UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

PAULO ALEXANDRE DE TOLEDO ALVES

Comportamento dos herbicidas ametrina e glifosato aplicados em
associação em solo de cultivo de cana-de-açúcar

**Piracicaba
2012**

PAULO ALEXANDRE DE TOLEDO ALVES

Comportamento dos herbicidas ametrina e glifosato aplicados em
associação em solo de cultivo de cana-de-açúcar
versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010

Dissertação apresentada ao Centro de Energia
Nuclear na Agricultura da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura
e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo

Piracicaba

2012

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

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Alves, Paulo Alexandre de Toledo

Comportamento dos herbicidas ametrina e glifosato aplicados em associação em solo de cultivo de cana-de-açúcar / Paulo Alexandre de Toledo Alves; orientador Valdemar Luiz Tornisielo. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 5890 de 2010. - - Piracicaba, 2012.

90 p.: il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Adsorção 2. Análise do solo 3. Biodegradação ambiental 4. Biologia do solo 5. Boas Práticas de Laboratório 6. Desorção 7. Mapeamento do solo 8. Química ambiental 9. Química do solo 10. Radioisótopos I. Título

CDU 502.175 : (631.42 + 632.95.028)

AGRADECIMENTOS

Em especial:

Ao Prof. Dr. Valdemar Tornisielo, orientador-amigo, modelo de orientador e de ser humano: por estar sempre presente, pelo excesso de paciência, tolerância e generosidade. Por acreditar que todos podem contribuir com o seu melhor, partindo-se sempre de bons princípios.

À Sra. Maria Júlia Aleone Tornisielo, indiscutivelmente amiga, ótima companheira de viagem, espelhando as melhores características de vosso esposo.

À Srta. Mayra Monteiro Viana, namorada, companheira, melhor-amigo, ombro-amigo, felicidade, amor e paz. Meu pedacinho do céu ao alcance dos olhos, meu paraíso nos momentos de tormenta. Seja eterno enquanto dure, mas que dure para sempre!

À Mara Terezinha Toigo de Toledo Alves, Paulo Raimundo de Toledo Alves e Renata de Toledo Alves, mãe, pai e irmã respectivamente. Pelo apoio, educação e incentivo. Sem vocês nada de isto seria possível, de forma literal e figurativa.

Aos técnicos Carlos Alberto Dorelli e Rodrigo Floriano Pimpinato, na figura de amigos e colaboradores do projeto. Viabilizando etapas difíceis e instruindo da melhor forma possível.

Aos colegas de trabalho e amigos Graziela Moura Andrade, Sérgio Henrique Monteiro, Franz Zirena Vilca, Nádia Hortense Torres, Rafael Grossi Botelho, Rafael Marques Pereira Leal, Eloana Bonfleur, Oscar Bahia Filho, Tatiana Beatriz Goudromihos, Ana Carolina Ribeiro Dias, Luiz Fernando Machado, Aderbal Almeida Rocha, Maria Aparecida da Costa, Rafael Figueira, Ruy Bessa Lopes, Lucineide Maranhão e Marcela Lembi Viti, que com $\alpha = 0,01$ e $p = 99\%$ contribuíram significativamente com vivência e experiências de vida, e de certa forma com este trabalho.

À Usina Iracema, pelo fornecimento dos solos e referências do histórico da área, na figura do Sr. Luiz Fernando. À UNICA (União das Indústrias de Cana-de-açúcar) e aos professores Dr. Jener Fernando e Dr. Bernardo Rudorff pelo fornecimento dos mapas para a escolha do solo.

A Sra. Maria Cecília Monteiro Viana, Sr. Francisco Donato Viana, Thales e Maracy, e famílias Monteiro e Viana pelas orientações, incentivo, apoio, paciência e dedicação.

Ao CENA/USP, professores Antônio Vargas de Oliveira Figueira, Adriana Pinheiro Martineli, Elisabete A. De Nadai Fernandes, Marli de Fátima Fiore e José Albertino Bendassolli, pela convivência e estrutura. Aos funcionários da Pós-Graduação e Marília da Biblioteca, pelo ótimo serviço prestado, agilidade e dedicação.

À FAPESP pela Bolsa e apoio financeiro.

A todos aqueles que eu me esqueci de mencionar, presentes mesmo que em pensamentos, pela compreensão pelo esquecimento dos nomes.

Agradeço.

*"To believe with certainty we must begin with doubting."
Stanisław Leszczyński (1677 - 1766)*

RESUMO

ALVES, P. A. T. **Comportamento dos herbicidas ametrina e glifosato aplicados em associação em solo de cultivo de cana-de-açúcar**. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

Das pragas que afetam as lavouras canavieiras, as plantas daninhas representam o maior grupo, apontando o setor de herbicidas como o que mais cresce no mercado de agrotóxicos. O surgimento de daninhas resistentes e a intenção de melhora no controle têm feito com que agricultores pratiquem técnicas de mistura de tanque na aplicação de herbicidas, modalidade não prevista na legislação brasileira e alvo de discussões no cenário nacional. As misturas de tanque podem gerar economia na aplicação, porém pouco se sabe se esta associação de moléculas é sinérgica ou antagônica ao comportamento individual dos agrotóxicos no ambiente. Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi avaliar o comportamento dos herbicidas ametrina e glifosato aplicados em associação no solo Argissolo Vermelho (PV) de cultivo de cana-de-açúcar. Para isto, foram realizados experimentos com base nas normas OECD, da série de testes de produtos químicos, 307 (biodegradação em solos), 217 (atividade microbiana em solos) e 106 (Sorção/Dessorção em solos). Para os testes, considerou-se a dose máxima de campo (DMC) de 2,88 Kg i.a ha⁻¹ para o glifosato e 3 Kg i.a ha⁻¹ para a ametrina. Os testes de biodegradação e de sorção/dessorção individuais foram realizados com ¹⁴C-glifosato e ¹⁴C-ametrina, e nas misturas ¹⁴C-glifosato + ametrina (não radiomarcada) e ¹⁴C-ametrina + glifosato (não radiomarcado). Os experimentos de atividade microbiana foram realizados com herbicidas não radiomarcados e com ¹⁴C-glicose. O experimento de biodegradação apresentou resultados de meia-vida de mineralização ($t_{1/2}$) do glifosato no solo de 55 dias para o produto aplicado sem mistura com ametrina e de 119 dias para a mistura de glifosato+ametrina, não sendo possível a determinação da DT₅₀ (meia-vida no solo) a partir da porção extraível. A ametrina apresentou meia-vida de mineralização de aproximadamente 180 dias quando aplicada sozinha e de 243 dias quando misturada com glifosato, porém a DT₅₀ foi de 15 dias para a mistura e 20 dias para a molécula aplicada isoladamente. No experimento de atividade microbiana, a ametrina mostrou efeitos adversos nas menores doses, amenizados pela mistura da molécula com o glifosato. O glifosato estimulou a atividade microbiana do solo, porém quando aplicado com ametrina teve este efeito reduzido. Nos experimentos de sorção o glifosato apresentou K_{oc} elevado, sendo este significativamente aumentado no tratamento de glifosato em mistura com ametrina. A sorção da ametrina foi baixa, porém na associação com o glifosato foi observado aumento significativo de K_d. A dessorção do glifosato e do glifosato em mistura com ametrina foi baixa e não houve diferenças entre os tratamentos, porém a dessorção da ametrina foi diminuída no tratamento associado ao glifosato. Conclui-se que a associação dos herbicidas ametrina e glifosato influencia o comportamento individual das moléculas no solo, porém de forma positiva para a ametrina e pouco significativa para o glifosato.

Palavras-chave: Ametrina. Glifosato. Mistura de tanque. Comportamento. Solo.

ABSTRACT

ALVES, P. A. T. **Behavior of ametryn and glyphosate herbicides applied in association in soil of cultivation of sugar cane.** 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2012.

Of all plagues that impact sugarcane production, weeds represent the largest group, indicating the sector of herbicides as the largest growing market among the pesticides. The emergence of resistant weeds and the intention to improve their control have led farmers to mix pesticides in tank for application, a technique not stated in Brazilian law that generates discussion at national level. The tank mixtures may promote cost savings during applications, but little is known whether this association of molecules has a synergistic or antagonistic effect for the individual pesticides behavior in the environment. Therefore, the main objective of this study was to evaluate the behavior of the herbicides glyphosate and ametryn applied in association in an Ultisol (PV) soil from sugarcane cultivation. For this, were set 3 experiments, conducted according the OECD guidelines for testing chemicals: 307 (aerobic transformation in soils), 217 (microorganisms and carbon transformation) and 106 (sorption/desorption in soils). The doses of herbicides for all tests were set according to the maximum doses at field conditions, being 2,88 Kg a.i ha⁻¹ for glyphosate and 3 Kg a.i ha⁻¹ for ametryn. The tests of biodegradation and sorption/desorption were performed using ametryn and glyphosate ¹⁴C radiolabeled, and for the mix treatment were used the radiolabeled herbicide plus the other herbicide not radiolabeled. The test of carbon transformation by microorganisms was performed with non-radiolabeled herbicides and ¹⁴C-glucose. The biodegradation experiment showed results of mineralization half-life in soil (*t*_{1/2}) of 55 and 119 days for glyphosate and glyphosate plus ametryn respectively. Ametryn showed a *t*_{1/2} of 180 days when applied alone in the soil, increasing to 243 days when mixed with glyphosate. For the DT₅₀ (half-life in soil), the ametryn without glyphosate showed a DT₅₀ of 20 days, and this half-life decreased to 15 days for the ametryn with glyphosate. It was not possible to determinate the DT₅₀ on the extractable portion of glyphosate radiolabeled experiments. In the carbon transformation experiment the results for ametryn alone evidenced adverse effects at lower doses, softened when mixing it with glyphosate. On the other hand, glyphosate stimulated the microorganism's activity when applied without ametryn, and when mixed showed a small decrease in the activity rate. The sorption of glyphosate demonstrated high values for K_{oc} coefficient, being smoothly bigger in the treatment of glyphosate mixed with ametryn. Regarding ametryn, its sorption showed lower levels of K_{oc}, but when applied in association to glyphosate the rate increased significantly. The glyphosate desorption was little, and mixing it with ametryn didn't show differences. On the other hand, the ametryn desorption was lower at the treatment with glyphosate mixed. The main conclusion of this study is that the association of herbicides ametryn and glyphosate has influence on the individual behavior of the molecules on Ultisol soil, but positively for ametryn and negligible for glyphosate.

Keywords: Ametryn. Glyphosate. Tank Mix. Behavior. Soil.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	Agrotóxicos na agricultura – aspectos comerciais e legislação	14
2.2	Agrotóxicos: aspectos físico-químicos e ambientais	17
2.3	Glifosato	20
2.4	Ametrina	22
2.5	Misturas de Tanque	24
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	Escolha, coleta e manejo dos solos	25
3.1.1	<i>Escolha dos solos</i>	25
3.1.2	<i>Coleta e manejo dos solos</i>	28
3.2	Ensaio de Biodegradação	32
3.2.1	<i>Ensaio com glifosato radiomarcado</i>	35
3.2.2	<i>Ensaio com ametrina radiomarcada</i>	37
3.3	Ensaio de atividade microbiana	39
3.4	Ensaio de Sorção e Dessorção	43
3.5	Equipamentos, reagentes e soluções	46
3.5.1	<i>Equipamentos utilizados</i>	46
3.5.2	<i>Reagentes e soluções</i>	47
3.6	Escopo BPL - Boas Práticas de Laboratório	50
4.	RESULTADOS	52
4.1	Biodegradação	52
4.1.1	<i>Biodegradação do glifosato e glifosato+ametrina</i>	52
4.1.2	<i>Biodegradação da ametrina e ametrina+glifosato</i>	56
4.2	Atividade Microbiana	61
4.3	Sorção e Dessorção	73
4.3.1	<i>Sorção e dessorção do glifosato e glifosato+ametrina</i>	73
4.3.2	<i>Sorção e dessorção da ametrina e ametrina+glifosato</i>	79
5.	CONCLUSÕES	84
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	85
	REFERÊNCIAS	85

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país tipicamente agrícola, sendo a cana-de-açúcar uma das principais culturas, atualmente em destaque pela utilização do etanol em substituição ao petróleo e servindo de base para a produção de biodiesel. A produtividade da cana-de-açúcar está atrelada a uma série de fatores críticos, como condições climáticas, variedade da planta, manejo do solo, manejo de pragas e doenças.

As plantas daninhas são um dos maiores fatores de perda de produtividade no campo. Para o controle das invasoras é cada vez mais comum a utilização de herbicidas associados, em aplicação conjunta (conhecida como mistura de tanque). Esta prática não é prevista na legislação brasileira, mas pode gerar economia na aplicação e uma maior efetividade no controle, aumentando-se tempo de atuação dos produtos químicos.

A cana-de-açúcar é uma cultura que necessita de controle de daninhas em pré e pós-emergência. Os herbicidas glifosato e ametrina poderiam ser utilizados conjuntamente para este tipo de controle, pois o glifosato atua em pós-emergência e pode ser aplicado posteriormente como maturador, não apresentando efeito residual. Já a ametrina é um herbicida que possui efeito residual no solo, eficaz no controle das invasoras em pré e pós-emergência e em longo prazo. Este tipo de associação pode garantir a proteção do cultivo em todo o período de interferência da planta daninha na cultura. Sendo assim, a aplicação destes dois herbicidas pode minimizar ou anular o efeito negativo das invasoras no potencial produtivo da cana-de-açúcar. Um fator importante nas aplicações associadas (misturas de tanque) é o comportamento dos herbicidas em conjunto nos solos, uma vez que este é um dos destinos finais destes produtos. Os estudos de comportamento de associações de agrotóxicos em solos são escassos, ficando restritos ao comportamento individual de cada molécula.

A prática de misturas de tanque torna-se cada vez mais comum na agricultura brasileira, e vem gerando bastante polêmica em relação à liberação ou proibição. Neste contexto, o principal objetivo deste trabalho foi estudar as interações entre o glifosato e a ametrina no compartimento solo (de campo de cultivo de cana-de-açúcar) e possíveis interferências no comportamento ambiental de uma molécula

sobre a outra, definindo, quando existentes, os impactos antagônicos ou sinérgicos dessa prática.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Agrotóxicos na agricultura – aspectos comerciais e legislação

Com o domínio das práticas agrícolas durante o desenvolvimento humano tornou-se possível o aumento populacional, o surgimento de novos nichos de trabalho e a aglomeração do homem em cidades. Nos tempos recentes, após a segunda revolução industrial e segunda guerra mundial, o economista Thomas Robert Malthus propôs em 1978 que a população humana cresceria sob a forma matemática de uma progressão geométrica (dobrando a cada 25 anos), e em contrapartida a produção de alimentos em uma progressão aritmética, acarretando então em um déficit muito grande no fornecimento de alimentos (MALTHUS, 1978). Neste cenário, possivelmente não foram levadas em consideração a inteligência e a capacidade do homem de adaptação às necessidades, evidenciada posteriormente com a revolução verde. No entanto, cabe observar que atualmente a falta de alimentos em algumas partes do globo terrestre não é uma consequência de baixas nos sistemas produtivos, mas sim no sistema de distribuição, em virtude do modelo econômico adotado mundialmente.

O mundo possui atualmente aproximadamente 1,4 bilhões de hectares utilizados para o cultivo e produção de alimentos em terras aráveis, dos quais estão alocados no Brasil aproximadamente 160 milhões de hectares distribuídos entre agricultura, silvicultura e novas áreas aráveis, e aproximadamente 196 milhões em pastagens (FAO, 2010). Como os recursos naturais são findáveis, importantes e estritamente limitados, deve-se levar também em consideração o impacto ambiental causado pelos sistemas produtivos. O aumento de áreas plantadas exige a derrubada de florestas e a ocupação de habitats de espécies nativas, podendo ainda gerar poluição da água e desequilíbrio nos ciclos biogeoquímicos. Porém se observamos a Figura 1, podemos notar que a produtividade de commodities agrícolas no Brasil aumentou significativamente nos últimos 20 anos sem que houvesse proporcional aumento das áreas plantadas.

Figura 1 – Gráfico da Produção de agrícola total por safra (algodão, amendoim, arroz, aveia, canola, centeio, cevada, feijão, girassol, mamona, milho, soja, sorgo, trigo e tricale) versus área total plantada, de 1976 a 2012 (2011 total previsto e 2012 total estimado). Fonte: Adaptado de CONAB (2012)

Observando-se a Figura 1, para as safras entre 1976 a 2012, tem-se que a produção agrícola cresceu aproximadamente 236% em volume (distribuído entre as culturas referenciadas), enquanto que as áreas plantadas cresceram apenas 38%. A produtividade acompanhou este crescimento subindo de aproximadamente 1,26 para 3,15 toneladas/ha entre 1976 a 2010 (CONAB, 2012), representando um aumento de 149% para o período. Dentro destes dados, pode-se ainda concluir que o período de maior crescimento de produção e produtividade foi entre 1990 e 2010.

Para que este aumento de produtividade fosse possível, foi necessário o desenvolvimento de tecnologias que solucionassem os problemas como pobreza de solos, correção de acidez do solo, falta de água, secas, adaptação das plantas, forma de plantio e pragas. Neste contexto, as pragas correspondem ao maior fator de perda de produtividade, considerando-se ataques de insetos, fungos, vírus, nematóides, bactérias, ácaros e competição de plantas daninhas. O controle de pragas evoluiu a partir da 2ª Guerra Mundial, com a ampla utilização do DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), descoberto em 1939 pelo entomologista suíço Paul Müller. O DDT foi difundido mundialmente pelo amplo espectro de atuação, baixo

custo e eficiência no combate de vetores de doenças tropicais como o tifo e a malária (D'AMATO, 2002).

Em 1962 a publicação do livro “Primavera Silenciosa” foi considerada o primeiro ato de manifestação ambientalista contra o uso indiscriminado de DDT, relatando a diminuição de populações de aves de topo de cadeia alimentar em atribuição ao uso do inseticida (CARSON, 1962). A partir da década de 60 a utilização destes produtos foi tornando-se intensiva, e problemas de saúde ambiental e humana relacionados ao uso da tecnologia começaram a aparecer. Isto fez com que governos e organizações internacionais tomassem posição em relação ao uso, à liberação e comercialização destes produtos, surgindo então uma série de normas nacionais e internacionais regulamentando a matéria. Em 1972 o DDT foi proibido nos Estados Unidos da América, em virtude de estar associado a altos índices de intoxicação, presente em tecidos gordurosos e no leite materno de pessoas que não tiveram contato direto com o inseticida (USDHHS, 2002).

A problemática envolvendo o DDT alertou o mundo para o uso indiscriminado de substâncias perigosas em lavouras, abrindo espaço a discussões de viabilidade dos sistemas produtivos em virtude do alto risco de poluição ambiental. Embora exista este alto risco, existe também a afirmação da necessidade de fornecimento de alimentos ao mundo para suprir a demanda, e sob este ponto de vista convencionou-se que químicos para controle de pragas só poderiam ser utilizados de forma segura e controlada, conhecendo-se as vias de degradação, persistência ambiental e toxicidade (KOTAKA, 2001).

No Brasil estes produtos químicos utilizados para o controle de pragas no campo ganharam legislação específica em 1989, com a lei N° 7.802, de 11 de julho, sendo antes regulamentados apenas por minutas ministeriais e portarias específicas (LUCCHESI, 2005). A lei N° 7.802, anteriormente citada, definiu o termo agrotóxico para estes tipos de produtos, embora no campo sejam comumente encontrados os termos “defensivos agrícolas”, “pesticidas”, “agroquímicos” entre outros. Em 2002 foi emitido o Decreto N° 4.074, de 04 de janeiro, regulamentando a lei N° 7.802, de 11 de julho 1989, com novos termos e definições, compreendidos em 98 artigos (BRASIL, 2002). Tanto a lei quanto o decreto trazem informações sólidas sobre proibições, classificação, análise de risco, manejo e de registro para os agrotóxicos, colocando o Brasil em um patamar burocraticamente elevado em relação à liberação comercial, principalmente pelo tempo de demora para análise de documentação.

Sob o aspecto comercial, os agrotóxicos representaram um mercado de aproximadamente 12,9 bilhões de reais em 2009 no Brasil, sendo o segmento de herbicidas o líder absoluto com uma parcela de aproximadamente 38% deste valor. Ainda em 2009 a comercialização de agrotóxicos (produtos comerciais) girou em torno de 725 mil toneladas, contra quase 674 mil toneladas em 2008 (MENTEN et al., 2009). No campo, a quantidade de ingredientes ativos aplicados (média nacional) subiu de 2,27 Kg/ha em 1997 para 3,2 Kg/ha em 2005, representando um aumento de aproximadamente 18% em oito anos (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2002; 2010).

2.2 Agrotóxicos: aspectos físico-químicos e ambientais

Os agrotóxicos possuem características físico-químicas distintas, como K_a ou K_b (constantes de ionização ácido ou base, respectivamente), pressão de vapor (P), solubilidade em água (S_w), partição n-octanol-água (K_{ow}) e constante da lei de Henry. Estas características (disponíveis na ficha técnica de cada molécula) permitem análises prévias de comportamento destes produtos no ambiente, sendo muito importantes ao desenvolvimento de estudos ambientais (LAVORENTI et al., 2003).

As constantes de ionização ácido/base (K_a e K_b) indicam a tendência de ionização em relação ao meio, elucidando em qual faixa de pH tal fenômeno pode ocorrer. Se uma molécula formar íons negativos, então esta possui caráter ácido, e caso forme íons positivos possui caráter básico (HORNSBY; WANCHOPPE; HERNER, 1995). O K_{ow} (coeficiente de partição n-octanol-água) está relacionado às tendências hidrofóbicas ou hidrofílicas de um agrotóxico, e intimamente relacionado à solubilidade em água. Caso um agrotóxico apresente elevado valor de K_{ow} ($\text{Log de } K_{ow} > 4,0$) este terá tendência de acumulação em lipídios, como matéria orgânica do solo, representando então uma baixa mobilidade em solos com alto teor de matéria orgânica (LAVORENTI et al., 2003). A pressão de vapor (P) é uma medida da tendência de uma molécula em fase líquida escapar para a fase gasosa, e é ambientalmente importante, pois pode fazer com que o agrotóxico seja disperso ao ambiente (LAVORENTI et al., 2003). A solubilidade (S_w) é a medida da quantidade

máxima do produto que pode ser dissolvida em água, permitindo inferências sobre a mobilidade horizontal ou vertical no solo (LINDE, 1994). A Lei de Henry, também conhecida como constante K_H , mostra a tendência do pesticida a volatilizar ou permanecer na fase aquosa, podendo ser interpretada conjuntamente à Pressão de Vapor (SILVA; FAY 2004).

No ambiente, um agrotóxico pode ser volatilizado, lixiviado, escoado superficialmente, sorvido, transformado, degradado ou mineralizado (Figura 2). A volatilização depende diretamente da pressão de vapor (P) e da Constante da Lei de Henry de cada composto químico, permitindo com que o produto atinja áreas distintas do local aplicado, podendo ainda ser carregado com a precipitação gerando a contaminação de águas e áreas adjacentes (McBRIDE, D. K., 1989). A lixiviação é o fenômeno de percolação vertical no solo de uma molécula pela ação da água, permitindo com que esta atinja águas subterrâneas (OECD, 2002). O escoamento superficial pode ocorrer com precipitações logo após a aplicação do agrotóxico, representando uma via rápida de contaminação para corpos de água nas proximidades das lavouras (McBRIDE, D. K., 1989). A sorção ocorre quando existe a ligação da molécula com partículas do solo sob a forma de adsorção, absorção ou partição hidrofóbica (SPARKS, 2003). A degradação química de um agrotóxico pode ocorrer por quebra (lise) da molécula por ação de temperatura, água, luz ou combinação destes fatores, e pode ocorrer também por vias metabólicas intermediadas, por processos enzimáticos ou microrganismos presentes no solo (BOLAG; BOLAG, 1992). A degradação biológica ocorre por meio de microrganismos presentes no solo, principalmente por fungos e bactérias, gerando metabólitos (degradação parcial) ou mineralizando moléculas a CO_2 . A mineralização é uma das principais vias de remoção de agrotóxicos do ambiente, porém depende diretamente de fatores como tipo de solo (textura, teor de argila, areia, minerais, metais e matéria orgânica), clima, umidade, micro-biota e tipo de composto químico (McBRIDE, D. K., 1989; Mc BRIDE, M. B., 1994; SPADOTTO, 2002; DAMIN, 2005).

Figura 2 – Destinos possíveis para os agrotóxicos no ambiente. Adaptado de Nimmo (1985), Howard (1991) e Es (1990)

Outro destino provável para os produtos químicos utilizados no campo é a água. A Tabela 1 oferece um resumo do potencial de risco associado à contaminação de águas por agrotóxicos.

Tabela 1 – Sumário do potencial de risco de contaminação por agrotóxicos de águas superficiais, sub-superficiais e subterrâneas. Adaptado de McBride, D. K. (1989).

	Baixo Risco de Contaminação	Alto Risco de Contaminação
Características dos Agrotóxicos		
Solubilidade em água	Baixa	Alta
Sorção no solo	Alta	Baixa
Persistência	Baixa	Alta
Características do Solo		
Textura	Argilosa	Arenosa
Teor de Matéria Orgânica	Alto	Baixo
Macroporos	Poucos/Pequenos	Muitos/Amplios
Profundidade do lençol freático	Alta	Baixa
Volume de água		
Chuva/Irrigação	Pequenos Volumes em Intervalos intermitentes	Altos volumes em poucos intervalos

Cada molécula utilizada na agricultura tem especificações distintas quanto ao comportamento ambiental, e estas especificações estão diretamente atreladas às características físico-químicas. Embora um produto possa ser classificado como pouco tóxico este ainda pode causar sérios danos à saúde humana e ambiental. Três fatores principais estão diretamente relacionados ao risco de exposição de um agrotóxico: 1) Persistência Ambiental (ligada à meia-vida da molécula no solo); 2) Sorção e Dessorção ao solo e sedimentos; e 3) Capacidade de acumulação em seres vivos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1990; LINDE, 1994). Pode-se citar o DDT como exemplo de persistência no solo, em que estudos ambientais recentes encontraram resíduos remanescentes da utilização em larga escala na década de 60, apontando ainda a detecção deste produto em tecido humano e animal por meio da ingestão de alimentos cultivados em solos contaminados (USDHHS, 2002).

Sendo o solo um destino certo de agrotóxicos e outros produtos químicos agrícolas, o estudo de comportamento ambiental de moléculas individuais e interações possíveis torna-se extremamente importante na ciência moderna. Os campos agrícolas onde existe o uso intensivo de insumos e produtos químicos podem atuar como pool de contaminação imediata ou futura, permitindo a aparição de efeitos adversos crônicos ou agudos, em plantas, animais e no homem.

2.3 Glifosato

A molécula do Glifosato (Figura 3) foi desenvolvida na década de 1960 e teve a sua propriedade herbicida descoberta pela Monsanto Company no início da década de 1970, sendo a sua comercialização iniciada em 1974, quando foi aprovada nos Estados Unidos. O glifosato é um herbicida de pós-emergência e largo espectro, não seletivo, capaz de controlar efetivamente as plantas invasoras mais agressivas (FRANZ, 1985; GRUYS; SIKORSKI, 1999).

Figura 3 – Fórmula estrutural do glifosato

Por ser considerado ameno em efeitos ambientais e apresentar baixa toxicidade em mamíferos, o glifosato tornou-se o herbicida mais utilizado no mundo. Um fator que estimulou as vendas e aumentou o volume de aplicação foi a comercialização da soja transgênica (RR) tolerante ao herbicida, que permitiu ao agricultor a aplicação em larga escala durante as invasões de plantas daninhas após o desenvolvimento da cultura (AMARANTE JUNIOR, 2002).

O método de ação do herbicida glifosato começa na superfície foliar onde se inicia a translocação na planta até o sítio de ação e inibição da enzima-alvo, a 5-enolpiruvilshiquimato-3-fosfato sintase (EPSP). A EPSP catalisa a condensação do ácido chiquímico e do fosfato piruvato, e quando interrompida não permite a síntese de três aminoácidos fundamentais para a planta: o triptofano, a fenilalanina e a tirosina (KIRKWOOD; MCKAY, 1994 apud MONQUERO et al., 2004).

As características físico-químicas do glifosato podem ser observadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Informações técnicas e características físico-químicas do glifosato

<i>Nome químico (IUPAC):</i>	N-(phosphonomethyl)-glycin
<i>Nome comum:</i>	glyphosate/glifosato
<i>Número CAS:</i>	1071-83-6
<i>Fórmula molecular:</i>	C ₃ H ₈ NO ₅ P
<i>Peso molecular:</i>	169 g mol ⁻¹
<i>Classe:</i>	Herbicida
<i>Grupo:</i>	glicina substituída
<i>Pressão de vapor (P):</i>	1,31 · 10 ⁻⁵ Pa (25 °C, ácido)
<i>Solubilidade em água (S_w):</i>	10,5 g L ⁻¹ (20 °C, 995 g kg ⁻¹)
<i>Coeficiente pK_a:</i>	2,34 (a 25 °C)
<i>Coeficiente K_{ow} (Log K_{ow}):</i>	-3,2 (pH 7, 20 °C)
<i>Lei de Henry:</i>	2,10 x 10 ⁻⁰⁷ (Pa m ³ mol ⁻¹)

Fonte: IUPAC Pesticides Footprint (Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/373.htm>)

De acordo com a Tabela 2, o glifosato apresenta uma alta solubilidade em água (S_w), um coeficiente pK_a de caráter ácido e um coeficiente K_{ow} representando forte tendência hidrofílica. A pressão de vapor (P) do glifosato e a constante da Lei de Henry permitem classificá-lo como não volátil quando dissolvido em água. De acordo com Lavorenti et al. (2003), os agrotóxicos que possuem alta solubilidade e K_{ow}<1,0 apresentam características de baixa mobilidade e menor capacidade de sorção aos colóides do solo, porém esta regra não se aplica ao glifosato, que tem

uma rápida ligação a sítios positivos do solo (principalmente em argilas) como regiões com óxido de ferro e alumínio, apresentando elevados valores de coeficiente de sorção (K_{oc}) em comparação a outros herbicidas (SPRANKLE et al., 1975).

O glifosato é uma molécula que não sofre intensamente a degradação por hidrólise ou fotólise (FRANZ et al., 1985). Nos solos e sedimentos pode ser degradado ou transformado por vias aeróbicas e anaeróbicas, gerando metabólitos e/ou mineralizado a CO_2 e NH_4^+ (WHO, 1994). Nos solos, o glifosato pode tomar duas vias distintas de degradação, sendo a primeira a partir da formação do AMPA (ácido aminometilfosfônico), principal metabólito, e consequente degradação por ação da enzima C-P Liase. A segunda via ocorre a partir da formação da sarcosina (metabólito secundário do glifosato) pela ação da C-P Liase, e posterior quebra em glicina pela enzima sarcosina oxidase (LIU et al., 1991).

Outra característica importante do glifosato é a sua rápida sorção ao solo após contato, fazendo com que a sua mobilidade seja restrita (WHO, 1994). Por outro lado, esta sorção rápida não impede que o herbicida seja degradado em pouco tempo, porém o mesmo tende a formar resíduos ligados (não extraíveis) em estudos ambientais (WHO, 1994).

2.4 Ametrina

A ametrina (Figura 4) é uma molécula herbicida de ação seletiva e sistêmica, pertencente ao grupo das Triazinas. Foi descoberta como herbicida pela primeira vez por J. R. Geigy, em 1952 na Suíça. Sua ação é de pré e pós-emergência, atuando como inibidor da fotossíntese (ROBERTS, 1999).

Figura 4 – Fórmula estrutural da ametrina

A ametrina é absorvida pelas folhas e raízes, translocada pelo xilema para os outros tecidos vegetais e acumulada nos meristemas apicais. Como triazina inibidora de fotossíntese, a ametrina liga-se ao fotossistema II pelo complexo protéico QB, sítios 2 e 3, na membrana dos cloroplastos, interrompendo o fluxo de elétrons da cadeia transportadora (GRESSEL, 1985). Este herbicida é recomendado no controle de daninhas em culturas de banana, citros, café, soja, trigo, maçã, cana-de-açúcar entre outras (ROBERTS, 1999). As características físico-químicas da ametrina estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Informações técnicas e características físico-químicas da ametrina.

<i>Nome químico (IUPAC):</i>	N2-ethyl-N4-isopropyl-6-methylthio-1,3,5-triazine-2,4-diamine
<i>Nome comum:</i>	Ametryn/Ametrina
<i>Número CAS:</i>	834-12-8
<i>Fórmula molecular:</i>	C ₉ H ₁₇ N ₅ S
<i>Peso molecular:</i>	227,3 g mol ⁻¹
<i>Classe:</i>	Herbicida
<i>Grupo:</i>	Triazina
<i>Pressão de vapor (P):</i>	0,365 mPa (25 °C, ácido)
<i>Solubilidade em água (S_w):</i>	0,2 g L ⁻¹ (20 °C, 995 g kg ⁻¹)
<i>Coeficiente pK_a:</i>	10,07 (a 25 °C)
<i>Coeficiente K_{ow} (Log K_{OW}):</i>	2,63 (pH 7, 20 °C)
<i>Lei de Henry:</i>	4,10 x 10 ⁻⁰⁴ (Pa m ³ mol ⁻¹)

Fonte: IUPAC Pesticides Footprint (Disponível em: <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/27.htm>)

Pela Tabela 3, pode-se inferir que a ametrina possui uma baixa solubilidade em água (S_w), um pK_a relativamente elevado (caráter ácido fraco), K_{ow} >1,0 e pressão de Vapor (P) e Lei de Henry que indicam a não volatilidade quando misturada em água.

A ametrina pode ser removida do solo majoritariamente por atividade microbiana, apresentando uma mobilidade horizontal e vertical acentuada, podendo ainda permanecer ligada ao solo. A sua remobilização, quando ligada ao solo, pode ocorrer pela ação da água após chuvas fortes ou até mesmo em culturas irrigadas (EXTOXNET, 1995).

2.5 Misturas de Tanque

As misturas de tanque são associações de 2 ou mais agrotóxicos, ou agrotóxicos e insumos, em apenas um tanque para aplicação conjunta em lavouras. Esta prática pode ser observada em países como Austrália, Canadá, Estados Unidos da América e Reino Unido, em que existem recomendações quanto à forma de aplicação, incompatibilidade e recomendações de segurança (CANADA, 2012; HOLMES, J. et al., 2009; FISHEL, F. M., 2010; REINO UNIDO, 2002).

Agronomicamente, misturar 2 ou mais agrotóxicos pode ser uma boa estratégia para a logística de aplicação, gerando uma economia no consumo de combustível, horas de aplicação, menor compactação dos solos e possível maior efetividade e espectro de controle. Cabe ainda a observação de incompatibilidades entre produtos formulados, informação geralmente disponível na bula e rótulo de cada produto. Para os herbicidas, além da incompatibilidade, outro fator preocupante é a interação antagônica, sinérgica ou aditiva entre duas substâncias em relação à sua efetividade de controle de plantas daninhas. A mistura de herbicidas pode gerar interações antes ou depois da entrada na planta alvo, alterando o modo de ação de forma sinérgica, antagônica ou aditiva (ZHANG; HAMILL; WEAVER, 1995). Quando uma mistura age de forma antagônica, significa que a resposta de controle foi menor que a esperada. Se a mistura é sinérgica, então houve uma resposta de controle de plantas invasoras maior que a esperada, e se não houve alteração da resposta esperada no controle pode-se dizer que a mistura foi aditiva (COLBY, 1967). Outra prática recente na agricultura é a mistura de tanque entre herbicidas, micronutrientes e insumos. Carvalho et al. (2008) aplicaram o glifosato em conjunto com uréia ou sulfato de amônio no controle de plantas daninhas, e observaram que houve maior efetividade no tratamento associado ao uso de sulfato de amônio com o herbicida. Os autores explicaram que o glifosato tende a formar um sal fosfatado a partir da dissociação do sulfato de amônio, gerando um composto que penetra mais facilmente na planta.

Ambientalmente, os estudos com misturas de agrotóxicos se limitam à toxicidade, sendo raros os estudos de comportamento de associações entre duas ou mais moléculas. Matthiessen et al. (1988) estudaram a toxicidade, em trutas arco-íris, das principais misturas de tanque utilizadas no Reino Unido na década de 80,

concluindo que houveram poucas diferenças em relação à toxicidade dos produtos aplicados individualmente.

Embora as misturas de tanque tenham sido amplamente estudadas na efetividade, antagonismo e/ou sinergismo no controle de plantas daninhas, ainda existe uma lacuna muito grande para a questão ambiental. A ciência pode atuar de maneira positiva nesta área, fornecendo o suporte necessário para que as novas tecnologias não afetem a sustentabilidade do planeta e a qualidade de vida em longo prazo.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios de degradação, sorção/dessorção e atividade microbiana foram conduzidos no Laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Universidade de São Paulo (USP), Brasil.

3.1 Escolha, coleta e manejo dos solos

3.1.1 *Escolha dos solos*

Para a escolha do solo correto para instalação dos experimentos, foi necessário levantamento das áreas de cultivo de cana-de-açúcar nos municípios de Piracicaba e Itacemópolis. Os mapas de cultivo de cana-de-açúcar dos municípios foram fornecidos pela ÚNICA (União das Indústrias de Cana-de-açúcar), sendo estes provenientes do projeto CANASAT, cedidos gentilmente pelo Prof. Dr. Bernardo Rudorff (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, INPE), referentes ao período de safra de 2008 a 2009.

Os mapas de solos (cartas de solos) foram fornecidos pelo prof. Dr. Jener Fernando (Instituto Agrônomo de Campinas - IAC, SP), e cobriram as áreas

necessárias para o estudo em aproximadamente 97%. Todos os arquivos foram recebidos em formato *shapefile* (shp) e foram manejados em ArcGIS® versão 9.3.

Os mapas de solos e de Cana-de-açúcar foram tratados antes da sobreposição, com agrupamentos de classes semelhantes e detalhamento da área de trabalho. Após este tratamento, os mapas de solos e de cana-de-açúcar foram sobrepostos, utilizando-se as ferramentas do ArcToolbox no ArcGIS para a finalização. Os dados de área foram obtidos das tabelas de atributos após inclusão das unidades de conversão e das análises estatísticas. O resultado final foi um mapa com projeção Córrego Alegre UTM S23, demonstrando a distribuição do plantio de cana-de-açúcar sobre os diversos solos dos municípios de Piracicaba e Iracemápolis (Figura 5).

Figura 5 – Mapa final do plantio de Cana-de-açúcar sobreposto com os tipos de solos de Piracicaba e Iracemápolis, SP (Safrá 2008 e 2009)

Os dados das tabelas de atributos foram organizados, e um ranking de solos com cultivo de cana-de-açúcar foi elaborado (tabela 4). A partir deste ranking foi eleito o Solo PV (Argissolo Vermelho) como o mais representativo para a cultura da cana-de-açúcar nos municípios de Piracicaba e Itacemópolis, SP Brasil, com aproximadamente 39,18% da área de cana plantada.

Tabela 4 – Tabela resumida de ranking de área (Km² e m²) para solos com cana-de-açúcar

Tipo de Solo	Área (Km²)	Área (m²)	% Relativa
Argissolo Vermelho (PV)	221,45	221453089	39,18%
Latossolo Vermelho-Escuro (LE)	116,05	116051894	20,53%
Latossolo Roxo (LR)	56,10	56104849	9,93%
Litossolo (Li)	55,01	55013144	9,73%
Neossolo Quartzarênico (AQ)	37,77	37767594	6,68%
Outros	72,72	72728535	13,95%

Após a escolha do solo a ser utilizado como sistema teste, foram determinados 4 pontos de coletas dentro de fazendas da Usina Itacema, que forneceu a autorização para a retirada das amostras de solo. Dos 4 pontos de coleta foi escolhido o ponto 03, localizado na fazenda São Pedro, município de Piracicaba. A Usina Itacema forneceu um histórico de aplicações da área com a utilização dos produtos glifosato (Roundup) e ametrina (Gesapax) de 2007 a 2011, apresentado na Tabela 5.

Tabela 5 – Histórico de aplicações Fazenda São Pedro

Tabela 6 - Histórico de aplicações / Fazenda São Pedro						
Parcela	Operação	Insumo	Data	Soma de Área (ha)	Soma de Consumo Total (L)	Média de Consumo Médio (L/ha)
32	Aplic. Herb. Massey TP	Gesapax	08/02/2011	35,30	124,88	3,54
			11/02/2011	130,99	60,00	0,46
			Total	166,29	184,88	2,00
39	Aplic. Herb.-PPI Massey	Roundup	26/01/2011	192,57	605,49	3,14
			Total	192,57	605,49	3,14
410	Herb.Bordadura Patriot TS	ROUNDUP TRANSORB	04/01/2010	10,00	15,46	1,55
		Roundup	25/03/2010	13,50	183,62	13,60
		Total	23,50	199,08	7,57	
5	Erradic.Quím.Soq. Massey	ROUNDUP TRANSORB	08/02/2011	20,00	180,00	9,00
		Total	20,00	180,00	9,00	
32	Aplic. Herb. Massey TP	Gesapax	08/02/2011	16,49	58,33	3,54
			26/02/2011	12,00	42,00	3,50
			15/03/2011	12,00	32,73	2,73
			Total	40,49	133,06	3,25
43	Herb.C.Química Costal TS	ROUNDUP TRANSORB	01/01/2010	36,65	8,00	0,22
			04/01/2010	7,90	10,00	1,27
		Total	44,55	18,00	0,74	
410	Herb.Bordadura Patriot TS	ROUNDUP TRANSORB	08/04/2010	4,20	10,32	2,46
		Roundup	08/04/2010	4,20	36,13	8,60
		Total	8,40	46,45	5,53	
494	Erradic.Quím.Soq. Terc.	ROUNDUP TRANSORB	05/01/2011	36,00	128,68	3,58
		Roundup	05/01/2011	36,00	110,30	3,06
		Total	72,00	238,98	3,32	
Total Geral				567,80	1605,94	34,56

Fonte: Usina Iracema.

Conforme observado na tabela 5, o local escolhido para a coleta do solo 3 (parcela 127) não recebeu aplicação dos herbicidas utilizados neste estudo durante o período entre as safras de 2007 a 2011.

3.1.2 Coleta e manejo dos solos

Três lotes de solos foram coletados para a condução das fases experimentais. Para a escolha correta do local da coleta foi utilizado um GPS Garmin® Etrex Venture número de série 77648403, com precisão mínima de 8 m. Foram escolhidos 3 pontos aleatoriamente em um raio de 10 metros a partir da

primeira coleta para a retirada do solo, havendo posterior homogeneização das amostras (sacos coletados). Foram retiradas amostras de solo da primeira camada de aproximadamente 10 cm de profundidade (Figura 6).

Figura 6 – A) Limpeza da palha superficial; B) Coleta do solo e armazenamento em sacos; C) Demonstração da profundidade de retirada da camada de solo

As informações detalhadas das coletas podem ser encontradas na Tabela 6.

Tabela 6 – Dados das coletas de solos na fazenda São Pedro, município de Piracicaba, estado de São Paulo – Brasil

	Coleta 01	Coleta 02	Coleta 03
Data da coleta	19 ago. 2010	03 fev. 2011	25 mai. 2011
Horário	09h 50min	10h 25min	08h 52min
Coordenadas	S 22°42.256' WO 47°32.281'	S 22°42.250' WO 47°32.285'	S 22°42.247' WO 47°32.283'
Precisão do GPS	8 m	7 m	8 m
Tipo de solo	Argissolo Vermelho	Argissolo Vermelho	Argissolo Vermelho
Peso aproximado	100 Kg	46 Kg	62 Kg
Data da peneiração	23 ago. 2010	07 fev. 2011	28 mai. 2011
Lote de referência	PA01	PA02	PA03

Após as coletas, os solos foram secos à sombra e posteriormente peneirados em peneira de 2 mm. Do solo peneirado foram retiradas alíquotas de aproximadamente 300 g e enviadas para análises no Departamento de Solos da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, ESALQ – USP, sendo o restante guardado em geladeira até a data de utilização, respeitando-se um prazo de validade de 3 meses a partir da coleta para a montagem dos experimentos. Os resultados das análises de solo podem ser observados na Tabela 7.

Tabela 7 – Sumário dos resultados das análises físico-químicas dos solos

Solo/ Lote	M.O g dm ⁻³	pH (em CaCl ₂)	Areia Total g Kg ⁻¹	Silte	Argila (g Kg ⁻¹)		CTC	P	S	Ca	Mg	K
					c/disp	água						
PV/PA01	17	5,93	582	116	302	50	148,3	19	7	78	60	1,4
PV/PA03	22	6,31	644	28	127	N/A	111,7	14	13	60	28	1,9

Para os experimentos de biodegradação e de atividade microbiana foi necessária a determinação da umidade e capacidade de campo dos solos. Para a determinação da umidade dos solos foram pesados, em triplicata, 10g de solo em uma placa de Petri, deixando-a por 24 horas em estufa a aproximadamente 105 °C. Após a incubação de 24 horas foi determinada a umidade dos solos pesando-se as triplicatas e submetendo-se os resultados à equação 1.

$$U = \frac{(m_p + m) - (m_p + m_s)}{(m_p + m_s) - (m_p)} \text{ kg kg}^{-1} \quad (1)$$

em que;

m_p = peso da placa de Petri, g;

m = peso do solo úmido, g;

m_s = peso do solo seco, g.

Após a determinação da umidade foi realizado o teste de determinação da capacidade de campo, pelo método descrito por Costa (1983). O método baseia-se em colocar o solo seco peneirado em um Becker de volume 500 mL, deixando cair 2 mL de água por 10 segundos utilizando-se uma pipeta volumétrica, retirando-se então o torrão formado e colocando-o em uma placa de Petri (com o peso determinado previamente) para secagem em estufa (24 horas a aproximadamente 60 °C). A capacidade de campo (CC%) foi calculada de acordo com a equação 2.

$$CC (\%) = \frac{(m_p + m) - (m_p + m_s)}{(m_p + m_s) - (m_p)} \times 100 \quad (2)$$

em que;

m_p = peso da placa de Petri, g;

$(m_p + m)$ = peso do torrão úmido na placa de Petri, g;

$(m_p + m_s)$ = peso do torrão seco na placa de Petri, g.

Para a montagem do experimento convencionou-se a utilização de 50 g de solo base seca para cada frasco de incubação. Para determinar o peso real do solo úmido (equivalente a 50 g de solo seco) a ser utilizado foi utilizada a equação 3.

$$m = (1 + U) \cdot m_s \quad (3)$$

em que;

m = massa de solo, na umidade atual, a ser pesada, g;

m_s = massa de solo seco desejada, g;

U = umidade atual no solo (kg kg^{-1}) determinada pela equação 1.

O solo foi ajustado a 75% de sua capacidade de campo, sendo então necessária a adição de água para que o mesmo fosse ativado. A determinação da quantidade de água a ser adicionada foi calculada de acordo com a equação 4.

$$V_a = \frac{[(CC \cdot 0,75) - U] \cdot m_s}{100} \quad (4)$$

em que;

V_a = volume de água a ser adicionado ao solo, mL;

CC = capacidade de campo (%);

U = Umidade atual do solo;

m_s = massa de solo seco, g;

Os resultados do teor de umidade, capacidade de campo, peso de solo equivalente a 50 g de solo seco e volume de água a ser adicionado podem ser observados na Tabela 8, para cada lote de solo.

Tabela 8 – Resultados em média das triplicadas das análises de teor de umidade, capacidade de campo, peso úmido equivalente a 50 g de solo seco e volume de água necessário para atingir 75% da capacidade de campo, de cada lote de solo

Lote do solo	Teor de Umidade (kg kg ⁻¹)	Capacidade de Campo (CC %)	Peso úmido (equivalente a 50 g de solo seco)	Volume de água (para atingir 75% da CC) em mL
PA01	0,070	19,14	53,52	3,66
PA02	0,103	19,22	55,13	2,08
PA03	0,042	19,22	52,10	6,06

Para efeito de cálculos futuros foi considerada uma densidade de aproximadamente 1,2 g cm⁻³ para os solos e uma profundidade a campo de 0,1 m.

3.2 Ensaios de Biodegradação

Os ensaios de degradação mineralização foram montados em frasco Bartha (Figura 7) e incubados a 20 ± 2 °C em sala climatizada, seguindo-se a norma “Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil”, Guideline 307 da OECD (OECD, 2002). O desenho experimental consiste em aplicar diretamente ao solo uma quantidade conhecida do agrotóxico radiomarcado, em um sistema hermético, onde se possam quantificar a mineralização a partir do ¹⁴CO₂ desprendido, os possíveis produtos e metabólitos extraíveis do solo e o resíduo ligado ao solo, fechando um balanço de massas com pouca perda.

Os frascos de incubação foram montados em duplicatas (R1 e R2) para cada tempo de coleta, adicionando-se 2 frascos de backup (também R1 e R2).

Figura 7 – Esquema de montagem de frascos de Bartha para incubação dos experimentos

Conforme a Figura 7, o solo é colocado no Erlenmeyer, onde é ativado com a umidade necessária para atingir 75% da capacidade de campo e recebe a aplicação do agrotóxico radiomarcado em concentração conhecida. No tubo lateral do frasco de incubação encontra-se uma solução de NaOH $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, que atua na captura do $^{14}\text{CO}_2$ desprendido após a mineralização da molécula aplicada. Esta solução é coletada semanalmente (podendo haver variações nos tempos de coleta após 70 dias de incubação) em triplicatas de 1 mL e quantificada por espectrometria de cintilação líquida (ECL). O solo contido no Erlenmeyer é retirado do frasco conforme tempo de incubação e submetido à extração por método específico para cada tipo de produto estudado. O extrato é então concentrado e rota-evaporador e analisado por cromatografia de camada fina (TLC – *Thin Layer Chromatography*), quando possível. Após o procedimento de extração o solo é seco e oxidado em oxidador biológico a aproximadamente 900°C para quantificação do resíduo ligado.

Para a aplicação dos herbicidas foi considerado um cenário que, apesar de pouco provável, representaria o pior caso de aplicação no campo em que todo o produto atinge diretamente o solo. Para isto, utilizaram-se as concentrações de glifosato a $2,88 \text{ Kg i.a ha}^{-1}$ ($2,16 \text{ Kg e.a ha}^{-1}$) e ametrina a 3 Kg i.a ha^{-1} , representando a dose máxima de campo (DMC) recomendada para a cultura de cana-de-açúcar destes produtos. Os parâmetros de aplicação da ametrina e do glifosato estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 – Parâmetros considerados para elaboração das soluções de trabalho

Ingrediente Ativo (Glifosato)	2,16 Kg/ha
Equivalente ácido (e.a) (Glifosato)	360 g/L
Ingrediente Ativo (Ametrina)	2,55 Kg/ha
Profundidade Considerada	0,1 m
Densidade do Solo	1200 Kg/m ³
MS (Massa de Solo em 1 ha)	1200000 Kg/ha
QST (Quantidade de Substância Teste por Frasco) (Glifosato)	90 µg de i.a
QST (Quantidade de Substância Teste por Frasco) (Ametrina)	106,25 µg de i.a
Massa do solo Fresco	0,05 Kg
Quantidade de frascos Bartha	20 (unidade)

Foram montados 4 experimentos de biodegradação, sendo: 1) ^{14}C -Glifosato: biodegradação da molécula glifosato aplicada sem a mistura com ametrina; 2) ^{14}C -Glifosato+Ametrina: aplicação da molécula glifosato (radiomarcada) em mistura com a ametrina (não radiomarcada) para comparação com o experimento 1;

3) ^{14}C -Ametrina: biodegradação da molécula ametrina aplicada sem a mistura com glifosato; e 4) ^{14}C -Ametrina+Glifosato: aplicação da molécula ametrina (radiomarcada) em mistura com o glifosato (não radiomarcado) para comparação com o experimento 3.

Os dados de mineralização foram ajustados com um modelo de Cinética de Primeira Ordem Multi-Compartimento (FOMC - *First Order Multi-Compartment Kinetic*) proposto por Gustafson e Holden (1990) (eq. 5). Para cálculos de meia-vida de mineralização ($t_{1/2}$) e de persistência no solo (DT_{50}) utilizou-se então a equação 6.

$$C = C_0 \cdot (1 + \beta t)^{-\alpha} \quad (5)$$

em que;

C = Quantidade de produto restante no solo no tempo t (%)

C_0 = Quantidade de produto aplicado ao solo no tempo 0 (%);

β = Parâmetro de localização;

α = Parâmetro determinado pelo coeficiente de variação k (SFO);

$$\text{DT}_{50} \text{ ou } t_{1/2} = \frac{(2^{(1/\alpha)} - 1)}{\beta} \quad (6)$$

Como não foi possível determinar a formação de metabólitos de glifosato utilizou-se apenas o cálculo da meia-vida de mineralização ($t_{1/2}$).

Nos resultados em triplicatas foram aplicadas as análises de CV% (Coeficiente de Variação), tolerando-se uma precisão mínima de 20%. As leituras em triplicatas em que o CV% apresentou-se superior a 20% foram submetidas ao teste Q de Dixon para exclusão de outliers (eq. 7).

$$R = \frac{X_S - X_V}{X_1 - X_2} \quad (7)$$

em que:

R = Valor calculado a ser comparado com o valor de referência (0,970 para $n = 3$, $p = 95\%$);

X_S = Valor Suspeito;

X_V = Valor mais próximo (maior ou menor);

X_1 = Maior Valor do conjunto de dados;

X_2 = Menor Valor do conjunto de dados;

3.2.1 Ensaios com glifosato radiomarcado

A biodegradação do glifosato sem mistura com ametrina (^{14}C -Glifosato) foi realizada com o solo lote PA01, utilizando-se 53,52 g de solo por frasco de incubação, e a do glifosato em mistura com a ametrina (^{14}C -Glifosato+Ametrina) com o solo lote PA03 e 52,10 g de solo por frasco de incubação. Os preparos das soluções de trabalho foram realizados nas datas de aplicações. Utilizou-se a molécula glifosato radiomarcada no radical fosfonometil. Para a adição do glifosato em complementação ao radiomarcado foi utilizada solução de padrão analítico. Antes da aplicação das soluções de trabalho, os solos foram pré-ativados por uma semana com 50% da umidade necessária para atingir 75% da capacidade de campo, adicionando-se o restante da água após a aplicação da solução de trabalho.

Foram coletados $^{14}\text{CO}_2$ (solução NaOH 0,2 mol L⁻¹ dos frascos Bartha) nos tempos 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70 dias após a aplicação (DAA) para o experimento ^{14}C -Glifosato e 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63 e 70, 84 e 120 DAA para ^{14}C -Glifosato+Ametrina. As coletas de solução de hidróxido de sódio foram realizadas nos frascos T70 R1 e R2, Backup R1 e R2, em triplicatas de 1 mL por tempo de coleta.

As amostras de solos foram coletadas para extração nos tempos 0, 7, 14, 28, 42, 56 e 70 DAA no ensaio ^{14}C -Glifosato, adicionando-se os tempos 84 e 120 DAA no experimento ^{14}C -Glifosato+Ametrina, seguindo-se o método descrito na Figura 8.

Figura 8 – Fluxograma do método de extração para a molécula glifosato em solos

Devido o fato da extração não ter apresentado radioatividade suficiente no extrato para concentração não foi possível a aplicação em placas de TLC com a molécula radiomarcada glifosato. Após a extração os solos foram secos em estufa a aproximadamente 40 °C e oxidados em oxidador biológico Harvey OX-500 a 900 °C (0,2 g por 3 minutos) para determinação do resíduo ligado.

3.2.2 Ensaio com ametrina radiomarcada

Os experimentos ^{14}C -Ametrina e ^{14}C -Ametrina+Glifosato foram montados com o solo lote PA02 na quantidade de aproximadamente 53,13 g por frasco de incubação. As soluções de trabalho foram confeccionadas nas datas de aplicações. Utilizou-se ametrina radiomarcada em carbono do anel. Os solos foram pré-ativados por uma semana com 50% da umidade necessária para atingir 75% da capacidade de campo, adicionando-se o restante da água após a aplicação da solução de trabalho.

Foram coletados $^{14}\text{CO}_2$ (solução NaOH 0,2 mol L⁻¹ dos frascos Bartha) nos tempos 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, 63, 70, 84, 110 e 120 dias após aplicação em ambos os experimentos. As coletas de solução de hidróxido de sódio foram realizadas nos frascos T120 R1 e R2, Backup R1 e R2, em triplicatas de 1 mL de cada frasco por tempo de coleta.

As amostras de solos foram coletadas para extração nos tempos 7, 14, 28, 42, 56, 70, 84 e 120 DAA, seguindo-se o método descrito na Figura 9.

Figura 9 – Fluxograma do método de extração para a molécula ametrina em solos

Ao contrário dos experimentos com a molécula glifosato radiomarcada, os extratos de ametrina radiomarcada apresentaram boa taxa de radioatividade permitindo então análises com placas de TLC.

Após a extração, os solos foram secos em estufa a aproximadamente 40 °C e oxidados em oxidador biológico Harvey OX-500 a 900 °C (0,2 g por 3 minutos) para determinação do resíduo ligado, fechando o balanço de massas.

3.3 Ensaio de atividade microbiana

O estudo de atividade microbiana foi realizado seguindo-se a norma "Soil Microorganism: Carbon transformation test", Guideline 217 da OECD (OECD 2000). Este experimento consiste em aplicar uma quantidade conhecida de ^{14}C -Glicose em solos incubados com concentrações diferentes do agrotóxico, coletando-se o $^{14}\text{CO}_2$ evoluído durante 12 horas em intervalos de 2 horas. Este procedimento é então repetido temporalmente após 7, 14 e 28 dias de incubação, verificando possíveis diferenças quanto à dosagem ou mistura de agrotóxicos.

O desenho experimental (Figura 10) consistiu em incubar em frascos herméticos (capacidade de 3 litros) 300 g de solo, sendo o controle 1 no frasco 1 (sem aplicação de herbicidas, apenas os solventes em quantidade igual aos demais frascos de incubação) aplicando-se ametrina+glifosato DMC (na dose máxima de campo) no frasco 2, ametrina+glifosato 5xDMC (cinco vezes a dose máxima de campo) no frasco 3, controle 2 no frasco 4, ametrina DMC no frasco 5, ametrina 5xDMC no frasco 6, controle 3 no frasco 7, glifosato 1xDMC no frasco 8 e glifosato 5xDMC no frasco 9. Dos frascos herméticos foram retiradas 3 alíquotas de 10 g de solo a cada tempo de incubação (0, 7, 14 e 28 dias) e transferidas para frascos Bartha devidamente identificados onde receberam 1 mL de ^{14}C -Glicose radiomarcada contendo aproximadamente $5387,64 \text{ Bq mL}^{-1}$ de radioatividade e 720 mg L^{-1} de glicose. Dos frascos de Bartha coletou-se 1mL de 10mL da solução $\text{NaOH } 0,2 \text{ mol L}^{-1}$ a cada 2 horas para quantificação do $^{14}\text{CO}_2$ evoluído por ECL (Espectrômetro de Cintilação Líquida) e elaboração da curva de mineralização.

As soluções de trabalho foram preparadas no momento da utilização. Todos os resultados foram analisados estatisticamente quanto à precisão (Coeficiente de Variação CV%), tolerando-se uma variação máxima de 20%.

Figura 10 – Fluxograma esquemático da montagem e execução do experimento de Atividade Microbiana

Aos resultados obtidos foram elaboradas curvas de regressão linear sobre os valores de porcentagem de recuperação acumulada por hora de coleta e por tempo. Estas curvas foram comparadas estatisticamente para: 1) diferenças entre coeficientes de correlação (Teste Z de Fisher) (eq. 8); 2) diferenças entre o coeficiente de inclinação da curva (teste T de Student) (eq. 10); e 3) diferenças entre curvas, todos os parâmetros (análise de covariância). Os cálculos aritméticos foram realizados manualmente por fórmulas em MS Excel versão 2007, utilizando-se apenas as medidas calculadas automaticamente pelo programa para o desvio padrão da interseção, resíduos das curvas e soma dos quadrados dos valores reais, valores ajustados pela curva e valores residuais.

$$z = \frac{r'_1 - r'_2}{\sqrt{\frac{1}{n_1 - 3} + \frac{1}{n_2 - 3}}} \quad (8)$$

em que:

n_1 = número de amostras do grupo de análises 1;

n_2 = número de amostras do grupo de análises 2;

r'_1 = coeficiente de correlação ajustado do grupo 1 (eq. 9);

r'_2 = coeficiente de correlação ajustado do grupo 2 (eq. 9).

$$r' = (0.5) \log_e \left| \frac{1+r}{1-r} \right| \quad (9)$$

$$t = \frac{b_1 - b_2}{s_{b_1 - b_2}} \quad (10)$$

em que:

b_1 = coeficiente de interseção do grupo 1;

b_2 = coeficiente de interseção do grupo 2;

$S_{b_1 - b_2}$ = desvio padrão da diferença entre os coeficientes de inclinação (eq. 11)

$$s_{b_1-b_2} = \sqrt{s_{b_1}^2 + s_{b_2}^2} \quad (11)$$

A análise das comparações entre as curvas de regressão foi realizada a cada duas curvas pelo software online “StatTools - Comparing two regression lines program” (http://www.stattools.net/Comp2Regs_Pgm.php). As comparações de curvas, testes T e testes Z seguiram o delineamento à baixo:

- 1) Ametrina 1xDMC (A1) x Controle (C) – T0, T7, T14 e T28;
- 2) Ametrina 5xDMC (A5) x Controle (C) – T0, T7, T14 e T28;
- 3) Glifosato 1xDMC (G1) x Controle (C) – T0, T7, T14 e T28;
- 4) Glifosato 5xDMC (G5) x Controle (C) – T0, T7, T14 e T28;
- 5) Ametrina+Glifosato 1xDMC (AG1) x Controle (C) – T0, T7, T14 e T28;
- 6) Ametrina+Glifosato 5xDMC (AG5) x Controle (C) – T0, T7, T14 e T28;
- 7) Ametrina 1xDMC (A1) x Ametrina 5xDMC (A5) – T0, T7, T14 e T28;
- 8) Glifosato 1xDMC (G1) x Glifosato 5xDMC (G5) – T0, T7, T14 e T28;
- 9) Ametrina+Glifosato 1xDMC (AG1) x Ametrina+Glifosato 5xDMC (AG5) – T0, T7, T14 e T28;
- 10) Ametrina 1xDMC (A1) x Ametrina+Glifosato 1xDMC (AG1) – T0, T7, T14 e T28;
- 11) Ametrina 5xDMC (A5) x Ametrina+Glifosato 5xDMC (AG5) – T0, T7, T14 e T28;
- 12) Glifosato 1xDMC (G1) x Ametrina+Glifosato 1xDMC (AG1) – T0, T7, T14 e T28;
- 13) Glifosato 5xDMC (G5) x Ametrina+Glifosato 5xDMC (AG5) – T0, T7, T14 e T28;
- 14) Ametrina 1xDMC (A1) – T0 x T7, T0 x T14, T0 x T28, T7 x T14, T7 x T28, T14 x T28;
- 15) Ametrina 5xDMC (A5) – T0 x T7, T0 x T14, T0 x T28, T7 x T14, T7 x T28, T14 x T28;
- 16) Glifosato 1xDMC (G1) – T0 x T7, T0 x T14, T0 x T28, T7 x T14, T7 x T28, T14 x T28;

- 17) Glifosato 5xDMC (G5) – T0 x T7, T0 x T14, T0 x T28, T7 x T14, T7 x T28, T14 x T28;
- 18) Ametrina+Glifosato 1xDMC (AG1) – T0 x T7, T0 x T14, T0 x T28, T7 x T14, T7 x T28, T14 x T28;
- 19) Ametrina+Glifosato 5xDMC (AG5) – T0 x T7, T0 x T14, T0 x T28, T7 x T14, T7 x T28, T14 x T28;
- 20) Controle (C) – T0 x T7, T0 x T14, T0 x T28, T7 x T14, T7 x T28, T14 x T28;

Foram realizados no total 98 testes de curvas (considerando-se todos os parâmetros), 98 testes Z para comparações de coeficientes de correlação de curvas e 98 testes T para verificação do coeficiente de inclinação das retas.

3.4 Ensaio de Sorção e Dessorção

Os experimentos de sorção e dessorção foram realizados no laboratório de Ecotoxicologia do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo, conduzidos em triplicata seguindo-se a norma “Adsorption-Desorption Using a Batch Equilibrium Method”, Guideline 106 da OECD (OECD, 2000). O experimento foi montado em frascos de teflon para centrífuga com capacidade de 50 mL. A relação solo:solução foi determinada em 1:5, utilizando-se solução aquosa de CaCl_2 0,01 mol L⁻¹ e 2 g de solo por frasco. O solo utilizado nesta etapa analítica foi o Argissolo Vermelho lote PA03.

Para a sorção do glifosato e da ametrina aplicados individualmente foram utilizadas as concentrações ½, 1, 2, 4 e 8 vezes a DMC (Dose Máxima de Campo), sendo esta 2,88 Kg i.a ha⁻¹ para o glifosato e 3 Kg i.a ha⁻¹ para ametrina. Para a sorção das misturas de tanque (associações) utilizou-se as mesmas concentrações para o produto alvo individual, porém adicionando-se à solução o produto frio da molécula de mistura (não alvo) na concentração de 1 x DMC.

Os frascos de teflon foram inequivocamente identificados, recebendo o solo (2 g) e a solução de trabalho. As soluções foram preparadas no dia da utilização (Anexo C), contendo aproximadamente 100 Bq mL⁻¹ de radioatividade. Para cada tratamento preparou-se 30 mL de solução de trabalho, aplicando-se 10 mL em cada

frasco de teflon (triplicatas). Após aplicação os frascos foram colocados em mesa agitadora pendular para agitação por 24 horas. Após 24 horas de agitação a 200 rpm os frascos foram centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada (aproximadamente 4 °C). Coletou-se então 3 alíquotas de 1 mL do sobrenadante para leitura em ECL (Espectrômetro de Cintilação Líquida) e quantificação do produto sorvido por diferença ao remanescente no solo. A solução remanescente foi então descartada em recipiente adequado e encaminhada à central de resíduos radioativos do CENA/USP.

Os experimentos de dessorção foram realizados logo em seguida ao experimento de sorção, aplicando-se ao frasco de teflon com o solo 10 mL da solução aquosa de CaCl_2 0,01 mol L⁻¹ e posteriormente agitando-os em mesa agitadora pendular por mais 24 horas a 200 rpm. Após a etapa de agitação os frascos foram novamente centrifugados a 3000 rpm por 15 minutos em centrífuga refrigerada (aproximadamente 4 °C) coletando-se três alíquotas de 1 mL do sobrenadante para análise em ECL e determinação da radioatividade desprendida do solo (dessorção). Foram utilizados apenas frascos de centrífuga novos, mas realizou-se teste de sorção dos produtos radiomarcados às paredes de teflon, que concluiu a não aderência dos produtos ao material.

Todos os dados da sorção gerados foram ajustados ao modelo das isothermas de Freundlich (eq. 8).

$$C_S^{\text{ads}} = K_f^{\text{ads}} \cdot (C_{\text{aq}}^{\text{ads}})^{1/n} \quad (12)$$

em que:

C_S^{ads} = quantidade da substância teste adsorvida ao solo, $\mu\text{g g}^{-1}$

$C_{\text{aq}}^{\text{ads}}$ = concentração de equilíbrio da substância teste na solução, $\mu\text{g mL}^{-1}$

K_f^{ads} = Coeficiente de adsorção de Freundlich $\text{cm}^3 \text{g}^{-1}$

n = constante da regressão (entre 0,7 e 1,0)

Foram calculadas ainda as constantes K_d (coeficiente de distribuição – eq. 9), K_{oc} (coeficiente de adsorção – eq. 10), K_{des} (coeficiente de dessorção – eq. 11) e as isothermas de Freundlich para a dessorção (eq. 12).

$$K_d = \frac{C_s^{ads}}{C_{aq}^{ads}} \quad (13)$$

em que:

C_s^{ads} = quantidade da substância teste adsorvida ao solo, $\mu\text{g g}^{-1}$

C_{aq}^{ads} = concentração de equilíbrio da substância teste na solução, $\mu\text{g mL}^{-1}$

$$K_{oc} = K_d \cdot \frac{100}{\%OC} \quad (14)$$

em que:

$\%OC$ = Quantidade de carbono orgânico na amostra de solo (g g^{-1})

$$K_{des} = \frac{m_s^{ads} - m_{aq}^{des}}{m_{aq}^{des}} \cdot \frac{V_T}{m_{solo}} \quad (\text{mL g}^{-1}) \quad (15)$$

em que:

m_s^{ads} = Massa de substância teste adsorvida ao solo (μg)

m_{aq}^{des} = Massa de substância teste dessorvida do solo (μg)

V_T = Volume total da solução aquosa em contato com o solo durante o experimento de dessorção (mL)

m_{solo} = Massa de solo utilizada no experimento (g)

$$C_s^{des} = \frac{m_s^{ads} - m_{aq}^{des}}{m_{solo}} \quad (\mu\text{g g}^{-1}) \quad (16)$$

em que:

m_s^{ads} = Massa de substância teste adsorvida ao solo (μg)

m_{aq}^{des} = Massa de substância teste dessorvida do solo (μg)

m_{solo} = Massa de solo utilizada no experimento (g)

Para a determinação da porcentagem de carbono orgânico na equação 7 foi utilizada a equação de conversão (eq. 13) em relação ao total de matéria orgânica calculada na análise do solo lote PA03.

$$\%OC = \frac{MO}{FC} \cdot \frac{1}{MO} \cdot 100 \quad (17)$$

em que:

MO = Matéria Orgânica do solo (g dm^{-3})

FC = Fator de Conversão (1,724)

Os resultados entre os tratamentos foram comparados utilizando-se o teste estatístico T pareado (eq. 14). Para verificação da precisão do experimento utilizaram-se as medidas de desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV%) com tolerância máxima de 5%. Todos os dados foram validados para um intervalo de confiança de 95%.

$$T = \frac{\bar{X} - \bar{Y}}{S_d / \sqrt{n}} \quad (18)$$

em que:

T = Valor a ser comparado com referência (n-1 graus de liberdade)

S_d = Desvio Padrão da diferença entre os valores dos grupos amostrais X e Y

$\bar{X}$ = Média do grupo amostral 1

$\bar{Y}$ = Média do grupo amostral 2

n = número de amostras

3.5 Equipamentos, reagentes e soluções

3.5.1 Equipamentos utilizados

Os equipamentos utilizados estão descritos na tabela 10.

Tabela 10 – Lista de Equipamentos utilizados na condução dos estudos (parte analítica)

Nome do equipamento	Marca/Modelo	Código	Procedimento	Finalidade
Aplicador Automático de Placas de TLC	Camag/ Linomat IV	AA01	POPE004	• Estudo de Biodegradação;
Espectrômetro de Cintilação Líquida (ECL)	Packard Tricarb/ 1600TR	AC01	POPE001	• Estudo de Biodegradação;
Balança Analítica	Shimadzu/ AX200	BA01	POPE055	• Estudo de Sorção/Dessorção;
Balança Analítica	Gehaka/ BG4400	BA03	POPE018	• Estudo de Atividade Microbiana.
Balança Analítica	AND/HA-202M	BA02	POPE017	• Estudo de Biodegradação.
Bomba de Vácuo	Vacu Ubrand/ MZ2CNT	BV05	POPE011	• Estudo de Biodegradação.
Centrífuga de Chão Refrigerada	Beckman/ J2-HS	CR01	POPE007	• Estudo de Biodegradação;
Scanner de Placas TLC Cyclone Plus	Perkin Elmer/ C431200	CY01	N/A	• Estudo de Sorção/Dessorção.
Estufa de Secagem	Marconi/ MA033	ET02	POPE031	• Estudo de Biodegradação;
Freezer	Eletrolux/Super	FR01	POPE024	• Estudo de Sorção/Dessorção.
Freezer	Brastemp/220	FR02		• Estudo de Biodegradação;
Geladeira	Brastemp/ Duplex 410	GE02		• Estudo de Sorção/Dessorção;
Geladeira	Eletrolux/H300	GE03		• Estudo de Atividade Microbiana.
Geladeira	Consul/Duplex	GE04		• Estudo de Atividade Microbiana.
Mesa Agitadora Pendular	Marconi/TE240	MA01	POPE057	• Estudo de Sorção/Dessorção.
Mesa Agitadora Orbital	Marconi/TE140	MA02	POPE005	• Estudo de Biodegradação.
Micropipeta 100–1000 µL	Labmate/ 100–1000 µL	MP01	POPE050	• Estudo de Biodegradação;
Micropipeta 1–10 µL	Nichiryo/ 1–10 µL	MP02		• Estudo de Sorção/Dessorção;
Micropipeta 20–200 µL	Labmate/ 20–200 µL	MP03		• Estudo de Atividade Microbiana.
Microseringa 10 µL	Hamilton/10 µL	MS01	POPM004	• Estudo de Biodegradação.
Microseringa 100 µL	Hamilton/100 µL	MS02		
Oxidador Biológico de Amostras - Oxidizer	Harvey/OX500	OX01	POPE003	• Estudo de Biodegradação.
Rota-Vapor	Reidolph/ VV2000	RV01	POPE009	• Estudo de Biodegradação;
Refrigerador/Circulador	Julabo/ FC600	RC01	POPE039	
Sistema Sala Climatizada	N/A	SC01	POPE037	
Termômetro DataLogger	Testo/174	TT01	POPE051	• Estudo de Sorção/Dessorção;
				• Estudo de Atividade Microbiana.

3.5.2 Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com sais e reagentes válidos. Seguiu-se o procedimento operacional padrão POPM005 do laboratório de Ecotoxicologia para identificação (rotulagem). O sistema de lotes foi sequencial a partir do 01,

colocando-se antes do número as iniciais “PA” (Paulo Alves). As soluções extratoras preparadas nos experimentos de biodegradação estão descritas na Tabela 11, o preparo de soluções de p.a (padrões analíticos) na Tabela 12 e o preparo das soluções captadoras de $^{14}\text{CO}_2$ na Tabela 13.

Tabela 11 – Preparo de soluções extratoras nos experimentos de biodegradação.

Nome da Solução	Composição	Lotes preparados	Data do Preparo	Utilização
Solução Extratora Glifosato (CaCl_2 0,01 mol L ⁻¹)	<ul style="list-style-type: none"> • Sal CaCl_2 (Fabricante: Synth Lote: 126796) – 8 g. • H_2O deionizada – 1 L. • Materiais: Balança BA03; Balão volumétrico 78849 BPL; Frasco de armazenamento 1L. 	PA01	13/10/2010	T0 Glifosato
		PA02	20/10/2010	T7 Glifosato
		PA03	27/10/2010	T14 Glifosato
		PA04	09/11/2010	T28 Glifosato
		PA05	23/11/2010	T42 Glifosato
		PA06	07/12/2010	T56 Glifosato
		PA07	21/12/2010	T70 Glifosato
		PA08	04/08/2011	T0 Glifosato+Ametrina
		PA09	11/08/2011	T7 Glifosato+Ametrina
		PA10	18/08/2011	T14 Glifosato+Ametrina
		PA11	01/09/2011	T28 Glifosato+Ametrina
		PA12	01/09/2011	T42 Glifosato+Ametrina
		PA13	29/09/2011	T56 Glifosato+Ametrina
		PA14	13/10/2011	T70 Glifosato+Ametrina
		PA15	27/10/2011	T84 Glifosato+Ametrina
		PA16	02/12/2011	T120 Glifosato+Ametrina
Solução extratora Ametrina (Acetonitrila:Água 4:1)	<ul style="list-style-type: none"> • Acetonitrila HPLC (Fabricante: Tedia; Lote: 1009297R) – 0,8 L. • H_2O deionizada – 0,2 L. • Materiais: Proveta de vidro (capacidade 1L); Frasco de armazenamento 1L. 	PA01	07/03/2011	T0 Ametrina
		PA02	08/03/2011	T0 Ametrina+Glifosato
		PA03	14/03/2011	T7 Ametrina
		PA04	15/03/2011	T7 Ametrina+Glifosato
		PA05	21/03/2011	T14 Ametrina
		PA06	22/03/2011	T14 Ametrina+Glifosato
		PA07	04/04/2011	T28 Ametrina
		PA08	05/04/2011	T28 Ametrina+Glifosato
		PA09	18/04/2011	T42 Ametrina
		PA10	19/04/2011	T42 Ametrina+Glifosato
		PA11	02/05/2011	T56 Ametrina
		PA12	03/05/2011	T56 Ametrina+Glifosato
		PA13	16/05/2011	T70 Ametrina
		PA14	17/05/2011	T70 Ametrina+Glifosato
		PA15	30/05/2011	T84 Ametrina
		PA16	31/05/2011	T84 Ametrina+Glifosato
		PA17	05/07/2011	T120 Ametrina
		PA18	06/07/2011	T120 Ametrina+Glifosato

Tabela 12 – Preparo de soluções de padrões analíticos

Nome da Solução	Composição	Lotes preparados	Data do Preparo	Utilização
Solução de Padrão Analítico Glifosato ($1 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	<ul style="list-style-type: none"> • Padrão Analítico Glifosato (Cadeia de Custódia: 310 para lote PA01; e Cadeia de Custódia 565 para lote PA02) – 10,03 mg; 	PA01	13/10/2010	Biodegradação Glifosato
	<ul style="list-style-type: none"> • Água mili-q – 10 mL; • Materiais: Balança BA01; Pipeta volumétrica 1010 BPL; Frasco de Cintilação novo. 	PA02	08/03/2011	Biodegradação Ametrina+Glifosato e Glifosato+Ametrina
Solução de Padrão Analítico Glifosato ($5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	<ul style="list-style-type: none"> • Padrão Analítico Glifosato (Cadeia de Custódia 565) – 10,03 mg; • Solução Extratora Glifosato Lote PA15 – 2 mL; • Materiais: Balança BA01; Pipeta volumétrica 2 mL. 	PA01	09/11/2011	Atividade Microbiana
Solução de Padrão Analítico Glifosato ($50 \mu\text{g } \text{mL}^{-1}$)	<ul style="list-style-type: none"> • Padrão Analítico Glifosato (Cadeia de Custódia 565) – 1 mg; • Solução Extratora Glifosato Lote PA15 – 20 mL; • Materiais: Balança BA01; Pipeta volumétrica 2 mL; Frasco de Cintilação novo. 	PA01	08/11/2011	Sorção/Dessorção Glifosato, Glifosato+Ametrina e Ametrina+Glifosato
Solução de Padrão Analítico Ametrina ($10 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	<ul style="list-style-type: none"> • Padrão Analítico Ametrina (Cadeia de Custódia 459) – 10 mg; 	PA01	07/03/2011	Biodegradação Ametrina e Ametrina+Glifosato
	<ul style="list-style-type: none"> • Acetona (Fabricante: Tedia; Lote: 705343) – 1 mL; • Materiais: Balança BA01; Micropipeta MP01; Frasco de Cintilação novo. 	PA02	04/08/2011	Biodegradação Glifosato+Ametrina
Solução de Padrão Analítico Ametrina ($5 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$)	<ul style="list-style-type: none"> • Padrão Analítico Ametrina (Cadeia de Custódia 459) – 15 mg; • Acetona (Fabricante: Tedia; Lote: 705343) – 3 mL; • Materiais: Balança BA01; Micropipeta MP01; Frasco de Cintilação novo. 	PA01	09/11/2011	Atividade Microbiana
Solução de Padrão Analítico Ametrina ($50 \mu\text{g } \text{mL}^{-1}$)	<ul style="list-style-type: none"> • Padrão Analítico Ametrina (Cadeia de Custódia 459) – 1 mg; • Solução Extratora Glifosato Lote PA15 – 20 mL; • Materiais: Balança BA01; Pipeta Volumétrica 1010 BPL; Frasco de Cintilação novo. 	PA01	08/11/2011	Sorção/Dessorção Ametrina, Ametrina+Glifosato e Glifosato+Ametrina

Tabela 13 – Preparo de soluções de hidróxido de sódio 0,02 mol L⁻¹

Nome da Solução	Composição	Lotes preparados	Data do Preparo	Utilização
Solução NaOH 0,2 mol L ⁻¹ – Biodegradação	<ul style="list-style-type: none"> • Sal NaOH (Fabricante: Synth; Lote: 101625 para o lote PA01; Fabricante: Qhemis; Lote: Q0024 para os lotes PA02, PA03, PA04 e PA05) – 8 g. • H₂O deionizada: 1 L; • Materiais: Balança BA03; Balão volumétrico 78849 BPL; Frasco de armazenamento 1L. 	PA01	13/10/2010	Glifosato: T0, T7 e T14.
		PA02	03/11/2010	Glifosato: T21, T28, T35, T42, T49, T56, T63 e T70.
		PA03	07/03/2011	Ametrina e Ametrina+Glifosato: T0, T7, T14, T21, T28, T35 e T42.
		PA04	02/05/2011	Ametrina e Ametrina+Glifosato: T49, T56, T63, T70, T84, T110 e T120.
		PA05	04/08/2011	Glifosato+Ametrina: T0, T7, T14, T21, T28, T35, T42, T49, T56, T63, T70, T84 e T120.
Solução NaOH 0,2 mol L ⁻¹ – Atividade Microbiana	<ul style="list-style-type: none"> • Sal NaOH (Fabricante: Qhemis; Lote: Q0024) – 40 g. • H₂O deionizada: 5 L; • Materiais: Balança BA03; Balão volumétrico 78849 BPL; Frasco de âmbar 5 L. 	PA06	09/11/2011	T0 e T7.
		PA07	23/11/2011	T14 e T28.
		PA08	07/12/2011	T28.

A validade pré-estabelecida das soluções foi de 6 meses para soluções aquosas de NaOH 0,2 mol L⁻¹, 3 meses para soluções aquosas de CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹, 6 meses para as soluções de padrões analíticos e 6 meses para soluções extratoras à base de acetonitrila. A validade dos reagentes, solventes e sais foi observada e dada como preferencial se anterior à estimada antes do preenchimento da identificação (rotulagem).

3.6 Escopo BPL - Boas Práticas de Laboratório

Apenas os experimentos de biodegradação foram conduzidos sob o escopo BPL (INMETRO 2009; INMETRO 2011). O Laboratório de Ecotoxicologia CENA/USP possui reconhecimento BPL pelo INMETRO (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia) sob registro BPL0018. Um Plano de Estudo (PE) foi elaborado para a parte experimental, entrando na agenda mestra do laboratório de

Ecotoxicologia como estudo BPL, Diretor de Estudos (DE) Paulo Alexandre de Toledo Alves.

Durante a condução dos experimentos foram realizadas 10 auditorias/inspeções pela Garantia da Qualidade do Laboratório de Ecotoxicologia (Tabela 14). Todas as auditorias e inspeções foram revisadas pelo Prof. Dr. Valdemar Luiz Tornisielo na figura de Gerente da Instalação de Testes (GIT).

Tabela 14 – Etapas Críticas auditadas e datas de apresentações

Etapas Críticas	Data da Auditoria	Data de apresentação ao DE	Data de apresentação ao GIT	Código do relatório de auditoria
Auditoria de PE	10/09/2010	10/09/2010	10/09/2010	MV10/2010
Teste de Umidade	25/08/2010	25/08/2010	25/08/2010	MV08/2010
Teste de Umidade	27/09/2010	27/09/2010	29/09/2010	MV08/2010
Extração T14	27/10/2010	27/10/2010	27/10/2010	MV08/2010
Concentração T14	04/11/2010	04/11/2010	04/11/2010	MV08/2010
Extração T42 e Coleta de $^{14}\text{CO}_2$	24/11/2010	24/11/2010	24/11/2010	MV08/2010
Extração T42 e Coleta de $^{14}\text{CO}_2$	18/04/2011	18/04/2011	18/04/2011	MV08/2010
Correção de Umidade T56	02/05/2011	04/05/2011	04/05/2011	MV08/2010
Montagem de Experimento	04/08/2011	04/08/2011	04/08/2011	MV08/2010

Durante as atividades de inspeção foram verificados também todos os cálculos de preparo de soluções, análises de solos e aplicação de substância teste. Todas as NC (Não-Conformidades) detectadas foram sanadas dentro do prazo estabelecido pela Garantia da Qualidade, e encontram-se arquivadas no arquivo da Garantia da Qualidade do laboratório. Não houve alterações significativas ao Plano de Estudo.

Todos os procedimentos utilizados encontram-se disponíveis no Laboratório de Ecotoxicologia sob a forma de POP (Procedimentos Operacionais Padrão).

4. RESULTADOS

4.1 Biodegradação

4.1.1 Biodegradação do glifosato e glifosato+ametrina

Os experimentos de biodegradação englobam três subdivisões específicas: 1) Mineralização (conversão do produto aplicado ao solo em CO₂); 2) Resíduos não-ligados (extraíveis pelo método de extração); e 3) Resíduos Ligados (quantificados pela oxidação do solo residual da extração). Os resultados das análises com a molécula ¹⁴C-Glifosato e ¹⁴C-Glifosato+Ametrina são apresentados na Tabela 15.

Tabela 15 – Resultados dos experimentos ¹⁴C-Glifosato (G) e ¹⁴C-Glifosato+Ametrina (G+A), em porcentagem de radioatividade do total de radioatividade aplicado.

Tempo	Repetição	Resíduos Não-Ligados*		Resíduos Ligados		Mineralização (Acumulado)		Recuperação total	
		G**	G+A***	G	G+A	G	G+A	G	G+A
T0	R1	5,1%	2,4%	87,7%	90,0%	0%	0%	90%	98%
	R2	4,8%	2,4%	92,6%	105,3%				
T7	R1	4,3%	1,8%	69,1%	76,5%	20%	11%	95%	93%
	R2	4,2%	2,1%	80,9%	87,1%				
T14	R1	3,2%	1,6%	74,2%	77,5%	30%	18%	105%	92%
	R2	4,0%	1,7%	75,8%	70,3%				
T28	R1	3,6%	1,5%	61,2%	71,0%	39%	26%	104%	96%
	R2	3,4%	1,5%	67,9%	70,5%				
T42	R1	2,3%	1,5%	62,3%	55,0%	45%	34%	107%	93%
	R2	3,2%	1,5%	61,4%	63,9%				
T56	R1	2,5%	1,5%	57,5%	60,3%	50%	40%	107%	103%
	R2	1,8%	1,6%	55,9%	64,5%				
T70	R1	2,3%	1,4%	47,7%	49,4%	54%	44%	104%	98%
	R2	2,4%	1,7%	53,8%	58,9%				
T84	R1	N/A	1,5%	N/A	57,1%	N/A	47%	N/A	100%
	R2	N/A	1,4%	N/A	50,0%				
T120	R1	N/A	1,7%	N/A	40,8%	N/A	51%	N/A	95%
	R2	N/A	1,6%	N/A	48,5%				

*Os resultados das extrações de glifosato não foram considerados no cálculo da recuperação total, pois as leituras no ECL indicaram valores muito baixos. **Os resultados apresentados pelo “G” foram obtidos da leitura dos extratos concentrados e não foram utilizados no cálculo da recuperação total.***Os extratos de “G+A” foram obtidos dos extratos não concentrados e não foram utilizados nos cálculos da recuperação total.

Como observado na Tabela 15, os resíduos ligados foram altos para ambos os experimentos. As altas taxas de recuperação do glifosato no solo (resíduo ligado) indicam a sua capacidade de forte sorção, porém esta característica da molécula contrasta com a sua rápida conversão à CO_2 . Pode-se então inferir que mesmo sorvida ao solo, a molécula do glifosato ficou disponível aos microrganismos, permitindo a sua remoção e degradação. Ogram et al. (1985) indicaram em estudo com 2,4-D que as taxas de degradação podem ser influenciadas pela sorção do agrotóxico e da sua disponibilidade aos microrganismos, avaliando que o herbicida disponível em solução no solo possuía grande capacidade de ser degradado, porém o produto sorvido também. O atraso na degradação do glifosato em mistura pode ser explicado também pela fase de adaptação do solo aos herbicidas aplicados. Rueppel et al. (1977) demonstraram que a microbiota do solo tende a adaptar-se rapidamente à presença do glifosato, indicando que os microrganismos possuem a capacidade de adaptação de rotas metabólicas para a degradação do herbicida como forma de obtenção de energia.

O experimento ^{14}C -Glifosato sem mistura com ametrina apresentou uma taxa de mineralização alta, atingindo 50% do total de radioatividade aplicado aos 56 dias. Em estudos de mineralização com glifosato em diferentes solos, Alexa et al. (2009) atribuíram a fase de rápida mineralização inicial ao ataque microbiano ao glifosato em solução, e a fase posterior mais lenta ao ataque microbiano à molécula já sorvida aos colóides do solo. A mineralização da mistura do glifosato com a ametrina fez com que a taxa de 50% de $^{14}\text{CO}_2$ evoluído fosse atingida apenas aos 120 dias de incubação. Pela Figura 5 pode-se observar que a mineralização do glifosato aplicado sem ametrina ocorreu de forma rápida e em apenas uma fase, ao contrário da degradação da mistura que teve uma fase inicial rápida e um pico aos 49 dias após a aplicação. Com a ametrina no solo pode ocorrer tanto a competição por produto a ser degradado quanto a toxicidade aguda aos microrganismos, fazendo com que a fase de adaptação do solo aos herbicidas seja mais lenta.

Figura 11 – Porcentagem de $^{14}\text{CO}_2$ desprendido dos frascos de incubação por tempo de incubação para os experimentos com glifosato radiomarcado

Outro fator importante é que o experimento com apenas glifosato foi interrompido aos 70 dias de incubação, pois já havia alcançado 50% de mineralização aos 56 dias apresentando dados suficientes para a modelagem FOMC (*First Order Multi-Compartment Kinetics* – Modelo de Cinética de Primeira Ordem para Multi-Compartimentos).

O processo de extração não conseguiu remover o glifosato do solo, em virtude da molécula possuir uma grande afinidade com o solo (CHEAH et al., 1997). Pela Tabela 10 pode-se observar que os valores de radioatividade do total aplicado para os resíduos ligados ao solo foram levemente superiores no experimento G+A (glifosato em mistura com ametrina).

Os dados de mineralização foram utilizados no cálculo da meia-vida de mineralização no solo, a partir do diferencial entre o produto mineralizado e o restante no solo. Para o cálculo foram utilizados os valores de glifosato remanescente no solo nos tempos de incubação partindo-se de um total aplicado inicialmente de 100%. O gráfico do modelo de cinética FOMC aplicado é apresentado na Figura 12.

Figura 12 – Gráfico do modelo de cinética FOMC em comparação com os resultados práticos dos experimentos com glifosato radiomarcado, indicando a porcentagem remanescente de radioatividade no solo em relação à radioatividade inicialmente aplicada

Após as análises foram determinados os valores de meia-vida de mineralização para o glifosato isoladamente e para o glifosato em mistura com ametrina no solo Argissolo Vermelho – PV (Tabela 16).

Tabela 16 – Resultados dos cálculos de meia-vida de mineralização no solo e parâmetros do modelo de regressão FOMC (experimentos com glifosato radiomarcado)

Tratamento	$t_{1/2}$ Mineralização (dias)	C_0 (%)	α	β
glifosato	55	100	0,198	1,694
glifosato+ametrina	119	100	0,216	5,000

Observando-se o resultado do parâmetro β nota-se que a curva de glifosato+ametrina obteve valor mais alto, indicando que a degradação ocorreu de forma menos compartimentalizada. Enquanto que o glifosato aplicado isoladamente adequou-se melhor ao modelo FOMC. Conforme a tabela 16 pode-se observar que o modelo de cinética aplicado aos resultados foi pertinente, visto que a $t_{1/2}$ calculada pelo modelo foi bem próxima do resultado prático de obtenção de 50% de $^{14}\text{CO}_2$ (mineralização) em ambos os experimentos.

Bonfleur et al. (2011) estudaram a degradação dos herbicidas atrazina e glifosato aplicados em associação simulando mistura de tanque, relatando que a

atrazina não alterou a forma de degradação do glifosato, porém a presença do glifosato alterou significativamente a degradação da atrazina. Os resultados dos autores são similares aos os resultados dos experimentos deste estudo.

4.1.2 Biodegradação da ametrina e ametrina+glifosato

A degradação da ametrina (Tabela 17) ocorreu de forma diferente da degradação do glifosato, apresentando uma fase extraível do solo (resíduo não ligado) maior em relação ao resíduo ligado.

Tabela 17 – Resultados dos experimentos ^{14}C -Ametrina (A) e ^{14}C -Ametrina+Glifosato (A+G), em porcentagem de radioatividade do total de radioatividade aplicado

Tempo	Repetição	Resíduos Não-Ligados*		Resíduos Ligados		Mineralização (Acumulado)		Recuperação total	
		A	A+G	A	A+G	A	A+G	A	A+G
T0	R1	103,4%	100,4%	3,2%	2,6%	0%	0%	106%	103%
	R2	102,1%	100,8%	3,1%	2,9%				
T7	R1	88,1%	85,7%	17,2%	16,4%	0,3%	0,3%	105%	103%
	R2	85,4%	86,5%	19,2%	17,2%				
T14	R1	79,8%	77,8%	23,2%	21,2%	1,5%	1,2%	105%	100%
	R2	81,2%	76,3%	23,8%	22,9%				
T28	R1	73,0%	70,4%	27,1%	27,7%	5,7%	4,8%	103%	101%
	R2	68,3%	69,5%	26,6%	25,5%				
T42	R1	57,3%	54,8%	33,8%	29,6%	12,2%	11,0%	103%	96%
	R2	58,2%	57,7%	31,4%	28,2%				
T56	R1	52,2%	52,3%	31,0%	31,6%	19,6%	17,6%	106%	101%
	R2	52,6%	51,0%	36,1%	32,3%				
T70	R1	41,7%	43,2%	35,5%	33,2%	27,1%	23,2%	101%	98%
	R2	38,7%	40,3%	31,2%	32,3%				
T84	R1	38,7%	36,1%	34,4%	38,6%	32,7%	27,9%	105%	102%
	R2	38,1%	34,2%	34,1%	39,7%				
T120	R1	30,6%	25,4%	33,6%	35,0%	42,9%	37,9%	103%	100%
	R2	23,1%	26,4%	33,0%	36,9%				

A baixa quantidade de resíduos ligados nos solos nos tempos iniciais pode ser explicada pela característica de sorção da ametrina. Vivian et al. (2007) indicaram que houve correlação positiva entre a sorção da ametrina e a quantidade de matéria orgânica e argila presente no solo, apresentando a sorção da ametrina como grandeza diretamente proporcional a estes compostos no solo. Pode-se então

observar que a quantidade de resíduo ligado ao solo aumentou conforme se passaram os dias de incubação, atingindo por volta de 30% em ambos os tratamentos (ametrina e ametrina associada ao glifosato) aos 42 dias de incubação, apresentando leve aumento nos tempos posteriores. Costa et al. (1997) avaliaram a degradação da ametrina em solos esterilizados e não esterilizados, indicando que a matéria orgânica tem grande fator de impacto no processo de metabolização do herbicida.

A mineralização da ametrina e da ametrina aplicada em mistura com o glifosato não atingiu 50%, mesmo com 120 dias de incubação. O $^{14}\text{CO}_2$ desprendido atingiu um pico máximo de aproximadamente 7% no tempo de coleta T110 (Figura 13).

Figura 13 – Porcentagem de $^{14}\text{CO}_2$ desprendido dos frascos de incubação por tempo de incubação para os experimentos com ametrina radiomarcada

Em ambos os tratamentos o período de incubação de 120 dias não foi suficiente para atingir a meia vida de mineralização ($t_{1/2}$) determinada por modelagem. O modelo FOMC (Figura 14) foi aplicado aos dados de porcentagem de radioatividade remanescente no solo a partir da diferença entre o mineralizado e 100% de radioatividade aplicada inicialmente (para cada tempo de incubação).

Figura 14 – Gráfico do modelo de cinética FOMC para a mineralização em comparação com os resultados práticos dos experimentos com ametrina radiomarcada, indicando a porcentagem remanescente de radioatividade no solo em relação à radioatividade inicialmente aplicada

O modelo FOMC para a mineralização encaixou-se melhor aos dados do meio ao término do experimento (após 56 dias de incubação). A determinação dos parâmetros α e β do modelo FOMC (Tabela 13) elucidou que a degradação da ametrina ocorre de forma multi-compartimentos, levando algum tempo para que o solo responda ao produto aplicado.

A meia-vida de mineralização ($t_{1/2}$) no solo Argissolo Vermelho para os experimentos de ametrina e ametrina em mistura com glifosato foi de 180 e 243 dias respectivamente (Tabela 18).

Tabela 18 – Resultados dos cálculos de meia-vida de mineralização no solo e parâmetros do modelo de regressão FOMC (experimentos com ametrina radiomarcada)

Tratamento	$t_{1/2}$ Mineralização (dias)	C_0 (%)	α	β
ametrina	180	100	0,382	35,000
ametrina+glifosato	243	100	0,354	40,000

A análise de metabólitos nos extratos dos solos por cromatografia de camada fina pode ser observada na Tabela 19. As áreas de picos de metabólitos foram agrupadas, comparando-se os resultados com o padrão aplicado na placa.

Tabela 19 – Resultados das placas de TLC de ^{14}C -Ametrina (A) e ^{14}C -Ametrina+Glifosato (A+G), em porcentagem de área para ametrina e metabólitos e cálculo da porcentagem de resíduo não ligado

Tempo	Repetição	Leituras TLC (% área)				Resíduo não ligado (porcentagem do total aplicado)			
		Ametrina		Metabólitos		Ametrina		Metabólitos	
		A	A+G	A	A+G	A	A+G	A	A+G
T0	R1	82,6%	71,2%	17,4%	28,9%	85,41%	71,48%	17,99%	29,02%
	R2	69,6%	68,1%	30,4%	31,9%	71,06%	68,64%	31,04%	32,16%
T7	R1	78,0%	71,1%	22,0%	28,9%	68,72%	60,93%	19,38%	24,77%
	R2	75,3%	70,1%	24,7%	29,9%	64,31%	60,64%	21,09%	25,86%
T14	R1	66,2%	69,3%	33,7%	30,7%	52,83%	53,92%	26,89%	23,88%
	R2	65,1%	76,5%	34,9%	23,5%	52,86%	58,37%	28,34%	17,93%
T28	R1	64,5%	59,5%	35,6%	40,5%	47,09%	41,89%	25,99%	28,51%
	R2	63,0%	63,6%	36,9%	36,4%	43,03%	44,20%	25,20%	25,30%
T42	R1	66,2%	54,5%	33,8%	45,5%	37,93%	29,87%	19,37%	24,93%
	R2	66,0%	53,3%	34,1%	46,8%	38,41%	30,75%	19,85%	27,00%
T56	R1	62,2%	51,4%	37,8%	48,7%	32,47%	26,88%	19,73%	25,47%
	R2	54,6%	49,6%	45,4%	50,4%	28,72%	25,30%	23,88%	25,70%
T70	R1	52,9%	50,0%	47,0%	50,0%	22,06%	21,60%	19,60%	21,60%
	R2	56,6%	45,4%	43,3%	54,5%	21,90%	18,30%	16,76%	21,96%
T84	R1	53,7%	49,5%	46,2%	50,5%	20,78%	17,87%	17,88%	18,23%
	R2	46,1%	39,8%	53,9%	60,2%	17,56%	13,61%	20,54%	20,59%
T120	R1	48,0%	48,0%	52,1%	51,9%	14,69%	12,19%	15,94%	13,18%
	R2	38,3%	51,9%	61,7%	48,0%	8,85%	13,70%	14,25%	12,67%

De acordo com a Tabela 19, os experimentos A e A+G diferiram pouco em relação à formação de metabólitos no solo. Pode-se inferir que houve um gradiente decrescente de ametrina e um crescente de metabólitos no solo, complementando a etapa de mineralização. A fração de resíduo extraível de ametrina convertida a metabólitos superou 50% aos 70 dias de incubação, com aumento sensível até os 120 DAA. Somando-se a porcentagem do total de radioatividade aplicada inicialmente referente aos metabólitos e ao total mineralizado aos 120 dias, tem-se que: A) ^{14}C -Ametrina: média da radioatividade (R1 e R2) dos metabólitos 13% + mineralização acumulada de 43% = 56%; B) ^{14}C -Ametrina+Glifosato: média da radioatividade (R1 e R2) dos metabólitos 13% + mineralização acumulada de 38% = 51%; concluindo que no experimento de ametrina aplicada isoladamente aos 120 dias 56% do total de radioatividade aplicada inicialmente sob a forma de ametrina já haviam sido convertidos a $^{14}\text{CO}_2$ e/ou metabólitos no solo, sendo esta taxa de conversão de 51% no experimento de ametrina em mistura com glifosato.

A partir dos dados de análise de TLC foi possível então a determinação da meia vida (DT_{50}) da molécula ametrina no solo (Tabela 20), considerando-se apenas a fração radioativa correspondente à molécula principal. Novamente o modelo FOMC foi aplicado (figura 15).

Tabela 20 – Resultados dos cálculos de meia-vida no solo e parâmetros do modelo de regressão FOMC (experimentos com ametrina radiomarcada)

Tratamento	DT_{50} (dias)	C_0 (%)	α	β
ametrina	20	100	1	20,000
ametrina+glifosato	15	100	1	15,000

Figura 15 – Gráfico de cinética FOMC para a determinação da DT_{50} da ametrina a partir dos resíduos extraídos do solo durante o período de incubação

As informações fornecidas pela Tabela 20 podem ser confirmadas por dados divulgados na literatura atual. Andrade et al. (2010) encontraram um valor de meia-vida de 11 dias para a ametrina aplicada em um Argissolo Vermelho-Amarelo, com valor de pH de aproximadamente 5,9 e características físico-químicas semelhantes às do solo utilizado neste estudo (Argissolo Vermelho).

Embora o cálculo de meia-vida (DT_{50}) tenha acusado um valor relativamente baixo, deve-se lembrar que este é realizado com a fração extraível de ametrina do solo, desconsiderando-se o resíduo ligado. Os resíduos ligados podem ser definidos como não passíveis de extração com métodos que não alterem significativamente a sua natureza e/ou a matriz do solo (BURAUEL et al., 1998). Porém pelo fato da

possibilidade de ocorrência de remobilização de agrotóxicos ligados ao solo no campo em virtude da adição de insumos ou variações de pH (LAVORENTI et al., 1998; PEIXOTO et al., 2005), deve-se considerar também a meia-vida de mineralização da molécula, pois esta garante que pelo menos 50% do produto original já tenha sido degradada de sua forma para dióxido de carbono.

As comparações estatísticas por análise multivariada entre os tratamentos ametrina e ametrina+glifosato comprovaram a diferenciação das curvas de mineralização e de cálculo de meia-vida no solo, demonstrado que embora a diferença seja pequena esta não deve ser descartada.

Bonfleur et al. (2011) demonstraram que o glifosato presente em pequenas doses na mistura com a atrazina acelerou a degradação desta, fazendo com que as taxas de mineralização da associação fossem superiores às taxas de mineralização da molécula aplicada isoladamente.

Neste estudo trabalhou-se com a ametrina (herbicida do mesmo grupo da atrazina) em mistura com o glifosato, apontando que a presença do glifosato aumentou de forma discreta a degradação da ametrina, adiantando a meia vida de degradação no solo em 5 dias comparando-se com o experimento de ametrina aplicada sem mistura com glifosato.

4.2 Atividade Microbiana

Embora se tenha aplicado uma quantidade grande de radioatividade aos solos por meio da molécula de glicose, as recuperações por meio do $^{14}\text{CO}_2$ desprendido não ultrapassaram 6% por coleta em todos os testes. Os resultados dos tratamentos estão descritos na Tabela 21 (ametrina), Tabela 22 (glifosato), Tabela 23 (ametrina+glifosato) e Tabela 24 (controle), em porcentagem média recuperada do total de radioatividade aplicado inicialmente.

Tabela 21 – Resultados da porcentagem de radioatividade do total inicial aplicado (^{14}C -Glicose) por tempo e hora de coleta para a molécula ametrina

Tempo	Ametrina 1xDMC				Ametrina 5xDMC			
	T0	T7	T14	T28	T0	T7	T14	T28
2h	2,79%	2,92%	5,51%	4,84%	2,52%	3,77%	4,92%	5,01%
4h	3,03%	4,63%	6,34%	6,11%	2,74%	6,29%	5,68%	6,21%
6h	4,77%	2,86%	3,44%	3,89%	4,47%	4,16%	3,30%	4,01%
8h	2,50%	2,44%	2,25%	2,17%	3,29%	3,10%	2,29%	2,26%
10h	1,70%	1,58%	1,58%	1,56%	2,17%	1,70%	1,46%	1,66%
12h	1,02%	1,06%	1,38%	1,25%	1,19%	1,07%	1,29%	1,27%
Total	15,81%	15,49%	20,50%	19,82%	16,38%	20,09%	18,94%	20,42%

Tabela 22 – Resultados da porcentagem de radioatividade do total inicial aplicado (^{14}C -Glicose) por tempo e hora de coleta para a molécula glifosato

Tempo	Glifosato 1xDMC				Glifosato 5xDMC			
	T0	T7	T14	T28	T0	T7	T14	T28
2h	2,53%	4,71%	5,07%	4,23%	3,08%	3,37%	4,23%	4,89%
4h	3,02%	6,27%	5,81%	5,66%	4,07%	5,11%	5,25%	6,25%
6h	4,39%	4,33%	3,88%	4,42%	3,97%	4,03%	3,71%	4,32%
8h	3,13%	3,03%	2,44%	2,33%	2,97%	3,45%	2,35%	2,50%
10h	1,84%	1,64%	1,67%	1,84%	1,72%	1,99%	1,64%	1,83%
12h	1,11%	1,01%	1,36%	1,32%	1,13%	1,13%	0,99%	1,39%
Total	15,55%	17,15%	17,22%	15,31%	16,24%	17,34%	18,07%	20,26%

Tabela 23 – Resultados da porcentagem de radioatividade do total inicial aplicado (^{14}C -Glicose) por tempo e hora de coleta para a mistura de ametrina+glifosato

Tempo	Ametrina+Glifosato 1xDMC				Ametrina+Glifosato 5xDMC			
	T0	T7	T14	T28	T0	T7	T14	T28
2h	2,49%	3,11%	3,83%	2,38%	2,83%	3,63%	4,94%	4,79%
4h	3,23%	5,31%	5,53%	3,65%	3,20%	5,28%	5,33%	6,69%
6h	4,22%	3,50%	2,96%	3,52%	4,71%	3,45%	3,26%	3,95%
8h	3,01%	2,61%	2,00%	2,39%	2,83%	2,62%	2,01%	2,10%
10h	1,56%	1,63%	1,56%	1,84%	1,61%	1,45%	1,38%	1,51%
12h	1,04%	0,99%	1,34%	1,53%	1,06%	0,91%	1,15%	1,22%
Total	16,02%	20,99%	20,23%	19,80%	16,94%	19,08%	18,17%	21,18%

Tabela 24 – Resultados da porcentagem de radioatividade do total inicial aplicado (^{14}C -Glicose) por tempo e hora de coleta para o controle (solo sem herbicidas)

Tempo	T0	T7	T14	T28
2h	2,30%	3,43%	3,94%	4,40%
4h	2,69%	5,66%	4,83%	5,43%
6h	3,83%	3,99%	3,37%	3,94%
8h	3,31%	3,04%	2,33%	2,15%
10h	1,65%	1,71%	1,53%	1,57%
12h	1,02%	1,05%	1,31%	1,22%
Total	14,80%	18,88%	17,31%	18,71%

Conforme observado nas Tabelas 21, 22, 23 e 24, a porcentagem do total de radioatividade aplicado inicialmente ficou entre aproximadamente 15 e 20% para a ametrina 1xDMC, 16 e 20% para ametrina 5xDMC, 15 e 17% para glifosato 1xDMC, 16 e 20% para glifosato 5xDMC, 16 e 21% para ametrina+glifosato 1xDMC, 17 e 21% para ametrina+glifosato 5xDMC e entre 14 e 19% para o controle.

A evolução de $^{14}\text{CO}_2$ da glicose dos experimentos com a ametrina aplicada ao solo pode ser observada na Figura 16.

Figura 16 – Gráficos de evolução de $^{14}\text{CO}_2$ por tempo de incubação para a molécula ametrina

Os gráficos apresentados na Figura 16 proporcionam analisar a evolução de $^{14}\text{CO}_2$ nas horas de coletas e nos tempos de coletas (dias). No T0 o pico de liberação de dióxido de carbono foi tardia, tanto para o tratamento quanto para o controle, iniciando-se após 6 horas de incubação. Á partir do T7 até o término do experimento observou-se uma rápida resposta do solo à adição da glicose radiomarcada, com picos de degradação após 4 horas de incubação e um

decréscimo nas horas subsequentes. Observa-se também que a quantidade de recuperação de radioatividade foi levemente superior nos tratamentos em relação ao controle.

Com a molécula glifosato (Figura 17) ocorreu o mesmo comportamento no solo no tempo T0, porém com exceção ao tratamento com glifosato na dosagem 5xDMC que antecipou o pico de degradação para 4 horas.

Figura 17 – Gráficos de evolução de $^{14}\text{CO}_2$ por tempo de incubação para a molécula glifosato

Nos tempos seguintes a degradação da glicose nos solos tratados com glifosato tiveram os picos mais altos após 4 horas de incubação. Cabe observar que a quantidade média de recuperação da radioatividade aplicada foi um pouco superior nos tratamentos em relação ao controle.

Para as misturas (Figura 18) a degradação da glicose também seguiu um padrão de pico às 6 horas de incubação no T0 com posterior declínio, reduzindo-se o tempo do pico inicial para 4 horas nos tempos T7, T14 e T28.

Figura 18 – Gráficos de evolução de $^{14}\text{CO}_2$ por tempo de incubação para a mistura ametrina+glifosato

Analisando-se os gráficos das Figuras 16, 17 e 18 com as Tabelas 21, 22, 23 e 24 tem-se que o total degradado da glicose ao término de cada período de incubação foi sempre superior nos tratamentos, com exceção do tratamento glifosato 1xDMC que apresentou valores inferiores ao controle no T7, T14 e T28. Isto indica que a presença da ametrina, do glifosato em 5x a dose máxima de campo e da mistura de glifosato com ametrina aumenta a atividade microbiana significativamente.

Uma análise mais profunda pode ser observada nas curvas de degradação com regressão linear para cada tratamento, tempo e controle. Para o cálculo acumulado somou-se, por exemplo, ao ponto de coleta de 4 horas o valor obtido na coleta de 2 horas, no ponto de coleta de 6 horas somou-se então ao resultado os pontos de coleta de 2 e 4 horas e assim por diante, fazendo com que o resultado acumulado no tempo de coleta de 12 horas corresponde-se à soma de todos os resultados anteriores mais o resultado do ponto de coleta de 12 horas após incubação com glicose. As análises gráficas são apresentadas nas Figuras 19 (ametrina e controle), 20 (glifosato e controle) e 21 (ametrina+glifosato e controle). Os parâmetros da curva de regressão estão descritos na Tabela 25.

Figura 19 – Gráficos da evolução de $^{14}\text{CO}_2$ da glicose acumulado por tempo de incubação para a molécula ametrina e controle

Figura 20 – Gráficos da evolução de $^{14}\text{CO}_2$ da glicose acumulado por tempo de incubação para a molécula glifosato e controle

Figura 21 – Gráficos da evolução de $^{14}\text{CO}_2$ da glicose acumulado por tempo de incubação para a mistura ametrina+glifosato e controle

Tabela 25 – Parâmetros da curva de regressão ($y = ax + b$) para as médias de resultados de porcentagem de $^{14}\text{CO}_2$ evoluído acumulado nos tempos de coleta

Tratamento	Tempo	<i>a</i>	<i>b</i>	r^2
Glifosato 1xDMC	T0	1,409	0,470	0,961
	T7	1,591	3,098	0,914
	T14	1,460	4,280	0,925
	T28	1,513	3,296	0,926
Glifosato 5xDMC	T0	1,403	1,540	0,952
	T7	1,577	1,850	0,948
	T14	1,359	3,450	0,923
	T28	1,570	4,080	0,921
Ametrina 1xDMC	T0	1,350	1,030	0,947
	T7	1,594	2,922	0,919
	T14	1,414	5,067	0,910
	T28	1,427	4,345	0,908
Ametrina 5xDMC	T0	1,462	0,112	0,969
	T7	1,227	2,015	0,942
	T14	1,336	4,346	0,919
	T28	1,472	4,443	0,911
Ametrina+Glifosato 1xDMC	T0	1,352	0,725	0,953
	T7	1,371	2,278	0,927
	T14	1,264	3,304	0,922
	T28	1,459	4,542	0,893
Ametrina+Glifosato 5xDMC	T0	1,390	1,032	0,948
	T7	1,339	2,902	0,920
	T14	1,251	4,450	0,914
	T28	1,289	0,802	0,969
Controle	T0	1,316	0,252	0,963
	T7	1,521	2,420	0,928
	T14	1,298	3,018	0,938
	T28	1,381	3,685	0,920

Todos os coeficientes de correlação (r^2) ficaram acima de 0,89. As comparações dos coeficientes de correlação das curvas não apresentaram diferenças significativas pelo teste estatístico Z, indicando boa repetibilidade dos experimentos. Os testes estatísticos T para o coeficiente de inclinação foram conclusivos, mostrando que também não houve diferenças significativas entre todos os tratamentos. Os testes de ANOVA (“Analisy of Variance” – análise de variâncias) demonstraram que houve algumas variações quanto a tratamentos, doses e diferenças entre o controle (Tabelas 26 e 27).

Tabela 26 – Resultados dos testes estatísticos entre tratamentos e controle e entre dosagens de tratamentos (A1 = Ametrina 1xDMC; A5 = Ametrina 5xDMC, G1 = Glifosato 1xDMC; G5 = Glifosato 5xDMC; AG1 = Ametrina+Glifosato 1xDMC; e AG5 = Ametrina+Glifosato 5xDMC)

Análise	T0	T7	T14	T28
A1 x C	Igual	A1 Menor	Igual	Igual
G1 x C	Igual	Igual	G1 Maior	Igual
AG1 x C	Igual	Igual	Igual	AG1 Menor
A5 x C	Igual	Igual	Igual	Igual
G5 x C	G5 Maior	Igual	Igual	Igual
AG5 x C	Igual	Igual	Igual	Igual
A1 x A5	Igual	A5 Maior	A5 Maior	Igual
G1 x G5	Igual	Igual	Igual	Igual
AG1 x AG5	Igual	Igual	Igual	AG5 Maior
A1 x AG1	Igual	Igual	Igual	AG1 Menor
A5 x AG5	Igual	Igual	Igual	Igual
G1 x AG1	Igual	AG1 Menor	AG1 Menor	AG1 Menor
G5 x AG5	Igual	Igual	Igual	Igual

Tabela 27 – Resultados dos testes estatísticos internos entre os tempos dos tratamentos (A1 = Ametrina 1xDMC; A5 = Ametrina 5xDMC, G1 = Glifosato 1xDMC; G5 = Glifosato 5xDMC; AG1 = Ametrina+Glifosato 1xDMC; e AG5 = Ametrina+Glifosato 5xDMC)

Análise	A1	A5	G1	G5	AG1	AG5	C
T0 X T7	Igual	T7 Maior	T7 Maior	Igual	Igual	Igual	T7 Maior
T0 x T14	Igual	T14 Maior	T14 Maior	Igual	T14 Maior	T14 Maior	T14 Maior
T0 x T28	T28 Maior	T28 Maior	T28 Maior	T28 Maior	Igual	T28 Maior	T28 Maior
T7 x T14	Igual	Igual	Igual	Igual	Igual	Igual	Igual
T7 x T28	T28 Maior	Igual	Igual	T28 Maior	T28 Menor	T28 Maior	Igual
T14 x T28	T28 Maior	Igual	Igual	T28 Maior	T28 Menor	Igual	Igual

Conforme a Tabela 26, apenas os tratamentos Ametrina 5xDMC e Ametrina+Glifosato 5xDMC apresentaram curvas de regressão sem diferenças significativas em todos os tempos (0, 7, 14 e 28 dias de incubação) em relação ao controle. O tratamento Ametrina 1xDMC apresentou curva de regressão diferente do controle no T7, com valores de recuperações inferiores. O tratamento de Glifosato 1xDMC diferenciou-se do controle apenas no T14, onde os resultados foram superiores ao mesmo. Para o tratamento Glifosato 5xDMC os resultados foram diferentes (superiores) que os resultados do controle apenas no T0. Das misturas, a Ametrina+Glifosato 1xDMC apresentou diferença quanto ao controle no T28, com valores menores. A mistura Ametrina+Glifosato 5xDMC não apresentou comportamento diferente do controle para as curvas de regressão. Nas comparações entre as dosagens, o tratamento de Ametrina 5xDMC apresentou

valores superiores ao tratamento 1xDMC de atividade microbiana nos tempos T7 e T14. Os tratamentos Glifosato 1xDMC e 5xDMC não apresentaram diferenças significativas entre si durante o período de incubação. As misturas Ametrina+Glifosato apresentaram diferenças apenas no T28, sendo o tratamento 5xDMC superior em taxa recuperação em relação ao 1xDMC. Comparando-se os tratamentos Ametrina 1xDMC e Ametrina+Glifosato 1xDMC nos tempos de incubação observou-se que a mistura diferenciou-se apenas no T28, obtendo valores menores de recuperação de $^{14}\text{CO}_2$ à partir da glicose aplicada. Na dosagem superior (5xDMC) a Ametrina aplicada sem mistura não apresentou diferenças significativas entre a mistura Ametrina+Glifosato na mesma dose. A mistura Ametrina+Glifosato quando comparada com o glifosato não apresentou diferenças apenas na dosagem 5xDMC. Na dosagem 1xDMC a mistura Ametrina+Glifosato apresentou valores de recuperações significativamente menores que o glifosato à partir do T7.

A Tabela 27 ajuda na compreensão do comportamento da atividade microbiana durante a evolução do tempo nos experimentos. Por exemplo, o controle obteve valores superiores de degradação de glicose em relação ao T0 nos tempos T7, T14 e T28, porém quando comparados os tempos T7xT14, T7xT28 e T14xT28, não houve diferenças significativas na taxa de evolução de $^{14}\text{CO}_2$, indicando que o solo melhorou a sua resposta de atividade microbiana logo nos 7 primeiros dias de incubação, estabilizando-se a partir disto, lembrando que o solo controle não recebeu adição de herbicidas. Este mesmo comportamento pode ser observado nos tratamentos Ametrina 5xDMC e Glifosato 1xDMC. O tratamento Glifosato 5xDMC também apresentou diferenças significativas entre os tempos T0 e T28 com taxas superiores no tempo 28, porém este crescimento na taxa de mineralização da glicose ocorreu de forma lenta entre os tempos T7 e T28, pois a comparação T7xT14 não mostrou diferenças. Este mesmo comportamento do Glifosato 5xDMC nos tempos de incubação foi observado no tratamento Ametrina 1xDMC, porém cabe ressaltar que este tratamento quando comparado com o controle apresentou taxas menores de evolução na atividade microbiana no T7. As misturas apresentaram comportamento particulares, a Ametrina+Glifosato 1xDMC não apresentou diferenças significativas entre o T0 e o T7, porém entre o T0 e o T14 houve um aumento na taxa de atividade microbiana. Para os tempos seguintes, entre o T7 e T14 não houve diferenças significativas, porém entre T7xT28 e

T14xT28 ocorreram decréscimos nas taxas evolução de $^{14}\text{CO}_2$. Este decréscimo fez com que o T0 não apresentasse diferença quando comparado com o T28, indicando que a mistura comportou-se de duas formas diferentes durante os 28 dias de incubação, com um aumento discreto no início e um posterior decréscimo até o término do experimento. A mistura na dose 5xDMC apresentou um aumento significativo na taxa de mineralização da glicose no T14 e no T28 comparando-se com o T0, porém este crescimento foi lento entre os tempos T0xT14 e T7xT28, pois os testes estatísticos com T7xT14 e T14xT28 não apresentaram diferenças significativas.

Haney et al. (2000) checaram os efeitos do glifosato sobre a atividade microbiana e biomassa microbiana por meio da mineralização de carbono e nitrogênio, concluindo que o herbicida estimulou a atividade microbiana sem afetar a biomassa. Prata et al. (2001) avaliaram a mineralização e atividade microbiana em solos com ametrina e adição de vinhaça, concluindo que a vinhaça ajudou no processo de degradação da ametrina aumentando também a atividade microbiana dos solos. Os autores concluíram ainda que o efeito do aumento da atividade microbiana ocorreu pela adição da vinhaça, pois o tratamento com ametrina e sem vinhaça apresentou também taxas de recuperações próximas às do controle.

Com os resultados obtidos, pode-se inferir que a ametrina teve influência sobre a taxa de atividade microbiana do solo apenas na dose 1xDMC, afetando também o comportamento da mistura com glifosato na mesma dose em relação ao controle. Já a presença do glifosato no solo estimulou o desenvolvimento de $^{14}\text{CO}_2$ da glicose durante a incubação, sendo este estímulo adiantado na maior dose (5xDMC). A presença do glifosato na dose 5xDMC na mistura com ametrina na mesma dose pode ter equalizado o efeito negativo desta na atividade microbiana, pois na dose 1xDMC as taxas da mistura foram menores que o glifosato 1xDMC isolado, tendo a mistura apresentado taxas menores que o controle no T28 nesta dose.

4.3 Sorção e Dessorção

4.3.1 Sorção e dessorção do glifosato e glifosato+ametrina

O glifosato apresentou uma alta sorção ao Argissolo Vermelho, tanto para o experimento isolado quanto para o experimento com glifosato em mistura com ametrina (Tabela 28).

Tabela 28 – Resultados dos coeficientes de sorção para o glifosato e glifosato+radiomarcado

Tratamento		C_s ($\mu\text{g g}^{-1}$)	C_{aq} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	K_d (mL g^{-1})	K_{oc} (mL g^{-1})	K_d (Médio)	K_{oc} (Médio)
glifosato	1/2 x DMC	R1	0,885	0,015	59,116	55,723	523,997
		R2	0,884	0,016	56,627		
		R3	0,883	0,017	51,426		
	1 x DMC	R1	1,767	0,033	53,882	54,081	508,557
		R2	1,768	0,032	54,493		
		R3	1,767	0,033	53,867		
	2 x DMC	R1	3,534	0,066	53,246	51,509	484,368
		R2	3,530	0,070	50,540		
		R3	3,530	0,070	50,740		
	4 x DMC	R1	7,053	0,147	47,901	48,017	451,536
		R2	7,052	0,148	47,596		
		R3	7,055	0,145	48,554		
	8 x DMC	R1	14,049	0,351	39,995	42,333	398,082
		R2	14,076	0,324	43,479		
		R3	14,077	0,323	43,524		
glifosato+ametrina	1/2 x DMC	R1	0,892	0,008	106,065	97,987	921,433
		R2	0,891	0,009	98,354		
		R3	0,890	0,010	89,542		
	1 x DMC	R1	1,781	0,019	96,072	97,834	919,991
		R2	1,782	0,018	101,253		
		R3	1,781	0,019	96,175		
	2 x DMC	R1	3,562	0,038	93,416	91,032	856,030
		R2	3,557	0,043	83,444		
		R3	3,563	0,037	96,236		
	4 x DMC	R1	7,104	0,096	73,892	78,400	737,245
		R2	7,099	0,101	70,454		
		R3	7,122	0,078	90,854		
	8 x DMC	R1	14,209	0,191	74,378	74,106	696,863
		R2	14,197	0,203	70,058		
		R3	14,217	0,183	77,880		

As quantidades de glifosato adsorvidas ao solo (C_s em μg de produto por g de solo) variaram entre 0,88 e 4,07 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o tratamento glifosato, entre a menor e maior dose respectivamente, e 0,89 e 14,21 $\mu\text{g g}^{-1}$ para o tratamento glifosato+ametrina. A quantidade de produto em solução (C_{aq} em μg de produto por mL de solução) foram baixas em ambos os experimentos, com valores entre 0,015 e 0,35 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o tratamento glifosato (menor e maior dose respectivamente) e 0,010 e 0,20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o glifosato+ametrina. Os valores de coeficiente de distribuição (K_D) e coeficiente de adsorção (K_{oc}) apresentaram valores altos, porém maiores nas menores doses do produto.

Os dados da sorção foram ajustados para as isotermas de Freundlich, aplicando-se a função logaritmo aos dados de C_s e C_{aq} , foram também elaboradas curvas de regressão linear para os dados sem a função logaritmo, sendo os resultados apresentados na Figura 22.

Figura 22 – Gráficos de Sorção (glifosato adiomarcado) (A) dados ajustados a Freundlich e (B) dados Regressão linear

Pela Figura 22 pode-se observar que, tanto para os dados não tratados quanto para os dados ajustados Freundlich, o modelo de regressão linear adequou-se bem (coeficientes de correlação superiores a 0,99).

Os valores de K_{oc} dos tratamentos glifosato e glifosato+ametrina foram testados estatisticamente pelo teste T pareado, sendo a hipótese H_0 de igualdade de médias. Os resultados são apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 – Resultados do teste estatístico T Pareado para a Sorção, 2 graus de liberdade e Valor T padrão de 4,303 para $\alpha = 0,05$ e $p = 95\%$

Teste Estatístico T Pareado					
Conc.	glifosato K_{oc}	glifosato+ ametrina K_{oc}	Diferença	Teste T	Análise
1/2 x DMC	555,90	997,40	441,50	5,494	Rejeita-se H_0
	532,50	924,88	392,38		
	483,59	842,02	358,43		
Média	524,00	921,43	397,44		
Desv. Pad.	36,90	77,75	41,76		
1 x DMC	506,69	903,43	396,74	9,696	Rejeita-se H_0
	512,43	952,15	439,72		
	506,55	904,40	397,85		
Média	508,56	919,99	411,43		
Desv. Pad.	3,36	27,85	24,50		
2 x DMC	500,71	878,45	377,74	3,610	Aceita-se H_0
	475,26	784,68	309,42		
	477,14	904,96	427,83		
Média	484,37	856,03	371,66		
Desv. Pad.	14,18	63,20	59,44		
4 x DMC	450,44	694,85	244,41	1,681	Aceita-se H_0
	447,57	662,53	214,95		
	456,59	854,36	397,77		
Média	451,54	737,24	285,71		
Desv. Pad.	4,60	102,70	98,16		
8 x DMC	376,10	699,43	323,33	4,078	Aceita-se H_0
	408,86	658,80	249,94		
	409,28	732,36	323,08		
Média	398,08	696,86	298,78		
Desv. Pad.	19,04	36,85	42,30		

Conforme a Tabela 29, houve diferença significativa para o K_{oc} entre o tratamento glifosato e glifosato+ametrina nas doses 1/2xDMC e 1xDMC, sendo a sorção do glifosato maior quando presente em mistura com a ametrina. Cabe lembrar que a concentração citada na tabela é referente apenas à molécula

radiomarcada, glifosato neste caso, sendo a concentração da ametrina 1xDMC para todas as doses de glifosato no tratamento glifosato+ametrina.

Os resultados do coeficiente de sorção de Freundlich (K_f^{ads}) foram 55,72, 54,08, 51,50, 48,01 e 42,33 para as doses com glifosato 1/2xDMC, 1xDMC, 2xDMC, 4xDMC e 8xDMC respectivamente, e 97,98, 97,83, 91,03, 70,40 e 74,10 para as doses de glifosato+ametrina (em mistura com ametrina) 1/2xDMC, 1xDMC, 2xDMC, 4xDMC e 8xDMC respectivamente. Cheah et al. (1997) obtiveram valores de K_f^{ads} para o glifosato próximos de 417 em solo com alto teor de matéria orgânica e argila, porém o autor não deixa claro se este resultado foi ajustado pela porcentagem de matéria orgânica no solo, conforme equação 10 deste trabalho e recomendação da norma OECD 106 (OECD, 200). Comparando-se com outros dados da literatura, Prata et al. (2000) e Prata et al. (2003) obtiveram valores de K_f^{ads} para o glifosato em solos semelhantes ao Argissolo Vermelho por volta de 50, corroborando com os resultados deste trabalho.

A etapa de dessorção comprovou que o glifosato, ao entrar em contato com o solo, permanece fortemente ligado a este. Os resultados dos coeficientes de dessorção estão apresentados na Tabela 30.

Tabela 30 – Resultados dos coeficientes de dessorção para o glifosato e glifosato+ametrina

Tratamento		m_s^{ads} (μg)	m_{aq}^{des} (μg)	K_{des}	K_{des} (Médio)
glifosato	1/2 x DMC	R1	1,770	0,034	256,156
		R2	1,769	0,035	244,331
		R3	1,766	0,038	225,488
	1 x DMC	R1	3,534	0,055	317,433
		R2	3,535	0,066	261,015
		R3	3,534	0,074	234,288
	2 x DMC	R1	7,067	0,160	215,751
		R2	7,060	0,168	205,285
		R3	7,061	0,164	209,746
	4 x DMC	R1	14,106	0,320	215,639
		R2	14,104	0,357	192,563
		R3	14,109	0,409	167,366
	8 x DMC	R1	28,097	0,704	194,530
		R2	28,153	0,632	217,718
		R3	28,153	0,768	178,244
glifosato+ametrina	1/2 x DMC	R1	1,783	0,021	414,354
		R2	1,782	0,022	398,537
		R3	1,780	0,019	475,389
	1 x DMC	R1	3,563	0,043	411,519
		R2	3,565	0,042	417,902
		R3	3,563	0,045	390,680
	2 x DMC	R1	7,124	0,091	386,520
		R2	7,115	0,090	388,487
		R3	7,126	0,102	344,837
	4 x DMC	R1	14,208	0,207	337,379
		R2	14,198	0,208	335,597
		R3	14,243	0,213	329,920
	8 x DMC	R1	28,418	0,444	315,293
		R2	28,395	0,453	308,365
		R3	28,435	0,458	305,716

Como pode ser observado na coluna “ m_{aq}^{des} (μg)” da Tabela 30, o glifosato apresentou uma baixa dessorção em relação ao produto aplicado, comportamento observado em todas as dosagens.

As isotermas de Freundlich (Figura 23) também se adequaram bem ao modelo de regressão linear, e os testes estatísticos T pareado entre os tratamentos glifosato e glifosato+ametrina (H_0 = médias iguais) não mostraram diferenças significativas para todas as doses (Tabela 31).

Figura 23 – Gráfico de dessorção (glifosato radiomarcado) com dados ajustados a Freundlich com regressão linear

Tabela 31 – Resultados do teste estatístico T Pareado para a dessorção, 2 graus de liberdade e Valor T padrão de 4,303 para $\alpha = 0,05$ e $p = 95\%$

Teste Estatístico T Pareado					
Conc.	glifosato K_{des}	glifosato+ ametrina K_{des}	Diferença	Teste T	Análise
1/2 x DMC	256,16	414,35	158,20	1,999	Aceita-se H0
	244,33	398,54	154,21		
	225,49	475,39	249,90		
	Média 241,99	429,43	187,43		
Desv. Pad.	15,47	40,58	54,13		
1 x DMC	317,43	411,52	94,09	2,171	Aceita-se H0
	261,02	417,90	156,89		
	234,29	390,68	156,39		
	Média 270,91	406,70	135,79		
Desv. Pad.	42,45	14,24	36,12		
2 x DMC	215,75	386,52	170,77	3,769	Aceita-se H0
	205,28	388,49	183,20		
	209,75	344,84	135,09		
	Média 210,26	373,28	163,02		
Desv. Pad.	5,25	24,65	24,97		
4 x DMC	215,64	337,38	121,74	4,029	Aceita-se H0
	192,56	335,60	143,03		
	167,37	329,92	162,55		
	Média 191,86	334,30	142,44		
Desv. Pad.	24,14	3,90	20,41		
8 x DMC	194,53	315,29	120,76	3,325	Aceita-se H0
	217,72	308,36	90,65		
	178,24	305,72	127,47		
	Média 196,83	309,79	112,96		
Desv. Pad.	19,84	4,95	19,61		

Os resultados apontaram para uma rápida e forte sorção e fraca dessorção do glifosato no solo Argissolo Vermelho de cultivo de cana-de-açúcar. A mistura do glifosato com a ametrina aumentou a sorção do glifosato apenas nas doses mais baixas, porém são estas doses que representam a maior possibilidade de comparação com os efeitos da molécula em condições de campo. Do ponto de vista agrônomo, a forte sorção de um produto pode imobilizá-lo, impedindo que este atinja, de imediato, corpos d'água e águas sub-superficiais por processos de escoamento superficial, lixiviação e percolação no solo.

4.3.2 Sorção e dessorção da ametrina e ametrina+glifosato

A ametrina apresentou baixa sorção ao solo Argissolo Vermelho (Tabela 32).

Tabela 32 – Resultados dos coeficientes de sorção para a ametrina e ametrina+glifosato

Tratamento		C_s ($\mu\text{g g}^{-1}$)	C_{aq} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	K_d (mL g^{-1})	K_{oc} (mL g^{-1})	K_d (Médio)	K_{oc} (Médio)
ametrina	1/2 x DMC	R1	0,620	0,655	0,948	0,949	8,926
		R2	0,626	0,649	0,965		
		R3	0,616	0,659	0,935		
	1 x DMC	R1	1,162	1,388	0,838	0,844	7,940
		R2	1,179	1,371	0,860		
		R3	1,160	1,390	0,835		
	2 x DMC	R1	2,466	2,634	0,936	0,917	8,621
		R2	2,311	2,789	0,829		
		R3	2,531	2,569	0,985		
	4 x DMC	R1	4,127	6,073	0,680	0,661	6,217
		R2	4,049	6,151	0,658		
		R3	4,003	6,197	0,646		
	8 x DMC	R1	7,635	12,765	0,598	0,567	5,336
		R2	7,382	13,018	0,567		
		R3	7,127	13,273	0,537		
ametrina + glifosato	1/2 x DMC	R1	0,923	0,352	2,626	2,646	24,880
		R2	0,926	0,349	2,648		
		R3	0,927	0,348	2,663		
	1 x DMC	R1	1,830	0,720	2,542	2,485	23,369
		R2	1,807	0,743	2,431		
		R3	1,818	0,732	2,482		
	2 x DMC	R1	3,552	1,548	2,294	2,381	22,386
		R2	3,633	1,467	2,476		
		R3	3,587	1,513	2,372		
	4 x DMC	R1	7,063	3,137	2,251	2,226	20,928
		R2	7,032	3,168	2,220		
		R3	7,018	3,182	2,206		
	8 x DMC	R1	13,601	6,799	2,000	2,045	19,229
		R2	13,811	6,589	2,096		
		R3	13,685	6,715	2,038		

Ao contrário do glifosato, a ametrina apresentou coeficientes de sorção crescentes conforme aumento de dose no solo. Andrade et al. (2010) estudaram a sorção da ametrina em solos com diferentes pH e quantidades de matéria orgânica, concluindo que quanto maior o pH do solo, maior o índice de sorção (K_D e/ou K_f). Os autores concluíram ainda que o solo PVA (Argissolo Vermelho-Amarelo) apresentou resultados baixos de sorção, indicando risco de contaminação de lençóis freáticos e águas sub-superficiais. O solo utilizado pelos autores apresenta características muito similares ao solo utilizados neste experimento, que obteve valores de K_D semelhantes aos citados na literatura.

Os resultados da sorção foram ajustados para as isothermas de Freundlich, aplicando-se a função logaritmo aos dados de C_s e C_{aq} . Assim como feito no experimento com glifosato radiomarcado, foram também elaboradas curvas de regressão linear para os dados da ametrina sem a função logaritmo, sendo os resultados apresentados na Figura 24.

Figura 24 – Gráficos de Sorção (ametrina radiomarcada) (A) dados ajustados a Freundlich e (B) dados Regressão linear

Pela Figura 24 conclui-se que a função logaritmo aplicada aos dados ajustou-se melhor ao modelo de regressão linear, porém o gráfico com os dados não tratados com logaritmo também apresentaram coeficientes de correlação superiores a 0,9, indicando que o processo de sorção da ametrina ocorre de forma linear conforme aumento de dose.

Os resultados de K_{oc} dos tratamentos ametrina e ametrina+glifosato foram testados estatisticamente pelo teste T pareado, sendo a hipótese H_0 de igualdade de médias. Os resultados são apresentados na Tabela 33.

Tabela 33 – Resultados do teste estatístico T Pareado para a Sorção, 2 graus de liberdade e Valor T padrão de 4,303 para $\alpha = 0,05$ e $p = 95\%$

Teste Estatístico T Pareado					
Conc.	ametrina K_{oc}	ametrina+ glifosato K_{oc}	Diferença	Teste T	Análise
1/2 x DMC	8,91	24,69	15,78	35,512	Rejeita-se H_0
	9,07	24,90	15,83		
	8,79	25,05	16,25		
Média	8,93	24,88	15,95		
Desv. Pad.	0,14	0,18	0,26		
1 x DMC	7,88	23,91	16,03	14,147	Rejeita-se H_0
	8,09	22,86	14,77		
	7,85	23,34	15,49		
Média	7,94	23,37	15,43		
Desv. Pad.	0,13	0,52	0,63		
2 x DMC	8,80	21,57	12,77	5,302	Rejeita-se H_0
	7,79	23,28	15,49		
	9,27	22,30	13,03		
Média	8,62	22,39	13,76		
Desv. Pad.	0,75	0,86	1,50		
4 x DMC	6,39	21,17	14,78	144,764	Rejeita-se H_0
	6,19	20,87	14,68		
	6,07	20,74	14,67		
Média	6,22	20,93	14,71		
Desv. Pad.	0,16	0,22	0,06		
8 x DMC	5,62	18,81	13,19	12,794	Rejeita-se H_0
	5,33	19,71	14,38		
	5,05	19,16	14,12		
Média	5,34	19,23	13,89		
Desv. Pad.	0,29	0,45	0,63		

O teste estatístico T Pareado (Tabela 33) indicou que a mistura de ametrina+glifosato é significativamente diferente do tratamento com ametrina isolada em todas as dosagens. Desta forma, pode-se dizer que a presença do glifosato na 1xDMC com ametrina em qualquer dosagem das testadas aumentou em média aproximadamente 3x a capacidade de sorção da ametrina.

O ensaio de dessorção apresentou taxas baixas para a ametrina (Tabela 34).

Tabela 34 – Resultados dos coeficientes de dessorção para a ametrina e ametrina+glifosato

Tratamento		m_s^{ads} (μg)	m_{aq}^{des} (μg)	K_{des}	K_{des} (Médio)
ametrina	1/2 x DMC	R1	1,241	0,518	6,976
		R2	1,252	0,516	7,132
		R3	1,232	0,504	7,237
	1 x DMC	R1	2,325	1,041	6,163
		R2	2,358	1,021	6,553
		R3	2,321	1,048	6,074
	2 x DMC	R1	4,932	1,989	7,399
		R2	4,622	1,952	6,842
		R3	5,062	1,899	8,330
	4 x DMC	R1	8,254	3,998	5,324
		R2	8,097	4,078	4,927
		R3	8,005	4,124	4,705
	8 x DMC	R1	15,270	7,694	4,923
		R2	14,765	7,790	4,477
		R3	14,254	7,768	4,175
ametrina+glifosato	1/2 x DMC	R1	1,847	0,252	31,617
		R2	1,851	0,257	30,957
		R3	1,854	0,257	31,015
	1 x DMC	R1	3,660	0,514	30,625
		R2	3,614	0,506	30,702
		R3	3,635	0,536	28,893
	2 x DMC	R1	7,104	0,984	31,090
		R2	7,265	0,996	31,468
		R3	7,175	1,030	29,813
	4 x DMC	R1	14,125	2,095	28,717
		R2	14,064	2,084	28,743
		R3	14,037	2,049	29,257
	8 x DMC	R1	27,202	4,000	29,001
		R2	27,623	4,064	28,985
		R3	27,370	4,426	25,923

Os resultados de K_{des} tanto para os tratamentos ametrina quanto para ametrina+glifosato demonstram-se decrescentes conforme aumento de dose aplicada no solo. Isto indica que quanto mais produto aplicado, maior a dessorção deste, indicando um possível efeito de saturação nos sítios de ligação da molécula com o solo.

Os dados de dessorção também foram ajustados às isotermas de Freundlich (Figura 25), apresentando resultados satisfatórios para o modelo de regressão linear.

Figura 25 – Gráfico de dessorção (ametrina radiomarcada) com dados ajustados a Freundlich com regressão linear

As comparações estatísticas da dessorção da ametrina por teste T (Tabela 35) mostraram diferenças significativas na taxa de dessorção, sendo esta cerca de 4x menor no tratamento de mistura da ametrina com o glifosato em relação à ametrina aplicada sem glifosato.

Tabela 35 – Resultados do teste estatístico T Pareado para a dessorção, 2 graus de liberdade e Valor T padrão de 4,303 para $\alpha = 0,05$ e $p = 95 \%$

Teste Estatístico T Pareado					
Conc.	ametrina K_{des}	ametrina+ glifosato K_{des}	Diferença	Teste T	Análise
1/2 x DMC	6,98	31,62	24,64	28,662	Rejeita-se H_0
	7,13	30,96	23,83		
	7,24	31,01	23,78		
	Média	7,11	31,20		
Desv. Pad.	0,13	0,37	0,49		
1 x DMC	6,16	30,62	24,46	15,758	Rejeita-se H_0
	6,55	30,70	24,15		
	6,07	28,89	22,82		
	Média	6,26	30,07		
Desv. Pad.	0,25	1,02	0,87		
2 x DMC	7,40	31,09	23,69	8,324	Rejeita-se H_0
	6,84	31,47	24,63		
	8,33	29,81	21,48		
	Média	7,52	30,79		
Desv. Pad.	0,75	0,87	1,61		
4 x DMC	5,32	28,72	23,39	23,551	Rejeita-se H_0
	4,93	28,74	23,82		
	4,71	29,26	24,55		
	Média	4,99	28,91		
Desv. Pad.	0,31	0,30	0,59		
8 x DMC	4,92	29,00	24,08	9,116	Rejeita-se H_0
	4,48	28,99	24,51		
	4,17	25,92	21,75		
	Média	4,52	27,97		
Desv. Pad.	0,38	1,77	1,48		

De forma geral, o glifosato fortaleceu a sorção da ametrina, ajudando também a manter a molécula adsorvida durante o experimento de dessorção. A dosagem de ametrina não influenciou este decréscimo, apresentando valores diferenciais parecidos em todas as doses.

5. CONCLUSÕES

Dos experimentos realizados conclui-se que:

- 1) Biodegradação: a meia-vida de mineralização da ametrina em mistura com o glifosato apresentou valor superior quando comparado com a molécula aplicada isoladamente, porém o efeito foi sinérgico para a meia-vida no solo (15 dias para a mistura ametrina+glifosato e 20 dias para apenas ametrina); o glifosato teve a sua meia-vida de mineralização aumentada de 55 dias para 119 dias comparando-se os tratamentos glifosato e glifosato+ametrina respectivamente, porém não foi possível estudar a meia-vida no solo uma vez que o produto permaneceu fortemente sorvido durante as extrações.
- 2) Atividade microbiana: O glifosato estimulou a atividade microbiana, principalmente na maior dose, enquanto que a ametrina isolada apresentou efeitos adversos na dose inferior. A mistura de ametrina+glifosato na dose inferior apresentou efeito negativo na atividade microbiana, porém se comparado com tratamento de ametrina isolada na mesma dose este efeito foi menor. A mistura ametrina+glifosato na dose superior elevou a atividade microbiana, fortalecendo o sinergismo do comportamento da mistura.
- 3) Sorção/Dessorção: a sorção do glifosato ao solo Argissolo Vermelho foi alta e da ametrina baixa. Para as misturas a sorção foi mais alta em ambos os tratamentos, em comparação com a sorção das moléculas isoladas. A dessorção do glifosato foi baixa, e não houve diferenciação quanto ao tratamento glifosato+ametrina em todas as doses, porém a dessorção da ametrina reduziu quando esta foi aplicada em mistura com glifosato.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Embora estes resultados indiquem um ponto positivo para a mistura de ametrina+glifosato, faltam ainda estudos quanto à toxicidade, eficiência agronômica, resíduos em alimentos e outros, que indiquem a viabilidade da prática, não só para os herbicidas estudados como para todos os tipos de misturas praticadas. Existem poucos estudos ambientais com misturas de agrotóxicos. Embora a prática de mistura de tanque não seja prevista na legislação brasileira, é amplamente utilizada pelos agricultores, fortalecendo a necessidade de estudos nesta área. Ressaltando que esta técnica de aplicação possui recomendações quanto à forma de manejo e execução em encartes oficiais de países como Reino Unido, Estados Unidos e Austrália.

REFERÊNCIAS

- ALEXA, E.; BRAGEA, M.; SUMALAN, R.; LAZUREANU, A.; NEGREA M.; IANCU, S. Dynamic of glyphosate mineralization in different soil types. **Romanian Agricultural Research**, Fundulea, v. 26, p. 57-60, 2009.
- AMARANTE JUNIOR, O. P.; SANTOS, T. C. R.; BRITO, N. M.; RIBEIRO, M. L. Glifosato: propriedades, toxicidade, usos e legislação. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 589-593, 2002.
- ANDRADE, S. R. B.; SILVA, A. A.; LIMA, C. F.; QUEIROZ, M. E. L. R.; FRANÇA, A. C.; D'ANTONINO, L. Meia-vida do ametryn em argissolo vermelho-amarelo e latossolo vermelho-amarelo, com diferentes valores de pH. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 28, n. 2, p. 375-383, 2010.
- BONFLEUR, E. J.; LAVORENTI A.; TORNISIELO, V. L. Mineralization and degradation of glyphosate and atrazine applied in combination in a Brazilian Oxisol. **Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**. London, UK, 2010. p. 69-75.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Decreto n. 4.074, de 04 de janeiro de 2002. Regulamenta a Lei N° 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 05 de jan. de 2002. Disponível em <<http://www.planalto.gov.br/ccivil/leis/>>. Acesso em: 04 fev. 2012.

BURAUER, P.; WAIS, A.; FÜHR, F. The lysimeter concept. In: FÜHR, J. R.; PRIMMER, J. O. (Ed.). **Soil bound residues**. Washington, DC: ACS, 1998. p. 177-188.

BOLAG, W. B.; BOLAG, J. Biodegradation. In: LEDERBERG, J. (Ed.). **Encyclopedia of microbiology**. San Diego: Academic Press, 1992. p. 461-471.

CANADÁ. Ministry of Agriculture. **Safety precautions** – mixing and loading pesticides. Vancouver, 2011. Disponível em: <http://www.al.gov.bc.ca/pesticides/d_5.htm> Acesso em: 15 fev. 2012.

CARSON, R. **Silent spring**. New York: Houghton Mifflin Company, 1962.

CARVALHO, S. J. P.; DIAS, A. C. R.; DAMIN, V.; NICOLAI, M.; CHRISTOFFOLETI, P. J. Glifosato aplicado com diferentes concentrações de uréia ou sulfato de amônio para dessecação de plantas daninhas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 43, n. 11, p. 1501-1508, 2008.

CHEAH, U. B.; KIRKWOOD, R. C.; LUM, K. Y. Adsorption, desorption and mobility of four commonly used pesticides in Malaysian agricultural soils. **Pesticide Science**, London, v. 50, p. 53-63, 1997.

COLBY, S. R. Calculating synergistic and antagonistic responses of herbicide combinations. **Weeds**, Urbana, v. 15, n. 1, p. 20-22, 1967.

COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO – CONAB. **Relatório CONAB de 1976 a 2012**. Brasília, DF, 2012. Disponível em: <http://www.conab.gov.br/OlalaCMS/uploads/arquivos/12_01_12_16_11_21_brasilprodutoseriehist.xls>. Acesso em: 25 jan. 2012.

COSTA, M. A.; MONTEIRO, R. T. R.; TORNISIELO, V. L. Influência da adição da palha de cana-de-açúcar na degradação de ¹⁴C-ametrina em solo areia quartzosa. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 54, p. 117-122, 1997.

D'AMATO, C.; TORRES, J. P. M.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental - uma revisão. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6a, p. 995-1002, 2002.

DAMIN, V. **Biodegradação, sorção e dessorção do herbicida ^{14}C -Diuron em dois Latossolos tratados com lodo de esgoto**. 2005. 70 p. Dissertação (Mestrado em Solos e Nutrição de Plantas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005.

ES. H. M. van. **Pesticide management for water quality** - principles and practices. Ithaca, NY, 1990. Disponível em: <<http://psep.cce.cornell.edu/facts-slides-self/Factsheets.aspx>>. Acesso em: 7 out. 2011.

EXTOXNET. **Pesticide Information Profiles**: Ametryn. 1995. Disponível em: <<http://extoxnet.orst.edu/pips/ametryn.htm>>. Acesso em: 10 fev. 2012.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION – FAO. **Statistic report**. Rome, 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/ess-yearbook2010/yearbook2010-production/en/>> Acesso em: 25 jan. 2012.

FISHEL, F. M. **Pesticide interactions**. Gainesville, FL: University of Florida, 2010. Disponível em: <<http://edis.ifas.ufl.edu/pi182>> Acesso em: 15 fev. 2012.

FRANZ, J. E. Discovery, development and chemistry of glyphosate. In: GROSSBARD, E.; ATKINSON, D. (Ed.). **The herbicide glyphosate**. London: Butterworths, 1985. p. 3-17.

GRESSEL, J. Herbicide tolerance and resistance alteration of site of activity. In: DUKE, S. O. **Weed physiology**. Boca Raton: CRC Press, 1985. v. 1, p. 160-190.

GRUYS, K. J.; SIKORSKI, J. A. Inhibitors of tryptophan, phenylalanine and tyrosine biosynthesis as herbicides. In: SINGH, B. K. (Ed.). **Plant amino acids: biochemistry and biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1999. p. 357-384.

GUSTAFSON, D. I.; HOLDEN, L. R. Nonlinear pesticide dissipation in soil: a new model on spatial variability. **Environmental Science and Technology**, Easton, v. 24, n. 7, p. 1032-1038, 1990.

HOLMES, J.; MICIC, S.; MOORE, J. **FarmNote** - Guidelines for tank-mixing. Baron-Hay Court South Perth, WA: Department of Agriculture and Food, 2009.

HORNSBY, A. G.; WANCHOPPE, R. D.; HERNER, A. E. **Pesticide properties in the environment**. New York: Springer-Verlag, 1995. 227 p.

HOWARD, P. H. **Handbook of environmental fate and exposure data for organic chemicals: pesticides**. Chelsea: Lewis Publisher, 1991.

INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL – INMETRO. **Princípios de Boas Práticas de Laboratório – BPL**. Rio de Janeiro, 2009. 19 p. (NIT-DICLA-035 rev01).

_____. **Princípios de Boas Práticas de Laboratório – BPL**. Rio de Janeiro, 2011. 19 p. (NIT-DICLA-035 rev02).

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Indicadores de desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro, 2002. 197 p.

_____. **Indicadores de desenvolvimento sustentável**. Rio de Janeiro, 2010. 443 p.

KOTAKA, E. T.; ZAMBRONE, F. A. D. **Contribuições para a construção de diretrizes de avaliação do risco toxicológico de agrotóxicos**. Campinas: International Life Sciences Institute do Brasil, 2001. 160 p.

LAVORENTI, A.; BURAUDEL, P.; WAIS, A.; FÜHR, F. Remobilization of bound anilazine residues in fulvic acids. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 8, p. 33-44, 1998.

LAVORENTI, A.; PRATA, F.; REGITANO, J. B. Comportamento de pesticidas em solos: fundamentos. In: CURI, N.; MARQUES, J. J.; GUILHERME, L. R. G.; LIMA, J. M.; LOPES, A. S.; ALVAREZ V, V. H. (Org.). **Tópicos especiais em ciência do solo**. Viçosa: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2003. v. 3, p. 335-400.

LINDE, C.D. **Physico-chemical properties and environmental fate of pesticides**. Sacramento, CA: Environmental Hazards Assessment Program. Department of Pesticide Regulation, 1994. 53 p.

LIU, C.-M.; McLEAN, P.A.; SOOKDEO, C.C.; CANNON, F.C. Degradation of the herbicide glyphosate by members of the family *Rhizobiaceae*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, DC, v. 57, p. 1799-1804, 1991.

LUCCHESI, G. **Agrotóxicos** – construção da legislação. Brasília, DF: Câmara dos Deputados, Consultoria Legislativa, 2005. Disponível em: <http://bd.camara.gov.br/bd/bitstream/handle/bdcamara/2227/agrotoxicos_construcao_lucchese.pdf?sequence=1> Acesso em: 10 fev. 2012.

MALTHUS, T. R. Ensaio sobre população (1798). In: GALVÊAS, E. (Comp.). **Os economistas**. São Paulo: Abril Cultural, 1983. p. 233-378.

MATTHIESSEN, P.; WHALE, G. F.; RYCROFT, R. J.; SHEAHAN, D. A. The joint toxicity of pesticide tank-mixes to rainbow trout. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v.13, p. 61-76, 1988.

McBRIDE, D.K. **Managing pesticides to prevent groundwater contamination**. Fargo, ND: North Dakota State University Extension Service, 1989. 12 p. (Publication E-979).

McBRIDE, M. B. **Environmental chemistry of soils**. New York: Oxford University Press, 1994. 406 p.

MENTEN, J.O.M.; SAMPAIO, I.A.; MOREIRA, H.; FLÔRES, D.; MENTEN, M. O setor de defensivos agrícolas no Brasil. **Informativo SINDAG**, São Paulo, Brasil, 2009. 4 p. Disponível em: <www.sindag.com.br/upload/OSetordeDefensivosagricolasnoBrasil.doc> Acesso em: 15 fev. 2012.

MONQUERO, P. A.; CHRISTOFFOLETI, P. J.; OSUNA, M. D.; DE PRADO, R. A. Absorção, translocação e metabolismo do glyphosate por plantas tolerantes e suscetíveis a este herbicida. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 22, n. 3, p. 445-451, 2004.

NIMMO, D. R. Pesticides. In: RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. (Ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**. New York: Hemisphere, 1985. p. 335-373.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **Guideline for the Testing of Chemicals**. Adsorption-Desorption Using a Batch Equilibrium Method. Paris, 2000. 45 p. (Guideline, 106).

_____. **Guideline for the Testing of Chemicals**. Soil microorganism: carbon transformation test. Paris, 2000. 10 p. (Guideline, 217).

_____. **Guideline for the Testing of Chemicals**. Aerobic and Anaerobic Transformation in Soil. Paris, 2002. 17 p. (Guideline, 307).

PEIXOTO, M. F. S. P.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J. B.; TORNISIELO, V. L.; PEIXOTO, C. P.; SAMPAIO, L. S. V.; SAMPAIO, H. S. V. Remobilização de resíduos ligados de ^{14}C -atrazina em ácidos fúlvicos. **Ciencia Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 340-346, 2005.

PRATA, F.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J. B.; TORNISIELO, V. L. Influência da matéria orgânica na sorção e dessorção do glifosato em solos com diferentes atributos mineralógicos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Viçosa, v. 24, p. 947-951, 2000.

_____. Degradação e sorção de ametrina em dois solos com aplicação de vinhaça. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 36, n. 7, p. 975-981, 2001.

PRATA, F.; CARDINALI, V. C. do B.; LAVORENTI, A.; TORNISIELO, V. L.; REGITANO, J. B. Glyphosate sorption and desorption in soils with distinct phosphorus levels. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 60, n. 1, p. 175-180, 2003.

REINO UNIDO. Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. **Risk assessment of mixtures of pesticides and similar substances**. London: UK Food Standards Agency, 2002. Disponível em: <<http://cot.food.gov.uk/pdfs/reportindexed.pdf>> Acesso em: 15 fev. 2012.

ROBERTS, T.; HUTSON, D. **Metabolic pathways of agrochemicals**. Part 1: herbicides and plant growth regulators. Cambridge, U.K: The Royal Society of Chemistry, 1999. 849 p.

RUPPEL, M. L.; BRIGHTWELL, B. B.; SCHAEFER, J.; MARVEL, J. T. J. Metabolism and degradation of glyphosate in soil and water. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, DC, v. 25, p. 517-528, 1977.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. **Agrotóxicos aspectos gerais**: agrotóxicos e ambiente. Brasília, DF: Embrapa, 2004.

SPADOTTO, C. A. **Comportamento e destino ambiental de herbicidas**. Londrina: Sociedade Brasileira da Ciência das Plantas Daninhas, Comitê de Meio Ambiente, 2002. (Comunicado Técnico).

SPARKS, D. L. **Environmental soil chemistry**. 2. ed. New York: Academic Press, 2003. 352 p.

SPRANKLE, P.; MEGGITT, W. F.; PENNER, D. Adsorption, mobility and microbial degradation of glyphosate in the soil. **Weed Research**, v. 23, n. 3, p. 229-234, 1975.

US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES - USDHHS. **Toxicological profile for DDT, DDE, and DDD**. Atlanta, GE: Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2002. 497 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Public health impact of pesticides used in agriculture**. Geneva, 1990. 129 p.

_____. **Glyphosate**. Geneva, 1994. 81 p. (Environmental Health Criteria, 159).

ZHANG, J.; HAMILL, A. S.; WEAVER, S. E. Antagonism and synergism between herbicides: trends from previous studies. **Weed Technology**, Lawrence, v. 9, p. 86-90, 1995.