	principal local onde ocorrem as	principal componente das ligações
24	9	ligado de ácidos	ligado de anilazina em ácidos
25	13	no Distrito de Tanquinho e no Município de Piracicaba – SP, respectivamente	no Município de Piracicaba – SP
26	2	*Carbonos radiomarcados com ^{14}C	*Posições da molécula marcada com ^{14}C
39	1	atividade	biomassa
42	Eixo do Y	Radioatividade aplicada (%)	% da Radioatividade aplicada
44	Tabela 2	total de ^{14}C -atrazina	do radiocarbono total
45	Tabela 3	total de ^{14}C -atrazina	do radiocarbono total
46	Tabela 4	da radioatividade extraída	do radiocarbono extraído
49	Eixo do Y	Radioatividade aplicada (%)	% da radioatividade aplicada
53	Tabela 7	do estudo	dos ^{14}C -compostos no estudo
54	Eixo dos Y's	Radioatividade aplicada (%)	% da radioatividade aplicada
55	Tabela 8	do estudo	dos ^{14}C -compostos no estudo
57	Tabela 9	da radioatividade extraída ou dessorvida	do radiocarbono extraído e dessorvido
58	3	mineralização,	mineralização no solo LE,

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Peixoto, Maria de Fátima da Silva Pinto

Distribuição do herbicida ^{14}C -atrazina na matéria orgânica de dois solos e remobilização de seus resíduos ligados em ácidos fúlvicos / Maria de Fátima da Silva Pinto Peixoto. -- Piracicaba, 1998.

80 p. : il.

Tese (doutorado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 1998.
Bibliografia.

1. Ácido fúlvico 2. Ácido húmico 3. Matéria orgânica 4. Química do solo 5.
Resíduo de herbicida I. Título

CDD 631.417

À Deus, por nos iluminar nos
momentos mais difíceis desta
caminhada.

OFEREÇO

“ Não importa o barco;
Não importa o seu tamanho;
Não importa para onde vá;
Mesmo que para além do sol;
Haverá sempre um barco...”

Autor Anônimo

À meu esposo Clóvis, companheiro
das minhas realizações.

Aos meus filhos Samantha e Caio
César, pelo amor e paciência.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Química Agrícola e Solos, da Universidade Federal da Bahia, à Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ/USP) e ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP), pela oportunidade oferecida para a realização deste Curso.

Ao programa CAPES/PICDT pela bolsa de estudo concedida durante o transcorrer do curso.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro para a condução desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Arquimedes Lavorenti, pela amizade, incentivo constante e valiosa orientação para a realização deste trabalho.

A amiga e companheira Dra. Jussara Borges Regitano, pela acolhida, amizade, sugestões e constantes ensinamentos.

Ao Dr. Valdemar Luiz Tornisielo pelo apoio e todas as facilidades oferecidas para a realização deste trabalho.

A Dra. Regina Tereza Rosim Monteiro, pelo apoio recebido.

A amiga e funcionária do setor de Ecotoxicologia do CENA/USP, Rosângela Aparecida DGaspari Rocha, pelo carinho, paciência e colaboração na realização das análises laboratoriais.

Aos funcionários Armelinda, Angélica, Rita, Lenita, Gertrudes, Carlos e Janaína do Departamento de Química da ESALQ/USP e Dorelli da Seção de Ecotoxicologia do CENA/USP, pelo grande apoio no transcorrer deste Curso.

Aos amigos Cidinha, Célia, Edna, Eduardo, Artur, Leonardo, Mariana e Júlio pela convivência harmoniosa.

Aos colegas, amigos e conterrâneos Carlos Alfredo, Francisco Adriano, Gilson Rezende (In memorian), Carlos Augusto, Elvis, Angélica, Marta e Marcellus, pela convivência fraterna.

Aos colegas de Curso, Ana Rosa, Fernando, Tadeu, João, Reinaldo, Oscarlina, Adriana, Marcelo, Fábio Prata, Fábio Valle, Edna, Marchiori, Aderbal e Elizabeth Fay, pelo companheirismo na vida acadêmica.

Às bibliotecárias Kátia e Eliana, pela revisão das referências bibliográficas.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE TABELAS.....	x
RESUMO.....	xii
SUMMARY.....	xiv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Considerações gerais.....	3
2.2 O herbicida atrazina.....	4
2.3 Degradação de pesticidas.....	5
2.4 Degradação da atrazina.....	7
2.5 Resíduo ligado.....	13
2.5.1 Ocorrência e distribuição dos resíduos ligados na fração orgânica do solo (ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e humina).....	14
2.5.2 Mecanismo de formação dos resíduos ligados.....	18
2.5.3 Biodegradação dos resíduos ligados.....	20
2.6 Caracterização das frações da matéria orgânica do solo.....	22
2.7 Remobilização dos resíduos ligados.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Herbicida.....	25
3.2 Solos.....	25
3.2.1 Preparo dos solos.....	26

3.2.2 Determinação da umidade dos solos para o ensaio de distribuição e remobilização.....	27
3.2.3 Determinação da capacidade de campo.....	27
3.3 Aplicação do produto radioativo e do produto técnico.....	27
3.4 Ensaio de distribuição com o produto radiomarcado.....	28
3.5 Mineralização da ^{14}C -atrazina.....	28
3.6 Ensaio de distribuição com o produto frio.....	29
3.7 Extração com solvente.....	30
3.8 Combustão das amostras de solo (determinação dos resíduos ligados).....	30
3.9 Fracionamento da matéria orgânica.....	31
3.10 Procedimentos para o estudo da remobilização do resíduo ligado de ^{14}C -atrazina na fração ácidos fúlvicos.....	32
3.10.1 Incubação.....	32
3.10.2 Mineralização, extração, combustão e fracionamento da matéria orgânica do resíduo ligado na fração ácidos fúlvicos.....	34
3.10.3 Dessorção.....	34
3.11 Ensaio de atividade microbiana.....	35
3.12 Biomassa microbiana.....	36
3.13 Cromatografia de camada delgada (Radio-TLC).....	36
3.14 Correção de contagem.....	37
3.15 Análise estatística do ensaio de biomassa microbiana.....	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	40
4.1 Estudo da distribuição de ^{14}C -atrazina.....	40
4.1.1 Mineralização.....	40
4.1.2 Extração, formação dos resíduos ligados totais e sua distribuição nas diferentes frações da matéria orgânica.....	42
4.1.3 Identificação dos resíduos extraíveis.....	45

4.2 Estudo da remobilização dos resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos	47
4.2.1 Mineralização.....	47
4.2.2 Dessorção, extração e remobilização dos resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos, nas diferentes frações da matéria orgânica.....	51
4.2.3 Identificação dos resíduos extraídos e dessorvidos.....	56
5 CONCLUSÕES.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
APÊNDICES.....	73

LISTA DE FIGURAS

	Página
1 Estrutura molecular da atrazina.....	26
2 Sistema utilizado para captura de $^{14}\text{CO}_2$ desprendido.....	29
3 Esquema simplificado do fracionamento da matéria orgânica.....	33
4 Curva de calibração para correção de “quench” no ensaio de distribuição.....	38
5 Curva de calibração para correção de “quench” no ensaio de remobilização.....	38
6 Porcentagem acumulada de $^{14}\text{CO}_2$ desprendido, resultante da aplicação de ^{14}C -atrazina, durante 63 dias de incubação (estudo de distribuição).....	40
7 Quantidade de radioatividade na forma de $^{14}\text{CO}_2$, extraída, e resíduos ligados totais nas frações ácidos fúlvicos, húmicos e humina , após 63 dias de incubação (estudo de distribuição).....	42
8 Porcentagem de $^{14}\text{CO}_2$ desprendido de resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos, durante 49 dias de incubação (estudo de remobilização).....	47
9 Quantidade acumulada de $^{14}\text{CO}_2$ desprendido no estudo de remobilização dos resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos	

fúlvicos. Tratamentos: .testemunha (test.), palha de milho (P.M.) e glicose + peptona (G+P).....	49
10 Atividade microbiana semanal nos solos Glei Húmico (GH) e Latossolo Vermelho Escuro (LE), durante 49 dias de incubação. Tratamentos: testemunha (test.), palha de milho (P.M.) e glicose + peptona (G+P).....	49
11 Porcentagem de resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos: dessorvidos (a), extraídos (b) e remobilizados em: ácidos fúlvicos (c), ácidos húmicos (d) e humina (e), no estudo de remobilização.....	54

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Esquema do ensaio para o estudo de remobilização dos resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos e atividade microbiana.....	34
2 Recuperação total de ^{14}C -atrazina no estudo da distribuição, em relação à radioatividade aplicada.....	44
3 Recuperação total de ^{14}C -atrazina no estudo da distribuição nas diferentes frações da matéria orgânica, em relação à concentração dos resíduos ligados.....	45
4 Identificação da radioatividade extraída por co-cromatografia de camada delgada (estudo de distribuição).....	46
5 Biomassa microbiana inicial e final dos tratamentos testemunha, palha de milho e glicose+peptona, nos solos Glei Húmico e Latossolo Vermelho Escuro, em um período de incubação de 49 dias.....	50
6 Valor de pH e teor de matéria orgânica, dos dois solos antes e depois da aplicação de resíduos ligados de atrazina em ácidos fúlvicos (produto frio).....	52
7 Recuperação total do estudo de remobilização dos resíduos ligados	

de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos, em relação à radioatividade aplicada.....	53
8 Recuperação total no estudo de remobilização dos resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos, nas diferentes frações da matéria orgânica, em relação à concentração de resíduos que permaneceram ligados.....	55
9 Identificação da radioatividade extraída ou dessorvida por co-cromatografia de camada delgada (estudo de remobilização).....	57

DISTRIBUIÇÃO DO HERBICIDA ^{14}C -ATRAZINA NA MATÉRIA ORGÂNICA DE DOIS SOLOS E REMOBILIZAÇÃO DE SEUS RESÍDUOS LIGADOS EM ÁCIDOS FÚLVICOS

Autora: MARIA DE FÁTIMA DA SILVA PINTO PEIXOTO

Orientador: Prof. Dr. ARQUIMEDES LAVORENTI

RESUMO

Objetivou-se avaliar em condições de laboratório, a distribuição dos resíduos ligados do herbicida ^{14}C -atrazina em substâncias húmicas de dois solos do Estado de São Paulo, bem como a remobilização dos seus resíduos ligados em ácidos fúlvicos. Os solos utilizados foram: Latossolo Vermelho Escuro e Glei Húmico. No estudo de distribuição aplicou-se em 100 g de cada solo (base seca) o produto radioativo na concentração de $10,38\mu\text{g i.a. g}^{-1}$ solo. Em paralelo, realizou-se uma outra incubação com os dois tipos de solo, porém utilizando-se a atrazina técnica (produto frio) com o objetivo de obter-se resíduos ligados em ácidos fúlvicos para o ensaio da atividade microbina. Avaliou-se a mineralização em um período de incubação de 63 dias, os resíduos extraíveis utilizando-se o sistema de solvente acetonitrila:água 8:2 v/v, os resíduos ligados através do método de combustão seca e subsequente fracionamento da matéria orgânica. No estudo da remobilização utilizou-se os mesmos solos descritos anteriormente, aplicando-se os seguintes tratamentos: 100g solo (base seca) +1,5g de palha de milho; 100 g solo + 0,2g glicose + 0,2 g peptona e 100 g solo (controle). A solução do resíduo ligado de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos, obtida do ensaio de distribuição, foi previamente ajustada à pH 6,5, com carbonato de potássio, e aplicada

em cada frasco de vidro contendo os solos e os tratamentos, numa quantidade até atingir 60% da capacidade de campo. O período de incubação foi de 49 dias e a metodologia para avaliar o desprendimento de $^{14}\text{CO}_2$, extração por solventes, combustão dos resíduos ligados e fracionamento da matéria orgânica foi idêntica ao do ensaio de distribuição. A dessorção foi feita utilizando-se uma solução de CaCl_2 0,01M. Para identificação dos metabólitos e/ou composto original, utilizou-se co-cromatografia de camada delgada, com o sistema de solventes clorofórmio:acetona:ácido acético:água (50:30:15:1 v/v/v/v). A atividade microbiana foi determinada pelo método respirométrico utilizando-se glicose ^{14}C e o de biomassa microbiana pelo método de fumigação-extração, analisado em delineamento experimental inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3x2. Os resultados obtidos indicaram que: a) o herbicida atrazina apresenta uma baixa mineralização, e ainda menor no solo Glei Húmico, indicando que neste solo a mineralização é um processo de pouca importância na detoxificação da atrazina; b) a formação de resíduos ligados é uma forma importante de dissipação de atrazina nesses solos, principalmente no GH. As maiores porcentagens de resíduos ligados de atrazina estão nas frações humina e ácido fúlvico, seguido pelo ácido húmico; c) nos dois solos a hidroxiatrazina é o principal metabólito; d) para os dois tipos de solo, grande parte dos resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos permanecem nesta fração, sendo pequena a remobilização para os ácidos húmicos e humina; e) a adição de palha de milho e glicose + peptona, não influencia a mineralização nem a disponibilidade dos resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos; f) ao término do estudo de remobilização, nas frações disponíveis (dessorvido + extraído), a atrazina é completamente degradada à hidroxiatrazina (em maior proporção) e desetilatrazina.

DISTRIBUTION OF ^{14}C -ATRAZINE IN HUMIC SUBSTANCES OF TWO SOILS AND THE REMOBILIZATION OF ITS BOUND RESIDUES IN FULVIC ACIDS

Author: MARIA DE FÁTIMA DA SILVA PINTO PEIXOTO

Adviser: Prof. Dr. ARQUIMEDES LAVORENTI

SUMMARY

The experiment was carried out under laboratory conditions in order to know the distribution of ^{14}C -atrazine bound residues in humic substances of Hapludox and Umbraquults soils from São Paulo State, and the remobilization of its bound residues in fulvic acids. In the distribution test it was applied $10.38 \mu\text{g a.i. g}^{-1}$ of radiolabelled compound into 100 g of soil (dry basis). Another soil incubation with technical atrazine only was also made in order to get the fulvic acids for the microbial activity measurement. The mineralization was evaluated during 63 days, the extractable and the bound residues were obtained through acetonitrile:water (8:2, v/v) extraction and organic matter fractionation, respectively. In the remobilization test, with the same soil samples as before, were applied corn straw and glucose plus peptone in some treatments in order to stimulate the micro-organisms. Neutralised solutions of fulvic acids, with ^{14}C -atrazine bound residues from the distribution test, were applied into the soils (100 g dry basis) until 60% of the water holding capacity of each soil was obtained. They were left for 49 days under incubation and the $^{14}\text{CO}_2$ evolution, solvent extraction, organic matter fractionation, and oxidation were similar to the distribution test. The desorption extract was obtained with $0.01 \text{ mol L}^{-1} \text{ CaCl}_2$ solution. Parent compound and metabolites were identified through thin layer co-chromatography using

chloroform:aceton:acetic acid:water (50:30:15:1) solvent system. The microbial activity was determined by soil respiration method using ^{14}C -glucose and the microbial biomass by fumigation-extraction method under completely randomised design and factorial experiment of 3×2 . The results showed that: a) atrazine presented a low mineralization on both soils and it was lower in the Umbraquults soil indicating that in this type of soil the mineralization was not a main process of detoxification of the compound; b) the bound residues formation is an important way of dissipation of atrazine from these soils, and mainly on the Umbraquults soil. The highest percentage of bound residues was found in the humin and fulvic acids and followed by the humic acids fractions; c) the main metabolite found on both soils was the hydroxiatrazine; d) the greatest part of ^{14}C -atrazine bound residues in fulvic acids of both soils presented in this same fraction, showing very small remobilization into humic acids and humin fractions; e) corn straw and glucose plus peptone did not influenced the mineralization nor the availability of ^{14}C -atrazine bound residues in fulvic acids; f) at the end of the incubation period the desorption and extraction extracts showed that the atrazine was completely degraded to hydroxiatrazine and at very small proportion to the desethylatrazine.

1 INTRODUÇÃO

Em função do uso intensivo de produtos químicos na agricultura moderna e da formação de grandes quantidades de resíduos, tem havido maior preocupação em conhecer-se o comportamento e destino dos pesticidas nos diversos ecossistemas.

↪ A maneira como um pesticida se comporta no solo depende principalmente das características físico-químicas da molécula e do ambiente. As suas interações ditam os processos de retenção, transformação e transporte, determinando o destino final dos pesticidas. Durante esses processos, pode haver formação de resíduo ligado definido como: resíduos não passíveis de extração (também chamados de resíduos não extraídos) em plantas e solos. São espécies químicas originadas de pesticidas, usados de acordo com as boas práticas agrícolas, que não são extraídos por métodos que não modifiquem significativamente a natureza química desses resíduos. A primeira tentativa de mobilização do pesticida acontece quando ele é liberado no primeiro estágio no ambiente e inicia seu movimento antes de tornar-se imobilizado ou estar ligado à outros componentes do solo. Se por qualquer razão, o resíduo ligado de pesticida é submetido a futura mobilização, o nome remobilização é utilizado para explicar esta nova organização que está começando a acontecer com o pesticida.

O significado ambiental da presença desses resíduos ligados é desconhecido, pois pouco se sabe sobre sua natureza, identidade, biodisponibilidade, toxicidade e natureza acumulativa e pela impossibilidade de detecção por métodos analíticos convencionais, subestimando a carga total de pesticida no solo ou na planta.

Os trabalhos de pesquisas com pesticidas radiomarcados em solos e plantas, em condições de laboratório, têm mostrado que ^{14}C -resíduos não extraíveis são usualmente detectados somente após o uso de técnicas destrutivas, tais como: forte hidrólise ácida ou básica e combustão do solo e de partes de plantas, onde a identidade do resíduo é perdida.

A questão da biodisponibilidade do resíduo ligado de pesticida no solo torna-se importante, quando se considera a possibilidade de sua absorção por culturas que se desenvolvem em sistema de rotação em solo contaminado.

Dentre as classes de pesticidas, os herbicidas tem sido os mais usados nas lavouras mundiais. No Brasil não é diferente. O país conta com uma das maiores áreas agricultáveis do mundo, com alto consumo de pesticidas, onde os herbicidas correspondem a quase metade do volume total de vendas.

Atrazina, é um herbicida bastante utilizado em pré-plantio e pré-emergência, como agente de controle de ervas daninhas principalmente na cultura do milho. Pesquisas com este herbicida são concentradas em aspectos de degradação e adsorção/dessorção (mobilidade). Os resultados mostram que há formação de resíduo ligado desta molécula em diversos solos, relacionada a fração orgânica do solo. No entanto, há pouca informação sobre o mecanismo envolvido.

Em função da grande utilização deste herbicida e do significado ambiental do estudo de resíduos ligados, este trabalho teve como objetivos principais avaliar, em condições de laboratório, a distribuição e a remobilização de resíduos ligados do herbicida atrazina nas frações orgânicas de dois solos representativos do Estado de São Paulo, como indicação da biodisponibilidade e detoxificação deste herbicida e/ou seus metabólitos.

Considerando-se que a formação de resíduos ligados está diretamente relacionada com a fração orgânica do solo, espera-se maior formação de resíduos ligados no solo Glei Húmico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Considerações gerais

Embora os pesticidas sejam de grande benefício para o homem, ajudando no aumento da produção de alimentos e controlando as pragas das plantas e animais, eles devem ser cuidadosamente usados e monitorados, porque podem ser perigosos tanto para a vida humana e animal, como também para o ambiente.

O marco inicial da utilização de produtos organo-sintéticos na agricultura para controle de pragas, doenças e ervas daninhas das lavouras, foi a década de 20 (Paulino, 1993). No entanto, na década de 40, por ocasião da segunda guerra mundial, o mundo conheceu verdadeira revolução no campo do controle de pragas com a descoberta das propriedades inseticidas do DDT. Após a guerra, novos praguicidas organo-sintéticos foram produzidos, sendo responsável pela poderosa estrutura industrial de produtos químicos em todo o mundo. Essa indústria expandiu-se rapidamente. As vendas atingiram U\$ 40 milhões em 1939, chegando a U\$ 300 milhões em 1959. Neste mesmo período, outros produtos tais como: herbicidas, fungicidas, desfolhantes, acaricidas, nematicidas, etc., foram colocados no mercado (Paschoal, 1979).

Apesar das exigências de caráter ambiental a serem consideradas pelas empresas na busca e introdução de produtos, o aumento do consumo de pesticidas ainda é considerável, principalmente dos herbicidas. O volume total de vendas de pesticidas no Brasil aumentou de U\$69,79 milhões de 1996 para U\$ 88,03 milhões em 1997, sendo que os herbicidas contribuíram com U\$ 20 milhões (Vendas de

defensivos, 1997). Essa intensificação no uso de herbicidas entre os agricultores deve-se entre outros fatores, ao aumento da área cultivada com culturas de grande expressão econômica e, a ação rápida, eficiência e efeitos prolongados dos herbicidas. Esses produtos são aplicados basicamente de duas maneiras: diretamente sobre o solo em pré-emergência ou em pós-emergência das plantas daninhas.

De maneira geral, pouco se sabe sobre o que ocorre com os herbicidas no solo após sua aplicação. Os principais problemas dessas moléculas orgânicas no ambiente estão relacionadas com sua toxicidade, persistência, destino final, transferência na cadeia alimentar e presença de resíduos nos alimentos (Lavorenti ¹).

2.2 O herbicida atrazina

As triazinas caracterizam-se por serem derivados nitrogenados heterocíclicos (estrutura de anel com átomos de diferentes tipos), composto de átomos de nitrogênio e carbono, sendo em sua maioria simétricos (Knüsli, 1970).

Atrazina, [2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina] apresenta-se na forma de sólido cristalino branco, com solubilidade em água = 33 mg L⁻¹, densidade = 1,187 g cm⁻³, pressão de vapor = 3,0.10⁻⁷ mmHg (Rodrigues & Almeida, 1995), peso molecular = 215,69 g mol, ponto de fusão = 176°C, coeficiente de partição octanol/água (log K_{ow}) = 2,34, pK_a (constante de dissociação) = 1,7 e K_d (coeficiente de distribuição) = 2,7. Sua meia vida (tempo necessário para que após a aplicação, atinja metade da concentração original) varia de 20 a 100 dias, dependendo das condições ambientais (Bintein & Devillers, 1996). É um herbicida básico, ou seja, tende a tornar-se positivamente carregado (cátion) pelo recebimento de íons hidrogênio (Blanco, 1979).

¹ LAVORENTI, A. Remobilization of bound anilazine residues in fulvic acids. Trabalho apresentado no IRA/KFA SEMINAR, Jülich, 1995.

No mundo, o consumo de atrazina é estimado em aproximadamente 70.000 t/ano, sendo cerca de 90 % na cultura do milho (Bintein & Devillers, 1996).

No Brasil é registrado para diversas culturas anuais e perenes (milho, cana-de-açúcar, sorgo, café, cacau, chá, abacaxi etc.), utilizado em pré ou pós-emergência das ervas, porém mais eficiente em pré-emergência. Dependendo da formulação é utilizada para o controle de plantas daninhas latifoliadas e algumas gramíneas. A atrazina é absorvida essencialmente por via radicular, sendo sua translocação acrópeta, pelo xilema, acumulando-se nos cloroplastos dos meristemas apicais e das folhas. Seu mecanismo de ação baseia-se na inibição da fotossíntese, por impedir a reação de Hill e bloquear alguns processos enzimáticos (Rodrigues & Almeida, 1995).

Quanto ao comportamento no solo, é adsorvida pelos colóides de argila e matéria orgânica. O processo é reversível, dependendo da umidade, temperatura e pH do terreno. É pouco lixiviável, não sendo encontrada em solos cultivados a profundidade superior à 30 cm, mesmo após sucessivos anos de aplicação. A degradação no solo é essencialmente microbiana, com metabolismo idêntico ao ocorrido nas plantas. Sensível a fotodecomposição, pode ocasionar perdas consideráveis do produto se não chover após a aplicação. A persistência média no solo é de 5 a 7 meses em condições climáticas tropicais e subtropicais. Não tem-se verificado fitotoxicidade em culturas de soja, feijão e algodão. Tem sido observado prejuízo na aveia quando semeada 5 meses após a aplicação do produto, na cultura anterior (Rodrigues & Almeida, 1995).

2.3 Degradação de pesticidas

→ De acordo com Moorman (1994) e Scheunert et al. (1992), a transformação ou degradação dos pesticidas no solo ocorre em função de várias reações bióticas e abióticas que compreendem: reações primárias (oxidação, redução, hidrólise) e secundárias (conjugações e reações com constituintes do solo), sendo que o grau de persistência é influenciado pelas condições ambientais (temperatura, umidade, profundidade do solo, aeração, etc.), presença de outros pesticidas e características

químicas da própria molécula. Essas interações determinam o destino final do pesticida no solo, que pode se manifestar na forma de resíduo ligado.

— A habilidade do solo em reter os pesticidas, adsorvendo-o, ajuda a reduzir a contaminação do ambiente. A degradação de pesticidas pelos microrganismos (biodegradação), pode ser considerado um fator determinante na sua persistência no solo (Monteiro, 1997). Portanto, é importante elucidar determinados conceitos relativos à degradação de moléculas orgânicas. Biodegradação pode ser completa (mineralização), resultando na formação de dióxido de carbono, água, produtos inorgânicos e compostos orgânicos de ocorrência comum no ambiente, como os ácidos orgânicos e outros. Além do que, biodegradação pode envolver apenas uma oxidação, redução ou perda de um grupo funcional que, mesmo sendo de pequeno porte, pode alterar as características físico-químicas da molécula original. No co-metabolismo, o microrganismo modifica a estrutura da molécula, porém não há fornecimento de energia para o crescimento (Alexander, 1994).

— A taxa de metabolismo microbiano de pesticidas no solo varia em função da disponibilidade da molécula para os microrganismos e do sistema de enzimas capaz de degradá-la. Além desses fatores, a umidade do solo, a temperatura, a aeração, o pH e os níveis de nutrientes também afetam este processo (Anderson & Domisch, 1978). Uma correlação positiva entre a biomassa microbiana e a taxa de degradação de dois herbicidas tiocarbamatos foi encontrada por Anderson (1981). Se o pesticida pode ser degradado por uma vasta população microbiana do solo (bom substrato para ataque enzimático), e assumindo a sua disponibilidade, a alta correlação entre biomassa e taxa de degradação pode ser válida. Se, ao contrário, somente uma pequena proporção da biomassa pode atacar o composto (pobre substrato para ataque enzimático), a taxa de degradação e dissipação poderá, depender de fatores físicos externos, tais como: luz e propriedades físico-químicas do solo e da própria molécula (Anderson, 1984).

Outra questão relatada na literatura, é a influência de nutrientes e compostos orgânicos sobre a biomassa microbiana (Anderson, 1981; Barriuso et al., 1997). Se quantidades de nutrientes são acrescentados ao solo, a biomassa microbiana em geral e em particular, os organismos que degradam a molécula em questão, aumentam em

quantidade, favorecendo o incremento de material enzimático que degrada o pesticida (Anderson, 1981).

Alvey & Crowley (1995) avaliaram o efeito da manipulação da relação C/N do solo sobre a mineralização da atrazina, adicionando várias fontes de carbono ao solo. O total de $^{14}\text{CO}_2$ desprendido foi medido para monitorar a relação C/N e determinar se houve uma correlação entre a mineralização da atrazina e a atividade microbiana. A influência da suplementação de nitrogênio inorgânico sobre a utilização da molécula de atrazina também foi avaliado. As complexas formas de carbono e nitrogênio tiveram um grande impacto sobre a regularização do tamanho da população e a atividade de diferentes grupos de microrganismos na comunidade microbiana do solo. Em diferentes estágios do processo de decomposição, no entanto, os materiais (composto, casca de arroz, feno, citrato de sódio, amido e glicose), com relações C/N variando entre 17 e 41, não foram efetivos na mineralização da atrazina. Isto sugere pouca ou nenhuma disponibilidade e competição por carbono e nitrogênio dentro da comunidade microbiana. Por outro lado, a forma de carbono adicionado afetou a mineralização da atrazina. Houve inibição da degradação de atrazina no solo com glicose e citrato de sódio.

2.4 Degradação da atrazina

A atrazina é um herbicida moderadamente persistente, com meia vida na superfície do solo variando de algumas semanas a alguns meses. É amplamente conhecido que a biotransformação ocorre mais intensamente na superfície do solo do que na subsuperfície (Vanderheyden et al., 1997).

Kaufman & Kearney (1970), em ampla revisão sobre a degradação dos herbicidas s-triazinas, descreveram três importantes caminhos para este processo: a) hidrólise do carbono na posição 2 do anel; b) N-dealquilação de cadeias laterais e c) clivagem do anel. A clivagem química é o caminho predominante para a detoxificação do 2-cloro-s-triazinas em solos.

No processo de degradação da atrazina pode ocorrer N-dealquilação microbiana dando origem aos metabólitos desetilatrazina (DEA), deisopropilatrazina (DIA) e desetildeisopropilatrazina (DEDIA) (Behki & Khan, 1986; Giardina et al., 1980; Kaufman & Blake, 1970 e Wolf & Martin, 1975) e hidrólise química que resulta na formação do metabólito não tóxico hidroxiatrazina (HA) (Armstrong et al., 1967; Armstrong & Chesters, 1968). Os metabólitos DEA e DIA podem sofrer hidroxilação e a HA N-dealquilação, resultando neste caso os metabólitos desetilhidroxiatrazina (DEHA) e deisopropilhidroxiatrazina (DIHA) (Behki & Khan, 1986). Segundo Cook & Hutter (1981), na completa degradação da atrazina antes da clivagem do anel, ocorrem hidroxilações continuadas formando, por exemplo, ácido cianúrico.

Yassir et al. (1998) estudaram o efeito da adição de fontes externas de carbono na mineralização das cadeias laterais de atrazina, em condições de laboratório. Eles concluíram que, após dois meses de incubação, as porcentagens cumulativas de mineralização não excederam a 10 % da radioatividade inicialmente aplicada na cadeia lateral etil e, 3 % na cadeia isopropil.

Uma vez introduzido no ambiente, os pesticidas são degradados por fungos e bactérias, servindo de fonte de carbono, nitrogênio e energia (Alexander, 1980). Os fungos são considerados os principais degradadores da atrazina (Kaufman & Blake, 1970), no entanto, as bactérias também a degradam (Giardina et al., 1980).

Levanon (1993) avaliou a função dos fungos e bactérias na biotransformação de atrazina, carbofuran, malation e alaclor no solo, utilizando a técnica de inibição seletiva desses microrganismos. Incubou 50 g de solo com 400 mg de palha de milho, adicionando os pesticidas radiomarcados na dosagem de $1 \mu\text{g g}^{-1}$ solo. A clivagem das cadeias laterais dos grupos etil e isopropil da atrazina foi devido, principalmente, a atividade dos fungos. Praticamente, não houve degradação do anel heterocíclico quando fungos e bactérias foram inibidos. Portanto, durante o metabolismo dos fungos houve clivagem das cadeias laterais da atrazina, abrindo caminho para a degradação bacteriana do anel do metabólito. [Concluiu-se que as enzimas dos fungos e bactérias atuam simultaneamente na biodegradação da atrazina. Kaufman & Black (1970) também

observaram que a clivagem das cadeias laterais da atrazina ocorre por N-dealquilação e que os fungos não foram capazes de degradar o anel.

A taxa de degradação da atrazina varia em função do tipo de solo, das condições ambientais e das práticas de manejo (Radosevich et al., 1997). Segundo Alexander (1994), valores de pH excessivamente ácidos ou básicos tendem a diminuir a atividade microbiana, pois afetam as atividades de todas as enzimas microbianas que são dependentes do íon H^+ . Recentemente, estudos têm sido feitos com isolados microbianos utilizando-se meios de cultura específicos, ou solos inoculados com esses organismos adaptados, obtendo-se, nestes casos, altas taxas de mineralização.

Kontchou & Gschwind (1995) estudaram a mineralização da atrazina em vários tipos de solo inoculado com uma linhagem de *Pseudomonas* (YAYA6), que cresceu em meio líquido tendo a atrazina como única fonte de carbono. Após 50 dias de incubação houve degradação de 50 % da molécula, após inoculação. A biodegradação da atrazina pela bactéria foi reduzida sob condições limitantes de suprimento de oxigênio e de pH (pH do solo < 7). Em solo com alto teor de matéria orgânica e com atrazina aplicada antes da inoculação com a bactéria, a taxa de biodegradação foi limitada pela baixa disponibilidade. O alto teor de matéria orgânica, propiciou elevada adsorção da atrazina, limitando a sua biodegradação. Observou-se também um aumento de três vezes na biomassa microbiana quando o inóculo não foi diluído.

Mandelbaum et al. (1993) e Skipper et al. (1967) testaram isolados de bactérias e fungos quanto a capacidade de degradar atrazina e seus metabólitos. Os resultados foram variáveis quando comparou-se fungos e bactérias. Alguns isolados de culturas puras não degradaram o anel da molécula de atrazina e hidroxiatrazina, porém utilizaram cadeias laterais, como o *Aspergillus fumigatus* que degradou 4 % das cadeias laterais como $^{14}CO_2$. A hidroxiatrazina correspondeu a 80 % do total extraído com metanol, indicando que a hidrólise química que leva à formação do metabólito hidroxiatrazina foi o principal caminho de degradação em solos (Skipper et al., 1967).

Os microrganismos têm papel preponderante na transformação de pesticidas em solo, visto que seu metabolismo pode acarretar a mineralização completa do pesticida ou a formação de metabólitos (Nakagawa & Andrea, 1997). O metabolismo microbiano tem

sido reportado como um dos mecanismos de degradação da atrazina no solo (Sorenson et al., 1993; Stolp & Shea, 1995 e Vanderheyden et al., 1997), porém a hidrólise química responsável pela formação de hidroxiatrazina também é importante. Com o objetivo de relacionar taxa de degradação de atrazina no solo com o valor pH do solo, teor de matéria orgânica e o teor de argila, constatou-se grande acumulação de hidroxiatrazina e ausência de degradação microbiana nos três solos testados (Armstrong et al., 1967). O aumento da taxa de hidrólise da atrazina foi consistente com os valores mais baixos de pH e mais altos de matéria orgânica. A hidrólise ácida, provavelmente, foi resultado da protonação do anel ou cadeia com o átomo de nitrogênio, seguida da clivagem da ligação C-Cl pela molécula de água. A protonação do N resultou em deficiência de elétrons do carbono ligado ao cloro, aumentando a tendência de deslocamento nucleofílico do cloro pela água. A função da matéria orgânica foi por outro lado, catalizar a hidrólise pela adsorção da atrazina, que é o resultado da ligação do H com o N do anel ou cadeia lateral e grupos ácidos fracos da matéria orgânica. Esse H pode aumentar a deficiência de elétrons ao redor do átomo de cloro e, desta forma, aumentar a tendência de ataque da água, aumentando a taxa de hidrólise. No entanto, este processo pode ocorrer por mediação de enzimas bacterianas como (Mandelbaum et al., 1993). Uma mistura de culturas de bactérias foi acrescentada ao solo, sendo que após uma hora detectou-se hidroxiatrazina com cerca de 80-85 % da molécula degradada. Houve incorporação de ^{18}O da H_2^{18}O durante a decloração. Concluiu-se que em solo não estéril a correlação entre alto teor de matéria orgânica e a formação de hidroxiatrazina pode ter sido resultado do aumento da atividade enzimática associada com altos níveis de matéria orgânica.

Best & Weber (1974) tentaram elucidar as causas primárias da dissipação da atrazina e prometrina em dois solos com diferentes valores de pH (5,5 e 7,5). A degradação foi o principal modo de dissipação para as duas moléculas. No caso da atrazina, em particular, a degradação foi principalmente por processo não biológico, e maior no solo com pH menor. Em condições de pH mais elevado, a degradação foi prejudicada como resultado da alta saturação em bases e baixa concentração de hidrogênio nos colóides do solo.

Em três solos de Oregon com umidade, teor de matéria orgânica, concentração de atrazina e taxa de fluxo de ar variáveis, foi verificado a importância da degradação microbiana e hidrólise química na detoxificação da atrazina (Skipper & Volk, 1972). Em dois dos solos testados, a hidroxiatrazina correspondeu a 10 % do total extraído, onde a detoxificação foi uma combinação da hidrólise química e da lenta degradação microbiana. O $^{14}\text{CO}_2$ respirado da cadeia lateral ^{14}C -etil de atrazina, representou menos de 10 % do total do ^{14}C acrescentado ao solo. O isopropil e constituintes do anel sofreram baixo ataque microbiano após 28 dias de incubação. No solo Woodburn, a hidrólise foi o caminho preponderante para detoxificação da atrazina, onde a hidroxiatrazina representou 40 % do total extraído. De acordo com os autores, a maior quantidade de hidroxiatrazina no solo Woodburn, pode ter sido devido ao baixo pH e maior acidez da matéria orgânica.

Existe substancial evidência na literatura que a dealquilação da atrazina é um dos mais significativos caminhos bióticos de sua degradação no solo (Behki & Khan, 1986; Brouwer et al., 1990; Giardina et al., 1980; Kaufman & Kearney, 1970; Sorenson et al., 1993 e Vanderheyden et al., 1997). No entanto, existe variação em relação às espécies de fungos e bactérias quanto a preferência pela desetilização e deisopropilação, relacionado provavelmente ao sistema enzimático (Behki & Khan, 1986). O anel das s-triazinas é resistente a clivagem e apenas pequena quantidade de $^{14}\text{CO}_2$ é liberado no solo (Skipper & Volk, 1972), por este motivo alguns produtos de degradação da atrazina podem ser persistentes (Adams & Thurman, 1991).

A predominância na formação de desetilatrazina em relação a outros produtos de degradação clorinados da atrazina foi relatada nos estudos de Adamns & Thurman (1991) e Skipper & Volk (1972), onde nestes casos existia uma população microbiana significativa, e capaz de realizar este processo de metabolismo.

A aparente persistência da atrazina sugere que as enzimas chaves que atuam no processo de degradação biológica podem não estar muito difundidas nos microrganismos indígenas, e que aplicações contínuas do produto anualmente em culturas de milho, mantem a comunidade microbiana que degrada a atrazina, aumentando a sua degradação no solo (Ostrofsky et al., 1997)

Outro aspecto a considerar refere-se ao tempo de residência, que afeta a biodisponibilidade e, conseqüentemente, a biodegradação. Radosevich et al. (1997) constataram uma relação inversa entre tempo de residência da molécula no solo e a biodegradação. Os autores explicam que o resultado pode estar relacionado à adsorção da molécula à matéria orgânica do solo e a taxa limitada de difusão através dos microporos do solo, além da formação de resíduos ligados de atrazina. Estes resultados indicam uma relação positiva entre a concentração de atrazina na fase aquosa e a taxa de mineralização.

Estudando a persistência, a mobilidade e a adsorção da atrazina nos solos Latossolo Vermelho Escuro e Glei Húmico durante 180 dias em condições de laboratório, Nakagawa et al. (1995) verificaram que a concentração de atrazina diminuiu de 95,2 % a 10,6 % no solo Glei Húmico. As quantidades detectadas de deisopropilatraxina e desetilatraxina foram baixas (0,8 e 0,1 %, respectivamente). Porém houve um aumento significativo na concentração de hidroxiatraxina, atingindo 26,2 %. No Latossolo Vermelho Escuro, a concentração de atrazina caiu de 91,1 % para 7,4 %, após o período total do experimento. Paralelamente, houve um pequeno aumento nas concentrações de deisopropilatraxina e desetilatraxina (1,6 e 0,4 %, respectivamente). A hidroxiatraxina apresentou um pico máximo aos 60 dias (10,8 %), mas decresceu no final do ensaio para 3,5%. Esta maior proporção de hidroxiatraxina no solo Glei Húmico é explicado pelos autores como conseqüência do baixo valor de pH do solo (4,6), que favorece o processo de hidrólise das clorotriaxinas. A liberação de $^{14}\text{CO}_2$, foi mais acentuada no Latossolo Vermelho Escuro (28,5 %) em comparação ao Glei Húmico (5,0 %). Aos 64 dias, os valores desprendidos foram de 3,2 e 5,8 %, para o Glei Húmico e o Latossolo Vermelho Escuro, respectivamente. Os valores dos coeficientes de adsorção (K) (2,6 e 2,1 para os solos Glei Húmico e Latossolo Vermelho Escuro, respectivamente) revelaram uma baixa capacidade de retenção desse herbicida. Kaufman & Kearney (1970) observaram que no processo de degradação microbiana da atrazina, ocorreu uma fase inicial de adaptação (fase lag) e, em seguida, uma fase exponencial. Villar et. al. (1996) constataram valores de degradação de atrazina bem mais baixos em condições de laboratório (0,6 %) do que no campo (9 %). Segundo os autores, tal fato

estaria relacionado à temperatura, cuja variação favorece diferentes grupos de microrganismos. Eles também concluíram que em solos ácidos, a atrazina pode sofrer degradação química, formando hidroxiatrazina e inibindo o processo de biodegradação. Queiroz (1997), em condições semi controladas, encontrou que 36,0 % da atividade aplicada no solo Latossolo Vermelho Escuro foi desprendida na forma de $^{14}\text{CO}_2$ após 150 dias. Houve uma fase inicial de degradação lenta, seguida de um aumento gradativo com um pico aos 90 dias (crescimento exponencial dos microrganismos).

Muitos estudos têm demonstrado que a degradação, lixiviação, biodisponibilidade, e persistência das moléculas de pesticidas estão relacionadas com a natureza e o conteúdo da matéria orgânica do solo (Khan, 1978).

Huang et al. (1984) verificaram que além das partículas de argila, os sesquióxidos presentes no solo tiveram uma grande capacidade de reter a atrazina. Após a destruição da matéria orgânica, a remoção dos sesquióxidos causou uma grande redução na adsorção deste herbicida. Os componentes amorfos possuem alta superfície específica e grupos funcionais doadores de prótons (Kwong & Huang, 1979). Portanto, a atrazina poderia receber um íon hidrogênio (H^+) no nitrogênio do anel heterocíclico sendo adsorvida às superfícies negativas das partículas do solo. Baixos valores de pH propiciam a protonação, favorecendo a adsorção da atrazina (Krovac et al., 1986). Green & Karickhoff (1990) afirmam que o pH das superfícies coloidais é cerca de duas vezes menor do que aquele medido em uma solução solo:água. Neste caso, quando essa diminuição coincide com o pKa, os pesticidas básicos têm mais espécies iônicas protonadas (positivas).

2.5 Resíduo ligado

Na avaliação do significado ambiental dos resíduos de pesticidas em solos e plantas, deve-se distinguir dois tipos de resíduos: aqueles que são e aqueles que não são extraídos com solventes orgânicos. Resíduos ligados de pesticidas são aqueles que permanecem após exaustiva extração, com solventes orgânicos, excluindo-se espécies químicas (molécula original e metabólitos) que não possuem nenhuma atividade

pesticida e são recicladas dentro de produtos naturais poliméricos, através de caminhos metabólicos biológicos (Khan, 1982).

A presença desses resíduos ligados em solos e plantas é conhecido a cerca de duas décadas, quando pesquisas começaram a ser desenvolvidas com o objetivo de elucidar seu mecanismo de formação (Lerch et al., 1997; Wais et al., 1995), quantificação e distribuição nas diferentes frações da matéria orgânica do solo (Barriuso & Koskinen, 1996; Capriel et al., 1985; Heitmann-Weber et al., 1994; Mittelstaedt et al., 1987 e Queiroz, 1997), biodisponibilidade para plantas (Khan & Behki, 1990; Kloskowsky et al., 1986; Führemann & Lichtenstein, 1978 e Lichtenstein, 1980) e, mais recentemente, a sua remobilização no ambiente. Estudos de remobilização objetivam obter uma indicação da biodisponibilidade e/ou detoxificação dos pesticidas (Lavoretti, 1997).

Quando os resíduos ligados constituem a fração principal de um resíduo de pesticida no solo, eles merecem uma atenção especial. As s-triazinas formam considerável quantidade de resíduos ligados. No período de 4 a 12 meses, esses resíduos podem variar de 49 a 57 %, em relação ao aplicado (Roberts, 1984).

2.5.1 Ocorrência e distribuição dos resíduos ligados na fração orgânica do solo (ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e humina)

Os resíduos ligados de pesticidas e seus metabólitos associados a matriz húmica do solo, podem ser fracionados utilizando-se hidróxido de sódio ou outra solução alcalina (Khan, 1982). Utilizando-se moléculas com ^{14}C marcado, a distribuição dos resíduos ligados pode ser detectada medindo-se a radioatividade encontrada nas frações da matéria orgânica do solo (Wais et al., 1995).

A ocorrência e distribuição de resíduos ligados de pesticidas tem sido o objetivo de vários estudos e na maioria deles moléculas radiomarcadas foram usadas, sendo o total de resíduo ligado determinado por combustão (Golab et al., 1979; Roberts & Standen, 1981; Spillner et al., 1979 e Still et al., 1981).

A distribuição desses resíduos entre as frações húmicas, tais como: ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e humina, não é constante e varia em função da molécula estudada e do tempo de exposição (Khan, 1982)

A atrazina é uma molécula que tem a capacidade de formar resíduos ligados no solo. Capriel et. al. (1985) constataram a presença de 50 % de ^{14}C na forma de resíduo ligado na fração de ácidos húmicos de um solo mineral, nove anos após a aplicação. Segundo Nakagawa et al. (1995) encontraram 48 e 37 % de resíduos ligados de atrazina nos solos Glei Húmico e Latossolo Vermelho Escuro, respectivamente, após 180 dias de incubação.

Barriuso et al. (1997) avaliaram a influência da adição de compostos ao solo sobre o comportamento de herbicidas, em condições de laboratório. Após um período de incubação de oito meses, a percentagem total de resíduos ligados de atrazina chegou à 50 % da radioatividade aplicada inicialmente. Eles concluíram que, para os tipos de triazinas estudadas, inclusive a atrazina, a proporção de resíduo extraível diminuiu e a proporção de resíduo ligado aumentou com a mineralização, indicando que a formação do resíduo ligado pode estar relacionada à atividade biológica e à biotransformação dos pesticidas.

Wilkemann & Klaine (1991) pesquisaram a degradação da atrazina e formação de resíduo ligado em um solo do oeste do Tennessee, utilizando microcosmo irradiado (estudo I) e não irradiado (estudo II). A mineralização da atrazina, medida pelo desprendimento de $^{14}\text{CO}_2$ foi de 28 e 0,07 %, no estudo II e I, respectivamente, evidenciando a contribuição biológica para este processo. A formação de resíduo ligado aumentou durante o período de incubação, chegando ao final de 180 dias com valores de 39 % no estudo I e 43 % no estudo II. Constataram também que a descloração e subsequente hidroxilação da atrazina para hidroxiatrazina, um metabólito não fitotóxico, é considerado um passo para formação de resíduo ligado e também para a desativação do herbicida.

A distribuição de resíduos ligados de pesticidas em ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e humina tem sido amplamente relatado em diversos trabalhos. As variações que ocorrem estão em função de características do pesticida e do solo e, principalmente,

do teor de matéria orgânica, sendo que os ácidos fúlvicos demonstram ter uma função inicial ativa na rápida imobilização de resíduos ligados. Com o passar do tempo, a tendência é a associação com os ácidos mais poliméricos (humina). No entanto, deve-se considerar que extrações alcalinas e técnicas de fracionamento químico podem modificar a matéria orgânica e os pesticidas. Desta forma, a distribuição dos resíduos ligados pode estar mais relacionada ao artifício da extração, do que ao próprio mecanismo de ligação (Barriuso & Koskinen, 1996). Por outro lado, avaliando a influência do fracionamento usando NaOH e HCl sobre a composição química da matéria orgânica do solo, Krosshavn et al. (1992) observaram que o fracionamento convencional do húmus não modificou significativamente o conteúdo dos diferentes grupos funcionais daquelas substâncias.

Barriuso & Koskinen (1996) utilizaram o fracionamento físico, para avaliar a incorporação de resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em frações de solo de diferentes tamanhos, em função do tempo. A maior proporção de resíduos ligados encontrou-se na fração 0,2 - 2 μm , que continha 50 % do total de carbono orgânico. Os resíduos ligados mais estáveis estavam associados à matéria orgânica humificada. Cerca de 1 dia e após 4 meses de aplicação, 22 e 53% da atrazina estava na forma de resíduo não extraível, respectivamente. Isto devido, provavelmente, ao alto teor de matéria orgânica deste solo.

Capriel et al. (1985) verificaram a distribuição e natureza dos resíduos ligados de atrazina em um solo mineral, nove anos após a aplicação do herbicida, e encontraram 7 % em ácidos húmicos, 17 % em ácidos fúlvicos e 22 % na humina, em relação à radioatividade aplicada. Quando se considerou o total de ^{14}C que permaneceu ligado ao solo, essas proporções foram 13, 33 e 44 %, nos ácidos húmicos, fúlvicos e humina, respectivamente. Na fração ácido húmico foi detectada maiores concentrações de atrazina, hidroxiatrazina, e, em menor proporção, os metabólitos dealquilados. Esses mesmos autores afirmaram que a incorporação da molécula em materiais húmicos pode limitar futuras metabolizações do herbicida e que, a formação de resíduos ligados tendem à diminuir sua fitotoxicidade.

Xie et al. (1997) constataram que o balanço de massa revelou uma quantidade significativa de ^{14}C -atrazina no componente mineral da humina, independentemente da

posição de marcação da molécula. Isto pode ter sido em função da pequena quantidade de matéria orgânica nesta fração, que não pode ser removida pelo método. Eles também observaram maior quantidade de radioatividade encontrada no componente ácido húmico da humina.

Queiroz (1997) avaliou a distribuição de resíduos ligados de ^{14}C -atrazina na fração orgânica de um Latossolo Vermelho Escuro. Encontrou 6,6, 3,3 e 20,3 % da radioatividade aplicada nas frações ácido fúlvico, humina e ácido húmico, respectivamente. Houve uma diminuição gradual dos resíduos dessorvidos, chegando a 1,5 % no final do ensaio. Os resíduos extraíveis variaram de 57, 39 e 21 % aos 15, 60 e 150 dias após a incubação.

Trabalhos enfocando a formação de resíduo ligado com outras moléculas do grupo das s-triazinas, também são relatados na literatura. Mittelstaedt et al. (1987) observaram uma forte sorção da ^{14}C -anilazina. Imediatamente após a aplicação, apenas 31 % da radioatividade aplicada pôde ser dessorvida com CaCl_2 , chegando a 10 % no final do ensaio. A fração não extraível (ligada) foi de 30 % inicialmente, e, após 100 dias 55 %. Nesta mesma linha de pesquisa Heitmann-Weber et al. (1994), em ensaio sobre a degradação de anilazina e dihidroxi-anilazina em várias profundidades de um solo Orthic Luvisol, da Alemanha, encontraram 14, 15 e 56 %, de resíduo ligado distribuído nas frações ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e humina, respectivamente.

Além dos estudos referentes à formação e distribuição dos resíduos ligados nas diferentes frações da matéria orgânica, alguns pesquisadores têm procurado elucidar a questão da influência da adição de materiais orgânicos como palha de milho, por exemplo, sobre a formação dos resíduos ligados e sua influência na degradação da molécula em questão. Foi o que procurou avaliar Printz et al. (1995), utilizando 1,5 g de palha de milho/100g de solo seco e o pesticida metabentiazuron. A degradação da palha 45 dias após a incubação, atingiu 45 % da radioatividade aplicada, enquanto que a degradação da molécula chegou a 5 %. A palha de milho estimulou a dissipação de metabentiazuron que ocorreu principalmente, devido a formação de resíduos ligados (83 % da radioatividade aplicada). Observou-se alta atividade microbiana na presença da palha, resultado da intensa mineralização desta. Cerca de 3% da radioatividade aplicada

na palha foi incorporada à biomassa microbiana, 10 dias após sua aplicação, enquanto que, o ^{14}C do metabentiazuron só foi incorporado na biomassa, após sua aplicação no solo. Com relação ao fracionamento da matéria orgânica, a quantidade de radiomarcado foi maior nos ácidos fúlvicos, seguido dos ácidos húmicos e humina. Na ausência e na presença da palha, a relação de radiocarbono residual dos: (ácidos fúlvicos + húmicos)/humina foi 0,73 e 1,66, respectivamente. Desta forma, verifica-se que a palha de milho promoveu um aumento significativo na degradação do metabentiazuron e também na formação de resíduos ligados.

2.5.2 Mecanismo de formação dos resíduos ligados

Uma significativa proporção de produtos de degradação de certos pesticidas aplicados na agricultura permanecem no solo como resíduos ligados. A matéria orgânica é a principal responsável pela formação desses resíduos. Além da ligação química, os produtos de degradação são firmemente retidos pelas frações da matéria orgânica por um processo que envolve, provavelmente, adsorção às superfícies externas e penetração nos vazios internos das ligações entre as moléculas com arranjo estrutural tipo peneira (Khan, 1991).

Estudos com pesticidas de diversas classes têm mostrado que a fração orgânica do solo é o principal local onde ocorrem as ligações dos resíduos ligados, no entanto, esses resíduos podem estar associados às frações inorgânicas do solo, em baixas concentrações (Khan, 1982).

Os resíduos ligados podem ser considerados como resultado de um processo de estabilização, pois suas taxas de degradação e mineralização são consideravelmente menores em comparação àquelas que correspondem aos herbicidas (Barriuso et al., 1997).

Existem várias hipóteses propostas para explicar a formação dos resíduos ligados no solo: ligações químicas com compostos da matéria orgânica do solo, captura em vazios internos na matéria orgânica, incorporação em polímeros fenólicos e bioincorporação em estruturas celulares (Calderbank, 1989) e ligações físicas com os

componentes minerais em solos com baixo teor de matéria orgânica (Musumeci & Ostiz, 1994).

Os resíduos ligados de pesticidas no solo, podem ser extraídos das frações orgânicas do solo. Uma análise qualitativa do caráter da ligação pode ser realizado por meio de espectroscopia de ressonância magnética nuclear (^{13}C -NMR). Utilizando-se desta técnica, Wais et al.(1995), avaliaram o mecanismo de ligação do fungicida anilazina, no ácido húmico extraído de dois solos da Alemanha. Foram detectadas ligações “alkoxy” entre anilazina e essas frações.

Wang et al. (1990), utilizando fracionamento por ultrafiltração e cromatografia líquida, estudou a ligação e a hidrólise da atrazina em ácido fúlvico caracterizado estequiometricamente. Eles concluíram que há uma forte conexão entre ligação e protonação de ácidos fúlvicos carboxilados, porém a máxima ligação não corresponde a completa protonação do ácido fúlvico ou atrazina. A capacidade de ligação da atrazina e hidroxiatrazina é bem definida em cada pH e não há competição entre elas, sendo que a máxima capacidade de ligação da atrazina ocorreu em pH 1,4. Em resumo, foi proposto como mecanismos de ligação: as pontes de hidrogênio do grupo OH do ácido fúlvico, que compete diretamente com a forte ligação do H^+ com a água e a interação de transferência de carga ou mecanismo doador e receptor de elétrons, com troca de íons por atrazina protonada. Os sítios de ligação são criados pelo rearranjo dinâmico do próprio ácido fúlvico. Entre uma pequena e grande partícula está um hidrogênio ligado, em equilíbrio análogo às interações que controlam a estrutura terciária das proteínas. Observou-se também que a capacidade de ligação da atrazina varia com a concentração de ácido fúlvico, em função do fato dos mesmos serem uma mistura polidispersa, com grande número de partículas de baixo peso molecular e pequeno número com alto peso molecular. Desta forma, aumentando-se a concentração de ácidos fúlvicos, por efeito de massa, ocorre agregação destes, incluindo neste processo ligações de pontes de hidrogênio. Neste caso, há bloqueio dos sítios de ligação onde estão envolvidos a atrazina e hidroxiatrazina.

Bollag (1991) mostrou que os xenobióticos, tais como: fenóis e anilinas substituídas, podem ser covalentemente ligados às substâncias húmicas e as reações

podem ser catalizadas por enzimas microbianas e agentes abióticos, sendo que existem dois mecanismos propostos para esta incorporação: ligação química direta da substância ao sítio reativo da superfície orgânica coloidal e incorporação da substância dentro da estrutura de ácidos fúlvicos e húmicos, recentemente formados durante o processo de humificação.

Musumeci & Ostiz (1994) analisaram alguns aspectos da função da atividade microbiológica sobre a ligação de cipermetrina em dois solos brasileiros (Latossolo Vermelho Escuro e Glei Húmico, com 1,3 e 8 % de matéria orgânica, respectivamente), utilizando isolados de microrganismos em um período de incubação de 120 dias. A atividade microbiológica foi importante fator de ligação do pesticida no solo com alto teor de matéria orgânica, onde somente 5,6 % do carbono radioativo permaneceu ligado nas amostras do solo Glei Húmico submetido à esterilização, em contraste com 41 % de resíduos ligados encontrados no solo não esterilizado. Entretanto, no caso do Latossolo Vermelho Escuro, nenhuma diferença foi encontrada entre o solo esterilizado e não esterilizado.

2.5.3 Biodegradação dos resíduos ligados

A persistência de resíduos não-extraíveis e sua suscetibilidade à mineralização é o ponto central de interesse para a avaliação do seu significado. Estudos de biodegradação de resíduos ligados com vários pesticidas têm mostrado, grandes variações. Entretanto, o fato dos microrganismos serem capazes de quebrar ligações heterocíclicas que resistem à hidrólise ácida e alcalina, indicam que os resíduos ligados de xenobióticos podem tornar-se biodisponíveis para plantas (Roberts, 1984). A questão do potencial de liberação e disponibilidade biológica tem sido revisada em vários trabalhos (Khan & Ivarson, 1981; Lichtenstein, 1980 e Rack & Lichtenstein, 1985). Existem diferentes grupos de microrganismos com variável habilidade em liberar resíduos ligados (Khan & Ivarson, 1982). Após a incorporação dos resíduos ligados à matéria orgânica sua liberação é gradual, em função da própria reciclagem da matéria orgânica ser bastante lenta (Golovleva et al., 1990). No entanto, vários trabalhos têm

mostrado que esses resíduos podem ser liberados mais rapidamente por determinado grupo de microrganismos (Khan & Behki, 1990; Musumeci & Ostiz, 1994). Já Bollag (1991) afirma que essa liberação ocorre muito lentamente e em extensão mínima, na maioria das observações disponíveis.

O efeito de duas espécies de *Pseudomonas* sobre a liberação de resíduos ligados de ^{14}C -atrazina incubada em condições de laboratório à temperatura constante foi avaliado durante 84 dias. O solo apresentou 54 % de resíduos ligados ao final da incubação. A adição de glicose ao final de 56 dias, aumentou a liberação de resíduos ligados, conseqüência, provavelmente, do aumento da população e atividade da bactéria. Embora as espécies de *Pseudomonas* utilizassem a atrazina como principal fonte de carbono, é evidente que a matéria orgânica do solo contendo resíduos ligados também serviram como substrato alternativo de carbono, resultando num aumento de sua atividade. No início os resíduos ligados foram inacessíveis para as espécies de *Pseudomonas*, no entanto, a utilização da matéria orgânica como substrato acelerou a liberação de resíduos ligados do solo. Os resíduos de hidroxiatrazina, atrazina dealquilada e seus hidroxí análogos aumentaram durante a incubação, enquanto que as de atrazina diminuíram. A análise dos extratos também revelou alta proporção de deisopropilatrazina e seus hidroxí análogos. Este fato não pode ser atribuído somente a liberação de resíduos ligados. Aparentemente, certa quantidade de atrazina liberada dos resíduos ligados pode ter sido futuramente metabolizada, preferencialmente por N-dealquilação (Khan & Behki, 1990).

No Brasil, o trabalho pioneiro sobre a biodisponibilidade de resíduos ligados foi o realizado por Musumeci et al. (1992). Eles avaliaram a formação e biodisponibilidade de resíduos de piretróides (^{14}C) ligados ao solo. Encontraram que cerca de 8 a 15 % dos resíduos ligados estavam disponíveis.

A liberação de resíduos ligados de cipermetrina como $^{14}\text{CO}_2$, foi constatada em um solo brasileiro (Latosolo Vermelho Escuro) por Musumeci & Ostiz (1994), utilizando-se isolados de microrganismos em diluição em série, incubados por 30 dias. Este fato é uma evidência de que os resíduos ligados não estão completamente excluídos de interações ambientais, embora vários aspectos de ensaios em laboratórios diferirem

das condições de campo, tais como, temperatura constante, teor de umidade ótima e uso de um ingrediente ativo não formulado.

Outra questão que deve-se considerar, são as próprias características físico-químicas do pesticida, que também influenciam na biodegradação do resíduo ligado, tais como sua estrutura molecular. Aquelas moléculas que possuem grupos fenóis e nitrogênio, formam quantidades consideráveis de resíduos ligados, como é o caso das triazinas (Calderbank, 1989) . O aumento do número de átomos de cloro também intensifica a formação dos resíduos ligados (Roberts, 1984).

2.6 Caracterização das frações da matéria orgânica do solo

Considerando-se o fato de que, existe forte relação entre a formação de resíduos ligados no solo e o teor de matéria orgânica do solo (Bollag, 1991; Calderbank, 1983; Khan, 1991 e Lerch et al., 1997) e que a distribuição da radioatividade nas diferentes frações orgânicas do solo é uma indicação de como os resíduos ligados foram formados, o estudo das características das substâncias húmicas torna-se importante para o melhor entendimento deste processo.

A matéria orgânica do solo consiste de restos vegetais ou animais não decompostos ou parcialmente decompostos (restos de plantas, raízes, microrganismos e seus produtos de decomposição). Pode ser subdividida em: substâncias húmicas (ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e humina) e substâncias não húmicas, tais como: carboidratos, proteínas, ceras, gorduras, etc. (Stevenson, 1986). As substâncias húmicas são formadas por profundas alterações de substâncias não húmicas através da degradação microbiana (Kononova, 1966). São ricas em carbono (45-65 %), oxigênio (30-40 %), que podem, em parte, estar ligados à grupos funcionais, como OCH_3 , OH e COOH , contendo nitrogênio (2-6 %) e pequenas quantidades de fósforo, enxôfre orgânico e cinzas. Diferem, entre si, em função da importância do núcleo, natureza das unidades que a constituem e composição das cadeias laterais e dos agrupamentos funcionais (Tauk-Tornisielo, 1997).

As substâncias húmicas podem ser subdivididas em ácidos fúlvicos, ácidos húmicos e humina em função de suas solubilidades em soluções aquosas a diferentes valores de pH. Os ácidos fúlvicos são solúveis em qualquer valor de pH. Os ácidos húmicos são solúveis em bases, mas precipitam em pH menor que 2. A humina é insolúvel em soluções aquosas a qualquer valor de pH (Stevenson, 1986).

Os ácidos fúlvicos possuem uma taxa de carbono relativamente fraca e o oxigênio bastante abundante com grande número de grupos funcionais ácidos, principalmente, COOH (Stevenson, 1986). Trata-se de uma molécula relativamente pequena, com núcleo pouco desenvolvido, cadeias laterais numerosas e acidez mais elevada que os ácidos húmicos (Tauk-Tornisielo, 1997). Apresentam peso molecular mais baixo, e solubilidade maior em água, do que as outras frações. Tem maior interesse em transporte de pesticidas, porque estão presentes em águas superficiais (Khan, 1991). Os ácidos húmicos possuem um núcleo preponderante, cadeias reduzidas, molécula mais condensada, volumosa, rica em carbono e menos em oxigênio, que pode fazer parte do núcleo sob forma não reativa. A humina é menos conhecida e parece ser mais condensada que os ácidos húmicos e sua insolubilidade pode estar relacionada com uma ligação muito íntima com a fração mineral (Tauk-Tornisielo, 1997). Kohl & Rice (1998), utilizando o fracionamento pelo método de partição com metil isobutil cetona (MIBK), separou a humina em três frações: lipídeos, ligada ao ácido húmico e resíduo insolúvel.

2.7 Remobilização de resíduos ligados

Uma nova linha de pesquisa vem surgindo com a finalidade de verificar se após a formação de resíduos ligados, eles teriam a capacidade de se remobilizarem no ambiente, ou seja, eles seriam capazes de se redistribuírem nas substâncias húmicas, por exemplo. Outros aspectos a serem explorados referem-se a degradação microbiana, dessorção e extração desses resíduos.

Lavorenti et al. (1998) avaliaram a remobilização de resíduos ligados de ^{14}C -anilazina em ácidos fúlvicos, em dois solos da Alemanha. Os microrganismos foram

estimulados aplicando-se os tratamentos palha de milho (1,5 g/100 g solo seco) e glicose + peptona (0,2 g + 0,2 g/100 g solo seco). Ocorreu baixa liberação de $^{14}\text{CO}_2$ em todos os tratamentos aplicados (variou de 0,2 a 1,4 %), indicando que os resíduos ligados de anilazina em ácidos fúlvicos não foram apreciavelmente mineralizados. O solo mais arenoso apresentou menor taxa de liberação de $^{14}\text{CO}_2$, em relação ao controle, principalmente, com a palha de milho. Segundo os autores, os microrganismos concentraram seu ataque nessas fontes externas de carbono e energia, antes de utilizarem o resíduo ligado dos ácidos fúlvicos. Na presença de glicose + peptona, houve um maior ataque ao resíduo ligado de ácidos fúlvicos. A dessorção variou de 22 a 39 %, sendo menor no tratamento com palha. A extração variou de 4 a 7 % nos dois solos, sendo menor no tratamento testemunha. Os autores concluíram ainda que houve grande proporção de resíduos ligados na forma de ácidos fúlvicos em ambos os solos e que os tratamentos usados não foram eficientes para liberar substancialmente esses resíduos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido nos laboratórios da Seção de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP), Piracicaba - SP.

3.1 Herbicida

Foram utilizadas no ensaio a atrazina grau técnico (97,5 % de pureza química) e a ^{14}C -atrazina radiomarcada uniformemente no anel ($[2,4,6\text{-}^{14}\text{C}]$, com $86,76 \mu\text{Ci mg}^{-1}$ de atividade específica e 99,3 % de pureza radioquímica). Ambos os produtos foram doados pela Novartis. A figura 1, representa a estrutura molecular do herbicida utilizado. Os critérios de escolha do herbicida foram sua importância na agricultura brasileira e persistência no ambiente.

3.2 Solos

Amostras de solos classificadas como Latossolo Vermelho Escuro (LE eutrófico, A moderado, textura média-arenosa) e Glei Húmico (GH distrófico, Tb, textura argilosa) foram coletadas na profundidade de 0-15 cm, em 10 pontos diferentes, em áreas de cultivo de cana-de-açúcar no Distrito de Tanquinho e no Município de Piracicaba-SP, respectivamente. As características físico-químicas são apresentadas abaixo:

Figura 1. Estrutura molecular da atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino *s*-triazina). *Carbonos radiomarcados com ^{14}C .

- LE: 710 g kg⁻¹ de areia, 200 g kg⁻¹ de argila, 90 g kg⁻¹ de silte, pH (CaCl₂) 6,5 e pH em água 6,8, carbono orgânico 8,0 g kg⁻¹, CTC 5,9 cmol_c kg⁻¹, V% 79,43, H+Al 1,21 cmol_c kg⁻¹.

- GH: 200 g kg⁻¹ de areia, 540 g kg⁻¹ de argila, 260 g kg⁻¹ de silte, pH(CaCl₂) 3,9 e pH em água 4,2, carbono orgânico 65,8 g kg⁻¹, CTC 23,06 cmol_c kg⁻¹, V% 5,19, H+Al 21,86 cmol_c kg⁻¹.

As análises químicas foram realizadas no laboratório de físico-química aplicada do Departamento de Química da ESALQ/USP. As análises granulométricas foram realizadas no laboratório de Física do Departamento de Ciência do Solo da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP).

3.2.1 Preparo dos solos

Logo após a coleta, as amostras de solo foram colocadas em geladeira a 5 °C. Após uma semana, secou-se à sombra para permitir que as mesmas fossem processadas em peneira de malha de 2 mm de diâmetro, obtendo-se a terra fina seca ao ar (TFSA).

3.2.2 Determinação da umidade dos solos para o ensaio de distribuição e remobilização

A umidade dos solos foi determinada pelo método gravimétrico, segundo Reichardt (1987), retirando-se três réplicas de 10 g de solo, deixando-as secar em estufa a 105° C por 24 horas. Os solos LE e GH apresentaram 4,5 % e 9,8 % de umidade, respectivamente.

3.2.3 Determinação da capacidade de campo

O método utilizado simula o princípio da capacidade de retenção de água do solo (Costa, 1983) e denomina-se torrão separado pela frente de molhamento (TSFM). Colocou-se cerca de 150 g de TFSA em cápsulas de alumínio e em seguida adicionou-se 2 mL de água destilada, por gotejamento com o auxílio de uma pipeta, num prazo de tempo de 40 segundos. O torrão úmido formado pela frente de molhamento foi separado da terra seca e colocado em uma placa de Petri e imediatamente pesado, obtendo-se assim o peso úmido (Pu). Em seguida, levou-se à estufa a 100° C por 24 horas. O teor de água do pequeno torrão foi determinado gravimetricamente. Em paralelo, pesou-se uma certa quantidade de TFSA e colocou-se em placas de Petri, e, em seguida, determinou-se seu teor de umidade pelo mesmo procedimento descrito anteriormente. A capacidade de campo foi então calculada pela diferença entre a percentagem de umidade do solo no torrão e sem torrão. O teor de umidade na capacidade de campo foi de 23 e 40 % para os solos LE e GH, respectivamente.

3.3 Aplicação do produto radioativo e do produto técnico

O cálculo da dose recomendada de atrazina radiomarcada a ser aplicada levou em consideração o limite de detecção do aparelho de cintilação líquida para permitir contagem suficiente durante o ensaio subsequente de remobilização. Considerou-se para o cálculo 100 g de solo (base seca), incorporação de 10 cm superficiais do solo e

densidade do solo $1,2 \text{ g cm}^{-3}$. A dose final recomendada foi $10,38 \text{ } \mu\text{g i.a. g}^{-1}$ solo (cerca de três vezes a dose máxima recomendada pelo fabricante $4 \text{ kg i.a. ha}^{-1}$). Isto correspondeu a dose radioativa de $123.902.984,10 \text{ dpm/100g} = 2.065,05 \text{ KBq}$.

3.4 Ensaio de distribuição com o produto radioamarcado

Três amostras de 100 g dos solos LE e GH (base seca) foram distribuídas em frascos de vidro com tampa (tipo compota), com capacidade para 500 mL. A seguir, adicionou-se água aos solos para atingir 40 % da capacidade de campo. Os potes foram fechados e incubados por oito dias com a finalidade de ativar os microrganismos. Passado este período, aplicou-se em cada pote 250 μL da solução estoque com o produto radioativo (homogeneizando-se com um bastão de vidro). Água deionizada foi adicionada até atingir o valor de 60 % da capacidade de campo. Os frascos foram pesados e incubados, no escuro, por 63 dias a temperatura constante de 25°C .

3.5 Mineralização da ^{14}C -atrazina

A mineralização da ^{14}C -atrazina foi acompanhada durante 63 dias de incubação pela captura do $^{14}\text{CO}_2$ desprendido. Para tal, utilizou-se o método descrito por Costa (1992). No interior de frascos de vidro com tampa (tipo compota) foram colocados 100 g de solo (base seca), e após homogeneização foi aberto um espaço no centro do mesmo, colocando-se um pequeno frasco suporte e dentro deste, um frasco de cintilação (20mL) com 10 mL de NaOH $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. A solução foi coletada periodicamente, a cada 7 dias (Figura 2). De cada frasco, retirou-se três alíquotas de 1 mL e acrescentou-se 10 mL da solução cintiladora: 4 g de difenil oxazole (PPO); 0,2 g de 1,4-bis-fenil-2-oxazoli-benzeno; 2,2'-p-fenileno-bis-[5-feniloxazole] (POPOP); 340 mL de Renex (95 % de pureza) e 660 mL de tolueno (Mesquita & Ruegg, 1984). A radioatividade das amostras foram quantificadas por 10 minutos em um cintilador líquido (Packard Tri-Carb 1600 TR). O valor da radioatividade encontrada em dpm (desintegrações por

Figura 2 . Sistema utilizado para a captura de $^{14}\text{CO}_2$ desprendido (Costa,1992)

minuto), foi calculada em termos percentuais da radioatividade inicial aplicada.

3.6 Ensaio de distribuição com o produto frio

Realizou-se paralelamente, nas mesmas condições, outra incubação utilizando apenas a atrazina técnica (produto frio), com a finalidade de obter resíduos ligados em ácidos fúlvicos para ser utilizado no ensaio de atividade microbiana.

Ao final do período de incubação, os dois solos foram submetidos à extração dos resíduos utilizando solvente orgânico e posterior fracionamento da matéria orgânica.

3.7 Extração com solvente

A solução utilizada para extração da atrazina foi acetonitrila : água (8:2 v/v), Lavorenti et al. (1997). Efetuou-se três extrações consecutivas. Inicialmente transferiu-se 50 g de solo, devidamente homogeneizados, com duas réplicas cada, para frascos de centrífuga de 250 mL. Na primeira extração, adicionou-se 150 mL da solução extratora e agitou-se por 1 hora a 220 rpm, em agitador horizontal. Centrifugou-se por 15 minutos à 10.000 rpm e juntou-se o sobrenadante das duas réplicas em outro frasco. Foram então, retiradas alíquotas de 1 mL, em triplicatas, e adicionados 10 mL da solução cintiladora (Mesquita & Ruegg, 1984), para análise da radioatividade (com exceção do item 3.6).

Na segunda extração, adicionou-se 140 mL da solução extratora à fase sólida da primeira extração e agitou-se por 1 hora a 220 rpm em agitador horizontal. Centrifugou-se por 15 minutos à 10.000 rpm e após juntar as respectivas réplicas, retirou-se alíquotas de 1 mL em triplicatas, para leitura em cintilador líquido. Em seguida, juntou-se o sobrenadante ao mesmo frasco da primeira extração. Na terceira extração, usou-se o mesmo procedimento da segunda. Após esta etapa, a fase sólida remanescente nos frascos de centrífuga foi colocada para secar à temperatura constante de 25° C, no escuro.

3.8 Combustão das amostras de solo (determinação dos resíduos ligados)

Após a extração, a determinação do total de resíduos não-extraíveis (ligados) das amostras sólidas dos dois solos, foi feita através do método de combustão seca no aparelho Biological Oxidizer – OX 500 (Harvey Instrument).

Após as extrações, as amostras de solo foram gentilmente maceradas para evitar o aquecimento e passadas em peneira de malha de 0,50 mm de diâmetro. A seguir, cinco réplicas de 0,25 g foram colocadas em barquinhas de cerâmica para realizar a combustão a 900° C (com fluxo de O₂ durante 3 minutos). Para coleta do ¹⁴CO₂

resultante, foi utilizado um coquetel de soluções (700 mL da solução cintiladora descrita por Mesquita & Ruegg (1984) + 300 mL de monoetanolamina + 250 mL de metanol). Imediatamente antes da combustão das amostras, foi realizado um teste para o controle da eficiência do aparelho com três alíquotas de 50 μ L de uma solução de ^{14}C -glicose.

3.9 Fracionamento da matéria orgânica

O fracionamento da matéria orgânica dos solos foi efetuado de acordo com procedimentos recomendados internacionalmente, baseados em termos da solubilidade das diferentes frações em ácidos e bases.

Após a extração com solventes, transferiu-se aproximadamente 50 g das amostras de solo para frascos de 250 mL, adicionou-se a cada um deles 120 mL de uma solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹ e agitou-os por 16 horas em agitador horizontal à 220 rpm. Depois, efetuou-se a centrifugação por 40 minutos à 12.000 rpm e separou-se o sobrenadante que continha as frações ácidos fúlvicos + ácidos húmicos da fração humina do solo residual. Este processo foi repetido novamente, porém na segunda extração utilizou-se 100 mL da solução de NaOH 0,5 mol L⁻¹. Mediu-se o volume total dos extratos e retirou-se alíquotas (0,5 mL solo LE e 0,05 mL solo GH), em triplicata, e acrescentou-se 10 mL de insta-GEL XF (coquetel universal utilizado em amostras aquosas e não aquosas), para leitura da radioatividade nestas frações. A fase sólida que permaneceu nos frascos de centrifuga (humina) foi colocada para secar a 25^o C, no escuro. Em seguida, realizou-se a combustão utilizando-se o mesmo procedimento descrito para determinação do resíduo ligado, com a finalidade de determinar o percentual de ^{14}C -atrazina distribuído nesta fração.

O sobrenadante foi submetido a novo fracionamento, adicionando-se 20 mL de HCl concentrado. Agitou-se levemente com as mãos e centrifugou-se por 30 minutos a 12.000 rpm, separando-se a parte solúvel (ácidos fúlvicos) da fase insolúvel (ácidos húmicos). Mediu-se o volume total da fase líquida e retirou-se uma alíquota de 0,5 mL em triplicata, acrescentando-se 10mL de insta-GEL, para análise da radioatividade. A

fase precipitada (ácidos húmicos) foi redissolvida com 30 mL de solução de NaOH 0,25 mol L⁻¹, com posterior ultra-sonificação (Bandelin Sonorese RK510S). Após medir-se o volume total, alíquotas de 0,05 mL (50µL) foram retiradas, em triplicata, acrescentando-se 10 mL de insta-GEL para análise da radioatividade.

Um esquema simplificado dos passos seguidos no fracionamento da matéria orgânica, é mostrado na Figura 3.

3.10 Procedimentos para o estudo da remobilização do resíduo ligado de ¹⁴C-atrazina na fração ácidos fúlvicos

A fração de ácidos fúlvicos contendo o resíduo ligado do herbicida ¹⁴C-atrazina, foi selecionada para o estudo de remobilização e os tratamentos contidos na Tabela 1 foram utilizados. Os ácidos fúlvicos, foram escolhidos por serem mais solúveis e, portanto, sujeitos a processos de remobilização.

Palha de milho e glicose+peptona foram utilizados em alguns tratamentos com o objetivo de verificar as influências que fontes externas de carbono e nitrogênio poderiam ter na atividade microbológica, afetando a remobilização do resíduo ligado em ácidos fúlvicos.

3.10.1 Incubação

Utilizou-se os mesmos solos e procedimentos feitos na instalação do ensaio de distribuição, aplicando-se os tratamentos da Tabela 1. O pH da solução de resíduo ligado de ¹⁴C-atrazina em ácidos fúlvicos, obtidas no ensaio de distribuição, foi previamente corrigida com carbonato de potássio até pH 6,5 e aplicada nos solos devidamente acondicionados nos mesmos frascos. A umidade em cada frasco de vidro contendo os solos tratados, foi corrigida para 60 % da capacidade de campo. Calculou-se a radioatividade inicial para o ensaio de remobilização (1.682.025,60 dpm/100g = 28.033,76 Bq/100 g solo).

Figura 3. Esquema simplificado do fracionamento da matéria orgânica

Tabela 1. Esquema do ensaio para o estudo de remobilização dos resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos e atividade microbiana.

Solos	Repetições	Tratamentos
LE	2	100g solo + 1,5 g de Palha de Milho
	2	100g de solo + 0,2 g glicose+ 0,2 g peptona
	2	100 g de solo
GH	2	100g solo + 1,5 g de Palha de Milho
	2	100g de solo + 0,2 g glicose+ 0,2 g peptona
	2	100 g de solo

LE = Latossolo Vermelho Escuro

GH= Gleí Húmico

3.10.2 Mineralização, extração, combustão e fracionamento da matéria orgânica do resíduo ligado na fração ácidos fúlvicos.

O período de incubação foi de 49 dias, no escuro e a temperatura constante de 25° C. A metodologia para avaliar a evolução de $^{14}\text{CO}_2$, extração por solventes, combustão dos resíduos não-extraíveis (ligados) e fracionamento da matéria orgânica foi idêntica ao do ensaio de distribuição.

3.10.3 Dessorção

Ao final do período de incubação e antes da extração, foi feita a dessorção. Para isto, as amostras de solo de cada frasco, foram divididas em duas partes iguais (aproximadamente 50 g) e colocadas em frascos de centrífuga, transferindo-se para cada um deles 100 mL de uma solução de CaCl_2 0,01 mol L^{-1} (para simular a força iônica do

solo). Em seguida, agitou-se por 24 horas à 220 rpm e, logo após, centrifugou-se à 10.000 rpm por 20 minutos. O líquido sobrenadante foi coletado retirando-se alíquotas de 1 mL, em duplicata, para análise do teor de radioatividade por cintilação líquida.

3.11 Ensaio da atividade microbiana

A atividade microbiana foi determinada semanalmente até 49 dias, em ensaio paralelo ao da remobilização, aplicando-se os os mesmos tratamentos descritos na Tabela 1. O método utilizado foi o descrito por Freitas et al. (1979). Pesou-se 1 g de solo incubado com umidade de 60 % da capacidade de campo e colocou-se em Erlenmeyer de 50 mL de capacidade. Em seguida, nas armadilhas com tiras de papel de filtro, colocou-se 250 µL de monoetanolamina. Logo após, aplicou-se em 1 g de solo 300 µL de uma solução de ¹⁴C-glicose com concentração de 2 µmol mL⁻¹, incubando as amostras por 1 hora. Ao final deste período, a monoetanolamina juntamente com o papel de filtro foram colocados dentro de frascos de cintilação contendo 10 mL da solução cintiladora (Mesquita & Ruegg (1984), para leitura da radioatividade em cintilador líquido. A atividade microbiana (µmol ¹⁴C-glicose. g⁻¹ solo seco. h⁻¹) foi calculada pela fórmula (1).

$$X = \frac{A}{A_o} \times \frac{C}{M} \times \frac{V}{T}$$

(1)

onde,

X = µmol ¹⁴C-glicose. g⁻¹.solo seco. h⁻¹

A = Atividade da amostra (dpm)

Ao = Atividade do padrão (dpm)

C = Concentração da solução de ¹⁴C-glicose (µmol/mL)

M = Massa de solo seco (g)

V = Volume da solução de ¹⁴C- glicose (µL)

T = Tempo de incubação (h)

3.12 Biomassa microbiana

Paralelo ao ensaio de remobilização e atividade microbiana, monitorou-se a biomassa dos microrganismos, aplicando-se ao solo LE e GH em ensaio inteiramente casualizado, os mesmos tratamentos descritos na Tabela 1, com três repetições cada. O método utilizado foi o de fumigação-extração (FE), descrito por Vance et al. (1987).

3.13 Cromatografia de camada delgada (Radio-TLC)

Os extratos obtidos no ensaio de distribuição (acetonitrila + água) e remobilização (CaCl_2 e acetonitrila + água) foram concentrados em rotaevaporador (Heidolph WB2000), a 40°C , até atingirem um volume de 5 mL. As amostras foram aplicadas simultaneamente com os padrões, no mesmo ponto de aplicação (co-cromatografia). Utilizou-se placas de camada delgada de sílica gel (60 F254), 20 cm x 20 cm, com o auxílio de um aplicador automático (Camag-Linomat IV).

O sistema de solventes utilizado para a eluição das placas, foi: clorofórmio:acetona:ácido acético:água (50:30:15:1 v/v/v/v) (Burauel et al.²).

Após a eluição das placas, estas foram secas ao ar por 30 minutos e em seguida as manchas foram visualizadas em luz UV, demarcadas a lápis e analisadas quanto a radioatividade e valores de R_f (razão de frente), em analisador linear de co-cromatografia de camada delgada (Automatic TLC-Linear Analyzer Berthold).

² BURAUDEL, P.; MITTELSTAEDT, W.; FÜHR, F. Freiland-lysimeterstudie mit [triazin- $\text{U-}^{14}\text{C}$] atrazin. Interner Bericht. Jülich, 1992. 66p.

3.14 Correção de contagem (cpm)

As correções da eficiência de leitura no cintilador líquido (em contagem por minuto, cpm) foram feitas através da curva de calibração com padrões externos (padrões com 130300 desintegrações por minuto, cpm = 100 % de eficiência). Desta forma, a eficiência foi correlacionada com quenching (tSIE), de acordo com as Figuras 4 (equação 2) e Figura 5 (equação 3), para os ensaios de distribuição e remobilização, respectivamente.

$$Y = a + bx + cx^{1,5} + dx^2 + e/x^{1,5} \quad (2)$$

onde: $a = 146,93853$ $b = -0,11907979$ $c = 0,0041974153$

$$d = -4,2792281e-05 \quad e = 698,8118 \quad r^2 = 0,99992589$$

$$Y = a + bx + c x^{2,5} + dx^3 + e/x^{0,5} \quad (3)$$

onde: $a = 141,36269$ $b = 0,052063294$ $c = 2,4573725e-06$

$$d = 4,9572875e-08 \quad e = 697,79155 \quad r^2 = 0,99997444$$

Figura 4. Curva de calibração para correção de “quench”
no ensaio de distribuição.

Figura 5. Curva de calibração de “quench”
no ensaio de remobilização

3.15 Análise estatística do ensaio de biomassa microbiana

Para avaliar o ensaio de atividade microbiana, o delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado, em esquema fatorial 3 x 2 para cada tipo de solo, sendo que as comparações foram feitas pelo teste de Tukey a 5% de significância.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo da distribuição da ^{14}C -atrazina

4.1.1 Mineralização

A quantificação do $^{14}\text{CO}_2$ desprendido no solo LE, mostrou uma fase inicial de mineralização lenta até os 21 dias e, à partir daí, uma fase exponencial crescente de liberação (Figura 6), atingindo valores acumulados de 7,26 % do total da radioatividade aplicada, no final do período (Figura 7). Na fase de maior mineralização, provavelmente, a clivagem do anel de atrazina pela ação dos microrganismos do solo foi mais acentuada. Este comportamento é típico da degradação microbiana de pesticidas e foi descrito por Kaufman & Kearney (1970).

Figura 6 – Porcentagem acumulada de $^{14}\text{CO}_2$ desprendido, resultante da aplicação de ^{14}C -atrazina, durante 63 dias de incubação (estudo de distribuição).

No solo GH, a curva manteve-se praticamente constante, apresentando ausência da fase exponencial e intensidade de mineralização bastante inferior ao LE (Figura 6). Ao final da incubação, o valor acumulado de $^{14}\text{CO}_2$ desprendido foi de apenas 0,12 % da radioatividade aplicada (Figura 7). Este mesmo comportamento foi observado por Nakagawa et al. (1995) em ensaio de laboratório com os solos LE e GH, no entanto, os valores acumulados encontrados no experimento foram bem maiores (28,5 e 5,0 %, respectivamente). Já Yassir et al. (1998) encontraram em incubação de dois meses, porcentagens de mineralização acumulada de atrazina de 10 % na cadeia lateral etil e, 3 % na cadeia isopropil.

A variação da intensidade de desprendimento de $^{14}\text{CO}_2$ nos dois solos, pode estar relacionada principalmente às diferenças no teor de matéria orgânica. No solo LE este valor é de $8,0 \text{ g kg}^{-1}$ e no GH $65,8 \text{ g kg}^{-1}$. Desta forma, a maior quantidade de sítios de adsorção no solo GH, propiciaria uma maior adsorção da molécula e, conseqüentemente, estaria menos disponível para ser mineralizada. Anderson & Domisch (1978) afirmam que a taxa de metabolismo microbiano de pesticidas no solo, varia em função da disponibilidade da molécula para os microrganismos e do sistema de enzimas capaz de degradá-la. Em estudo de mineralização da atrazina Kontchou & Gschwind (1995) verificaram que em solo com alto teor de matéria orgânica, a taxa de biodegradação foi limitada pela baixa disponibilidade da molécula, em função da maior adsorção.

Outro aspecto a ser considerado é que a atrazina é um herbicida básico, podendo receber um íon hidrogênio (H^+) no nitrogênio do anel heterocíclico e ser adsorvido às superfícies negativas das partículas do solo. Desta forma, valores baixos de pH propiciariam a protonação e, conseqüentemente, aumentariam a adsorção da atrazina, diminuindo, consideravelmente, a sua velocidade de degradação (Krovac et al., 1986). O baixo valor de pH do solo GH poderia favorecer a protonação uma vez que é sabido que o pH da superfície coloidal pode ser até duas vezes inferior ao pH medido em suspensão (Green & Karickhoff, 1990). Além do que, estudos de Villar et al. (1996) mostraram que em solos ácidos a atrazina pode sofrer degradação química formando o metabólito não tóxico hidroxiatrazina. De acordo com Wilkelmann & Klaine (1991),

Figura 7- Quantidade de radioatividade na forma de $^{14}\text{CO}_2$ desprendido, extraída, resíduos ligados totais e nas frações ácidos fúlvicos, húmicos e humina após 63 dias de incubação (estudo de distribuição).

descloração e subsequente hidroxilação da atrazina para hidroxiatrazina, um metabólito não fitotóxico, contribui para a formação de resíduos ligados e desativação do herbicida.

4.1.2 Extração, formação de resíduos ligados totais e sua distribuição nas diferentes frações da matéria orgânica do solo.

Verificou-se que a quantidade de radioatividade extraída (Figura 7) foi praticamente igual nos dois solos estudados (57,6 % e 58,2 % para o LE e GH, respectivamente), refletindo a eficiência da solução extratora.

Houve formação de resíduos ligados nos dois solos (26,4 e 33,2 % nos solos LE e GH respectivamente). Capriel et al. (1985) constataram a presença de resíduos ligados de atrazina na fração orgânica de um solo mineral, nove anos após a aplicação. Confrontando-se estes resultados com os de Nakagawa et. al (1995), Wilkelmann & Klaine (1991), Barriuso et al. (1997) e Queiroz (1997), os valores encontrados foram

menores. Segundo Roberts (1984), as s-triazinas são um grupo de pesticidas que quando presentes no solo formam considerável quantidade de resíduos ligados.

A formação de resíduos ligados de pesticidas está diretamente relacionada às ligações químicas com os constituintes orgânicos, à incorporação dentro de polímeros fenólicos à bioincorporação em estruturas celulares através da atividade metabólica dos microrganismos do solo e ao aprisionamento em vazios internos originados de ligações de pontes de hidrogênio entre ácidos fenólicos e benzenocarboxílicos que constituem o material húmico do solo. Todas essas hipóteses incluem os constituintes orgânicos e microrganismos (Calderbank, 1989; Khan, 1991 e Barriuso & Koskinen, 1996). Desta forma, a maior quantidade de resíduos não extraíveis (ligados) no solo GH em relação ao solo LE, pode ser explicado pelo maior teor de matéria orgânica no primeiro.

Com relação à distribuição de resíduos ligados nas diferentes frações da matéria orgânica (Figura 7), os solos obedeceram à seguinte ordem: humina $\cong$ ácidos fúlvicos > ácidos húmicos, Tabela 2. Quando se considera o total de ^{14}C que permaneceu ligado (Tabela 3), a ordem de distribuição não foi alterada.

A proporção da distribuição dos resíduos ligados em relação ao aplicado, nos solos LE e GH, foram semelhantes aos resultados encontrados por Capriel et. al. (1985), porém esses autores obtiveram valores mais elevados na humina (22 %) e nos ácidos fúlvicos (17 %).

A ligeira superioridade da humina para formação de resíduos ligados nos dois tipos de solo, possivelmente, esteja relacionada à fração mineral (Tauk-Tornisiello, 1997) e à natureza da molécula em questão (Khan, 1982). Segundo estudos de Xie et al. (1997) com atrazina, este comportamento pode estar relacionado à grande afinidade da molécula pela superfície negativa dos minerais associados à humina, considerando-se seu caráter básico (tendência à receber prótons). Além disso, o material orgânico ligado ao componente mineral da humina contribui significativamente para a ligação da molécula de pesticida.

As variações na distribuição de resíduos ligados entre o GH e o LE podem ser atribuídas, em primeira instância, às diferenças nas características químicas dos dois

Tabela 2- Recuperação total de ¹⁴C-atrazina, no estudo da distribuição, em relação a radioatividade aplicada. (*)

Solo	¹⁴ CO ₂ (**)	Resíduo Ligado	Extração ^(***)	Ácidos		Humina	Recuperação
				Fúlvicos	Húmicos		
----- (%) -----							
LE	7,25	26,44± 2,02	57,60	10,50± 0,06	3,24± 0,03	11,53± 0,68	90,12
GH	0,12	33,17± 0,61	58,20	12,65± 0,05	9,45± 1,03	12,49± 0,19	94,71

LE = Latossolo Vermelho Escuro

GH = Glei Húmico

(*) 2.065,05 KBq = 100%

(***) resultado obtido da soma das três extrações

(**) resultado obtido de valores acumulados

(±) desvio padrão da média das repetições

Tabela 3 - Recuperação total de ¹⁴C-atrazina no estudo da distribuição nas diferentes frações da matéria orgânica, em relação à concentração dos resíduos ligados.

Solo	Ácidos	Ácidos	Humina	Recuperação
	Fúlvicos	Húmicos		
	----- (%) -----			
LE	39,72± 0,24	12,27± 0,10	43,55± 2,58	95,54
GH	38,15± 0,16	28,49± 3,10	43,09± 0,59	109,73

GH = Glei Húmico (684,92 KBq = 100%) LE = Latossolo Vermelho Escuro (546,0 KBq = 100%)

(±) desvio padrão da média das repetições

solos, principalmente quanto ao teor de matéria orgânica (Huang et al. 1984 e Kwong & Wang, 1979)

4.1.3 Identificação dos resíduos extraíveis

A recuperação percentual dos resíduos obtidos por co-cromatografia de camada delgada, em relação ao total extraído (Tabela 4), mostrou que no solo LE 8,8 % foi identificado como o metabólito não tóxico hidroxiatrazina, e 44,1 % a molécula original. No solo GH, 2,3 % correspondeu ao metabólito desetilatrazina, 27,4 % a hidroxiatrazina e 26,1 %, a atrazina.

O metabolismo microbiano tem sido relatado como um dos mecanismos de degradação da atrazina no solo (Sorenson et al., 1993; Stolp & Shea, 1995 e Vanderheyden et al., 1997). Porém, um outro importante caminho para este processo é a hidrólise química, que leva à formação de hidroxiatrazina (Best & Weber, 1974 e Nakagawa et al., 1995). A formação de hidroxiatrazina é um processo de hidrólise química, provavelmente, resultado da protonação do anel ou cadeia com átomo de nitrogênio, seguida da clivagem da ligação C-Cl, pela molécula de água.

A presença de hidroxiatrazina nos dois tipos de solo, está de acordo com os resultados encontrados por Skipper et al. (1967) e Armstrong et al. (1967). Esses

Tabela 4 – Identificação da radioatividade extraída por co-cromatografia de camada delgada (estudo de distribuição).

Solo	Rfs ^(*)		
	0,39	0,50	0,90
LE	-	8,84	44,10
GH	2,32	27,40	26,10

Rf 0,39 = Desetilatrazina (DEA) Rf 0,50 = Hidroxiatrazina (HA) Rf 0,90 = Atrazina (AT)

(*) média determinada por co-cromatografia de camada delgada

(-) não detectado

LE = Latossolo Vermelho Escuro

GH = Glei Húmico

Sistema de solvente: clorofórmio: acetona : ácido acético : água (50:30:15:1 v/v/v/v)

autores constataram que a hidrólise química, é o principal caminho de degradação da atrazina em solos, sendo o ataque microbiano de menor importância.

O metabólito dealquilado desetilatrazina foi detectado apenas no solo GH. Provavelmente, por existir microrganismos capazes de realizar o processo de N-dealquilação. A variação em relação às espécies de fungos e bactérias quanto à preferência por desetilação e desisopropilação foi reportada por Behki & Khan (1986). A predominância na formação de desetilatrazina, em relação à outros produtos de degradação microbiana da atrazina, também foi constatado por Skipper & Volk (1972) e Adamns & Thurman (1991). No solo GH houve maior formação de hidroxiatrazina, em relação ao LE.

Armstrong et al. (1967) constataram que o aumento da taxa de hidrólise da atrazina, causando grande acumulação de hidroxiatrazina, estava correlacionado com baixos valores de pH e alto teor de matéria orgânica. A função da matéria orgânica foi catalizar a hidrólise pela adsorção da atrazina, que é resultado da ligação do hidrogênio com o nitrogênio do anel ou cadeia lateral e grupos ácidos fracos desta. Esse hidrogênio pode aumentar a deficiência de elétrons ao redor do átomo de cloro e, desta forma, facilitar o ataque das moléculas de água, aumentando a taxa de hidrólise. Outro fato que pode ter favorecido a formação de hidroxiatrazina neste solo, é o seu baixo pH (4,15),

que favorece a hidrólise das clorotriazinas (Best & Weber, 1974 e Nakagawa et al., 1995).

4.2 Estudo da remobilização dos resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos

4.2.1 Mineralização

Estudos de mineralização de resíduos ligados com vários pesticidas têm mostrado dependendo, da natureza química da molécula, grandes variações (Roberts, 1984).

Figura 8 – Porcentagem de $^{14}\text{CO}_2$ desprendido, de resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos, durante 49 dias de incubação (estudo de remobilização).

A Figura 8 mostra o potencial de mineralização dos resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos, num período de incubação de 49 dias. No solo LE, até o sétimo dia houve um aumento no desprendimento de $^{14}\text{CO}_2$, chegando a um valor acumulado de 0,1 % para todos os tratamentos. À partir daí, houve aumento no

desprendimento de $^{14}\text{CO}_2$. Com a palha de milho houve um pequeno favorecimento à degradação do resíduo ligado, e com a glicose+peptona, ocorreu efeito contrário. Provavelmente, neste último caso, os microrganismos concentraram seu ataque às substâncias mais simples (mais fáceis de degradar), antes de utilizarem o resíduo ligado. Alvey & Crowley (1995) concluíram que a forma de carbono adicionado ao solo afetou a mineralização da atrazina, demonstrado pela inibição da degradação pela glicose e citrato de sódio.

No solo GH, o desprendimento de $^{14}\text{CO}_2$ foi praticamente constante e igual para todos os tratamentos até o final da incubação e menos intensa que no solo LE. Este comportamento é descrito por Bollag (1991), onde afirma que essa liberação ocorre muito lentamente e em extensão mínima, na maioria das observações disponíveis. Neste caso em particular, este comportamento deve estar principalmente relacionado à menor disponibilidade do resíduo ligado no solo GH e em menor extensão à variação nos diferentes grupos de microrganismos na sua habilidade para degradar os resíduos ligados (Khan & Ivarson, 1982).

De uma maneira geral, observa-se que nos solos estudados ocorreu uma baixa liberação de $^{14}\text{CO}_2$, variando de 0,22 % a 0,39 % no solo LE e de 0,02 % a 0,03 % no solo GH (Figura 9), indicando que esses resíduos não foram apreciavelmente mineralizados. Lavorenti et al. (1998) observou resultados semelhantes para o fungicida anilazina.

O monitoramento da atividade microbiana durante o período de incubação, no estudo de remobilização dos resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos, está apresentado na Figura 10. No tempo zero, a atividade foi praticamente a mesma nos dois solos. Do sétimo até o vigésimo primeiro dia, houve uma pequena superioridade de atividade no solo GH. À partir daí, este solo mostrou um aumento nos três tratamentos estudados. No solo LE não houve flutuação significativa nos tratamentos, durante o período de incubação. Esses valores não ultrapassaram a $0,5\ \mu\text{mol } ^{14}\text{C}\text{-glicose/g solo seco/h}$. Em compensação, no solo GH aos 28 e 35 dias, nos tratamentos palha de milho e glicose+peptona, respectivamente, atingiu valores de $3,5\ \mu\text{mol } ^{14}\text{C}\text{-glicose/g solo seco/h}$.

Figura 9 - Quantidade acumulada de $^{14}\text{CO}_2$ desprendido no estudo de remobilização dos resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos. Tratamentos: testemunha (Test.), palha de milho (P.M.) e glicose+peptona (G+P).

Figura 10 – Atividade microbiana semanal nos solos Glei Húmico (GH) e Latossolo Vermelho Escuro (LE) durante 49 dias de incubação. Tratamentos: testemunha (test), palha de milho (P.M.) e glicose+peptona (G+P).

Analisando-se todos esses aspectos, pode-se inferir que a maior atividade microbiana do solo GH ocorreu principalmente, em função de seu maior teor de matéria orgânica que propiciou maior quantidade de substratos para os microrganismos e, em menor grau, aos tratamentos aplicados.

Comparando-se os resultados da atividade microbiana com a porcentagem acumulada de $^{14}\text{CO}_2$ desprendido (Figura 8), no mesmo período, nota-se que há uma relação inversa, ou seja, o solo onde ocorreu maior degradação dos resíduos ligados em ácidos fúlvicos (LE), apresentou uma atividade microbiana menos intensa, indicando que não houve uma relação direta entre os dois processos.

Avaliou-se a influência da palha de milho (alta relação C/N) e glicose+peptona (baixa relação C/N) na biomassa microbiana inicial e final, num período de incubação de 49 dias (Tabela 5). Para os dois solos, no período inicial, a maior contribuição para a

Tabela 5 - Biomassa microbiana inicial e final dos tratamentos testemunha, palha de milho e glicose+peptona, nos solos Glei Húmico e Latossolo Vermelho Escuro, em um período de incubação de 49 dias.

Solo	Tratamentos	Biomassa Inicial	Biomassa Final
		----- $\mu\text{g C g}^{-1}$ solo -----	
GH	Testemunha	538,46 bB	551,62 cA
	Palha de Milho	705,51 cB	2042,31 aA
	Glicose+Peptona	1378,50 aB	1480,49 bA
LE	Testemunha	222,65 cB	245,77 cA
	Palha de Milho	250,97 bB	655,68 aA
	Glicose+Peptona	338,66 aB	458,51 bA

Médias seguidas por letras distintas minúsculas na coluna, e maiúsculas na linha, dentro de cada solo, diferem entre si pelo teste Tukey à 5 % de significância.

biomassa microbiana ocorreu com o tratamento glicose+peptona. No final do ensaio houve maior efeito da palha de milho devido, provavelmente, à maior relação C/N desta, ocorrendo um efeito mais duradouro.

Adicionando-se nutrientes ao solo, a biomassa microbiana em geral, aumenta, favorecendo o incremento do material enzimático que degrada o pesticida (Anderson, 1981). No entanto, a taxa de metabolismo microbiano também está em função da disponibilidade da molécula para os microrganismos e o sistema de enzimas que possam degradá-la, além de fatores como pH e níveis de nutrientes (Anderson & Domisch, 1978). Desta forma, se somente uma pequena população microbiana pode degradar o composto, a taxa de degradação poderá depender das propriedades físico-químicas do solo, da própria molécula e da especificidade dos microrganismos (Anderson, 1984).

Após a aplicação do resíduo ligado de atrazina em ácidos fúlvicos (produto frio) nos solos LE e GH, não ocorreram modificações significantes no pH e teor de matéria orgânica (Tabela 6). Apenas no solo LE, houve um pequeno aumento no pH, reflexo do seu baixo poder tampão, devido ao menor teor de matéria orgânica.

4.2.2 Dessorção, extração e remobilização dos resíduos ligados de ^{14}C -atrazina, nas diferentes frações da matéria orgânica

Ao final do período de incubação dos resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos, estes ainda permaneceram ligados no solo LE nas proporções de 30,24 %, 27,64 % e 24,30 %, nos tratamentos testemunha, palha de milho e glicose+peptona, respectivamente. No solo GH essas porcentagens foram bastante superiores (59,22 %, 61,40 % e 57,99%, nos mesmos tratamentos) (Tabela 7). A maior porcentagem encontrada no solo GH deve-se ao maior teor de matéria orgânica e, conseqüentemente, maior retenção de resíduos neste solo. De uma maneira geral, não houve influência dos tratamentos aplicados.

O total dessorvido foi maior no solo LE (18,83 a 26,81 %) do que no GH (3,76 a 3,89 %), Figura 11a. O processo de dessorção dos resíduos ligados pode estar

Tabela 6 – Valor de pH e teor de matéria orgânica, dos solos antes e depois da aplicação de resíduos ligados de atrazina em ácidos fúlvicos (produto frio).

Solo e Tratamentos	pH (CaCl ₂)		Matéria Orgânica (g dm ⁻³)	
	Antes	Depois	Antes	Depois
GH	4,1		69	
Testemunha		3,9		72
Palha de Milho		3,9		73
Glicose+Peptona		3,9		65
LE	6,6		18	
Testemunha		7,4		14
Palha de Milho		7,9		21
Glicose+Peptona		7,7		16

relacionado com a solubilidade em água da fração ácidos fúlvicos. Segundo Khan (1981) esta fração apresenta peso molecular mais baixo, maior solubilidade em água em relação às outras frações e é de maior interesse quando se considera o transporte de pesticidas, porque estão presentes em águas superficiais.

A porcentagem de produto extraído em relação ao resíduo ligado aplicado, foi superior à dessorção nos dois tipos de solo (Figura 11 a e b) e variou de 49,13 a 51,35 % e de 40,57 a 43,76 % nos solos LE e GH, respectivamente.

O fracionamento da matéria orgânica revelou os seguintes resultados: grande quantidade de resíduos ligados em ácidos fúlvicos ainda permaneceram nesta fração, com porcentagens em relação ao aplicado variando de 21,60 a 26,47 % no solo LE e 34,42 a 37,80 % no GH (Figura 11c).

Tabela 7 – Recuperação total do estudo de remobilização dos resíduos ligados de ¹⁴C-atrazina em ácidos fúlvicos, em relação à radioatividade aplicada. (*)

Solo e Tratamentos	¹⁴ CO ₂ (**)	Dessorção	Extração (***)	Resíduo		Ácidos		Recuperação	
				Ligado	Ácidos Fúlvicos	Ácidos Húmicos	Humina		
----- (%) -----									
LE									
Testemunha	0,31	18,83±0,98	51,35	30,24±1,43	26,47±0,57	1,00±0,09	2,48±0,08		100,44
Palha de Milho	0,37	19,44±0,57	50,45	27,64±0,78	23,99±0,86	1,16±0,01	2,29±0,20		97,70
Glicose + Peptona	0,20	25,81±0,12	49,13	24,30±1,23	21,60±0,49	0,98±0,03	1,61±0,07		99,33
GH									
Testemunha	0,03	3,89± 0,15	40,57	59,22±2,31	37,80±0,85	10,37±0,15	7,90±0,13		100,56
Palha de Milho	0,03	3,76±0,06	41,89	61,40±1,03	36,95±0,60	11,50±4,11	7,65±0,03		101,78
Glicose + Peptona	0,01	3,80±0,12	43,76	57,99±2,09	34,42±0,41	11,37±1,78	7,19±0,05		100,55
LE = Latossolo Vermelho Escuro				GH = Glei Húmico		(±) desvio padrão da média das repetições (*) 28,033 KBq = 100%			

LE = Latossolo Vermelho Escuro GH = Glei Húmico (±) desvio padrão da média das repetições (*) 28,033 KBq = 100%
 (**) resultado obtido de valores acumulados (***) resultado obtido da soma de três extrações

(a)

(b)

(c)

(d)

(e)

Figura 11 – Porcentagem de resíduos ligados de ¹⁴C-atrazina em ácidos fúlvicos: dessorvidos (a), extraídos (b) e remobilizados em: ácidos fúlvicos (c), ácidos húmicos (d) e humina (e), no estudo de remobilização. (28,033 KBq = 100%)

Uma pequena porcentagem de resíduos ligados nos ácidos fúlvicos, foi encontrada nas frações ácidos húmicos e humina, com valores abaixo de 12 e 2,5 % do total da radioatividade aplicada no solo GH e LE, respectivamente (Figuras 11 d e e). Resultados semelhantes foram encontrados para o fungicida anilazina (Lavorenti, 1995).

Analisando-se a Tabela 8, verificou-se que no estudo de remobilização, cerca de 59,37 a 63,99 % e de 86,89 à 88,91 %, do resíduo que ainda permaneceu ligado foi encontrado principalmente nos ácidos fúlvicos dos solos GH e LE, respectivamente, indicando que em ambos os solos a remobilização foi em direção ao mesmo tipo de fração em que a atrazina estava ligada originalmente. Praticamente não houve variação entre os tratamentos dentro de cada solo. As porcentagens de recuperação variaram de 91,34 a 94,73 % no solo GH e de 99,24 a 99,57 % no solo LE.

Tabela 8 - Recuperação total do estudo de remobilização dos resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos, nas diferentes frações da matéria orgânica, em relação à concentração de resíduos que permaneceram ligados.

Solo e Tratamentos	Ácidos Fúlvicos	Ácidos Húmicos	Humina	Recuperação
	----- (%) -----			
GH				
Testemunha	63,99±1,04	17,51±0,43	13,23±0,56	94,73
Palha de Milho	60,19±1,99	18,78±7,01	12,45±0,26	91,42
Glicose +Peptona	59,37±1,43	19,56±2,36	12,41±0,56	91,34
LE				
Testemunha	87,69±2,26	3,34±0,46	8,21±0,12	99,24
Palha de Milho	86,89±5,56	4,19±0,06	8,31±0,97	99,39
Glicose+ Peptona	88,91±3,24	4,03±0,19	6,63±0,12	99,57
GH= Glei Húmico LE = Latossolo Vermelho Escuro (±) desvio padrão da média das repetições				

Em linhas gerais, verificou-se que resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos podem ser remobilizados nas diferentes frações da matéria orgânica; podem estar disponíveis (extração + dessorção) e apenas pequenas frações estão biodisponíveis para mineralização. Deve-se ressaltar que a mineralização, dessorção e extração desses resíduos, foram mais intensas no solo LE, enquanto que a remobilização nos ácidos húmicos e humina foram maiores no solo GH.

4.2.3 Identificação dos resíduos extraídos e dessorvidos

A Tabela 9, mostra ausência da molécula original de atrazina e presença dos metabólitos hidroxiatrazina e desetilatraxina nas soluções extraídas e dessorvidas dos solos. Os tratamentos aplicados não influenciaram o tipo e a quantidade destes metabólitos.

Tanto os extratos dessorvidos com CaCl_2 , quanto aqueles extraídos com solvente, revelaram maiores porcentagens de hidroxiatrazina em relação a desetilatraxina nos dois tipos de solo, confirmando que a hidrólise química é uma rota importante para detoxificação deste herbicida (Skipper & Volk, 1972). A hidroxiatrazina é não fitotóxica, enquanto que a desetilatraxina é mais fitotóxica que a molécula original (Wilkelman & Klaine, 1991).

A porcentagem do metabólito desetilatraxina, nas soluções dessorvidas e extraídas, foi maior no solo LE (4,13 a 5,67 % na dessorção e 7,72 a 8,08 % na extração), em contraste ao solo GH (3,36 a 3,99 % na extração e 0,74 a 0,79 % na dessorção). No caso da hidroxiatrazina, na dessorção, esses valores também foram maiores no solo LE, mas na extração foi praticamente igual nos dois tipos de solo (Tabela 9).

A presença do metabólito desetilatraxina ocorreu possivelmente, como consequência do ataque microbiano à molécula de atrazina, resultando em N-dealquilação e formação deste metabólito (Kaufman & Black, 1970). Deve-se considerar que, mesmo aparecendo em porcentagens baixas nos resíduos extraídos e dessorvidos,

Tabela 9 – Identificação da radioatividade extraída ou dessorvida por co-cromatografia de camada delgada (estudo de remobilização).

Solo e Tratamentos	Rfs (*)					
	0,39		0,50		0,90	
	Dessorção	Extração	Dessorção	Extração	Dessorção	Extração
LE	(%)					
Testemunha	4,13	7,72	11,46	38,94	-	-
Palha de Milho	4,37	5,94	10,35	38,92	-	-
Glicose + Peptona	5,67	8,08	11,64	35,74	-	-
GH						
Testemunha	0,74	3,99	3,13	35,63	-	-
Palha de Milho	0,79	3,76	2,94	35,09	-	-
Glicose + Peptona	0,78	3,36	2,98	36,08	-	-
Rf 0,39 = Desetilatrizona (DEA)		Rf 0,50 = Hidroxiatrizona (HÁ)		Rf 0,90 = Atrizona (AT)		
(*) média determinada por co-cromatografia de camada delgada				(-) não detectado		
LE = Latossolo Vermelho Escuro		GH = Gleí Húmico				

Sistema de solvente: clorofórmio: acetona: ácido acético: água (50:30:15:1 v/v/v/v)

dos dois tipos de solo, a presença deste metabólito pode ser um fator importante quando se considera a questão ambiental.

5 CONCLUSÕES

Para as condições do ensaio e os solos em questão, os resultados permitem as seguintes conclusões:

- a) O herbicida atrazina apresenta uma baixa mineralização, e ainda menor no solo Glei Húmico, indicando que neste solo a mineralização é um processo de pouca importância na detoxificação da atrazina.
- b) A formação de resíduos ligados é uma forma importante de dissipação de atrazina nesses solos, principalmente no solo Glei Húmico. As maiores porcentagens de resíduos ligados de atrazina estão nas frações humina e ácido fúlvico, seguido pelo ácido húmico.
- c) Nos dois solos, a hidroxiatrazina foi o principal metabólito resultante da degradação da atrazina. O maior teor de matéria orgânica e menor valor de pH do solo Glei Húmico, propicia a hidrólise da atrazina e, conseqüentemente, maior formação de hidroxiazina.
- d) Os resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos, apresentam mineralização ainda menor que a observada durante o estudo de distribuição da atrazina.
- e) O solo Glei Húmico, ao final do ensaio de remobilização apresenta uma maior porcentagem de resíduos ligados.
- f) Para os dois solos, grande parte dos resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos permanecem nesta fração, sendo pequena a remobilização para os ácidos húmicos e humina.

- g) A adição de glicose + peptona e palha de milho, não influencia a mineralização nem a disponibilidade dos resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos.
- h) Ao término do estudo de remobilização, nas frações disponíveis (dessorvido + extraído), a atrazina é completamente degradada à hidroxiatrazina (em maior proporção) e desetilatrazina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, C.D.; THURMAN, E.M. Formation and transport of deethylatrazine in the soil and vadose zone. **Journal of Environmental Quality**, v.20, P.540-547, 1991.
- ALEXANDER, M. Biodegradation of chemicals of environmental concern. **Science** , v. 21, p.132-138, 1980.
- ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. San Diego: Academic Press, 1994. 302 p.
- ALVEY, S.; CROWLEY, D.E. Influence of organic amendments on biodegradation of atrazine as a nitrogen source. **Journal of Environmental Quality**, v.24, p.1156-1162, 1995.
- ANDERSON, J.P.E. Soil moisture and the rates of biodegradation of diallate and triallate. **Soil Biology & Biochemistry**, v.13, p.155-161, 1981.
- ANDERSON, J.P.E. Herbicide degradation in soil: Influence of microbial biomass. **Soil Biology & Biochemistry**, v.16, n.5, p.483-489, 1984.

- ANDERSON, J.P.E.; DOMSCH, K.H. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v.10, p.215-221, 1978.
- ARMOSTRONG, D.E.; CHESTERS, G. Adsorption catalyzed chemical hydrolysis of atrazine. **Environmental Science and Technology**, v. 9, p. 683-689, 1968.
- ARMOSTRONG, D.E.; CHESTERS, G.; HARRIS, R.F. Atrazine hydrolysis in soil. **Soil Science Society of America Proceedings**, v. 31, p.61-66, 1967.
- BARRIUSO, E.; KOSKINEN, W.C. Incorporating nonextractable atrazine residues into soil size fractions as a function of time. **Soil Science Society of America Journal**, v.60, p. 150-157, 1996.
- BARRIUSO, E.; HOUOT, S.; SERRA-WITTLING, C. Influence of compost addition to soil on the behaviour of herbicides. **Pesticide Science**, v.49, p.65-75, 1997.
- BEHKI, R.M.; KHAN, S. U. Degradation of atrazine by *Pseudomonas*: n-dealkylation and dehalogenation of atrazine and its metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.34, p.746-749, 1986.
- BEST, J.A.; WEBER, J.B. Disappearance of s-triazines as affected by soil pH using a balance-sheet approach. **Weed Science**, v.22, n.4, p.364-373, 1974.
- BINTEIN, S.; DEVILLERS, J. Evaluating the environmental fate of atrazine in France. **Chemosphere**, v. 32, n.12, p.2441-2456, 1996.

- BLANCO, H.G. Destino, comportamento e resíduos dos herbicidas no solo. **O Biológico**, v.45, n.11/12, p.255-248, 1979.
- BOLLAG, J.M. Enzymatic binding of pesticide degradation products to soil organic matter and their possible release. In: SOMASUNDARAM, L.; COATS, J.R. (Ed.) Pesticide transformation products. fate and significance in the environment. Washington: ACS, 1991. p.122-132. (Symposium Series, 459).
- BROUWER, W.W.M.; BOESTEN, J.J.T.I.; SIEGERS, W.G. Adsorption of transformation products of atrazine by soil. **Weed Research**, v..30, p.123-128, 1990.
- CALDERBANK, A. The occurrence and significance of bound pesticide residue in soil. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v.108, p.71-103, 1989.
- CAPRIEL, P.; HAISCH, A.; KHAN, S.U. Distribution and nature of bound (nonextractable) residues of atrazine in mineral soil nine years after herbicide application. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**., v.33, p. 567-569, 1985.
- COOK, A. M.; HUTTER, R. s-triazines as nitrogen sources for bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry** , v. 29, p. 1135-1143, 1981.
- COSTA, M.A. Biodegradação de ^{14}C -Ametrina em areia quartzosa com adição de palha de cana e solo rizosférico. Piracicaba, 1992. 107p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.

COSTA, M.P. Efeito da matéria orgânica em alguns atributos do solo. Piracicaba, 1983. 137p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

FREITAS, J.R.; NASCIMENTO FILHO, V.F.; VOSE, P.B.; RUSCHEL, A.P. Estimativa da atividade da microflora heterotrófica em um solo de terra roxa estruturada usando respirometria com glicose ^{14}C . **Energia Nuclear e Agricultura**, v.1, p.123-30, 1979.

FÜHREMANN, W.; LICHTENSTEIN, E.P. Release of soil-bound methyl [^{14}C] parathion residues and their uptake by earthworms and oat plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 28, n.3, p. 605-610, 1978.

GIARDINA, M.C.; GIARDI, M.T.; FILACCHIONI, G. 4-amino-2-cloro- 1,3,5-triazine: a new metabolite of atrazine by soil bacterium. **Agricultural and Biological Chemistry Journal**, v. 44, p. 2067-2072, 1980.

GOLAB, T.; ALTHAUS, W.A ; WOOTEN, H.L. Fate of [^{14}C] trifluralin in soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.7, n.1, p.163-179, 1979.

GOLOVLEVA, L.A.; AHARONSON, N.; GREENHALG, R.; SETHUNATHAN, N.; VONK, J.W. The role and limitations of microorganisms in the conversion of xenobiotics. **Pure and Applied Chemistry**, v.62, n.2, p.351-364, 1990.

GREEN, R.E.; KARICKHOFF, S.W. Sorption estimates for modeling. In: CHENG, R.F.; GREEN, R.F.; SPENCER, W.F. (Ed.). **Pesticides in the soil environment: processes, impacts and modeling**. Madison: SSSA, 1990. p.80-99. (Book Series, 2).

- HEITMAN-WEBER, B.; MITTESLSTAEDT, W.; FÜER, F. The degradation of anilazine and dihidroxy-anilazine at various soil depths of na Orthic Luvisol. **Journal of Environmental Science and Health**, v.2 B29, p.247-264, 1994.
- HUANG, P.M.; GROVER,R.; McKERCHER, R.B. Components and particle size fractions involved atrazine desorption by soil. **Soil Science**, v.138, p. 20-24, 1984.
- KAUFMAN, D.D.; BLACK, J. Degradation of atrazine by soil fungi. **Soil Biology & Biochemistry** , v. 2, p.73-80, 1970.
- KAUFMAN, D.D.; KEARNEY, P.C. Microbial degradation of s-triazine herbicides. **Residue Reviews** , v. 32, n.3, p.235-265, 1970.
- KHAN, S.U. The interaction of organic matter with pesticides. In: SCHNITZER, M.; KHAN, S.U. (Ed.) **Soil organic matter**. Amsterdan: Elsevier, 1978. p.137-173. (Development in Soil Science, 8).
- KHAN, S.U. Bound pesticide residues in soil and plant. **Residue Reviews**, v. 84, p. 1-25, 1982.
- KHAN, S.U. Bound (nonextractable) pesticide degradation products in soils. In:SOMASUNDARAM, L. & COATS, J.R. (Ed.) Pesticide transformation products. Fate and significance in the environment. Washington: ACS, 1991. p.108-121. (Symposium Series, 459).
- KHAN, S.U.; BEHKI, R.M. Effects of *Pseudomonas* species on the release of bound ^{14}C residues from soil treated with [14] atrazine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.2090-2093, 1990.

- KHAN, S.U.; IVARSON, K.C. Microbial release of unextracted (bound) residues from an organic soil treated with prometryn. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.29, p.1301-1303, 1981.
- KOHL, S.D.; RICE, J.A. The binding of contaminants to humin: A mass balance. **Chemosphere**, v.36, n.2, p.251-261, 1998.
- KLOSKOWSKI, R.; FÜHR, F.; MITTELSTAEDT, W. Plant availability of bound anilazine residues in a degraded loess soil. **Journal of Environmental Science and Health**, v. B21, n.6, p. 487-505, 1986.
- KNÜSLI, E. History of development of triazine herbicides. **Residue Reviews**, v. 32, p.1-9, 1970.
- KONONOVA, M.M. **Soil organic matter**. 2.ed. New York: Pergamon Press, 1966. 555p.
- KONTCHOU, C. Y.; GSCHWIND, N. Mineralization of the herbicide atrazine in soil inoculated with a *Pseudomonas* strain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p. 2291-2294, 1995.
- KROSSHAVN, M.; KÖGEL-KNABNER, I.; SOUTHON, T.E.; STEINNES, E. The influence of humus fractionation on the chemical composition of soil organic matter studied by solid-state ^{13}C NMR. **Journal of Soil Science**, v.43, p.473-483, 1992.
- KROVAC Jr., M.F. Regulatory aspects of bound residues (chemistry). **Residue Reviews**, v.97, p. 1-17, 1986.

KWONG, N.K.K.F.; HUANG, P.M. Surface reactivity of aluminium hydroxides precipitates in the presence of low molecular weight organic acids. **Soil Science Society of America Journal**, v.43, p.1107-1113, 1979.

LAVORENTI, A. Identificação de perigos de resíduos ligados de pesticidas em substâncias húmicas. In: ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 2., São Carlos, 1997. **Anais**. São Carlos: EMBRAPA,CNPDA, 1997. p.66-71.

LAVORENTI, A.; PEIXOTO, M.F.S.P.; BURAUDEL, P.; WAIS, A.; FÜHR, F. Comparação entre hidróxido de sódio e pirofosfato de sódio na extração e distribuição do resíduo ligado de ^{14}C -atrazina, nas frações húmicas de dois solos. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 7, p.77-88, 1997.

LAVORENTI, A.; BURAUDEL, P.; WAIS, A.; FUHR, F. Remobilization of bound anilazine residues in fulvic acids. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 8, 1998.

LERCH, R.N.; THURMAN, E.M.; KRUGER, E.L. Mixed-mode sorption of hydroxylated atrazine degradation products to soil: a mechanism for bound residue. **Environmental Science and Technology**, v.31, p.1539-1546, 1997.

LEVANON, D. Roles of fungi and bacteria in the mineralization of the pesticides atrazine, alachlor, malation and carbofuran in soil. **Soil Biology Biochemistry**, v. 25, n. 8, p.1097-1105, 1993.

LICHTENSTEIN, E.P. Bound residues in soils and transfer of soil residues in crops. **Residue Reviews**, v.76, p.147-153, 1980.

- MANDELBAUM, R.T.; WACKETT, L.P.; ALLAN, D.L. Rapid hydrolysis of atrazine to hydroxyatrazine by soil bacteria. **Environmental Science and Technology**, v.27, p.1943-1946, 1993.
- MESQUITA, T.B.; RUEGG, E.F. Influência de agentes tensoativos na detecção da radiação beta . **Ciência e Cultura**, v. 36, n.3, p.446-450, 1984.
- MONTEIRO, R.T. Degradação de pesticidas. In: MELO, I.S.; AZEVEDO, J.L. (Ed.) **Microbiologia ambiental**. Jaguariúna: EMBRAPA,CNPEDIA, 1997. Cap.4, p.107-124.
- MITTELSTAEDT, W.; FÜHR, F.; KLOSKOWSKY, R. Anilazine- formation of bound residues in a degraded loess soil. **Journal of Environmental Science and Health**, v.B22, n.5 , p.491-507, 1987.
- MOORMAN, T.B. Pesticide degradation by soil microorganisms: environmental, ecological, and management effects. **Soil Biology**. Boca Ranton: CRC Press, 1994. p. 121-165.
- MUSUMECI, M.R.; OSTIZ, S.B. Binding of cypermethrin residue in Brazillian soils and its release by microbial activity. **Revista de Microbiologia**., v.25, n.4, p.216-219, 1994.
- MUSUMECI, M.R.; TOMITA, R.Y.; SILVA, M.C.D.; SAMPAIO, M.R.F.P. Formação. e biodisponibilidade de resíduos de piretróides ¹⁴C ligados ao solo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.27, n.2, p.265-270, 1992.

NAKAGAWA, L.E.; ANDREA, M.M. Liberação de resíduos ligados de atrazina de solos por meio de esterilização por autoclavagem e radiação gama. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v.21, p.707-710, 1997.

NAKAGAWA, L.E.; LUCHINI, L.C.; MUSUMECI, M.R.; ANDREA, M.M. Comportamento da atrazina em solos brasileiros em condições de laboratório. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.30, n.4, p.471-476, 1995.

OSTROFSKY, E.B.; TRAINA, S.J.; TUOVINEN, O.H. Variation in atrazine mineralization rates in relation to agricultural management practice. **Journal of Environmental Quality**, v.26, p.647-657, 1997.

PASCHOAL, A D. **Pragas, praguicidas & a crise ambiental: problemas e soluções**. Rio de Janeiro: Fundação Getúlio Vargas, 1997. 102p.

PAULINO, S.R. A indústria de pesticidas agrícolas no Brasil: dinâmica inovadora e demandas ambientais. Campinas, 1993. 171p. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.

PRINTZ, H.; BURAUDEL, P.; FÜER, F. Effect of organic amendment on degradation and formation of bound residues of methabenthiaruron in soil under constant climatic conditions. **Journal of Environmental Science and Health**, v.B30, n.4, p.435-456, 1995.

QUEIROZ, S.R. Biodegradação de ^{14}C -atrazina em condições semi controladas. Piracicaba, 1997. 95p. Dissertação (Mestrado) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo.

RACK, K.D.; LICHTENSTEIN, E.P. Effects of soil microorganisms treated with [^{14}C] parathion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.33, p.938-943, 1985.

RADOSEVICH, M. ; TRAINA, S. J. ; TUOVINEN, O. H. Atrazine mineralization in laboratory-aged soil microcosms inoculated with s-triazine-degrading bacteria. **Journal of Environmental Quality** , v. 26, p.206-214, 1997.

REICHARDT, K. **A água em sistemas agrícolas**. São Paulo: Manole, 1987. 188p.

ROBERTS, T.R. Non-extractable pesticide residues in soils and plants. **Pure and Applied Chemistry** , v.56, n.7, p. 945-956, 1984.

ROBERTS, T.R.; STANDEN, M.E. Further studies of the degradation of the pyrethroide insecticide cypermethrin in soils. **Pesticide Science**, v.12, p.285-296, 1981.

RODRIGUES, B.N.; ALMEIDA, F.S.de. **Guia de herbicidas**. 3.ed. Londrina: 1995. 675 p.

SCHEUNERT, I; MANSOUR, M.; ANDREUX, F. Binding of organic pollutants to soil organic matter. **International Journal Environmental Analytical Chemistry**, v. 46, n. 1/3, p. 189-199, 1992. / Resumo em **CAB Abstracts on CD-ROM**, 1993-94/

SKIPPER, H.D.; VOLK, V.V. Biological and chemical degradation of atrazine in three Oregon soils. **Weed Science**, v.20, p.344-347, 1972.

SKIPPER, H.D.; GILMOUR, C.M.; FURTICK, W.T. Microbial versus chemical degradation of atrazine in soils. **Soil Science Society of America Proceedings**, v.31, p.653-656, 1967.

SORENSEN, B.A.; WYSE, D.L.; KOSKINEN, W.C.; BUHLDER, D.D.; LUESCHEN, W.E.; JORGENSEN, M.D. Formation and movement of ¹⁴C-atrazine degradation products in sandy loam soil under field conditions. **Weed Science**, v.41, p.239-245, 1993.

SPILLNER, C.J.; DeBAUN, J.R.; MENN, J.J. Degradation of fenitrothion in forest soil and effects on forest soil microbes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.27, n.5, p1054-1060, 1979.

STEVENSON, F.J. **Cycles of soil-carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur and micronutrients**. New York: John Wiley, 1986. 379p.

STILL, C.C.; BALBA, H.M.; MANSAGER, E.R. Studies on the nature and identity of bound chloroaniline residues in plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.29, n.4, p.739-746, 1981.

STOLP, N.B.; SHEA, P.J. Alachlor and atrazine degradation in Nebraska soil and underlying sediments. **Soil Science**, v.160, n.5, p.359-370, 1995.

TAUK-TORNISIELO, S.M. Substâncias húmicas e atividades microbianas no solo. In: ENCONTRO BRASILEIRO SOBRE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS, 2., São Carlos, 1997. **Anais**. São Carlos: EMBRAPA, CNPDIA, 1997. p.32-37.

VANDERHEYDEN, V.; DEBONGNIE, P.; PUSSEMIER, L. Accelerated degradation and mineralization of atrazine in surface and subsurface soil materials. **Pesticide Science**, v.49, p.237-242, 1997.

VANCE, E.D. ; BROOKES, P.C. ; JENKINSON, D.S. A extraction method for measuring soil microbial biomass C. **Soil Biology & Biochemistry**, v.19, p.703-707, 1987 .

VENDAS de defensivos. **O Estado de São Paulo. Suplemento Agrícola**, São Paulo, 09 de abr. 1997. p.11.

VILLAR, B.P.V.; MONTEIRO, R.T.R.; BURAUDEL, P.; WAIS, A. Degradação de ^{14}C -atrazina em condições de campo e laboratório. In: ENCONTRO NACIONAL DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 5.; ENCONTRO NORDESTINO DE MICROBIOLOGIA AMBIENTAL, 1. , Fortaleza, 1996. **Resumos**. Local de publicação: Sociedade Brasileira de Microbiologia, 1996. p.110.

WAIS, A.; HAIDER, K.; SPITELLER, M.; GRAAF, A. A.; BURAUDEL, P.; FÜHR, F. Using ^{13}C -NMR spectroscopy to evaluate the binding mechanism of bound pesticide residues in soils. **Journal Environmental Science and Health**, B22, n.1, p.1-25, 1995.

WANG, ZHEN-DI.; GAMBLE, D.S.; LANGFORD, C.H. Interaction of atrazine with Laurentian fulvic acid: binding and hydrolysis. **Analytica Chimica Acta**, v.232, p.181-188, 1990.

WILKELMANN, D.A.; KLAINE, S.J. Degradation and bound residue formation of atrazine in a western tennessee soil. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.10, p. 335-345, 1991.

WOLF, D. C. ; MARTIN, J. P. Microbial decomposition of ring ^{14}C -atrazine, cyanuric acid and 2-chloro-4,6-diamino-s-triazine. **Journal of Environmental Quality** , v. 4, p. 134-139, 1975.

XIE, H.; THOMAS, F; GUETZLOFF, F.; RICE, A. Fractionation of pesticide bound to humin. **Soil Science**, v.162, n.6, p.421-429, 1997.

YASSIR, A.; RIEU, C.; SOULAS, G. Microbial N-dealkylation of atrazine: effect of exogeneous organic substrates and behaviour of the soil microflora. **Pesticide Science**, v.54, p.75-82, 1998.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 - Desvios padrões dos valores médios da porcentagem de $^{14}\text{CO}_2$ desprendido (% em relação ao aplicado), nos solos LE e GH, durante o período de 63 dias de incubação, no ensaio de distribuição.

Dias	Solo	Média das repetições	Desvio padrão da média
7	LE	0.050	0.0003
	GH	0.014	0.0002
14	LE	0.110	0.0004
	GH	0.013	0.00005
21	LE	0.250	0.0002
	GH	0.013	0.0001
28	LE	0.530	0.0024
	GH	0.014	0.0002
35	LE	0.720	0.0040
	GH	0.012	0.00001
42	LE	0.970	0.0070
	GH	0.013	0.0001
49	LE	1.250	0.0017
	GH	0.013	0.0001
56	LE	1.670	0.0278
	GH	0.015	0.0002
63	LE	1.710	0.0080
	GH	0.013	0.0001

APÊNDICE 2 - Desvios padrões dos valores médios da percentagem de $^{14}\text{CO}_2$ desprendido (em relação a radioatividade aplicada) nos solos LE e GH, durante o período de incubação de 49 dias, no ensaio de remobilização.

Dias	Solo	Tratamentos	Médias das repetições	Desvio padrão da média
7	LE	Testemunha	0,0845	0,0011
		Palha de milho	0,0861	0,0025
		Glicose+peptona	0,0755	0,0049
	GH	Testemunha	0,0211	0,0028
		Palha de milho	0,0220	0,0011
		Glicose+peptona	0,0062	0,0030
14	LE	Testemunha	0,1325	0,0643
		Palha de milho	0,1777	0,0016
		Glicose+peptona	0,0494	0,0007
	GH	Testemunha	0,0036	0,0006
		Palha de milho	0,0038	0,0004
		Glicose+peptona	0,0018	0,0005
21	LE	Testemunha	0,0431	0,0009
		Palha de milho	0,0453	0,0011
		Glicose+peptona	0,0131	0,0004
	GH	Testemunha	0,0010	0,0001
		Palha de milho	0,0014	0,0008
		Glicose+peptona	0,0018	0,0004
28	LE	Testemunha	0,0208	0,0003
		Palha de milho	0,0285	0,0005
		Glicose+peptona	0,0165	0,0017
	GH	Testemunha	0,0015	0,0002
		Palha de milho	0,0019	0,0002
		Glicose+peptona	0,0022	0,0003
35	LE	Testemunha	0,0189	0,0013
		Palha de milho	0,0181	0,0007
		Glicose+peptona	0,0212	0,0006
	GH	Testemunha	0,0010	0,0003
		Palha de milho	0,0018	0,0001
		Glicose+peptona	0,0016	0,0003
42	LE	Testemunha	0,0146	0,0003
		Palha de milho	0,0148	0,0006
		Glicose+peptona	0,0212	0,0016
	GH	Testemunha	0,0010	0,0001

APÊNDICE 2 - Desvios padrões dos valores médios da percentagem de $^{14}\text{CO}_2$ desprendimento (em relação a radioatividade aplicada) nos solos LE e GH, durante o período de incubação de 49 dias, no ensaio de remobilização.

Dias	Solo	Tratamentos	Médias das repetições	Desvio padrão da média
49		Palha de milho	0,0009	0,0002
		Glicose + Peptona	0,0015	0,0004
	LE	Testemunha	0,0121	0,0001
		Palha de milho	0,0118	0,0070
		Glicose+peptona	0,0248	0,0062
	GH	Testemunha	0,0013	0,0006
		Palha de milho	0,0008	0,0007
		Glicose+peptona	0,0012	0,0001

APÊNDICE 3 - Desvios padrões dos valores médios de ^{14}C -glicose degradada ($\mu\text{mol } ^{14}\text{C}$ -glicose g^{-1} solo seco h^{-1}), para os solos LE e GH, incubados nos tempos zero à 49 dias, no ensaio de atividade microbiana.

Dias	Solo	Tratamentos	Médias das repetições	Desvio padrão da média
0	LE	Testemunha	0,5264	0,0146
		Palha de milho	0,5998	0,1388
		Glicose+peptona	0,4397	0,0027
	GH	Testemunha	0,5813	0,1665
		Palha de milho	0,4798	0,1582
		Glicose+peptona	0,5359	0,2954
7	LE	Testemunha	0,2769	0,0637
		Palha de milho	0,2661	0,1607
		Glicose+peptona	0,2134	0,0733
	GH	Testemunha	0,5945	0,0210
		Palha de milho	1,2084	0,0338
		Glicose+peptona	0,9647	0,0528
14	LE	Testemunha	0,2565	0,0637
		Palha de milho	0,4063	0,2855
		Glicose+peptona	0,3952	0,1391
	GH	Testemunha	0,8471	0,0090
		Palha de milho	0,6452	0,1412
		Glicose+peptona	1,1457	0,3452
21	LE	Testemunha	0,2802	0,0030
		Palha de milho	0,3924	0,0712
		Glicose+peptona	0,2839	0,1080
	GH	Testemunha	0,7232	0,1833
		Palha de milho	1,1993	0,0471
		Glicose+peptona	1,1448	0,1739
28	LE	Testemunha	0,3004	0,0099
		Palha de milho	0,5082	0,0065
		Glicose+peptona	0,5496	0,0303
	GH	Testemunha	2,2741	0,3840
		Palha de milho	3,5348	0,1403
		Glicose+peptona	2,2544	0,1710
35	LE	Testemunha	0,2906	0,0064
		Palha de milho	0,6107	0,2704

APÊNDICE 3 –Desvios padrões dos valores médios de ^{14}C -glicose desprendida ($\mu\text{mol } ^{14}\text{C}$ -glicose g^{-1} solo seco h^{-1}), nos solos LE e GH, incubados nos tempos zero à 49 dias, no ensaio de atividade microbiana.

Dias	Solo	Tratamentos	Médias das repetições	Desvio padrão da média
42	GH	Glicose+peptona	0,6098	0,0042
		Testemunha	2,0088	0,1126
		Palha de milho	2,5443	0,2312
		Glicose+peptona	3,4846	1,2772
	LE	Testemunha	0,3297	0,0094
		Palha de milho	0,5185	0,0564
		Glicose+peptona	0,4809	0,0446
		Testemunha	1,8421	0,0582
	GH	Palha de milho	2,0831	0,4201
		Glicose+peptona	2,3857	0,2747
		Testemunha	0,3309	0,0148
		Palha de milho	0,7287	0,1189
49	LE	Glicose+peptona	0,3587	0,0563
	GH	Testemunha	1,5743	0,1585
		Palha de milho	1,6797	0,2137
	LE	Glicose+peptona	1,7286	0,3702
		Testemunha		
		Palha de milho		

Apêndice 4 - Desvios padrões dos valores médios das percentagens* obtidas na 1^a, 2^a e 3^a extrações, nos solos LE e GH, no ensaio de distribuição.

Solo	Extração	Média das repetições	Desvio padrão da média
LE	1 ^a	40.55	0.2528
	2 ^a	9.75	0.0706
	3 ^a	7.35	0.0130
GH	1 ^a	27.71	1.3580
	2 ^a	17.61	0.1223
	3 ^a	12.84	0.2251

* calculadas em função da radioatividade aplicada

Apêndice 5 - Desvios padrões dos valores médios das percentagens* obtidas na 1^a, 2^a e 3^a extrações, nos solos LE e GH, no ensaio de remobilização.

Solo	Extração	Tratamentos	Média das repetições	Desvio padrão da média
LE	1 ^a	testemunha	34.19	1.3649
		palha de milho	33.53	1.2623
		glicose+peptona	33.86	1.3334
	2 ^a	testemunha	11.43	0.4401
		palha de milho	11.42	0.1887
		glicose+peptona	10.44	0.0016
	3 ^a	testemunha	5.73	0.0754
		palha de milho	5.50	0.4325
		glicose+peptona	4.83	0.0553
GH	1 ^a	testemunha	18.73	0.6317
		palha de milho	18.79	1.3483
		glicose+peptona	19.27	0.0287
	2 ^a	testemunha	14.76	0.3158
		palha de milho	14.33	1.4454
		glicose+peptona	15.12	0.0775
	3 ^a	testemunha	7.08	0.1024
		palha de milho	8.77	1.4707
		glicose+peptona	9.37	0.2338

* calculadas em função da radioatividade aplicada

APÊNDICE 6 – Análise da variância da variável biomassa microbiana do solo GH

CV	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor de F	Prob>F
Tratamentos	2	2944754,5286	1472377,2643	91708,6518	0,00001
Solo	1	1054079,6390	1054079,6390	65654,5201	0,00001
Trat.x Solo **	2	1642334,2776	821167,1388	51147,3065	0,00001
Resíduo	12	192,6593	16,0549		
Total	17				

GH = Glei Húmico

Coefficiente de variação = 0,359

(**) Significativo ao nível de 1%

APÊNDICE 7 – Análise da variância da variável biomassa microbiana do solo LE

CV	G.L.	S.Q.	Q.M.	Valor de F	Prob>F
Tratamentos	2	156054,0034	78027,0017	4039,4266	0,00001
Solo	1	149980,3419	149980,3419	7764,4222	0,00001
Trat.x Solo **	2	118047,5532	59023,7766	3055,6373	0,00001
Resíduo	12	231,7962	19,3163		
Total	17				

LE =Latossolo Vermelho Escuro

Coefficiente de variação = 1,214

(**) significativo ao nível de 1%