

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS

**BIOTRANSFORMAÇÃO DO HERBICIDA SULFENTRAZONA
EM SOLOS BRASILEIROS**

Camila Ortiz Martinez

Engenheira Agrônoma

Prof. Dra. Lucia R. Durrant

Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos
da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do
título de Mestre em Ciência de Alimentos

Campinas – 2006

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

M363b Martinez, Camila Ortiz
 Biotransformação do herbicida sulfentrazone em solos brasileiros /
 Camila Ortiz Martinez. -- Campinas, SP: [s.n.], 2006.

 Orientador: Lúcia Regina Durrant
 Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Engenharia de Alimentos.

 1. Sulfentrazone. 2. Biotransformação. 3. Temperatura. 4.
 Umidade. 5. Solos. I. Durrant, Lúcia Regina. II. Universidade
 Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III.
 Título.

(cars/fea)

Titulo em inglês: Sulfentrazone herbicide biotransformation in Brazilian soils

Palavras-chave em inglês (Keywords): Sulfentrazone, Biotransformation, Temperature
Humidity, Soils

Titulação: Mestre em Ciências de Alimentos

Banca examinadora: Lúcia Regina Durrant

Rose Marry Araújo Gondim Tomaz

Andrea Roberta Clemente

Érika Cristina Pavarina

Programa de Pós Graduação: Programa em Ciências de Alimentos

CAMILA ORTIZ MARTINEZ

BIOTRANSFORMAÇÃO DO HERBICIDA SULFENTRAZONA EM SOLOS
BRASILEIROS

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos da Universidade
Estadual de Campinas, para obtenção do
título de Mestre em Ciência de Alimentos

Aprovado em Campinas de de 2006

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lúcia Regina Durrant
(Orientadora)

Profa. Dra. Andrea Roberta Clemente
(Membro)

Dra. Érika Cristina Pavarina
(Membro)

Pesquisadora Dra. Rose Marry Araújo Gondim Tomaz
(Membro)

*"Mas os que esperam no Senhor renovam as suas
forças; sobem com asas como águias; correm
e não se cansam, caminham e não se fatigam"*

Isaías 40:31

Dedico mais esta conquista

*A Deus. “Porque d’Ele, e por Ele,
e para Ele, são todas as coisas”*

Romanos 11:36

AGRADECIMENTOS

Ao Trino Deus que me faz mais do que vencedora em todas as coisas, me ajudando e orientando com seu infinito amor e fidelidade.

À minha família pelo cuidado e ânimo dedicados a mim com tanto zelo e amor.

À Dra. Célia Maria M. S. Silva por ser um exemplo de dedicação, por todo conhecimento transmitido a mim, por sua confiança, orientação e motivação .

À Dra. Lucia Regina Durrant pela compreensão, orientação e confiança.

Aos funcionários da Embrapa Meio Ambiente que me auxiliaram no decorrer do desenvolvimento desse estudo.

Aos colegas que caminharam comigo nessa fase, trazendo alegrias, conforto e ensinios.

Aos amigos e irmãos que partilharam de minhas alegrias e tristezas no decorrer dessa caminhada, estando sempre presentes com braços acolhedores e palavras de sabedoria nos momentos de dificuldade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo suporte financeiro.

Ao curso de Pós-graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, e a Embrapa Meio Ambiente, pela oportunidade.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xv
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.3 Agrotóxicos	4
2.2 Impacto de agrotóxicos no ambiente solo	8
2.3 Biotransformação	10
2.3.1 Biotransformação de herbicidas.....	13
2.3.2 Influência da temperatura e umidade na biotransformação de herbicidas	15
2.4 O herbicida sulfentrazone.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1 Coleta e análise físico-química dos solos.....	22
3.2 Determinação do pH em água e CaCl ₂ para amostras de solo	22
3.3 Determinação da umidade residual e capacidade de campo (CC) dos solos	22
3.4 Degradação do herbicida sulfentrazone	23
3.4.1 Efeito da umidade	23
3.4.2 Efeito da temperatura.....	24
3.4.3 Extração e purificação de sulfentrazone em amostras de solo.....	24
3.4.3.1 Extração	24
3.4.3.2 Purificação	24
3.4.4 Identificação e quantificação de sulfentrazone via cromatografia gasosa.....	25
3.4.4.1 Condições cromatográficas.....	25
3.4.4.2 Determinação do limite de detecção	25
3.4.4.3 Recuperações e desempenho do método	26
3.4.4.4 Quantificação	26
3.5 Detecção do metabólito 3-hidroximetilsulfentrazone	27
3.6 Seleção e isolamento de microrganismos degradadores	28

3.7	Caracterização dos microrganismos tolerantes ao herbicida sulfentrazone	29
3.7.1	Identificação de linhagens bacterianas	29
3.7.1.1	Saponificação	30
3.7.1.2	Metilação	30
3.7.1.3	Extração	30
3.7.1.4	Lavagem	30
3.7.1.5	Análise cromatográfica	31
3.7.2	Identificação de linhagens fúngicas	31
3.8	Análise estatística	32
4	RESULTADOS	34
4.1	Identificação e quantificação de sulfentrazone via Cromatografia gasosa	34
4.2	Caracterização dos solos	36
4.3	Efeito da umidade na biotransformação de sulfentrazone	37
4.4	Efeito da temperatura na biotransformação de sulfentrazone	39
4.5	Estimação da meia-vida	41
4.6	Metabólito	44
4.7	Efeito do herbicida sobre os microrganismos	45
4.8	Identificação das linhagens microbianas degradadoras	48
4.8.1	Identificação de bactérias	48
4.8.2	Identificação de fungos	50
5	DISCUSSÃO	67
6	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
	APENDICE A	90
	APENDICE B	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cromatograma obtido para sulfentrazone via cromatografia gasosa.....	34
Figura 2 - Cromatogramas obtidos para amostra de solo testemunha e fortificada no detector μ ECD.	35
Figura 3 - Curva de calibração obtida em função da concentração das soluções padrões do herbicida e as respectivas áreas dos picos.....	36
Figura 4 - Degradação de sulfentrazone ao longo do tempo no solo LVE a 40°C e 70%CC, sendo 50% do composto degradado aos 91,63 dias (— modelo exponencial negativo ajustado, ● valores observados).....	42
Figura 5 - Degradação de sulfentrazone ao longo do tempo no solo LVA a 30°C e 70%CC, sendo a meia-vida superior a 120 dias (— modelo exponencial negativo ajustado, ● valores observados).	42
Figura 6 - Degradação de sulfentrazone ao longo do tempo no solo LVA a 70%CC e 27°C, sendo 50% do composto degradado aos 146,52 dias (— modelo exponencial negativo ajustado, ● valores observados).....	43
Figura 7 – Degradação de sulfentrazone no decorrer do tempo no solo AVA a 70%CC e 27°C, sendo 50% do composto degradado aos 172,41 dias (— modelo linear ajustado,● valores observados).....	43
Figura 8 - Cromatogramas de HMS (A) obtido por CLAE e detecção por arranjo de diodos em fase reversa com acetonitrila: ácido acético 0,5% (25:75) com gradiente em 45 min. para acetonitrila : ácido acético 0,5% (60:40) a um fluxo de 1 ml min ⁻¹	44
Figura 9 – Média da unidade formadora de colônia (ufcs g ⁻¹ solo) de bactérias e actinomicetos, contadas para os solos LVE, LVA e AVA com e sem o herbicida sulfentrazone (μ g g ⁻¹).	47
Figura 10 – Média da unidade formadora de colônia fúngica (ufcs g ⁻¹ solo), contadas para os solos LVE, LVA e AVA com e sem o herbicida sulfentrazone (μ g g ⁻¹).	47

Figura 11 – Fungos isolados do solo LVA com herbicida sulfentrazone, com 7 (a), 17 (b) e 25 dias (c) de crescimento, em meio Ágar Sabouraud..	52
Figura 12 – Fungos isolados do solo LVA sem adição do herbicida sulfentrazone com 7 (a, b), 9 (c) e 20 dias (d, e) de crescimento, em meio Ágar Sabouraud.	55
Figura 13 – Fungo isolado do solo LVE com herbicida sulfentrazone, com 20 dias de crescimento (a), em meio Ágar Sabouraud.	56
Figura 14 – Fungos isolados do solo LVE sem adição do herbicida sulfentrazone com 18 (a, b, c) e 30 dias (d) de crescimento, em meio Ágar Sabouraud..	58
Figura 15 – Fungos isolados do solo AVA com herbicida sulfentrazone, com 4 (a), 7 (b, c, d) e 25 dias (e) de crescimento, em meio Ágar Sabouraud.	62
Figura 16 – Fungo isolado do solo AVA sem adição do herbicida, com 14 dias de crescimento (a), em meio Ágar Sabouraud.	63
Figura 17 – Fungos isolados do solo LVE (a) e AVA (b) sem adição do herbicida sulfentrazone, com 4 e 18 dias de crescimento respectivamente, em meio Ágar Sabouraud.	64
Figura 18 – Fungos isolados do solo LVA (a) e AVA (b, c) com herbicida sulfentrazone, com 10, 7 e 30 dias de crescimento respectivamente, em meio Ágar Sabouraud..	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Meia-vida (TOMLIN, 2000) e potencial de lixiviação de herbicidas aplicados na cultura da soja e/ou cana-de açúcar nos solos Neossolo Quartzarenico órtico (NQO) e Latossolo vermelho distrófico (LVD), na região do Cerrado de São Gabriel do Oeste (PARAÍBA <i>et al.</i> , 2003).	7
Tabela 2 - Níveis de fortificação e porcentagem de recuperação de sulfentrazona em amostras de solo fortificadas.	35
Tabela 3 - Dados referentes a análise química dos solos LVE, LVA e AVA.....	36
Tabela 4 - Análise granulométrica dos solos LVE, LVA e AVA.	36
Tabela 5 – Quantidade remanescente de sulfentrazona (%) no decorrer do tempo nos solos AVA, LVA e LVE sob diferentes teores de umidade (%CC), e período (dias) correspondente a fase lag da microbiota presente nos respectivos solos.	37
Tabela 6 - Análise de variância da concentração remanescente de sulfentrazona ($\mu\text{g g}^{-1}$), sob diferentes teores de umidade, nos solos AVA, LVA e LVE.....	38
Tabela 7 - Estimativas de contrastes entre as concentrações remanescentes médias de sulfentrazona ($\mu\text{g g}^{-1}$) em diferentes teores de umidade, aos 225 dias, nos solos AVA, LVA e LVE.....	38
Tabela 8 – Quantidade remanescente de sulfentrazona (%) no decorrer do tempo nos solos AVA, LVA e LVE sob diferentes níveis de temperatura ($^{\circ}\text{C}$), e período (dias) correspondente a fase lag da microbiota presente nos respectivos solos.	39
Tabela 9 - Análise de variância da concentração remanescente de sulfentrazona ($\mu\text{g g}^{-1}$), sob diferentes temperaturas, nos solos AVA, LVA e LVE.	40
Tabela 10 - Estimativas de contrastes entre as concentrações remanescentes médias de sulfentrazona ($\mu\text{g g}^{-1}$) em diferentes temperaturas, aos 120 dias, nos solos AVA, LVA e LVE.....	40

Tabela 11 – Estimativas dos parâmetros alfa e beta dos modelos de degradação e respectivos valores estimados de meia vida do herbicida nos solos AVA, LVA e LVE, em diferentes condições experimentais (níveis de temperatura e umidade).	41
Tabela 12 – Avaliação do efeito do herbicida sulfentrazone no número médio de unidades formadoras de colônias microbianas isoladas dos solos LVE, LVA e AVA, mediante aplicação do Teste <i>t</i> de Student.....	45
Tabela 13 – Média da contagem de bactérias tolerantes a doses maiores do herbicida sulfentrazone (2,13; 4,22 e 7,0 $\mu\text{g g}^{-1}$) isoladas dos solos LVE, LVA e AVA.....	48
Tabela 14 - Identificação de linhagens bacterianas por MIS, presente nos solos LVE, AVA e LVA, selecionadas em meios com concentrações crescentes de sulfentrazone como única fonte de energia.	49

RESUMO

O destino de herbicidas nos solos de regiões temperadas é muito estudado, o que não é verificado em solos de regiões tropicais embora seja necessário, uma vez que a aplicação destes compostos, pode atingir áreas frágeis do ponto de vista ambiental. O herbicida sulfentrazone destaca-se entre os herbicidas utilizados nas principais culturas do estado de São Paulo. É classificado como altamente móvel e persistente, e tem um alto potencial de lixiviação tanto vertical quanto horizontal. Além disso, a persistência da molécula pode limitar ou injuriar o desenvolvimento de espécies cultivadas em rotação. Diante da importância do conhecimento sobre o comportamento e destino deste herbicida, este estudo se propôs a examinar a degradação deste composto orgânico em condições edafoclimáticas brasileiras. O estudo foi conduzido em três solos representativos de regiões de uso da sulfentrazone no Brasil (Latosolo vermelho escuro, Latossolo vermelho amarelo e Argissolo vermelho amarelo). Para cada local selecionado, foram retiradas dez amostras ao acaso, à profundidade de 0 – 10 cm. Em laboratório, as amostras de cada local, foram misturadas até a homogeneização para constituírem uma amostra composta, que foram secas ao ar e peneiradas em malha de 2 mm. Os solos (100 g) foram colocados em Erlenmeyers, com capacidade para 500 mL. A umidade do solo foi corrigida para 30, 70 e 100% da capacidade de campo e mantida constante até o final do período experimental. Após o período de repouso de sete dias, os solos foram suplementados com o herbicida sulfentrazone (0, 7 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo) e mantidos a 27°C. Solos sem adição de herbicida foram utilizados para o controle. Após 14, 30, 60, 120, 180 e 255 dias de incubação foram retiradas alíquotas para análise quantitativa dos resíduos de sulfentrazone, por meio de cromatografia gasosa. Posteriormente, foi conduzido outro experimento onde as amostras de solo, suplementadas ou não com o herbicida, nas mesmas condições já descritas, foram mantidas sob diferentes temperaturas (15, 30 e 40°C) e a umidade mantida constante (70% da capacidade de campo). Após 14, 30, 60 e 120 dias de incubação foram quantificados os resíduos de sulfentrazone por cromatografia gasosa. Em seguida, procedeu-se o isolamento e a identificação dos microrganismos degradadores do herbicida. As bactérias foram isoladas e identificadas após crescimento em presença de altas doses do herbicida (2,13; 4,22 e 7,0 $\mu\text{g g}^{-1}$). A identificação foi realizada pela análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular. Os fungos foram isolados e identificados com o auxílio de microscopia eletrônica de varredura e o uso de manual de identificação. Com base nas análises estatísticas, não houve efeito dos diferentes teores de umidade sobre a degradação da sulfentrazone. Para o fator temperatura, com 120 dias, foi observado efeito significativo sobre a degradação de sulfentrazone nos solos LVE e LVA. A degradação do herbicida no solo LVE foi maior nas temperaturas de 30 e 40°C, que não diferiram entre si, enquanto que no solo LVA a degradação foi maior a 30°C. As estimativas de meia-vida de sulfentrazone para os solos AVA, LVA e LVE foram de 172,41; 146,52 e 91,63 dias, respectivamente. Nos solos estudados foi observado que o herbicida estimulou o crescimento de actinomicetos, enquanto o crescimento de bactérias foi favorecido pelo herbicida apenas no solo AVA e afetado negativamente no solo LVE. O contrário ocorreu para o crescimento fúngico, o qual foi favorecido pelo herbicida no solo LVE, não sendo afetado por ele nos solos LVA e AVA. As bactérias degradadoras de sulfentrazone foram identificadas como *Nocardia brasiliensis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhizobium radiobacter*, *Ralstonia*

picketii e *Methylobacterium radiotolerans*. Os fungos isolados e identificados como degradadores deste herbicida pertencem aos gêneros *Cladosporium* sp., *Eupenicillium* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Chrysosporium* sp. e *Metarrhizium* sp.

ABSTRACT

The destination of herbicides in ground of tempering regions very is studied, what it is not verified in ground of tropical regions even so is necessary, a time that the application of these composites, can reach fragile areas of the ambient point of view. The herbicide sulfentrazone is distinguished enters the used herbicides in the main cultures of the state of São Paulo. It is classified as mobile and highly persistent, and has one high how much in such a way horizontal vertical leaching potential. Moreover, the persistence of the molecule can limit or injuriar the development of species cultivated in rotation. Ahead of the importance of the knowledge on the behavior and destination of this herbicide, this study examined the degradation of this organic composition in Brazilian edafo-climatic conditions. The study was lead in three representative ground of regions of use of sulfentrazone, in Brazil (oxisols and spodosol). For each selected place, ten samples to perhaps, the depth of 0 - 10cm had been removed. In laboratory, the samples of each place, had been mixed until the homogenization to constitute a composed sample, that had been droughts to air and bolted in mesh of 2mm. The ground (100g) had been placed in Erlenmeyers, with capacity for 500mL. The humidity of the ground was corrected for 30, 70 and 100% of the field capacity and kept constant until the end of the experimental period. After the period of rest of seven days, the ground had been supplemented with the herbicide sulfentrazone (0, 7 $\mu\text{g g}^{-1}$ of ground) and kept 27°C. Ground without herbicide addition had been used for the control. After 14, 30, 60, 120, 180 and 255 days of incubation had been removed aliquot for quantitative analysis of the sulfentrazone residues, by means of gaseous chromatography. Later, another experiment was lead where the ground samples, supplemented or not with the herbicide, in the same described conditions already, had been kept under different temperatures (15, 30 and 40°C) and the kept humidity constant (70% of the field capacity). After 14, 30, 60 and 120 days of incubation had been quantified the sulfentrazone residues for gaseous chromatography. After that, the isolation and the identification of the degrading microrganismos of the herbicide had been carried through. The bacteria had been isolated and identified after growth in presence of high doses of the herbicide (2,13; 4,22 and 7,0 $\mu\text{g g}^{-1}$). The identification was carried through by the cellular fatty acids analysis. The fungos had been isolated and identified with the aid of electronic microscopy of sweepings and the identification manual use. On the basis of the statistical analyses, did not have effect of different texts of humidity on the degradation of sulfentrazone. For the factor temperature, after 120 days, significant effect on the degradation of sulfentrazone in ground LVE and LVA was observed. The degradation of the herbicide in ground LVE was bigger in temperatures of the 30 and 40°C, that they had not differed between itself, whereas in ground LVA the degradation was bigger 30°C. The estimates of half-lives of sulfentrazone for ground AVA, LVA and LVE had been of 172,41; 146,52 and 91,63 days, respectively. In studied ground it was observed that the herbicide stimulated the growth of actinomicetos, while the growth of bacteria was favored by the herbicide only in the ground AVA and affected negative in ground LVE. The opposite occurred for the fungal growth, which was favored by the herbicide in ground LVE, not being affected for it in ground LVA and AVA. The degrading bacteria of sulfentrazone had been identified as *Nocardia brasiliensis*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Rhizobium radiobacter*, *Ralstonia pickettii* and *Methylobacterium radiotolerans*. The

isolated and identified fungi, degrading of this herbicide, belong to the sorts *Cladosporium* sp., *Eupenicillium* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., *Chrysosporium* sp. e *Metarrhizium* sp.

1 INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são frequentemente aplicados no decorrer dos ciclos das culturas para controlar organismos deletérios ou para impedir o crescimento de plantas daninhas. De todos os compostos que atingem o solo, eles merecem atenção especial, pois seu desaparecimento, persistência e transformação indicam sua eficácia como produto e seu perigo potencial para a microbiota e a qualidade do ambiente (FAY *et al.*, 1997). Muitos deles representam uma ameaça toxicológica progressiva para ambas existências animal e humana (ANG *et al.*, 2005).

Os relatos da presença de agrotóxicos em águas superficiais e subterrâneas iniciaram-se nos anos 70, e desde então, com o aprimoramento das técnicas analíticas com maior acuidade e sensibilidade, mostraram, por exemplo, que em 1988, mais da metade dos estados americanos possuíam águas subterrâneas contaminadas (PARSONS; WITT, 1989). Os relatos, geralmente, se referem à contaminação por herbicidas, os quais representam 49% do consumo total de agrotóxicos. No Brasil, os negócios com estes compostos se concentram nas culturas de soja, cana-de-açúcar, milho, arroz e algodão (PACHIONE, 2004).

O Brasil é um dos maiores sucessos da agricultura mundial nos últimos 25 anos (PIMENTA, 2002). No entanto, a atividade agrícola no Brasil tem expandido sua fronteira de forma desorganizada, atingindo áreas de recarga ou de afloramento de aquíferos, bastante vulneráveis à contaminação por agrotóxicos. Isso requer soluções de manejo, uma vez que os recursos hídricos subterrâneos vêm sendo utilizados de forma mais intensiva (EMBRAPA, 1999).

A aplicação de herbicidas na agricultura também pode causar contaminação de águas superficiais, além das águas subterrâneas. A quantidade de herbicida que se move para fora da área de aplicação irá depender das propriedades físico-químicas do herbicida e das características do local de aplicação (CARTER, 2000). Para determinar o potencial de poluição de águas, para um dado solo e clima, é necessária a determinação da meia-vida e da mobilidade dos herbicidas no solo.

A poluição das águas subterrâneas tem sido muito estudada em regiões temperadas (KOLPIN *et al.*, 1998; FUNARI *et al.*, 1998) e mediterrâneas (GRIFFINI *et al.* 1997;

PLANAS *et al.*, 1997). No entanto, dados em solos de regiões tropicais são escassos (CASTILHO *et al.*, 1997). A maioria dos dados de meia-vida reportados na literatura foi determinada na Europa e nos Estados Unidos e, portanto, não são diretamente aplicáveis a países tropicais (DORES; DELAMONICA-FREIRE, 1999).

Além do problema da contaminação de águas, a diversidade microbiana pode ser marcadamente afetada mediante o uso seguido de agrotóxicos, com ou sem alteração do metabolismo microbiano, e tais mudanças podem afetar a fertilidade do solo (JOHNSEN *et al.*, 2001; KAARE *et al.*, 2001).

Entretanto os agrotóxicos podem ser mineralizados por um microrganismo ou por um conjunto de microrganismos. A biotransformação de um complexo de moléculas normalmente envolve o efeito interativo das comunidades mistas de microrganismos e conta com a versatilidade metabólica das bactérias e fungos (ALEXANDER, 1999). Logo, ela é dependente da presença, número, e capacidade enzimática dos microrganismos do solo. Porém, a biodisponibilidade do composto, assim como as propriedades físico-químicas do solo e do composto influenciam fortemente a taxa de degradação (AISLABIE; LOYD-JONES, 1995).

Entre os agrotóxicos, a biotransformação de herbicidas tem sido objeto de estudo, devido ao potencial elevado, de parte destes compostos, para contaminação ambiental. Uma vez que grande parte deles é aplicada diretamente no solo. A disponibilidade destes compostos para os microrganismos do solo depende dos fatores temperatura e umidade, uma vez que ambos afetam sua adsorção ao solo, influenciando a bioatividade e a persistência dos mesmos (BEULKE *et al.*, 2004). Além disso, em escala de campo, a temperatura ótima para degradação de compostos orgânicos é a mesofílica (ao redor de 25°C a 40°C), e a umidade do solo tem efeito direto e profundo na proliferação dos microrganismos e suas atividades (FAY; SILVA, 2004).

O herbicida sulfentrazone destaca-se como objeto de estudo para biotransformação. Ele é um dos herbicidas mais utilizados nas principais culturas do Estado de São Paulo (FAIRBANKS, 2005). Esta molécula é um ácido fraco que tem uma constante de dissociação (pKa) de 6,56, logo, pode estar nas formas neutra (em pH < 6,56) e aniônica (em pH > 6,56) em solos agrícolas. Em solos arenosos e em valores de pH que excedem seu

pKa, sua adsorção diminui e cresce sua susceptibilidade a lixiviação e escoamento superficial (GREY *et al.*, 1997; GREY *et al.*, 2000). Este herbicida é altamente móvel, persistente, tem um alto potencial para contaminação de águas, e é considerado perigoso ao meio ambiente (AGROFIT, 2002; EPA, 2003).

A degradação microbiana do herbicida sulfentrazone é algo a ser explorado, uma vez que ainda não há relatos referentes a esta ocorrência, e que facilitaria o desenvolvimento de futuros estudos de biorremediação de locais contaminados. Além disso, os dados obtidos podem dar origem a taxas constantes aplicadas em modelos de destino e transporte, permitindo o estudo do comportamento de sulfentrazone em solos brasileiros. Sendo assim, foram traçados para este estudo os seguintes objetivos:

- ❖ Avaliar a interação microbiana com o herbicida sulfentrazone enfocando a degradação da molécula, em diferentes tipos de solos brasileiros.
- ❖ Determinar os efeitos da temperatura e umidade na degradação, dependente do tempo, do herbicida sulfentrazone.
- ❖ Avaliar o efeito do herbicida sobre a microbiota dos solos mediante a contagem de unidades formadoras de colônias.
- ❖ Selecionar e caracterizar morfológicamente os microrganismos capazes de degradar sulfentrazone.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Agrotóxicos

Os agrotóxicos são compostos orgânicos antropogênicos, formulados para controlar de forma seletiva plantas e organismos considerados prejudiciais para culturas agrícolas (RIGHETTO, 1997). Quando eles são utilizados corretamente, podem salvar acima de 40% das perdas das colheitas, mas o uso reduzido ou exagerado desses químicos pode causar consideráveis conseqüências tanto ambientais quanto para a saúde pública (RICHARDSON, 1998).

O acúmulo de agrotóxicos na biosfera pode criar um estresse ecológico, resultando na contaminação de recursos naturais e acumulação nos diferentes níveis tróficos da cadeia alimentar, sendo extremamente prejudicial aos seres vivos nos níveis mais altos, incluindo o homem (GOLOVLEVA *et al.*, 1992).

O mercado mundial de agrotóxicos movimenta atualmente US\$ 30 bilhões por ano. Segundo dados do Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG), o Brasil ocupa o 3º lugar no consumo de agrotóxicos e movimenta US\$ 2.5 bilhões, após Estados Unidos e Japão (FAIRBANKS, 2005). Existe, ainda, uma tendência para o aumento do uso desses compostos. Segundo divulgação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, em 2004 o uso de agrotóxicos no Brasil aumentou 22%, passando de 2.3 kg ha⁻¹ para 2.8 kg ha⁻¹ (FELICONIO, 2006). Os herbicidas representam 49% dentro desse total e seu uso está concentrado nas culturas de soja, cana-de-açúcar, milho, arroz e algodão (PACHIONE, 2004).

O estado de São Paulo ocupa o primeiro lugar do país na agropecuária e contribui com 19% da produção nacional (AGÊNCIA, 2002), constituindo o segundo maior produtor de soja e de cana-de-açúcar (GOVERNO, 2005). No entanto, ele ocupa o terceiro lugar no consumo de herbicidas (FERREIRA *et al.*, 2002).

A adoção de práticas conservacionistas de manejo de solo no Brasil, como sistema de semeadura direta, ocasiona alterações no processo de produção agrícola. Uma vez instalado o sistema, o revolvimento do solo passa a ser bem menor e, com isso, o preparo do solo deixa de ser utilizado para o controle de plantas daninhas. Como conseqüência, tem

aumentado a dependência do uso de herbicidas, principalmente em áreas de plantio de soja. Nos últimos 10 anos, cerca de US\$ 800 milhões por ano foram gastos com o consumo de herbicidas no país, sendo que somente a cultura da soja absorveu praticamente a metade deste montante. (REGITANO *et al.*, 2001).

Apesar do Brasil ser um dos maiores sucessos da agricultura mundial (PIMENTA, 2002), a expansão da fronteira agrícola brasileira levou a utilização de áreas de recarga ou de afloramento de aquíferos, vulneráveis à contaminação por agrotóxicos. Isso requer soluções de manejo que tornem esses sistemas sustentáveis, uma vez que os recursos hídricos subterrâneos vêm sendo utilizados de forma mais intensiva. Vários esforços estão sendo canalizados pelos órgãos governamentais e entidades privadas com o intuito de preservar a qualidade das águas (EMBRAPA, 1999).

Os relatos de contaminação de águas, geralmente, se referem à contaminação por herbicidas, os quais podem ser dispersos via escoamento superficial e lixiviação, causando contaminação de águas superficiais e subterrâneas. Apesar de considerar em separado os problemas de ambas, os ciclos hidrológicos permitem a conexão direta entre estes dois compartimentos. Dependendo do gradiente hidráulico, a água de superfície recarrega a água subterrânea ou é suprida por ela (LEONARD, 1990).

A poluição das águas subterrâneas tem sido muito estudada em regiões temperadas (KOLPIN *et al.*, 1998; FUNARI *et al.*, 1998) e mediterrâneas (GRIFFINI *et al.* 1997; PLANAS *et al.*, 1997). Os relatos geralmente se referem a contaminação por atrazina (KOLPIN *et al.*, 1998; KOOKANA *et al.*, 1998; GRAYMORE *et al.*, 2001) simazine e outros derivados de s-triazine (PICK *et al.*, 1992; DONNELLY *et al.*, 1993; LAMB *et al.*, 1998), alaclor (OSANO, 2002), outros cloroacetanilidas e fenilureas (KOLPIN *et al.*, 2000; GERECKE *et al.*, 2001; CARACCILO *et al.*, 2005).

Relatos de contaminação de águas subterrâneas em regiões tropicais, como mostrado para herbicidas do grupo triazinas (LI *et al.*, 2001), são escassos (CASTILHO *et al.*, 1997). Laabs *et al.* (2002) detectaram a presença dos herbicidas alaclor, atrazina, metolaclor, e trifluralina por todo perfil de dois solos do cerrado brasileiro, e em 95cm de profundidade do solo de lisímetros, indicando que a possibilidade de poluição de águas subterrâneas por esses compostos não pode ser descartada. O tempo necessário para

dissipação de 90% dos compostos foram de 14 e 20, 14 e 62, 41 e 82, 26 e 60 dias nos solos Latossolo vermelho amarelo e Areia Quartzosa, para os herbicidas alaclor, atrazina, metolaclor e trifluralina, respectivamente.

Apesar da avaliação do comportamento de herbicidas em solos tropicais ser relatada por diversos autores (OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2001; LAABS *et al.*, 2000; LAABS *et al.*, 2002; PARAÍBA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 1998; CHEAH *et al.*, 1997), sempre há indicação da necessidade de estudos incluindo avaliações de fatores controladores de adsorção, e degradação microbiana desses compostos.

O risco de contaminação de águas subterrâneas é classificado pelo índice do potencial de lixiviação (LPI) dos compostos orgânicos, frequentemente utilizado por agências governamentais e corporações privadas, uma vez que o transporte e degradação de compostos orgânicos é muito complexo envolvendo processos físicos, químicos e biológicos (BOESTEN, 2000). Além disso, estudos de monitoramento da presença de agrotóxicos em águas apresentam elevado custo, e consomem muito tempo devido ao grande número de análises que devem ser realizadas (SPADOTTO *et al.*, 2004).

Um dos fatores importantes na determinação do potencial de lixiviação de agrotóxicos, é a degradabilidade destes compostos, geralmente expressa pela meia-vida, que constitui um dos principais processos controladores de sua mobilidade no solo (GUSTAFSON, 1989). A meia-vida é muito variável, incluindo dias, meses, ou anos. A maioria dos dados reportados na literatura foram determinados na Europa e nos Estados Unidos e, portanto, não são diretamente aplicáveis a países tropicais (DORES; DELAMONICA-FREIRE, 1999). A sua determinação deve ocorrer em condições normais de uso, na região em que o composto orgânico é utilizado.

Em ambientes de clima tropical as condições de alta temperatura e precipitação, quando associadas com boa drenagem, favorecem o intemperismo e, conseqüentemente, a formação de solos com acúmulo de minerais de argila do tipo 1:1 e óxidos de ferro e alumínio (SILVA *et al.*, 1998). No Brasil, por exemplo, os latossolos, que corresponde a esta classe de solos, compreendem cerca de 50 a 60% do território (REGITANO *et al.*, 2001), e podem constituir um material para trabalhos de degradação de agrotóxicos.

Laabs *et al.* (2002), por exemplo, conduziram um estudo piloto de lixiviação e degradação de agrotóxicos aplicados em milho e soja, nos solos Latossolo vermelho-amarelo e Areia Quartzosa do cerrado brasileiro, e mostraram que a meia-vida foi de cinco a dez vezes menor do que aquelas obtidas para regiões temperadas. Ainda em solo do cerrado brasileiro, Laabs *et al.* (2000), demonstraram que a meia-vida dos herbicidas atrazina, simazina e metolaclor foi bem menor ($T_{1/2} < 15$ dias) em relação aquela obtida no mesmo solo de regiões temperadas. O que ocorreu, principalmente, pelo aumento da perda dos herbicidas por degradação e volatilização, devido a condição climática.

Paraíba *et al.* (2003) provaram ser essencial a inclusão da temperatura do solo no índice de potencial de lixiviação em condições tropicais, e estimaram o LPI de vários herbicidas em dois solos brasileiros (Tabela 1).

Tabela 1 – Meia-vida (TOMLIN, 2000) e potencial de lixiviação de herbicidas aplicados na cultura da soja e/ou cana-de açúcar nos solos Neossolo Quartzarenico órtico (NQO) e Latossolo vermelho distrófico (LVD), na região do Cerrado de São Gabriel do Oeste (PARAÍBA *et al.*, 2003).

Herbicida	Meia vida (dias)	Potencial de lixiviação	
		Solo NQO	Solo LVD
Atrazina	77	Alto	Baixo
2,4-D	10	Muito baixo	Muito baixo
Clomazone	30	Muito baixo	Muito baixo
Clorimuron-etil	40	Baixo	Muito baixo
Diclosulam	65	Muito alto	Alto
Dimetenamid	43	Moderado	Baixo
Fenoxaprop	21	Muito baixo	Muito baixo
Fluazifop- <i>p</i> -butil	15	Baixo	Muito baixo
Flumetsulam	60	Muito alto	Alto
Fomesafen	100	Muito alto	Alto
Haloxifop	55	Moderado	Baixo

Herbicida	Meia vida (dias)	Potencial de lixiviação	
		Solo NQO	Solo LVD
Imazaquim	60	Muito alto	Moderado
Imazetapir	90	Muito alto	Muito alto
Lactofen	7	Muito baixo	Muito baixo
Metolaclo	90	Moderado	Baixo
Metribuzin	40	Moderado	Baixo
Paraquat	1000	Muito Baixo	Muito Baixo
Sulfentrazone	540	Muito alto	Muito alto

Outros autores determinaram o LPI de herbicidas em solos brasileiros, como Oliveira Junior *et al.* (2001) que determinaram o LPI destes compostos nos solos Latossolo roxo, Areia Quartzosa e Podzólico vermelho-amarelo. Segundo estes autores o herbicida alachlor, com meia-vida de 15 dias, foi classificado como tendo potencial de lixiviação intermediário. Já os herbicidas, atrazina, hexazone e mesulfuron, com $T_{1/2}$ de 55, 90 e 23-33 dias respectivamente, apresentaram um alto potencial de lixiviação nesses solos.

2.2 Impacto de agrotóxicos no ambiente solo

O solo é um sistema vivo e dinâmico, um recurso não renovável, e a maior interface entre a agricultura e o ambiente (DORAN; ZEISS, 2000). A qualidade e saúde do solo determinam a sustentabilidade agrícola e a qualidade ambiental, as quais juntas determinam a saúde vegetal, animal e humana (ARSHAD; MARTIN, 2002; DORAN *et al.*, 2002). Porém, mundialmente, vem ocorrendo um declínio na qualidade do solo devido às mudanças adversas em suas propriedades físicas, químicas e biológicas, sendo que uma das causas principais é a contaminação por agrotóxicos (ARSHAD; MARTIN, 2002).

Deposições de agrotóxicos podem afetar as atividades microbianas em diferentes níveis funcionais. Isso acarreta mudanças na formação da complexa estrutura do solo e fertilidade, uma vez que os microrganismos são auxiliares importantes para tais fatores, através de reações bioquímicas que são fundamentais para renovação e mudança da composição original dos solos (FAY; SILVA, 2004).

A biomassa total e a diversidade microbiana também podem ser afetadas por agrotóxicos. Elas constituem a principal defesa contra a perda de nutrientes (por erosão ou por lixiviação) para todo o ecossistema (FAY; SILVA, 2004).

A diversidade microbiana possui duas implicações importantes. A primeira é que uma diminuição na diversidade irá, de forma geral, resultar no risco de uma diminuição na capacidade do sistema biológico em responder a perturbações. A segunda é que a diversidade microbiana reflete o histórico da influência no microambiente, ou seja, ela indica quanto o ecossistema foi estressado (JOHNSEN *et al.*, 2001).

Na literatura, o efeito de compostos orgânicos sobre a diversidade e a atividade microbiana é extremamente diverso, variando de relatos sobre o efeito dos compostos em espécies individuais ou em populações e sistemas biológicos, existindo grande diversidade de métodos para os testes tanto em laboratório quanto em campo (EDWARDS; BATER, 1990).

El-Fantroussi *et al.* (1999) utilizou a técnica de DGGE (gradiente desnaturante em gel de eletroforese) para avaliar o efeito de três herbicidas (diuron, diuron + linuron e cloroturon) sobre a microbiota de um solo. Foram encontradas duas bandas associadas a *Pseudomonas* no solo controle, as quais estiveram ausentes nos solos tratados com o herbicida linuron.

Haney *et al.* (2000) mediram a atividade microbiana pela determinação da mineralização de C e N. Eles observaram que a mineralização do C aumentou logo no primeiro dia após a adição de glifosato e continuou por 14 dias. A mineralização de C foi maior com o aumento da concentração do herbicida, sendo significativamente maior em todas as aplicações quando comparado ao controle. O herbicida estimulou significativamente a atividade microbiana, não afetando a biomassa.

Os efeitos de agrotóxicos sobre os microrganismos do solo podem ser inibitórios, estimulantes e/ou inexistentes. Atlas *et al.* (1991) observaram ambos os efeitos, mediante aplicação do herbicida 2,4,5-T (ácido triclofenoxiacético, $100 \mu\text{g g}^{-1}$), em comunidades microbianas de um solo arenoso. A diversidade das comunidades perturbadas foi significativamente menor, levando a sobrevivência de relativamente poucas espécies.

Enquanto as comunidades desenvolvidas demonstraram aumento na tolerância fisiológica e versatilidade metabólica em relação ao herbicida.

A contagem de fungos não foi modificada significativamente sob aplicação do herbicida fluzaifop-butil, quando em baixas concentrações (0 e 0,6 $\mu\text{g g}^{-1}$). No entanto, foi observada uma alta inibição temporária, para as concentrações de 3 e 6 $\mu\text{g g}^{-1}$ (ABDELMALLEK *et al.*, 1996). Já a aplicação dos herbicidas 2,4-D, tiobencarbe e flucoralin, ambos na dose recomendada, inibiu de modo geral as populações fúngicas. Este efeito foi transitório na presença de 2,4-D, e nas parcelas tratadas com tiobencarbe e flucoralin as populações fúngicas permaneceram menores do que as do controle (SHULA; MISHRA, 1997).

Os agrotóxicos podem afetar também a simbiose entre os rizóbios e as leguminosas, sob doses recomendadas para os compostos ou superior a estas. Isso pode ocorrer de vários modos: indiretamente, causando anomalias no crescimento das plantas, ou diretamente, reduzindo a sobrevivência ou o crescimento das bactérias no solo, influenciando a fixação de nitrogênio ou inibindo diretamente o processo de nodulação (SILVA *et al.*, 2004).

Num estudo realizado por Arruda *et al.* (2001), o herbicida sulfentrazone reduziu tanto a formação de nódulos quanto a fixação de nitrogênio. A matéria seca dos nódulos das raízes de soja, mediante aplicação de 72 $\mu\text{g m}^{-2}$ (dose recomendada) do ingrediente ativo (i.a.), apresentou redução de 55,5% no estágio R₃ da cultura e de 75% em R₅. O número de nódulos apresentou uma redução de 33% em R₃ e de 82,6% em R₅. Também houve decréscimo dos teores de aminoácidos e ureídeos no exsudato do xilema com o aumento da dose do herbicida (36 a 144 $\mu\text{g m}^{-2}$ de i.a.), e doses maiores do que 24 $\mu\text{g m}^{-2}$ de i.a. inibiram 50% a concentração de nitrato na seiva dos vasos do xilema. Ambas as alterações acarretaram menor produção e menor quantidade de fotoassimilados translocados e alocados aos nódulos.

2.3 Biotransformação

A transformação microbiana de agrotóxicos no solo varia em função de fatores como teor de água, temperatura, aeração, pH e níveis de nutrientes. Além destes, a disponibilidade do composto e a presença de microrganismos aptos a sua degradação são

fatores de grande importância, e determinantes na taxa de metabolismo microbiano (AISLABIE; LOYD-JONES, 1995).

A disponibilidade é dependente das propriedades físicas e químicas, tanto dos compostos como do solo. Dentre as propriedades do composto estão a solubilidade em água, alcalinidade e radicais reativos, entre outros. Entre as propriedades do solo, a quantidade e tipos de colóides são de grande importância na adsorção do composto às partículas sólidas presentes (MONTEIRO, 2001).

A adsorção diminui a disponibilidade dos agrotóxicos. Após sua aplicação eles são geralmente concentrados nas regiões externas dos agregados do solo e podem, lentamente, movimentar-se para dentro dos agregados. A degradação pelos microrganismos do solo ocorre principalmente na solução do solo, e em seguida na superfície e camadas exteriores dos agregados do solo (SCOW; JOHNSON, 1997; BEULKE *et al.*, 2004). Porém isso não necessariamente implica que a degradação do composto químico adsorvido é insignificante (BOIVIN *et al.*, 2005). Park *et al.* (2003) verificaram uma atração quimiotática dos microrganismos de um solo ao herbicida atrazina, o que aliado a grande concentração do herbicida adsorvido em relação a que estava na solução do solo, causou um aumento da taxa de mineralização do herbicida adsorvido.

A presença de microrganismos aptos para degradação de agrotóxicos conduz a um metabolismo dos mesmos, onde estes utilizam os compostos como fonte de carbono e energia, ou outro nutriente. O metabolismo pode ser construtivo e sequencial, conduzindo a uma oxidação completa dos compostos para dióxido de carbono e água, ou pode ser incompleto e produzir intermediários persistentes (de SOUZA *et al.*, 1998). Quando os microrganismos são capazes de transformar parcialmente os compostos para produtos que não produzem energia para o seu crescimento, o qual é mantido pela presença obrigatória de outro substrato, o processo é denominado co-metabolismo (SILVA *et al.*, 2004).

Os agrotóxicos podem ser degradados por um simples microrganismo ou por um conjunto de microrganismos diferentes, mas a degradação de um complexo de moléculas normalmente envolve o efeito interativo de comunidades mistas de microrganismos, contando com a versatilidade metabólica de bactérias e fungos (ALEXANDER, 1999).

A degradação microbiana de agrotóxicos geralmente envolve a utilização de sistemas enzimáticos que, bioquimicamente, transformam o mesmo em nutrientes e em fonte de energia para o microrganismo. As enzimas são compostos orgânicos complexos que aceleram reações químicas sem tornarem-se parte dos produtos finais, governando as reações de degradação dos agrotóxicos e tendo como função complexar nutrientes para as células microbianas. Podem ser intracelulares necessitando que o composto seja absorvido, ou extracelulares, onde são liberadas pelos microrganismos para a solução do solo, podendo, então, reagir com o composto (KAUFMAN; EDWARDS, 1982).

Diferentes enzimas podem ser envolvidas no processo de degradação de agrotóxicos. As enzimas clorohidrolase atrazina (AtzA), etilaminohidrolase hidroxiatrazina (AtzB), e isopropilaminohidrolase isopropilamelide (AtzC) estão envolvidas na conversão de atrazina para ácido cianúrico, o qual é mineralizado para dióxido de carbono e amônia por enzimas comumente encontradas nas bactérias do solo. Os genes, responsáveis pela síntese dessas enzimas envolvidas no metabolismo de atrazina, podem ser encontrados em um único microrganismo, como *Pseudomonas* sp. ADP (SADOWSKY *et al.*, 1998). Alguns deles, juntos ou não de outros genes envolvidos na síntese de outras enzimas, podem estar em outros microrganismos como *Nocardia* sp. e *Rhizobium* sp. (SMITH *et al.*, 2005).

A capacidade enzimática degradativa pode ser afetada pelos substituintes do anel aromático do agrotóxico. Como ocorreu segundo o estudo de Dejonghe *et al.* (2003), para herbicidas a base de urea, onde uma cultura mista bacteriana foi capaz de degradar herbicidas que continham o grupo metoxi-metil urea e não os que continham o grupo dimetil-amino urea.

Uma vez que microrganismos presentes nos solos são capazes de degradar e mineralizar agrotóxicos, pode-se desenvolver biorremediação de sítios contaminados, empregando-se microrganismos previamente selecionados (POINTING, 2001). Logo, o isolamento, a caracterização e a identificação de microrganismos, com habilidade em metabolizar compostos potencialmente tóxicos, é de suma importância para a biorremediação.

Biorremediação é o termo utilizado para descrever a decomposição microbiana de produtos orgânicos. Esta tecnologia permite o tratamento de áreas contaminadas, pelo uso de células ou produtos celulares para a limpeza destes ambientes, visando a transformação de contaminantes em produtos menos tóxicos que podem ser integrados nos ciclos biogeoquímicos naturais (BOUWER *et al.*, 1994; MELO *et al.*, 2001). A biorremediação pode também ser realizada por plantas, as quais são capazes de retirar compostos tóxicos do solo através de sistemas enzimáticos, processo denominado fitorremediação (SILVA *et al.*, 2004).

A aplicação da biorremediação quando comparada aos métodos físicos de limpeza é considerada menos onerosa, e causa menor impacto ambiental.

2.3.1 Biotransformação de herbicidas

Muitos estudos têm indicado que a degradação de herbicidas requer a atuação de uma cultura mista microbiana (EL-FANTROUSSI, 2000; PARK *et al.*, 2003; SETTE *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2005; KUMAR; PHILIP, 2006; SATSUMA, 2006). Uma ilustração advém de um estudo de Dejonghe *et al.* (2003), onde a cultura pura de *Variovax* sp. WDL1 não mineralizou completamente o herbicida linuron, o que ocorreu junto a atuação de mais 4 linhagens bacterianas, que degradaram os metabólitos formados, como 3,4-dicloroanilina e *N,O*-dimetilhidroxilamina. Contudo, culturas puras tem sido obtidas para a transformação de 3,4-dicloroanilina (CULLINGTON; WALKER, 1999), atrazina (De SOUZA *et al.*, 1998; AISLABIE *et al.*, 2004), 2,4-D (HAWKINS; HARWOOD, 2002), diuron (TURNBULL *et al.*, 2001), entre outros.

Há muitos trabalhos sobre a degradação de herbicidas e a taxa de degradação desses compostos varia em função de diferentes fatores.

A degradação pode variar conforme as condições ambientais e/ou de cultivo microbiano. Em solos agrícolas, menos de 4% do carbono aromático de alaclor foi mineralizado entre 30 e 120 dias (YEN *et al.*, 1994). Enquanto após 122 dias, 14 e 12% do herbicida ($18 \mu\text{g mL}^{-1}$) presente em meio extrato de malte suplementado com substrato advindo de madeira, foram degradados pelos fungos *Ceriporiopsis subvermispora* e *Phlebia tremellosa*, respectivamente, com rompimento do carbono aromático e produção de

CO₂ (FERREY *et al.*, 1994). O uso de meio mineral de sais, acrescido de alaclor, para crescimento de seis linhagens do gênero *Streptomyces*, propiciou a degradação de 50 a 78% do herbicida após 7 dias de incubação a 30°C (SETTE *et al.*, 2005).

Arthrobacter globiformis D47, adicionada em amostras de solo, degradou os herbicidas diuron e linuron, dentre outros herbicidas, no decorrer de 10 dias. A concentração inicial de ambos os herbicidas foi inicialmente igual a 20 µg g⁻¹ solo, e a final foi menor que 2 µg g⁻¹ solo (TURNBULL *et al.*, 2001). A mesma bactéria metabolizou completamente o herbicida diuron após 70 horas, quando este estava presente como única fonte de energia em meio líquido (WIDEHEM *et al.*, 2002). O herbicida linuron e seu metabólito 4-bromoanilina foram degradados por uma cultura microbiana enriquecida, em meio de cultura líquido, após 4 dias de incubação (EL_FANTROUSSI, 2000).

A degradação pode variar também conforme a concentração do composto em estudo. SETTE *et al.* (2005) mostraram que entre 6 linhagens do gênero *Streptomyces*, somente as linhagens *Streptomyces* sp. LS166, LS177, e LS182 foram capazes de crescer em alaclor numa concentração de 144 mg L⁻¹. Estas degradaram de 60 a 75% do herbicida em 14 dias. As demais linhagens cresceram somente em dose menor do que 72 mg L⁻¹, e também degradaram o composto, após 7 dias de incubação.

Os microrganismos podem responder de forma diferenciada a diferentes doses de um herbicida, variando, então, o tempo requerido para a degradação do composto. O fungo *Cunninghamella elegans* foi capaz de transformar 660 µg mL⁻¹ de metolaclor após 48 horas de incubação, sendo identificados seis metabólitos (não tóxicos) que corresponderam a 81% do total do composto parental (POTHULURI *et al.*, 1997). *Mucor racemosus*, *Fusarium* sp. e um actinomiceto, degradaram 70, 68 e 59%, respectivamente, deste herbicida à 50µg mL⁻¹ após 9 dias de incubação (SAXENA *et al.*, 1987). Sanyal e Kulshrestha (2002), mostraram que os fungos *Aspergillus flavus* e *Aspergillus terricola* degradaram em conjunto este herbicida na concentração de 100 µg mL⁻¹, com uma meia-vida de 3,5 dias, e isoladamente de 3,6 e 6,4 dias, respectivamente.

Outro fator que pode interferir na degradabilidade de um herbicida é a ocorrência da exposição anterior dos microrganismos ao composto, ou seja, grau de adaptação dos mesmos ao composto. Dellamatrice e Monteiro (2004) mostraram que a degradação de

diuron foi mais rápida em solo anteriormente exposto ao herbicida ($T_{1/2}$ de 77 dias) do que em solo sem nenhuma aplicação anterior ($T_{1/2}$ de 444 dias). O único metabólito encontrado foi 3,4-dicloroanilina.

Enfim, a taxa de biotransformação de um herbicida geralmente varia conforme a molécula, e o(s) microrganismo(s) degradador(es). O fungo *Chrysosporium pannorum* degradou 61% de 2,4-diclorofenol após 5 dias de incubação, porém o mesmo degradou somente 10% do composto parental dessa molécula, o herbicida 2,4-D, nesse período (VROUMSIA *et al.*, 2005). Koroleva *et al.* (2002), por exemplo, mostraram que o grau de consumo dependeu da cultura fúngica adicionada ao meio de cultura, onde *Cerrena maxima*, *Coriolopsis fulvocenerea*, e *Coriolus hirsutus*, produtores de lacase, consumiram mais de 50% de atrazina em 5 dias de cultivo, e 80 a 90% em 40 dias. Enquanto a linhagem *Mycelia sterilia* INBI 2-26, também produtora de lacase, consumiu mais de 70% de atrazina em apenas 17 dias.

2.3.2 Influência da temperatura e umidade na biotransformação de herbicidas

A partição de herbicidas no solo é dependente da temperatura e conteúdo de água, uma vez que o herbicida pode estar como vapor diluído no ar do solo, como soluto diluído na solução aquosa do solo, ou adsorvido na matéria orgânica e mineral do solo (TRUMAN *et al.*, 1998; PARAÍBA *et al.*, 2003; HULTGREN *et al.*, 2002; LOVELL-TAYLOR *et al.*, 2002).

Altas temperaturas podem aumentar a solubilidade de compostos em água, a difusão e a reação de sorção química. Em contraste, sorção física é diminuída devido a sua natureza exotérmica. Dessorção usualmente requer energia e pode ser aumentada em altas temperaturas (BEULKE *et al.*, 2004).

O conteúdo de água também exerce influência na sorção de herbicidas, o que depende, também das propriedades dos compostos (ROY *et al.*, 2000). Quando o conteúdo de água no solo está baixo, a estrutura de substâncias húmicas é modificada e as superfícies tornam-se mais hidrofóbicas, favorecendo a sorção de herbicidas hidrofóbicos. Em contraste, quando o conteúdo de água no solo é alto, os compostos hidrofílicos são

freqüentemente adsorvidos devido a sua alta afinidade por regiões hidrofílicas do húmus (BEULKE *et al.*, 2004).

Além de influenciar no comportamento dos compostos orgânicos no solo, a umidade tem efeito direto sobre o microbiota dos solos. O baixo conteúdo de umidade, além de reduzir o herbicida na solução do solo, reduz a biomassa e a atividade microbiana, por ser um componente indispensável do protoplasma celular. A água, de forma geral, auxilia também nas trocas gasosas e dissolve e transporta os diferentes nutrientes (FAY; SILVA, 2004).

Segundo Hultgren *et al.* (2002) o conteúdo de água, juntamente com o pH, influenciaram fortemente o comportamento do herbicida prosulfuron em campos agrícolas. O aumento do conteúdo de água causou aumento na atividade biológica e, conseqüentemente, a degradação do prosulfuron. García-Valcárcel e Tadeo (1999) mostraram que as taxas de degradação dos herbicidas hexazinone e simazine, em um solo areno-argiloso, foram maiores com o aumento do conteúdo de umidade, o qual variou de 4 a 18% a 25°C.

A temperatura, assim como a umidade, tem efeito direto no crescimento e atividade dos microrganismos. Em escala de campo, a degradação de compostos orgânicos é ótima em temperatura mesofílica (ao redor de 25°C a 40°C) e ocorre lentamente ou não ocorre em temperaturas muito baixas ou muito altas (FAY; SILVA, 2004). A variação sazonal, na temperatura e umidade, precisa ser levada em consideração quando os herbicidas são usados em climas diferentes.

A degradação microbiana do herbicida terbutilazina foi influenciada positivamente pela temperatura em solo superficial, mas não em subsolo. A meia-vida foi de 30 e 180 dias em solo superficial e subsolo respectivamente, a 22°C, Enquanto a 15°C foi igual a 180 e 200 dias para os respectivos solos (CARACCILO *et al.* 2001). A degradação do herbicida florasulam e de seu principal metabólito 5-hidroxi-florasulam também foi afetada pela temperatura em 3 tipos de solos. A meia-vida do herbicida foi de 1 a 8 dias a 20-25°C e de 6 a 85 dias a 5°C. Enquanto para o seu metabólito foi de 8 a 36 dias a 20-25°C e de 43 a 78 dias a 5°C (KRIEGER *et al.*, 2000).

Segundo Yen *et al.* (2003), após treze semanas de incubação, não houve dissipação do herbicida oxifluorfen, quando a cultura foi incubada a 10°C, mas 23% e 55% foi dissipado a 25°C e 40°C, respectivamente, ambos com a umidade a 60% da capacidade de campo. A meia-vida do herbicida variou de 72 a 160 dias em solos subtropicais distintos (texturas argilosa, franco-argiloarenosa e argilo-siltosa).

A temperatura e a umidade influenciam a degradação de herbicidas, uma vez que interferem na microbiota dos solos. Esses fatores exercem uma ação conjunta sobre a degradação. A meia-vida de metsulfuron-metil foi reduzida de 4,79 para 2,78 dias, 4,9 para 3,5, e de 3,3 para 1,9 dias, para três tipos de solo respectivamente, quando a temperatura aumentou de 20 para 30°C a 80% da capacidade de campo. Similarmente, a meia-vida diminuiu com o aumento da umidade do solo de 20 para 80% a 30°C (ISMAIL; AZLIZAN, 2002). Jurado-Exposito e Walker (1998), estudando a degradação dos herbicidas isoproturon, propyzamide e alaclor, verificaram que a meia vida de ambos os compostos foi maior em umidade e temperatura mais baixas (10% e 10°C em relação a 20% de umidade e 20°C).

A presença de água estimulou a biotransformação de isoxaflutole para diketonitrila, ácido benzóico e outros produtos, que também foi positivamente afetada pela temperatura. Depois de 56 dias de incubação, 16% do total de ¹⁴C apareceu como CO₂ em solo a 35°C, enquanto uma mineralização insignificante ocorreu em solo a 5°C (LOVELL-TAYLOR *et al.*, 2002). Beltrán *et al.* (2003) mostraram que a degradação de isoxaflutole, dando origem a diketonitrila, foi maior com o aumento do conteúdo de umidade (17, 29 e 45%) e da temperatura (10, 20, 30, 40 e 60°C), para 5 tipos de solo.

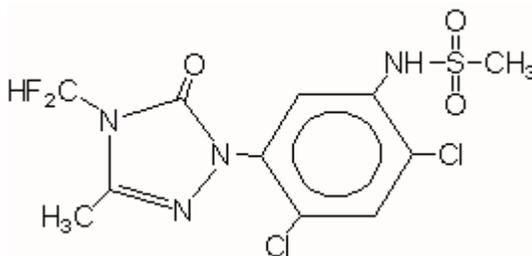
2.4 O herbicida sulfentrazone

O herbicida sulfentrazone esta entre os herbicidas mais utilizados nas principais culturas do estado de São Paulo (soja e cana-de-açúcar). Ele pode ser aplicado pós-plantio ou como pré-emergente em relação às plantas daninhas e o controle destas ocorre pela inibição da enzima protoporfirinogênio oxidase (Protox). Após ser absorvido pelas raízes das plantas, sua translocação ocorre com pequena movimentação pelo floema, pelo fato de

ocorrer rápida dessecação foliar. As plantas se tornam necróticas e morrem após exposição à luz (DAYAN, *et al.*, 1998).

As características inerentes ao herbicida sulfentrazone são:

- Nome químico: N-[2,4-dicloro-5-[4-(difluorometil)-4,5-dihidro-3-metil-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-yl]-fenil] metanossulfonamida.
- Propriedades químico-físicas:
 - Massa molar: 387,2
 - Fórmula molecular: $C_{11}H_{10}Cl_2F_2N_4O_3S$
 - Fórmula estrutural:



- Ponto de fusão: 121-123°C
 - Pressão de vapor: $1,3 \times 10^{-4}$ mPa (25°C)
 - Coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}): $\log K_{ow} = 1,48$
 - Gravidade específica: $1,21 \text{ g mL}^{-1}$ (20°C)
 - Estabilidade: Estável a hidrólise em água (pH 5-9), mas sofre fotólise ($T_{1/2} < 0,5$ dias)
 - Solubilidade em água: 400 mg L^{-1} (25°C).
 - Aplicação: Controle de plantas daninhas anuais de folha larga, algumas gramíneas e *Cyperus* spp. em soja (*Glycine Max* L.), cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) e fumo (*Nicotiana tabacum*).
- Formulação: SC (TOMLIM, 2000; CHEN, 2003).

- Comercialização: Introduzido pela FMC Corporation. Nomes comerciais: Authority, Spartan (USA), Boral (Brasil) (FMC), Capaz (América Latina) (FMC,1995).
- Destino no solo:
 - Estável no solo: Meia vida de 18 meses (TOMLIM, 2000). Segundo Chen (2003) tem $T_{1/2}$ de 121 dias em solos arenosos e $T_{1/2}$ de 302 dias em solos argilosos
 - Composto estável a fotólise em solo.
 - Baixa afinidade a matéria orgânica (K_{oc} 43)
 - Móvel em solo com alto conteúdo de areia
 - Baixo potencial para bioacumulação (TOMLIM, 2000; CHEN, 2003).

Estudos tanto em laboratório quanto em campo, dispuseram de características do herbicida sulfentrazone que influem no seu comportamento ambiental: moderadamente solúvel, não susceptível a hidrólise, extremamente susceptível a fotólise direta em água, muito estável para a fotólise em solo, meia-vida de 1,5 anos sob condições aeróbias, meia-vida de nove anos em condições anaeróbias, alta mobilidade em solo (média do coeficiente de partição, K_{oc} = 43, e do coeficiente de sorção, K_d <1) e baixa volatilidade em solo e água. Pode-se dizer que este composto é altamente móvel e persistente, e tem um alto potencial de lixiviação tanto vertical (para a água subterrânea) quanto horizontal (EPA, 2003).

O herbicida sulfentrazone é um ácido fraco que tem uma constante de dissociação (pK_a) de 6,56. Conseqüentemente pode estar predominantemente na forma neutra em valores de $pH < 6,56$, e na forma aniônica em pH maior que este. Por causa do pK_a estar entre os valores encontrados tipicamente na maioria dos solos agrícolas, as formas neutra e aniônica podem ocorrer nesses ambientes. O pH também muda sua solubilidade em água; ela é igual a 110; 780 e 1600 $mg L^{-1}$ a pH 6,0; 7,0 e 7,5 respectivamente (FMC, 1995; TOMLIM, 2000).

O coeficiente de sorção (K_d) diminuiu, e a disponibilidade de sulfentrazone na solução do solo aumentou com a textura do solo tornando-se mais arenosa e com o aumento do pH (GREY *et al.*,1997). Quando o pH foi $> pK_a$, mais de 75% do herbicida permaneceu

na solução (GREY *et al.*, 2000). Desse modo, em valores de pH que excedem seu pKa cresce sua susceptibilidade a lixiviação, e escorrimento superficial pela adsorção aos colóides ao solo. Isso demonstra que a ionização dependente do pH marcadamente afeta as propriedades químicas do herbicida, logo, toda sua atividade e destino no solo.

Avaliando a tolerância de girassol ao herbicida sulfentrazone, Kerr *et al.* (2004) verificaram que a CTC do solo teve um efeito consideravelmente maior do que o pH na tolerância de girassol ao herbicida sulfentrazone. Após 12 dias da aplicação verificou-se clorose foliar que foi 3 a 4 % mais severa em solos com pH 7.3 comparado com solos com pH 7.0. Porém mediante aplicação de 184 g i.a ha⁻¹ e pH 7.8, o peso seco das plantas de girassol foi menor em solos com CTC 8.2 comparado com aqueles com CTC de 13.7 cmol Kg⁻¹ ou maior do que esta, onde não houve alteração do peso seco. Diferença na intensidade da clorose mediante taxas de sulfentrazone (105, 158, e 184 g i.a ha⁻¹) foi maior em solos com CTC baixa (8.2 cmol Kg⁻¹), e menor em solos com aumento da CTC (23 cmol Kg⁻¹). Contudo a CTC influenciou a disponibilidade de sulfentrazone para a solução do solo, e conseqüentemente as plantas de girassol.

A adsorção de sulfentrazone também é afetada pelas práticas de manejo. Ela foi maior no solo sob sistema de plantio direto comparada ao solo sob sistema convencional de cultivo, isso em parte, devido ao maior nível de carbono orgânico presente no primeiro solo. O sistema conservacionista de plantio, que tende a aumentar a quantidade de resíduos de plantas, pode prolongar o tempo de residência de sulfentrazone no solo. O que pode também aumentar o potencial para uma longa estação de controle de plantas daninhas e persistência no solo (REDDY; LOCKE, 1998).

Esses fatores afetando o destino de sulfentrazone no solo são contribuidores para a adsorção e dessorção do sulfentrazone, e podem ajudar a explicar a ocorrência de injúrias em culturas susceptíveis muitos meses e até anos após a sua aplicação (GARVEY; MONKS, 1998; OHMES *et al.*, 1998). Grande injúria no algodão foi observada pela redução no peso de planta, no terceiro ano após aplicação em um solo do Tennessee, quando a meia-vida foi > ou igual a 85 dias. No ano de 1995 a meia-vida do herbicida foi de 113 dias, enquanto em 1997 foi de 24 dias, pois foi fortemente afetada pela chuva (normal em 1995 e mais intensa nos demais anos) (OHMES *et al.*, 2000).

Além do problema da persistência da molécula por um período suficiente para limitar ou injuriar o desenvolvimento de espécies cultivadas em rotação, seus resíduos podem persistir em partes das plantas que poderiam ser utilizadas para consumo humano ou animal, tornando-as inaceitáveis. Foi demonstrado que a sulfentrazona causou problemas no desenvolvimento e na reprodução de animais. Também foi observada em estudos de desenvolvimento, toxicidade para o embrião/feto em tratamentos em que a dose aplicada não foi matematicamente tóxica e os efeitos foram, primeiramente, observados na segunda geração de animais dos estudos de reprodução (EPA, 2003).

O herbicida é levemente tóxico para peixes. Resultados crônicos indicam que a sobrevivência e o crescimento de peixes jovens são significativamente afetados numa concentração aquática abaixo de $5.93 \mu\text{g mL}^{-1}$ (EPA, 2003).

O metabolismo de sulfentrazona em animais e plantas é similar. O maior metabólito em plantas é o 3-hidroximetilsulfentrazona (HMS). Ainda são formados o 3-desmetilsulfentrazona (DMS) e o ácido sulfentrazonacarboxílico (SCA).

A degradação de sulfentrazona em plantas de soja, via oxidação do grupo metil ligado ao anel aromático, deu origem a metabólitos (HMS, DMS e SCA) com uma toxicidade menor para as plantas. Os dados sugerem que a degradação oxidativa de sulfentrazona na soja não pode detoxificar completamente a molécula, e a baixa atividade dos metabólitos esta provavelmente associada com a rápida conversão destes em metabólitos conjugados inativos (DAYAN *et al.*, 1998). Num estudo anterior, Dayan *et al.* (1997) mostraram que os metabólitos iniciais foram convertidos rapidamente em metabólitos conjugados hidrofílicos.

Não há estudos referentes a degradação microbiana de sulfentrazona, no entanto, este é um aspecto importante a ser explorado, devido esse herbicida apresentar elevado potencial de contaminação ambiental e ser considerado perigoso ao meio ambiente (EPA, 2003).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram conduzidos nos Laboratórios de Microbiologia Ambiental e de Análise de Resíduos de Pesticidas da Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna – SP).

3.1 Coleta e análise físico-química dos solos

Os solos utilizados foram provenientes da Fazenda Experimental da Embrapa Meio Ambiente. Para cada tipo de solo selecionado: Latossolo vermelho escuro (LVE), Latossolo vermelho-amarelo (LVA) e Argissolo vermelho-amarelo (AVA), foram retiradas dez sub-amostras ao acaso, à profundidade de 0-10cm, as quais foram misturadas e homogeneizadas para constituírem uma amostra composta para cada solo. Em laboratório as amostras foram peneiradas em malha de 2mm e mantidas em câmara fria a 4°C até sua utilização.

3.2 Determinação do pH em CaCl₂ e água para amostras de solo

Aplicou-se a metodologia utilizada para a determinação do pH de soluções de solo em CaCl₂ proposta por van Raij *et al.* (2001). A um volume de solo de 10cm³, medidos em proveta volumétrica, foram adicionados 25mL de solução de CaCl₂ 0,01 mol L⁻¹ deixando esta solução em contato com o solo durante 15 minutos. Agitou-se a solução por 10 minutos a 220rpm, usando um agitador orbital, Lab Line. Após um período de decantação de 30 minutos, determinou-se o pH da solução do solo, utilizando um pHmetro Micronal, modelo 374, dotado de eletrodo de vidro combinado, previamente calibrado.

O pH dos solos também foi determinado em água. A 10g de solo foram adicionados 25mL de água. Esta solução foi agitada por 15 minutos a 220rpm, e após um período de decantação de 30 minutos, determinou-se o pH da solução do solo (EMBRAPA, 1997). Os equipamentos utilizados foram os mesmos utilizados para determinação do pH em CaCl₂.

3.3 Determinação da umidade residual e capacidade de campo (CC) dos solos

Solo seco e peneirado (20g) foi colocado em placa de Petri de maneira a formar um cone. No ponto mais alto deste cone foram adicionadas 20 gotas de água, retirando-se em seguida, o torrão formado com o auxílio de uma espátula. Este foi pesado, colocado em

estufa à 105°C por 24 horas e pesado novamente. A capacidade de campo foi calculada de acordo com a Equação 1.

Para determinação da umidade residual (U_r), 10g de solo foram pesados e colocados em estufa a 105°C por 24 h. Após este período essas amostras foram pesadas novamente. A U_r foi calculada mediante a aplicação da Equação 1, substituindo-se U_c por U_r (EMBRAPA, 1997). Para o ajuste da umidade dos solos em 30, 70 e 100% da capacidade de campo, foram aplicadas as a Equação 2 e a Equação 3.

$$\text{Equação 1: } U_c = \frac{(mu) - (ms)}{ms}$$

$$\text{Equação 2: } mu = ms (U_r + 1)$$

$$\text{Equação 3: } mf = ms (CCa \times U_c + 1)$$

Onde U_c é a umidade do solo na capacidade de campo, mu é o peso da massa úmida do solo (g), ms é o peso do solo seco (g) em estufa, mf é a massa final, U_r é a umidade residual e CCa é a umidade requerida em % da CC.

3.4 Degradação do herbicida sulfentrazona

3.4.1 Efeito da umidade

De cada amostra composta foram retiradas sub-amostras (150g) que foram acondicionadas em Erlenmeyer, e incubadas a temperatura ambiente por uma semana para equilíbrio da população microbiana. Posteriormente os solos foram suplementados com sulfentrazona (FMC Química do Brasil; grau técnico; 91,93% de pureza) na concentração de campo (700g de ingrediente ativo ha^{-1} ; $0,7\mu g g^{-1}$), sendo, logo em seguida, ajustado seu teor de umidade com água esterilizada, para 30, 70 e 100% da capacidade de campo. A correção da umidade, posterior à aplicação do herbicida, facilitou a homogeneização do solo, que foi realizada com o uso de um bastão de vidro. Os frascos foram mantidos a 27°C e a umidade foi mantida constante, por meio de pesagens efetuadas periodicamente. As amostras controle constaram de solo sem aplicação do herbicida. Com 30, 60, 120, 180 e 255 dias de incubação, amostras foram retiradas para avaliação da degradabilidade do herbicida, através de quantificação por cromatografia gasosa.

O delineamento estatístico foi completamente casualizado com três repetições.

3.4.2 Efeito da temperatura

De cada amostra composta foram retiradas sub-amostras (150g), mantidas em Erlenmeyer. Após sete dias de incubação para equilíbrio da população microbiana, os solos receberam a suplementação de sulfentrazona na concentração de campo. Estas sub-amostras foram incubadas a 15, 30 e 40°C. A umidade foi ajustada para 70% da capacidade de campo, devido aos resultados obtidos no ensaio descrito no item 4.1 e mantida constante durante todo o período experimental. Amostras de solo sem o herbicida foram incubadas como controle. Aos 14, 30, 60, e 120 dias de incubação, amostras foram retiradas para avaliação da degradabilidade do herbicida.

O delineamento estatístico foi completamente casualizado com três repetições.

3.4.3 Extração e purificação de sulfentrazona em amostras de solo

Ambos os procedimentos de extração e purificação foram validados e adaptados pelo Laboratório de Análise de Resíduos de Pesticidas da Embrapa Meio Ambiente, utilizando a metodologia de Chen (2003).

3.4.3.1 EXTRAÇÃO

A amostra de solo (10g) foi submetida à extração em sistema de refluxo, utilizando-se 150mL da solução de acetona e ácido clorídrico 0,25mol L⁻¹ (3:1), por 1 hora. Após atingir temperatura ambiente, as amostras foram filtradas em funil de Buchner a vácuo, em filtro Whatman N° 1. A fração líquida foi quantitativamente transferida para um balão de fundo redondo (250mL), sendo então, submetida ao processo de rotaevaporação (40°C), para redução de seu volume a 25mL. O volume final foi ajustado para 100mL com água bidestilada.

3.4.3.2 PURIFICAÇÃO

Foram realizadas extrações em coluna, em duas diferentes fases adsorventes (C₈ e sílica gel, ambos de 500mg), utilizando-se sistema Manifold. Alíquotas de 25mL da

amostra foram submetidas ao processo de purificação, inicialmente na fase C₈, pré – condicionada com acetato de etila e hexano, sendo o analito de interesse retido na fase adsorvente. Eluiu-se o analito para a coluna de sílica gel, utilizando-se uma mistura de acetato de etila-hexano (3:1, v/v), sendo então, recolhido após eluição com acetato de etila. O solvente de eluição foi evaporado até próximo à secura, utilizando-se um sistema de evaporação sob fluxo de nitrogênio (Concentrador Tecnal; modelo TE 194), a 45°C. A amostra foi ressuspensa para um volume final de 5mL em acetona.

3.4.4 Identificação e quantificação de sulfentrazone via cromatografia gasosa

3.4.4.1 CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As amostras foram analisadas por cromatografia gasosa, utilizando-se cromatógrafo a gás Agilent, modelo 6890, dotado de sistema de injeção splitless, (temperatura de 250°C), e detector de captura de elétrons (μ ECD com temperatura ajustada a 300°C). O volume injetado foi de 1 μ L. A separação do analito foi feita em coluna megabore, DB 608 (30 m x 0,53 mm x 0,83 μ m) com fluxo de nitrogênio de 16mL min.⁻¹ e temperatura do forno 180°C por 1 min., seguida de rampa de aquecimento a 20° C min.⁻¹ até 250°C e 5°C min.⁻¹ até 260°C .

3.4.4.2 DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO

O limite de detecção (menor concentração que o analito pode ser identificado, com 95% de certeza) foi determinado nas condições analíticas estabelecidas para análise de sulfentrazone, via cromatografia gasosa. Soluções padrões do herbicida, em diferentes concentrações (intervalo de 0,01 a 0,05mg L⁻¹), foram preparadas pela técnica de diluições sucessivas, a partir da solução padrão de sulfentrazone (FMC Química do Brasil, grau técnico, 91,93 % de pureza) a 1000mg L⁻¹, com grau de pureza corrigido para 100%. O solvente acetona (grau PR) foi utilizado para a obtenção das soluções. Posteriormente foram feitas cinco injeções de cada concentração da solução padrão do herbicida, e o limite de detecção foi estabelecido por análise estatística dos resultados obtidos nas injeções cromatográficas.

3.4.4.3 RECUPERAÇÕES E DESEMPENHO DO MÉTODO

A eficiência da metodologia, estabelecida para a determinação de resíduos de sulfentrazona em amostras de solo, foi avaliada fazendo-se experimentos de recuperação, que consistiram em estabelecer a fração do analito presente na amostra que de fato pode ser determinada através do método analítico empregado. Uma quantidade conhecida do herbicida foi adicionada às matrizes não contaminadas (amostras testemunha), sendo então submetidas ao procedimento de extração, purificação e análise do herbicida. Os níveis de fortificação testados foram $0,05\text{mg Kg}^{-1}$ e $0,7\text{mg Kg}^{-1}$. Foi considerado como faixa de aceitabilidade valores de recuperação compreendidos entre 70 e 120%. Amostras testemunha e amostras em branco foram submetidas aos mesmos procedimentos, para verificar a existência de interferentes nas matrizes estudadas e nos materiais e reagentes utilizados.

3.4.4.4 QUANTIFICAÇÃO

Para corrigir possíveis alterações na resposta do detector de captura de elétrons, para cada cinco amostras, nova curva de calibração foi efetuada.

Os dados de resíduos aqui apresentados foram calculados por regressão linear das curvas de calibração obtidas com soluções padrão de sulfentrazona, versus a resposta (altura, área do pico) obtida no cromatograma. Nas concentrações trabalhadas a resposta do equipamento é linear obedecendo a Equação 4:

$$\text{Equação 4: } y = b + m.x$$

Onde as constantes b (interseção) e m (coeficiente de regressão) são encontradas através da regressão linear no intervalo observado, x é a quantidade do composto injetado em nanograma (ng), e y é a resposta do detector.

As curvas foram feitas com cinco pares de concentração x resposta e foram obtidas para cada determinação analítica executada.

A quantidade em ppm (mg kg^{-1}) de sulfentrazona nas amostras foi, então, calculada segundo a Equação 5:

$$\text{Equação 5: } \text{mg kg}^{-1} = \frac{(x \mu\text{g}) (\text{vol.f.}) (\text{f.dil.})}{(m.) (\text{vol. inj.})}$$

Onde:

- ✓ $x = y - b / m$
- ✓ vol.f. = volume final no qual são dissolvidas as amostras antes da análise cromatográfica (mL).
- ✓ f. dil. = fator de diluição das amostras.
- ✓ m = massa da amostra tomada para a análise, em grama.
- ✓ vol. inj. = volume injetado no cromatógrafo em μL .

Nas amostras fortificadas a percentagem de recuperação foi calculada da seguinte maneira (Equação 6):

$$\text{Equação 6: } \% \text{ de recuperação} = \frac{\text{ppm encontrado (mg kg}^{-1}) \times 100}{\text{ppm adicionado (mg kg}^{-1})}$$

3.5 Detecção do metabólito 3-hidroximetilsulfentrazona

O padrão de 3-hidroximetilsulfentrazona utilizado para análise qualitativa das amostras foi obtido mediante a metabolização da sulfentrazona por camundongos. O procedimento foi validado e adaptado pelo Laboratório de Resíduos da Embrapa, utilizando a metodologia de Leung *et al.* (1991).

A fase orgânica (acetona) das amostras purificadas foi evaporada utilizando-se um sistema de evaporação sob fluxo de nitrogênio (Concentrador Tecnal - TE 194), a 45°C. As amostras foram ressuspensas em acetonitrila, e analisadas em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) sob as seguintes condições: cromatógrafo Shimadzu, coluna fase reversa C18, fluxo 1mL min^{-1} , temperatura ambiente, detecção por conjunto de fotodiodos, UV 254nm, gradiente 24:75 a 60:40 em 60 minutos, sendo a fase móvel composta por acetonitrila e ácido acético 0,5 %.

3.6 Seleção e isolamento de microrganismos degradadores

Foram isolados microrganismos das amostras de solo com e sem herbicida. Em Erlenmeyers foram pesados 10g de cada solo e adicionados 90mL de água. Após agitação manual, procedeu-se as diluições em série. As diluições foram feitas com água destilada autoclavada, precedidas do plaqueamento de 0,1mL das diluições 10^{-2} ; 10^{-3} e 10^{-4} para o isolamento de bactérias, fungos e actinomicetos, nos respectivos meios de cultura, com o uso de pérolas de vidro.

O isolamento de bactérias foi feito utilizando-se o meio Czapek (1000mL água; 3g NaNO_3 ; 1g K_2HPO_4 ; 0,5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,5g KCl ; 0,01g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 30g sacarose; 16g ágar). Para o isolamento de actinomicetos utilizou-se o meio amido-caseína (1000mL água; 10g amido; 0,3g caseína; 0,01g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,05g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2g K_2HPO_4 ; 2g NaCl ; 2g KNO_3 ; 16g ágar). E para o isolamento de fungos, o meio de Martin (1000mL água; 0,03g rosa bengala; 20g dextrose; 1g KH_2PO_4 ; 0,5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 5g peptona; 16g ágar). Os meios de cultura foram autoclavados por 20 minutos a 121°C e 1 atm. Os isolamentos procedentes de solo com o herbicida foram realizados em meios de cultura suplementados com sulfentrazona ($0,7\mu\text{g mL}^{-1}$) como única fonte de energia, o qual foi adicionado ao meio de cultura após a autoclavagem.

Após a inoculação as placas foram mantidas sob condição de incubação a 27°C .

Após o isolamento os fungos foram mantidos em meio Sabourad (1000mL água; 10g peptona; 40g D(+) glucose; 15g ágar) até a identificação.

As colônias bacterianas foram contadas com 3 dias de crescimento. Os actinomicetos foram contados com 2 e 7 dias de crescimento, nos meios com e sem adição de sulfentrazona respectivamente, enquanto o crescimento fúngico foi avaliado com 3 dias no solo LVE, e para os solos LVA e AVA com 17 e 8 dias, nos meios com e sem adição de sulfentrazona respectivamente.

Fez-se um isolamento visando a seleção de bactérias tolerantes, presentes nos solos em estudo, a doses maiores do herbicida. Este foi realizado em meio de cultura Czapek líquido, utilizando as concentrações de 2,13; 4,22 e $7,0\mu\text{g mL}^{-1}$ de sulfentrazona. Após diluição em série das amostras de solo, alíquotas de 1mL das suspensões das diluições 10^{-1} foram transferidas para Erlenmeyers contendo 99mL de meio de cultura líquido. Após 3

dias de crescimento foram retiradas alíquotas de 1mL, as quais foram transferidas para novos Erlenmeyers contendo 99mL de meio de cultura Czapek. Esse processo foi repetido e após 3 dias, procedeu-se as diluições em série, transferindo-se alíquota de 1mL da suspensão (10^{-1}) a um tubo de ensaio contendo 9mL de água destilada, e assim sucessivamente até a diluição 10^{-4} . Alíquotas (0,1mL) das diluições 10^{-2} ; 10^{-3} e 10^{-4} foram plaqueadas em meio Czapek sólido com as mesmas doses do herbicida utilizadas para o meio líquido, com o uso de pérolas de vidro. Os procedimentos foram conduzidos sob condições assépticas. Após a inoculação as placas foram mantidas sob incubação a 27°C.

Após o quarto dia de crescimento procedeu-se a contagem das colônias formadas. Foram isoladas e purificadas colônias referente a cada solo, de acordo com diferenças morfológicas visuais. Para purificação fez-se o teste de Gram concomitante a repicagens contínuas com estriamentos em 4 quadrantes em placa de Petri, mantendo-se o meio de cultura original de crescimento.

O teste de Gram consiste em um esfregaço da cultura sobre uma lâmina, que após ser fixado por 4 passagens sobre o fogo, foi submetido a coloração com cristal violeta (2g cristal; 20mL etanol; 0,8g oxalato de amônio; 80mL água destilada) seguido por lugol (1g iodina; 2g iodeto de potássio; 100mL água destilada), ambos por 1 minuto. Posteriormente lavou-se com etanol 95% (95mL etanol, 5mL água destilada) por 30 segundos, seguido de uma coloração final com safranina (0,25g safranina; 10mL etanol 95%; 90mL água destilada) por 10 segundos. A lâmina foi observada em microscópio óptico após secagem em temperatura ambiente (MÉTODOS, 2001).

3.7 Caracterização dos microrganismos tolerantes ao herbicida sulfentrazone

3.7.1 Identificação de linhagens bacterianas

Identificou-se as bactérias tolerantes a doses maiores do herbicida pela análise do perfil de ácidos graxos da membrana celular.

As bactérias a serem identificadas foram cultivadas em meio Trypticase Soy Broth, TSB[®] sólido (30g TSB; 16g ágar; 1000mL água), pelo método de estrias cruzadas, e incubadas a $28\pm 1^\circ\text{C}$, por 24 ± 2 horas. Decorrido este tempo, foram coletados,

aproximadamente, 40mg (quatro a seis alças com capacidade para 10µL) da cultura no 3º quadrante e transferidas para tubos *Kimax* (100 X 13mm). Depois, foram executadas quatro etapas para extração dos ácidos graxos celulares, sendo elas: saponificação, metilação, extração e lavagem (MICROBIAL, 2001).

3.7.1.1 SAPONIFICAÇÃO

Foi adicionado 1mL do reagente 1 (45g NaOH, 150mL metanol, 150mL água destilada deionizada) aos tubos contendo as células. Os tubos foram fechados vigorosamente, agitados durante 5 segundos no *vortex* e colocados em banho-maria a 95-100°C, por 5 minutos. Em seguida foram resfriados em água, e novamente agitados no *vortex* por 5-10 segundos, retornando ao banho-maria por mais 25 minutos.

3.7.1.2 METILAÇÃO

Os tubos foram resfriados em água, sendo posteriormente adicionados 2mL do reagente 2 (325mL HCL 6N, 275mL Metanol) e agitados por 5-10 segundos em *vortex*. Posteriormente foram colocados em banho-maria à 80°C±1, por 10 minutos.

3.7.1.3 EXTRAÇÃO

Os tubos foram novamente resfriados em água e a estes foi adicionado 1,25mL do reagente 3 (200mL hexano; 200mL terc-butil metil éter) e colocados no rotator clínico (*Fisher M246*) por 10 minutos. Os tubos foram fechados e com auxílio da pipeta de Pasteur, foi descartada a fase inferior (aquosa).

3.7.1.4 LAVAGEM

Foram adicionados 3mL do reagente 4 (10,8g NaOH; 900mL água destilada deionizada) aos tubos e estes foram agitados no rotator clínico por mais 5 minutos. Os tubos foram centrifugados a 4350g por 3 minutos, e aproximadamente 2/3 (500µL) da fase superior (orgânica) foram pipetadas e colocadas nos tubos *vial*. Em seguida, os tubos *vial* foram acondicionados no cromatógrafo gasoso, para a leitura das amostras.

3.7.1.5 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

Foi utilizado o cromatógrafo gasoso com injetor automático e detector Flame Ionization Detector (FID), marca Agilent, modelos 6850 e 7683, respectivamente. A interface foi obtida pelos programas ChemStation A.09.01 [1206] e MIDI Sherlock Microbial Identification System 4.0. A biblioteca selecionada foi a TSBA 40.

O tempo da corrida de cada amostra foi de 20.7 minutos. O resultado foi expresso por meio de um cromatograma e um relatório elaborado pelos softwares, que contêm área de picos e tempo de retenção nomeados. O resultado final foi apresentado de acordo com a similaridade entre o banco de dados e as áreas nomeadas, identificando, dessa forma, o microrganismo em questão. No caso de duas espécies diferentes serem nomeadas para a bactéria considerou-se o resultado significativo ao haver uma diferença de similaridade de 0,1 entre elas (MICROBIAL, 2001).

3.7.2 Identificação de linhagens fúngicas

Os fungos foram observados quanto as suas características morfológicas (coloração e conformação micelial), e submetidos à microscopia óptica. Para facilitar a identificação algumas linhagens foram submetidas à microscopia eletrônica de varredura (MEV), sendo esta também aplicada para ilustração das linhagens tolerantes ao herbicida.

Para visualização em MEV, adaptou-se a metodologia de Nogueira e Barroso (1998) fixando-se os fragmentos fúngicos em solução de glutaraldeído 2% e tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7,3, lavou-se 3 vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1M por 10 minutos. Posteriormente fixou-se o fragmento em OsO₄ 1% (tamponado em cacodilato de sódio 0,1M; pH 7,3) por 60 minutos e lavou-se 5 vezes em água destilada. Procedeu-se, então, a desidratação em série crescente de acetona (15, 30, 50, 75, 80, 95 e 100%), repetindo-se 3 vezes a última desidratação, com duração de 15 minutos cada uma. As amostras foram secas no Ponto Crítico (Emitech - K850), sendo, posteriormente metalizadas em metalizador (Emitech - K550) (NOGUEIRA; BARROSO 1998).

A determinação do gênero das linhagens fez-se mediante o uso de manual de identificação (BARNETT; HUNTER, 1972).

3.8 Análise estatística

Os efeitos de umidade e período de incubação sobre a quantidade remanescente de sulfentrazona (QRSulf) foram investigados utilizando-se análise de variância e testes F de Snedecor (MONTGOMERY, 1991). A mesma análise foi realizada para avaliar o efeito da temperatura sobre a QRSulf. A influência da temperatura e da umidade sobre a taxa média de degradação foi quantificada pela QRSulf ($\mu\text{g g}^{-1}$) na última data de avaliação, pois a quantidade inicial ($0,7\mu\text{g g}^{-1}$) era constante para todos os tratamentos. Para isso foram realizados testes **t** para contrastes entre as médias das QRSulf em diferentes níveis de temperatura e umidade.

As análises de variância e testes **t** para contrastes foram realizadas utilizando o Proc MIXED (The Mixed Procedure) do SAS System (SAS, 2004).

Quando as diferenças entre as médias de QRSulf foram significativas para algum dos contrastes avaliados, escolheu-se o nível do fator (temperatura ou umidade) com menor QRSulf (maior taxa de degradação) para ajuste de modelos de degradação e estimação de meia-vida (para os casos onde a QRSulf foi inferior a 50% na última data de avaliação).

Foram ajustados modelos não lineares do tipo exponencial negativo para descrever o padrão de degradação ao longo do tempo e estimação da meia-vida da sulfentrazona (Equação 7). Quando o modelo não linear não apresentou bom ajuste, utilizou-se uma aproximação linear (Equação 8).

$$\text{Equação 7: } Q(t) = 1 - \alpha \cdot \exp(-\beta \cdot t) + \varepsilon; \alpha > 0; \beta > 0$$

$$\text{Equação 8: } Q(t) = 1 - \beta \cdot t + \varepsilon; \beta > 0$$

Onde $Q(t)$ é a porcentagem de sulfentrazona remanescente no tempo t , α é a degradação máxima atingida, β é um parâmetro relacionado com a velocidade da degradação na fase decrescente, e ε é o erro aleatório associado a cada observação. A meia-vida corresponde ao valor t , para o qual o valor predito $Q(t)$ é igual a 0,50. No modelo não linear do tipo exponencial negativo foi utilizado o método de Gauss-Newton (BARD, 1970), utilizando o Proc NLIN do SAS System (SAS, 2004).

O efeito do herbicida sobre a microbiota dos solos, mensurado pelo número da unidade formadora de colônias (UFC), foi avaliado pelo teste de Student, com aproximação

de Satterthwaite (1946). Utilizou-se o Proc TTEST (TTEST procedure) do SAS System (SAS, 2004).

4 RESULTADOS

4.1 Identificação e quantificação de sulfentrazone via cromatografia gasosa

Nas condições estabelecidas de análise cromatográfica, a sulfentrazone foi identificada como sendo o pico que apresenta tempo de retenção médio de 8,8 min. O tempo necessário para cada análise foi de 13,5 minutos.

A Figura 1 apresenta um cromatograma obtido para uma solução padrão do herbicida.

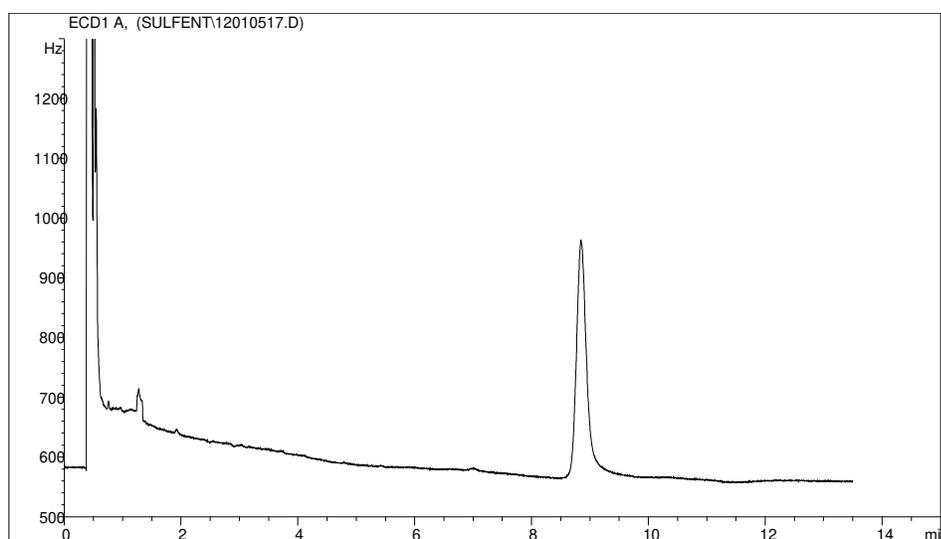


Figura 1 - Cromatograma obtido para sulfentrazone via cromatografia gasosa.

A Figura 2 apresenta a comparação entre os cromatogramas de uma amostra testemunha e fortificada, de uma mesma matriz (solo), mostrando que não ocorre interferência de componentes da matriz na região de detecção do analito.

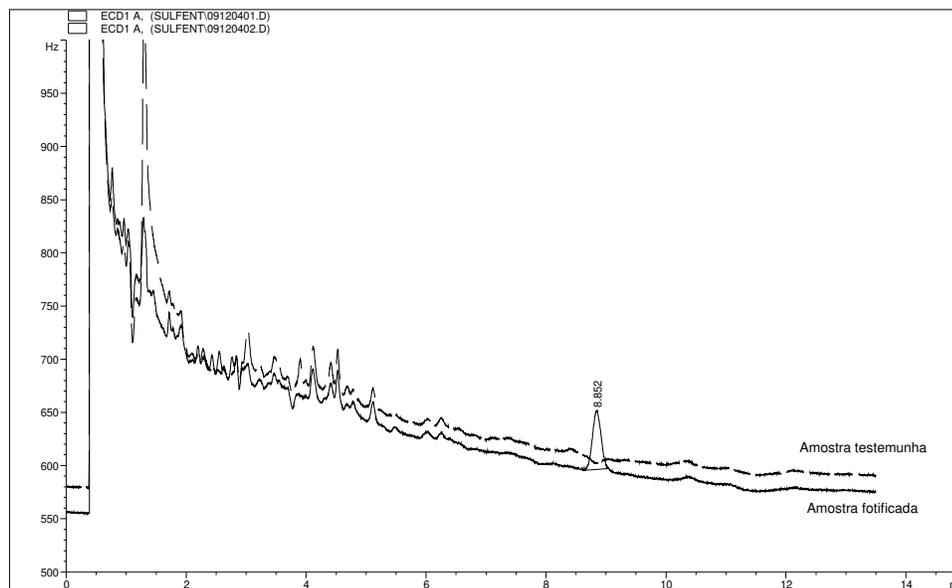


Figura 2 - Cromatogramas obtidos para amostra de solo testemunha e fortificada no detector μ ECD.

O limite de detecção obtido para a determinação do herbicida nas condições analíticas estabelecidas foi de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$. Todos os experimentos resultaram em valores de recuperação inseridos na faixa de aceitabilidade estabelecida (entre 70 e 120%). A Tabela 2 apresenta os valores de recuperação provenientes da análise das amostras fortificadas.

Tabela 2 - Níveis de fortificação e porcentagem de recuperação de sulfentrazone em amostras de solo fortificadas.

Matriz	Nível de Fortificação	% de Recuperação
Solo	$0,05 \text{ mg Kg}^{-1}$	106
Solo	$0,7 \text{ mg Kg}^{-1}$	120

As curvas de calibração obtidas para cada injeção de amostras não apresentaram coeficiente de correlação menor do que 0,99. A Figura 3 apresenta uma das curvas de calibração aplicadas.

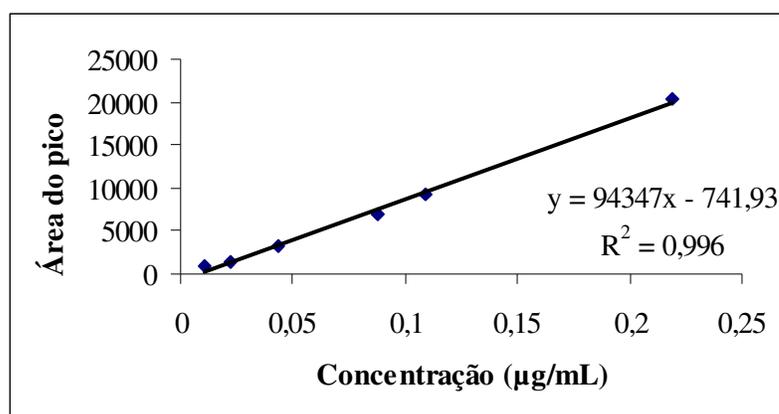


Figura 3 - Curva de calibração obtida em função da concentração das soluções padrões do herbicida e as respectivas áreas dos picos.

4.2 Caracterização dos solos

Os solos em estudo apresentaram as características químicas e físicas descritas nas Tabelas 3 e 4. A umidade na capacidade de campo (CC) para os solos LVE, LVA e AVA foi igual a 0,401; 0,303 e 0,376g g⁻¹ de solo respectivamente.

Tabela 3 - Dados referentes a análise química dos solos LVE, LVA e AVA

Solo	V %*	Alumí- nio (mmol dm ⁻³)	Acidez potencial (mmol dm ⁻³)	Capacidade de troca de cátions (mmol dm ⁻³)	Soma de bases (mmol dm ⁻³)	Matéria orgânica (g dm ⁻³)	PH em água / e CaCl ₂
LVE	5	19	88	93,2	4,8	21	5,01 / 4,02
LVA	46	1	28	61,1	23,3	16	6,22 / 4,90
AVA	18	11	58	71	13	21	5,44 / 4,34

*Saturação de bases.

Tabela 4 - Análise granulométrica dos solos LVE, LVA e AVA.

Solo	Argila (g Kg ⁻¹)	Silte (g Kg ⁻¹)	Areia total (g kg ⁻¹)	Classificação textural
LVE	373	162	466	Argiloarenosa
LVA	444	100	456	Argiloarenosa
AVA	221	98	681	Franco-argiloarenosa

4.3 Efeito da umidade na biotransformação de sulfentrazona

Observou-se um período de adaptação (fase lag) dos microrganismos ao herbicida, antes do início da degradação. Este período variou de acordo com o tipo de solo e teor de umidade (Tabela 5). No solo LVE a 100%CC não foi verificada a degradação do herbicida até 255 dias de incubação.

A velocidade de degradação diminuiu em quase todos os tratamentos, a partir dos 180 dias de incubação. Somente no caso do solo AVA com 30 e 70 % da CC, esta diminuição ocorreu já a partir dos 120 dias de incubação (Tabela 5).

Segundo os dados observados, a taxa de degradação do herbicida sulfentrazona foi maior para o solo AVA (76,39%), seguida do LVA (69,26%) e LVE (40,83%), com 255 dias de incubação (Tabela 5), considerando a umidade de 70%CC para os dois primeiros solos e a de 30%CC para o último.

Tabela 5 – Quantidade remanescente de sulfentrazona (%) no decorrer do tempo nos solos AVA, LVA e LVE sob diferentes teores de umidade (%CC), e período (dias) correspondente a fase lag da microbiota presente nos respectivos solos.

Solo	Umidade (% CC)	30 dias	60 dias	120 dias	180 dias	255 dias	Fase lag
AVA	30	128,45	110,58	59,17	51,36	37,54	> 60 e <120
AVA	70	88,77	88,18	57,64	52,91	23,61	> 60 e <120
AVA	100	85,12	90,93	85,58	70,97	63,11	> 60 e <120
LVA	30	62,08	68,54	55,16	36,06	38,95	< 30
LVA	70	81,11	88,61	56,74	33,06	30,74	> 60
LVA	100	88,77	85,54	71,18	51,83	49,9	> 30 e <60
LVE	30	119,65	105,07	76,31	55,14	59,17	> 60 e <120
LVE	70	90,97	79,53	99,47	60,21	63,91	> 30 e <60
LVE	100	123,11	160,06	190,64	73,71	90,12	>255

Para o fator umidade não houve efeito sobre a degradação de sulfentrazona ($p > 0,28$; Tabela 6 e Tabela 7).

Tabela 6 - Análise de variância da concentração remanescente de sulfentrazona ($\mu\text{g g}^{-1}$), sob diferentes teores de umidade, nos solos AVA, LVA e LVE.

Solo	Fonte de variação	Estatística (valor F)	Valor p
AVA	Umidade	0,73	0,5212
	Data	6,93	0,0007
	Data*Umidade	0,95	0,4929
LVA	Umidade	1,75	0,2512
	Data	8,92	0,0001
	Data*Umidade	0,37	0,9249
LVE	Umidade	23,54	<0,0001
	Data	14,42	<0,0001
	Data*Umidade	3,86	0,0032

Tabela 7 - Estimativas de contrastes entre as concentrações remanescentes médias de sulfentrazona ($\mu\text{g g}^{-1}$) em diferentes teores de umidade, aos 255 dias, nos solos AVA, LVA e LVE.

SOLO	Contraste entre médias sob diferentes teores de umidade (% CC)	Estimativa do contraste ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Erro padrão da estimativa ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valor p*
AVA	30% vs 70%	-0,01087	0,1829	0,9531
	30% vs 100%	-0,1373	0,1829	0,4594
	70% vs 100%	-0,1264	0,1829	0,4954
LVA	30% vs 70%	0,02097	0,1200	0,8625
	30% vs 100%	-0,1104	0,1200	0,3652
	70% vs 100%	-0,1314	0,1200	0,2828
LVE	30% vs 70%	-0,0355	0,1234	0,7755
	30% vs 100%	-0,1299	0,1234	0,3007
	70% vs 100%	-0,0944	0,1234	0,4500

* probabilidade de erro tipo I associada ao teste t para contrastes.

4.4 Efeito da temperatura na biotransformação de sulfentrazone

Houve efeito da temperatura e do tipo de solo no período de adaptação dos microrganismos ao herbicida, antes do início da degradação (Tabela 8).

Não foi possível observar alteração na velocidade de degradação do herbicida para o solo AVA a 15 e 40°C, e para o solo LVE a 15°C, devido a fase lag, observada sob estas condições, ser maior do que 60 dias e o experimento terminar aos 120 dias. Para os demais tratamentos houve aumento na velocidade de degradação a partir de 60 dias de incubação (Tabela 8).

Segundo os dados observados, a taxa de degradação foi maior para o solo LVE (63,24%), seguida do LVA (55,02%) e AVA (44,14%), com 120 dias de incubação. Estas foram obtidas a 40, 30 e 15°C respectivamente (Tabela 8).

Tabela 8 – Quantidade remanescente de sulfentrazone (%) no decorrer do tempo nos solos AVA, LVA e LVE sob diferentes níveis de temperatura (°C), e período (dias) correspondente a fase lag da microbiota presente nos respectivos solos.

Solo	Temperatura (°C)	14 dias	30 dias	60 dias	120 dias	Fase lag
AVA	15	123,47	87,5	106,15	55,86	> 60
AVA	30	92,37	76,44	81,63	76,14	> 14 e <30
AVA	40	126,35	101,37	91,63	75,68	> 60
LVA	15	75,1	80,01	78,84	63,8	< 14
LVA	30	82,7	60,78	78,33	44,98	< 14
LVA	40	90,48	84,94	79,96	68,26	> 14 e <30
LVE	15	113,37	80,61	100,64	63,06	>60
LVE	30	87,46	65,78	85,8	43,27	> 14 e <30
LVE	40	79,47	78,23	72,48	36,76	< 14

Para o fator temperatura houve efeito sobre a degradação de sulfentrazone para os solos LVE e LVA ($p < 0,013$; Tabela 9). Conforme a análise de contrastes, a degradação do herbicida no solo LVE foi maior nas temperaturas de 30 e 40°C, que não diferiram entre si.

Enquanto que no solo LVA a degradação foi maior a 30°C. O solo AVA apresentou uma evidência onde $p < 0,17$ para os contrastes 15 vs 30°C e 15 vs 40°C (Tabela 10).

Tabela 9 - Análise de variância da concentração remanescente de sulfentrazona ($\mu\text{g g}^{-1}$), sob diferentes temperaturas, nos solos AVA, LVA e LVE.

Solo	Fonte de variação	Estatística (valor F)	Valor p
AVA	Temperatura	2,76	0,1416
	Data	11,39	0,0002
	Data*Temperatura	1,84	0,1481
LVA	Temperatura	5,24	0,0130
	Data	8,49	0,0005
	Data*Temperatura	1,49	0,2238
LVE	Temperatura	10,54	0,0005
	Data	21,68	<0,0001
	Data*Temperatura	1,04	0,4266

Tabela 10 - Estimativas de contrastes entre as concentrações remanescentes médias de sulfentrazona ($\mu\text{g g}^{-1}$) em diferentes temperaturas, aos 120 dias, nos solos AVA, LVA e LVE.

Solo	Contraste entre médias sob diferentes temperaturas (°C)	Estimativa do contraste ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Erro padrão da estimativa ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valor p*
AVA	15° vs 30°	-0,1421	0,09631	0,1533
	15° vs 40°	-0,1388	0,09631	0,1626
	30° vs 40°	0,003267	0,09631	0,9732
LVA	15° vs 30°	0,1317	0,06157	0,0428
	15° vs 40°	-0,03117	0,06157	0,6173
	30° vs 40°	-0,1629	0,06157	0,0142

Solo	Contraste entre médias sob diferentes temperaturas (°C)	Estimativa do contraste ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Erro padrão da estimativa ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Valor p*
LVE	15° vs 30°	0,1385	0,07402	0,0736
	15° vs 40°	0,1840	0,07402	0,0203
	30° vs 40°	0,04557	0,07402	0,5440

* probabilidade de erro tipo I associada ao teste t para contrastes.

4.5 Estimação da meia-vida

As estimativas de meia-vida de sulfentrazone para os solos AVA, LVA e LVE foram de 172,41; 146,52 e 91,63 respectivamente (Tabela 11). Primeiramente estimou-se o valor de meia-vida para os solos sob o tratamento que proporcionou uma maior degradação de sulfentrazone, segundo as análises estatísticas. Assim foram ajustados modelos para os solos LVE (40°C; Figura 4) e LVA (30°C; Figura 5), ambos a 70%CC. Porém não foi possível calcular a meia-vida para este último. Optou-se, então, por ajustar modelos para este solo (Figura 6) e para o solo AVA (Figura 7) com dados advindos do ensaio de umidade a 70%CC, os quais mostraram uma taxa maior de degradação do herbicida.

Tabela 11 – Estimativas dos parâmetros alfa (a) e beta (b) dos modelos de degradação e respectivos valores estimados de meia vida do herbicida nos solos AVA, LVA e LVE, sob diferentes condições experimentais (níveis de temperatura e umidade).

Solo	Umidade (%)	Temperatura (°C)	F	Valor p^b	A	b	Meia vida (dias)
AVA ^a	70	27	226,79	<0,001	1,0000	0,0029	172,41
LVA	70	27	34,49	<0,001	1,2506	0,0034	146,52
LVA	70	30	147,38	<0,001	0,5000	0,0260	>120,00
LVE	70	40	164,63	<0,001	1,3456	0,0051	91,63

a) Para este solo foi ajustado um modelo linear. Neste caso o valor de a não foi estimado, mas fixado a priori (a=1).

b) Valor p relativo ao teste F para avaliação do ajuste do modelo proposto.

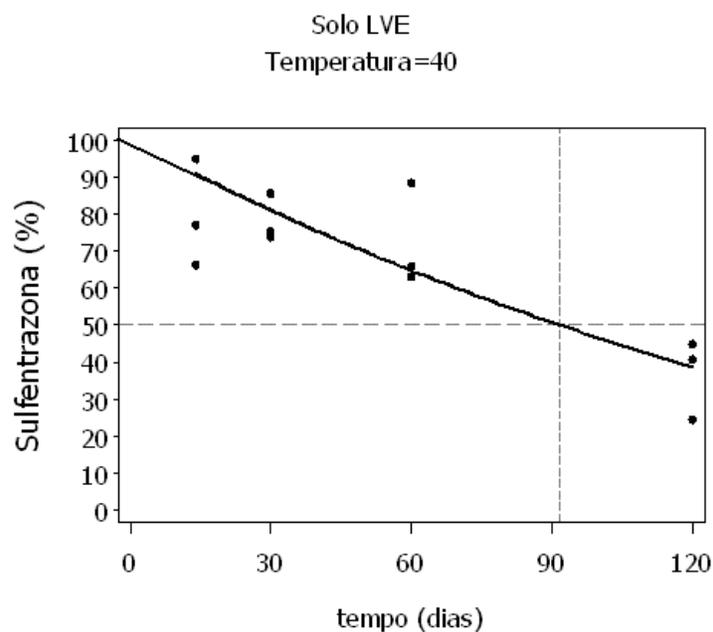


Figura 4 - Degradação de sulfentrazona ao longo do tempo no solo LVE a 40°C e 70%CC, sendo 50% do composto degradado aos 91,63 dias (— modelo exponencial negativo ajustado, ● valores observados).

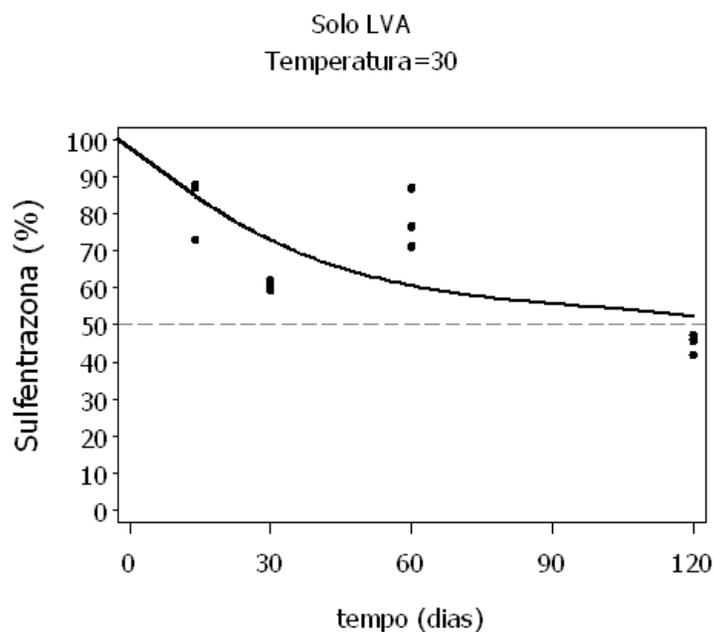


Figura 5 - Degradação de sulfentrazona ao longo do tempo no solo LVA a 30°C e 70%CC, sendo a meia-vida superior a 120 dias (— modelo exponencial negativo ajustado, ● valores observados).

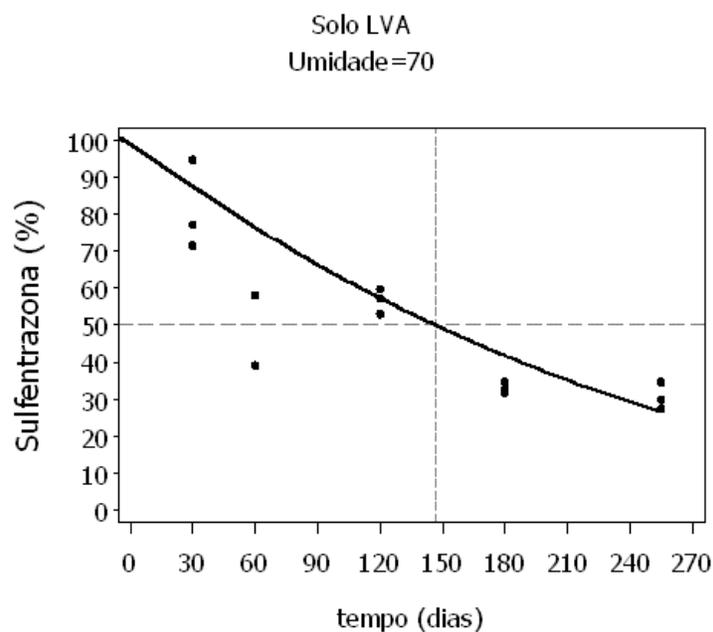


Figura 6 - Degradação de sulfentrazona ao longo do tempo no solo LVA a 70%CC e 27°C, sendo 50% do composto degradado aos 146,52 dias (— modelo exponencial ajustado, ● valores observados).

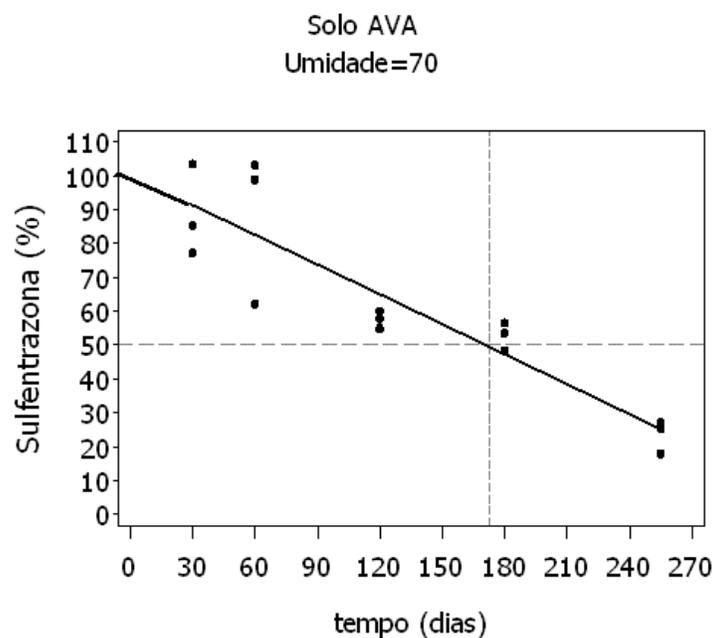


Figura 7 – Degradação de sulfentrazona no decorrer do tempo no solo AVA a 70%CC e 27°C, sendo 50% do composto degradado aos 172,41 dias (— modelo linear ajustado, ● valores observados).

4.6 Metabólito

Nas condições estabelecidas de análise cromatográfica, o metabólito 3-hidroximetilsulfentrazona (HMS) foi identificado como sendo o pico que apresenta tempo de retenção médio de 12,52 min (Figura 8). O tempo necessário para cada análise foi de 60 minutos. A análise foi desenvolvida por CLAE e detecção por arranjo de diodos em fase reversa com acetonitrila: ácido acético 0,5% (25:75) com gradiente em 45 min. para acetonitrila : ácido acético 0,5% (60:40) a um fluxo de 1 ml min^{-1} .

Os microrganismos presente nos solos foram capazes de metabolizar o herbicida. O metabólito HMS foi encontrado nas amostras de solo LVA a 30°C , AVA a 40°C , com 180 dias de incubação, e LVE a 27°C com 255 dias, ambos a 70% CC. O HMS também é o maior metabólito encontrado em plantas, onde ainda são formados o 3-desmetilsulfentrazona (DMS) e o ácido sulfentrazonacarboxílico (SCA).

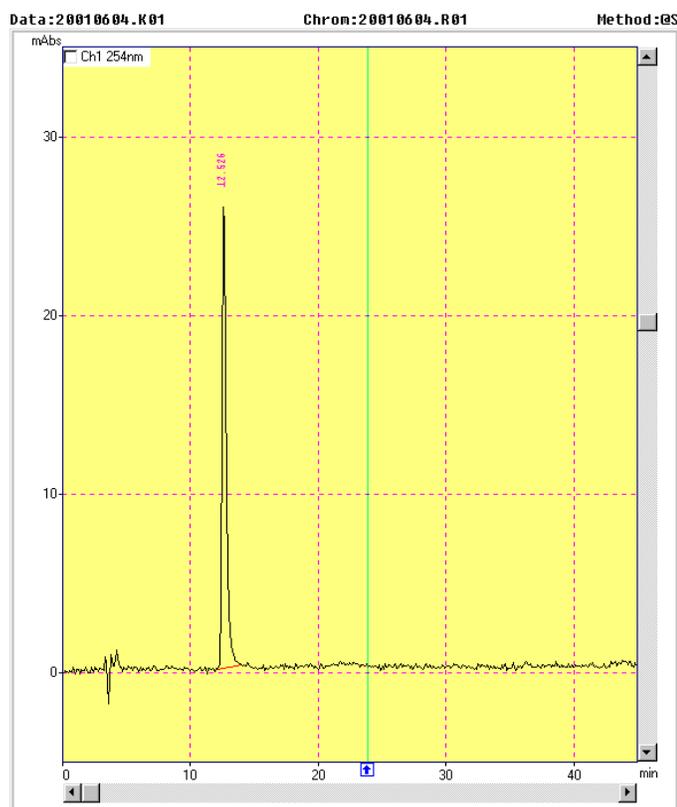


Figura 8 - Cromatograma de HMS obtido por CLAE.

4.7 Efeito do herbicida sobre os microrganismos

Houve efeito da ausência*presença do herbicida sobre o número de unidades formadoras de colônias (UFC) de actinomicetos nos três solos estudados. Para o crescimento de bactérias, somente o solo LVA apresentou baixa evidência do efeito do herbicida em UFC, enquanto para os solos AVA e LVA este efeito foi identificado na comunidade fúngica (Tabela 12).

Tabela 12 – Avaliação do efeito do herbicida sulfentrazone no número médio de unidades formadoras de colônias microbianas isoladas dos solos LVE, LVA e AVA, mediante aplicação do Teste *t* de Student.

Organismos	Solo	Sulfentrazone (0,7µg g ⁻¹)	média ^b (UFC)	Limite inferior ^b	Limite superior ^b	Valor p ^c
Actinomiceto	AVA	Ausente	303,33	116,885	489,78	
Actinomiceto	AVA	Presente	696,67	341,571	1051,76	
Actinomiceto	AVA	Diferença ^a	393,33			0,02393
Actinomiceto	LVA	Ausente	203,33	119,923	526,59	
Actinomiceto	LVA	Presente	753,33	414,239	1092,43	
Actinomiceto	LVA	Diferença	550,00			0,00727
Actinomiceto	LVE	Ausente	233,33	175,965	290,70	
Actinomiceto	LVE	Presente	523,33	312,060	734,61	
Actinomiceto	LVE	Diferença	290,00			0,02135
Bactéria	AVA	Ausente	1046,67	588,390	1504,94	
Bactéria	AVA	Presente	1440,00	960,877	1919,12	
Bactéria	AVA	Diferença	393,33			0,06325
Bactéria	LVA	Ausente	1233,33	795,721	1670,95	
Bactéria	LVA	Presente	1826,67	506,953	3146,38	
Bactéria	LVA	Diferença	593,33			0,18463
Bactéria	LVE	Ausente	433,33	225,001	641,67	
Bactéria	LVE	Presente	33,33	18,991	47,68	
Bactéria	LVE	Diferença	-400,00			0,01401

Organismos	Solo	Sulfentrazona (0,7µg g ⁻¹)	média ^b (UFC)	Limite inferior ^b	Limite superior ^b	Valor p ^c
Fungos	AVA	Ausente	22,33	-14,288	58,96	
Fungos	AVA	Presente	2,67	-0,202	5,54	
Fungos	AVA	Diferença	-19,67			0,14626
Fungos	LVA	Ausente	7,00	-3,828	17,83	
Fungos	LVA	Presente	2,00	-0,484	4,48	
Fungos	LVA	Diferença	-5,00			0,18019
Fungos	LVE	Ausente	11,33	-19,327	41,99	
Fungos	LVE	Presente	109,33	77,295	141,37	
Fungos	LVE	Diferença	98,00			0,00069

a) Diferença entre o número de UFC das amostras com e sem sulfentrazona.

b) Valor 1000 vezes menor do que o observado (divididos por 1000).

c) Valor p relativo ao teste t.

Conforme os resultados da análise estatística (Teste **t** de Student; Tabela 12), baseada nos microrganismos cultiváveis em meio de cultura (1% de 100 milhões g⁻¹ solo), nota-se que o crescimento de bactérias foi favorecido pelo herbicida no solo AVA (p=0,0632), e afetado negativamente no solo LVE (p=0,01410), enquanto no solo LVA não se observou diferença no crescimento nos solos com e sem herbicida (p=0,1846; Figura 9). O contrário ocorreu para o crescimento fúngico, o qual foi favorecido pelo herbicida no solo LVE (p=0,00069) não sendo afetado por ele nos solos LVA e AVA (p>0,14; Figura 10). O crescimento de actinomicetos foi estimulado na presença do herbicida em todos os solos (p<=0,02; Figura 9).

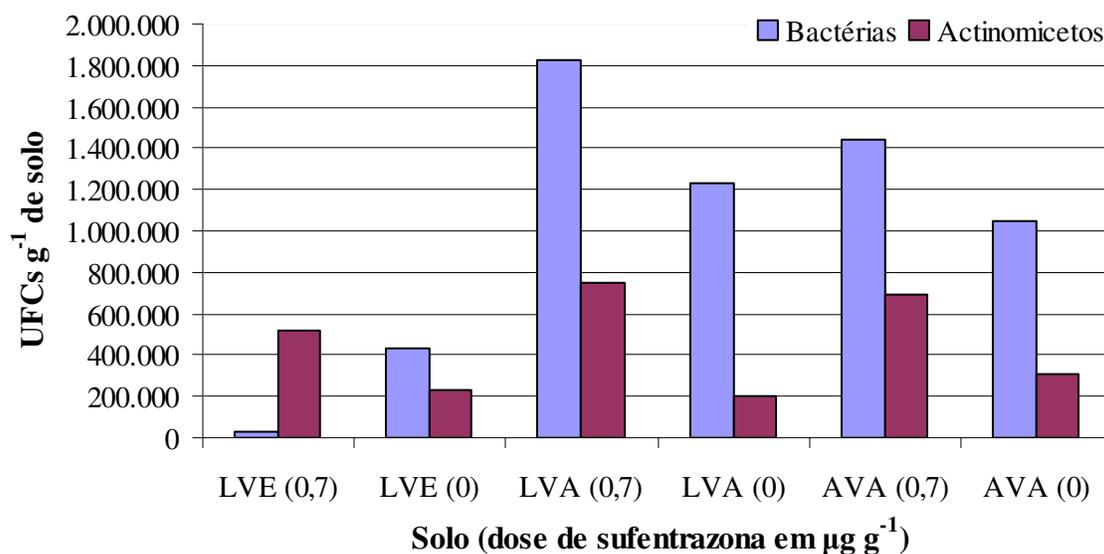


Figura 9 – Média da unidade formadora de colônia (UFC g⁻¹ solo) de bactérias e actinomicetos, contadas para os solos LVE, LVA e AVA com e sem o herbicida sulfentrazone (µg g⁻¹).

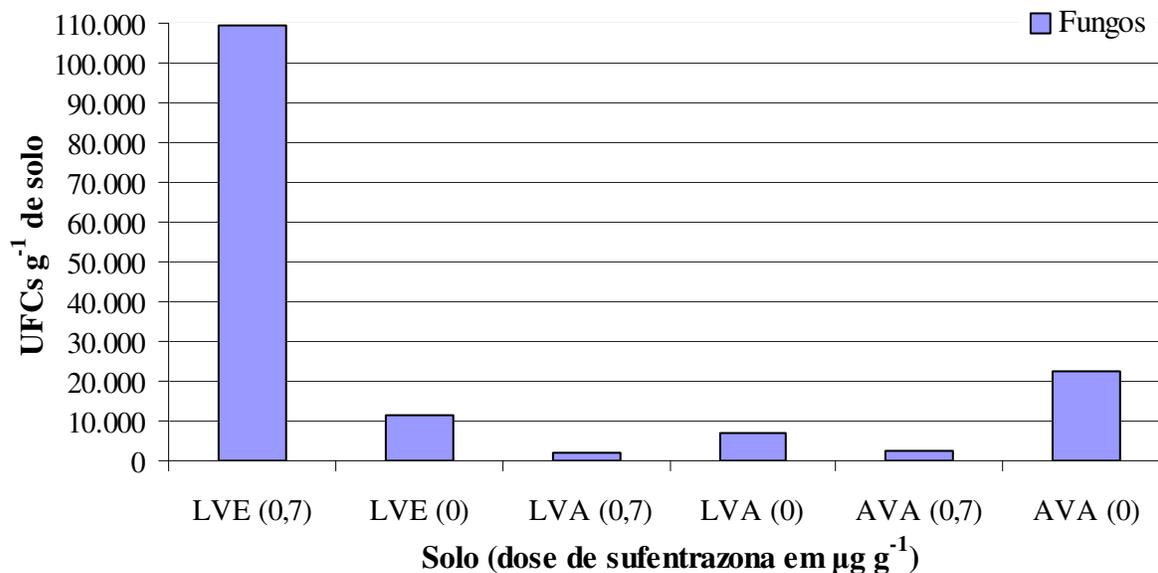


Figura 10 – Média da unidade formadora de colônia fúngica (UFC g⁻¹ solo), contadas para os solos LVE, LVA e AVA com e sem o herbicida sulfentrazone (µg g⁻¹).

No isolamento, visando seleção de bactérias tolerantes a doses maiores do herbicida, foram selecionadas bactérias dos tratamentos presentes na Tabela 13, onde está apresentado o crescimento bacteriano com 4 dias de incubação (UFC mL⁻¹).

Tabela 13 – Média da contagem de bactérias tolerantes a doses maiores do herbicida sulfentrazona (2,13; 4,22 e 7,0µg g⁻¹) isoladas dos solos LVE, LVA e AVA.

Solo	Sulfentrazona (µg g ⁻¹)	Diluição	UFC mL ⁻¹
AVA	7,0	10 ⁻³	2550000
LVE	2,13	10 ⁻²	22000
LVE	4,22	10 ⁻²	63000
LVA	2,13	10 ⁻³	>3000000
LVA	4,22	10 ⁻³	>3000000
LVA	7,0	10 ⁻³	>3000000

As bactérias isoladas do solo AVA e LVA foram capazes de crescer nos meios contendo 7,0µg mL⁻¹ de sulfentrazona. Para o solo LVE, houve um crescimento muito pequeno (< 25 UFC placa⁻¹, em diluição 10⁻²) nas doses 2,13 e 7,0µg mL⁻¹.

4.8 Identificação das linhagens microbianas degradadoras

4.8.1 Identificação de bactérias

Na Tabela 14 estão listadas as linhagens bacterianas selecionadas como degradadoras de sulfentrazona, pelo seu crescimento em dose até 10 vezes superior a dose de campo. Dentre elas, no solo LVE a espécie *Nocardia brasiliensis* (tolerante a dose 4,22µg mL⁻¹) foi encontrada em maior número. Enquanto no solo AVA foi a espécie *Acinetobacter calcoaceticus* (tolerante a dose 7,0µg mL⁻¹). Já no solo LVA se destacaram em número as espécies *Ralstonia pickettii* e *Rhizobium radiobacter* (tolerante a dose 7,0µg mL⁻¹).

Tabela 14 - Identificação de linhagens bacterianas por MIS, presente nos solos LVE, AVA e LVA, selecionadas em meios com concentrações crescentes de sulfentrazona como única fonte de energia.

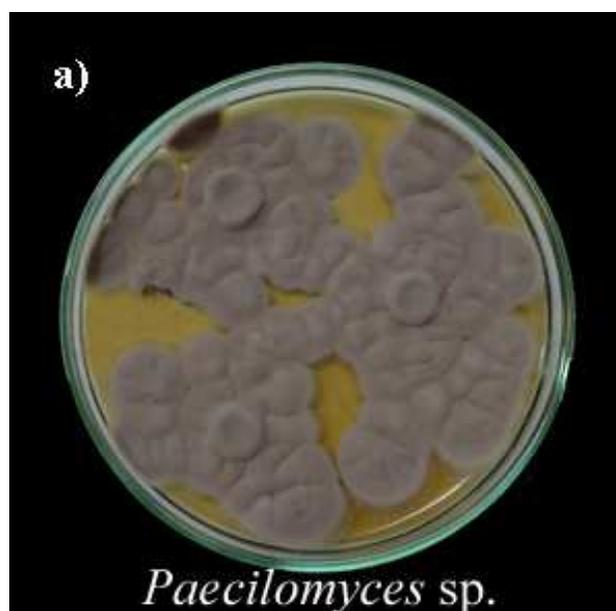
Solo/ nº do Isolado	Sulfentrazona ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Identificação	Índice de similaridade
LVE 9	2,13	<i>Nocardia pseudobrasiliensis</i>	0,521*
LVE 3	2,13	<i>Nocardia brasiliensis</i> GC, subgrupo B	0,481*
LVE 4	2,13	<i>Rhodococcus rhodnii</i>	0,283*
LVE 1	4,22	<i>Nocardia nova</i> ou <i>Nocardia brasiliensis</i> GC, subgrupo B	0,634 / 0,614
LVE 8	2,13	<i>Nocardia brasiliensis</i> GC, subgrupo B	0,546*
LVE 6	2,13	<i>Nocardia brasiliensis</i> GC, subgrupo B	0,521*
LVE 2B	4,22	<i>Nocardia brasiliensis</i> GC, subgrupo B	0,526*
LVE 7	2,13	<i>Nocardia brasiliensis</i> GC, subgrupo B	0,497*
LVE 2	4,22	<i>Gordonia-amarae</i> GC subgrupo B	0,497*
LVE 5	2,13	<i>Nocardia brasiliensis</i> GC, subgrupo B	0,378*
AVA3	7,0	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,827
AVA 5	7,0	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,771
AVA 8	7,0	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,785
AVA 6	7,0	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,814
AVA 7	7,0	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,791
AVA 2A	7,0	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> ou <i>Acinetobacter radioresistens</i>	0,773 / 0,705
AVA 2B	7,0	<i>Staphylococcus schleiferi</i>	0,465*
AVA 4	7,0	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,792
AVA 1	7,0	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	0,795
LVA 7	2,13	<i>Rhizobium radiobacter</i>	0,623
LVA 5	2,13	<i>Rhizobium radiobacter</i>	0,572*
LVA 4	2,13	<i>Ralstonia pickettii</i>	0,628

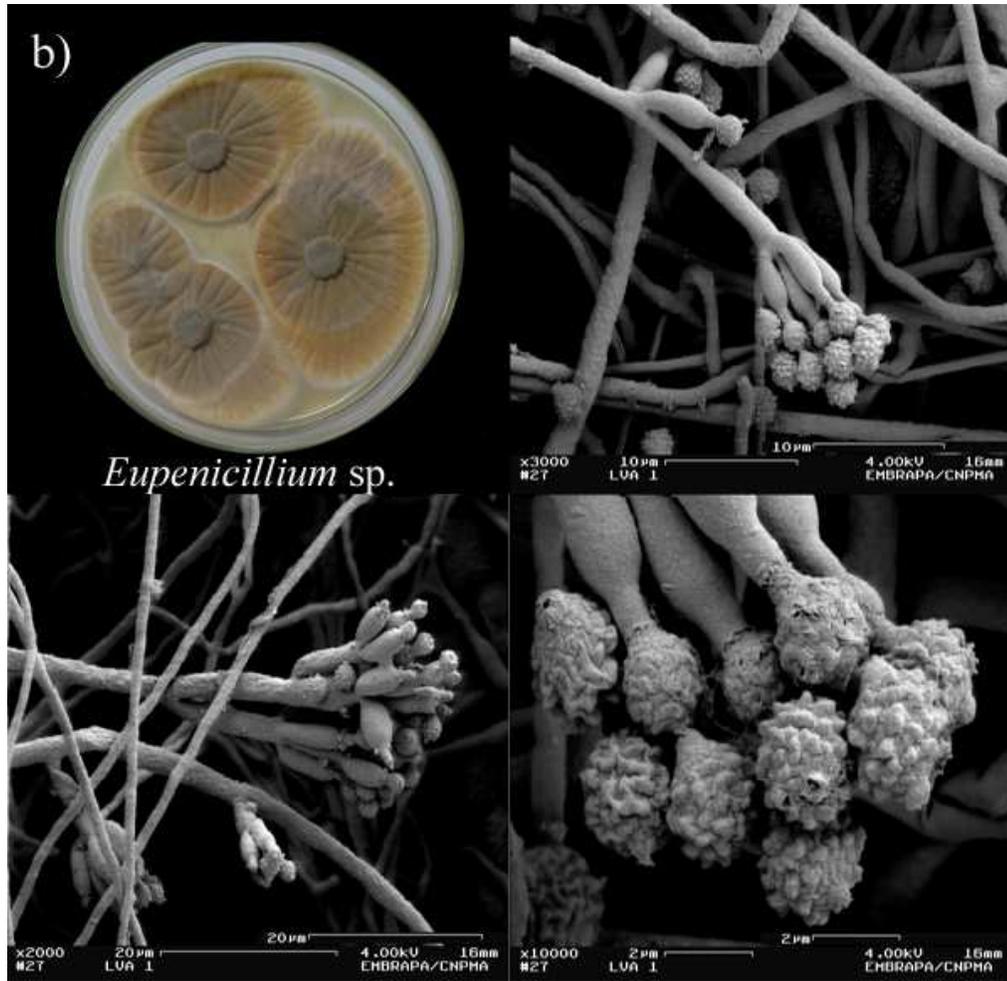
Solo de origem/Isolado	Sulfentrazona ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Identificação	Índice de similaridade
LVA 2	7,0	<i>Rhizobium radiobacter</i>	0,585*
LVA 10	7,0	<i>Rhizobium radiobacter</i>	0,560*
LVA 1B	7,0	<i>Ralstonia pickettii</i>	0,750
LVA 12	7,0	<i>Methylobacterium-mesophilicum/ radiotolerans</i>	0,732
LVA 1	7,0	<i>Ralstonia pickettii</i>	0,855

*Índice de similaridade abaixo do índice confiável (0,6).

4.8.2 Identificação de fungos

Os fungos isolados e identificados do solo LVA com aplicação de sulfentrazona, selecionados como possíveis degradadores do herbicida, foram *Cladosporium* sp., *Eupenicillium* sp. e *Paecilomyces* sp. (Figura 11). As linhagens isoladas do solo controle foram *Aspergillus* sp., duas linhagens de *Penicillium* sp., *Eupenicillium* sp. e *Paecilomyces* (Figura 12).





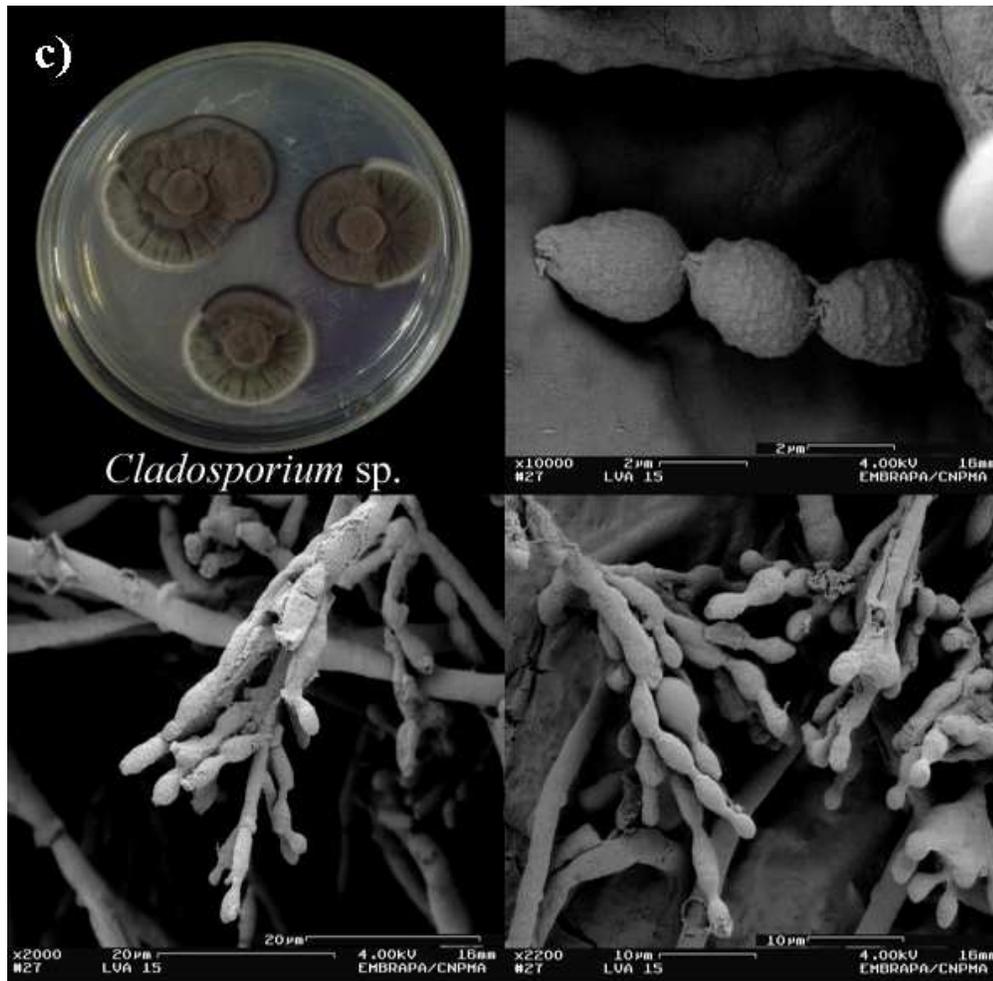
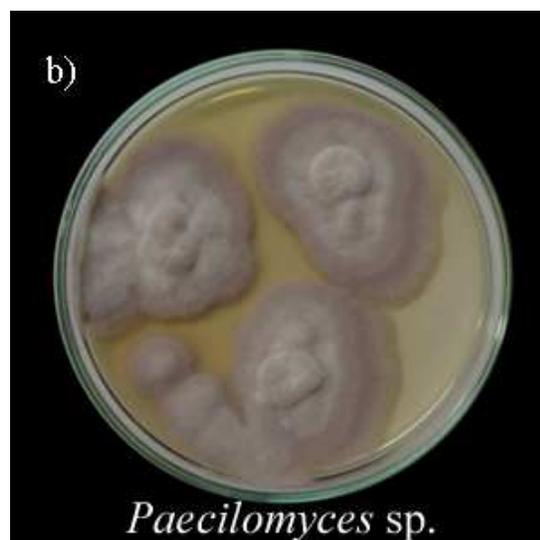
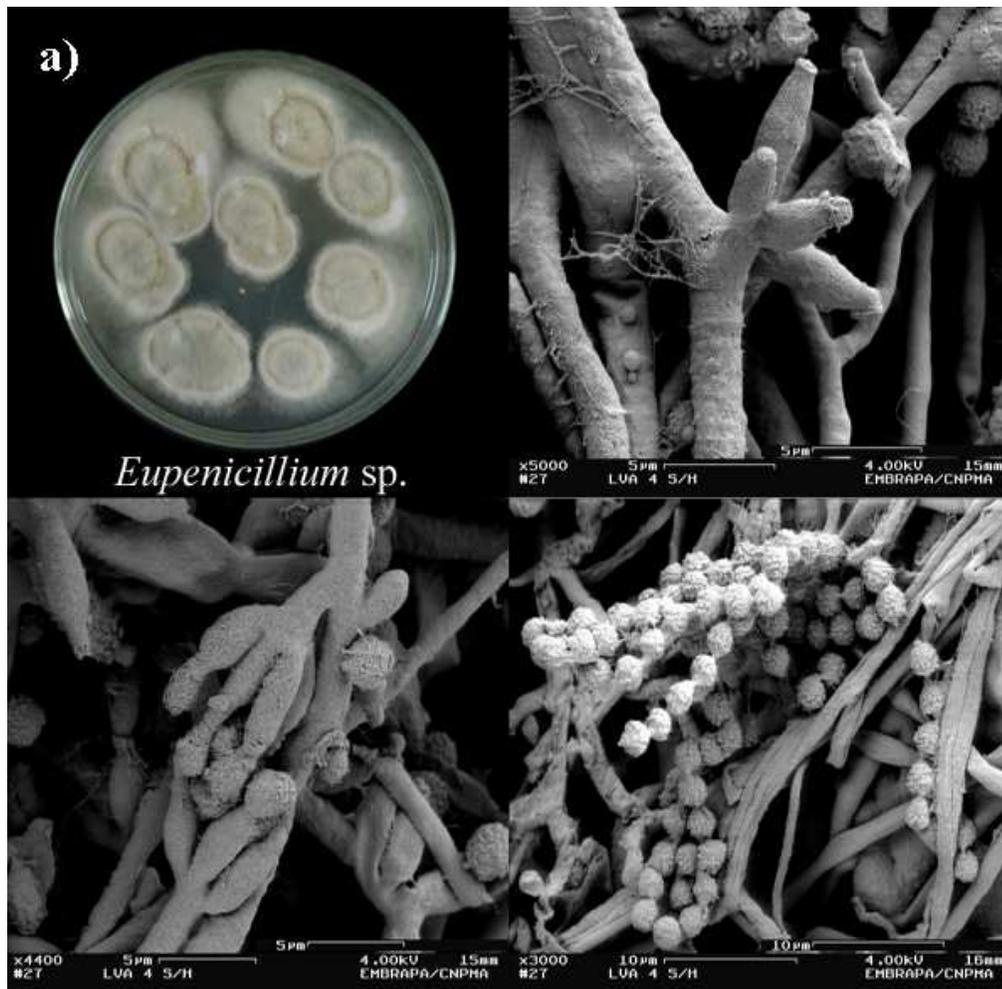
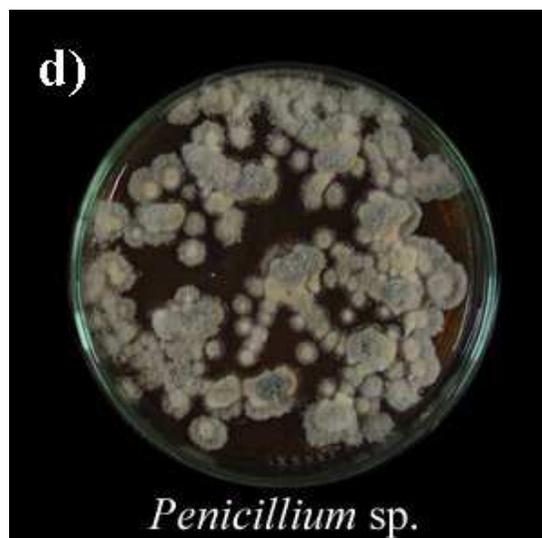
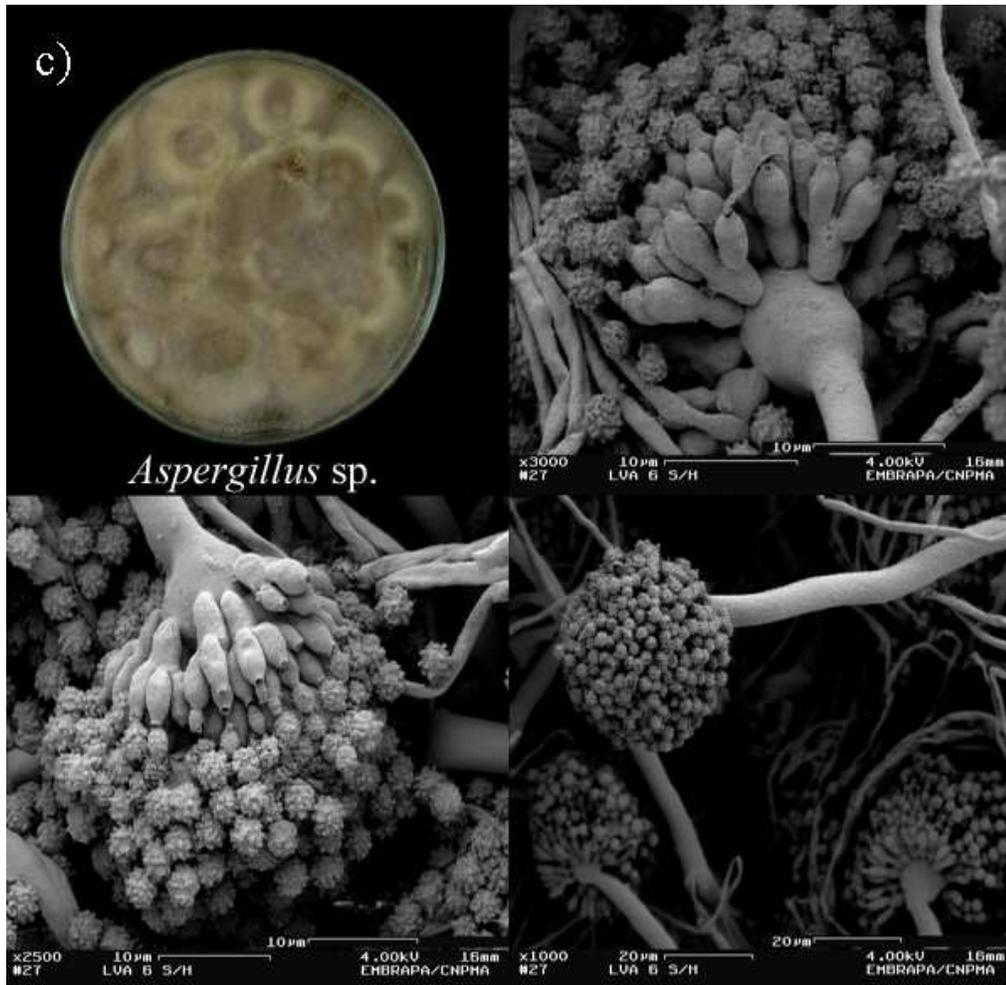


Figura 11 – Fungos isolados do solo LVA com herbicida sulfentrazone, com 7 (a), 17 (b) e 25 dias (c) de crescimento, em meio Ágar Sabouraud.





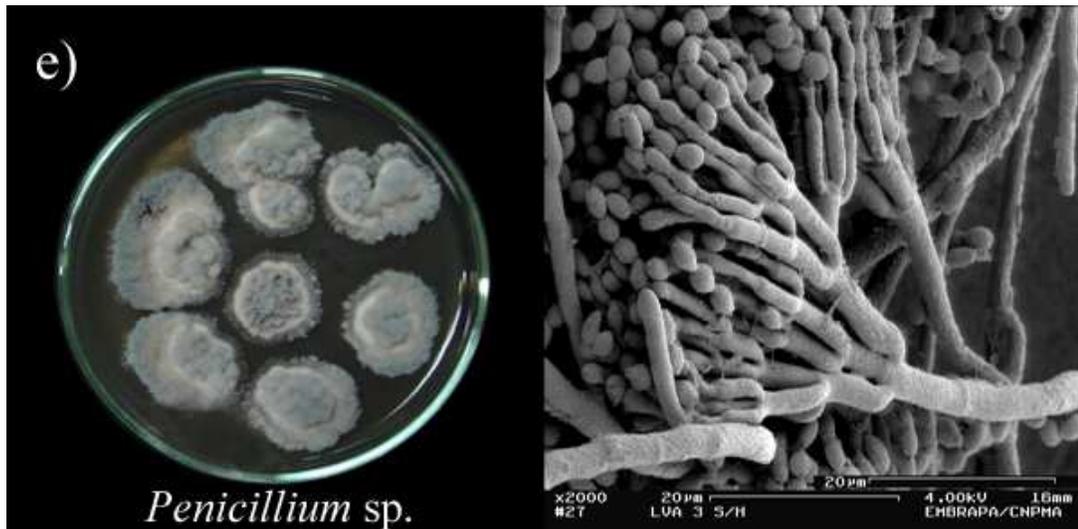


Figura 12 – Fungos isolados do solo LVA sem adição do herbicida sulfentrazone com 7 (a, b), 9 (c) e 20 dias (d, e) de crescimento, em meio Ágar Sabouraud.

Penicillium sp. (Figura 13) foi o único fungo isolado do solo LVE como possível degradador de sulfentrazone. Do solo controle foram isolados e identificados *Scopulariopsis* sp., duas linhagens de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp. (Figura 14).

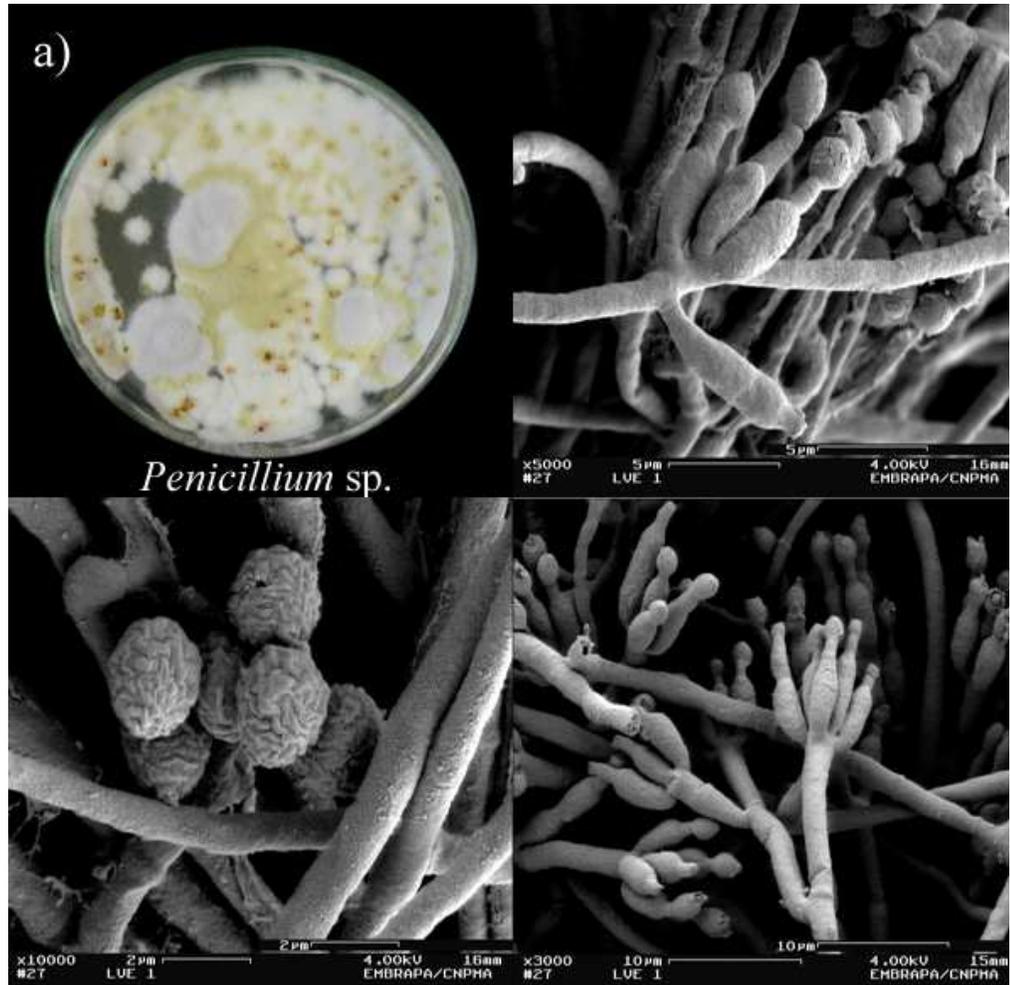
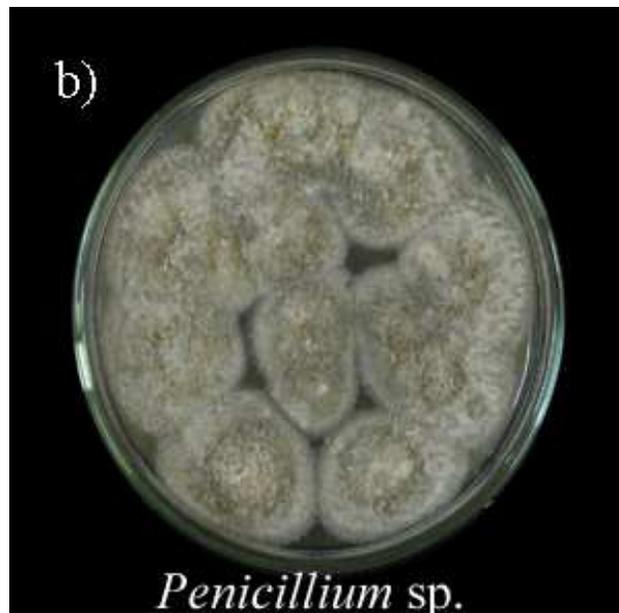


Figura 13 – Fungo isolado do solo LVE com herbicida sulfentrazone, com 20 dias de crescimento (a), em meio Ágar Sabouraud.



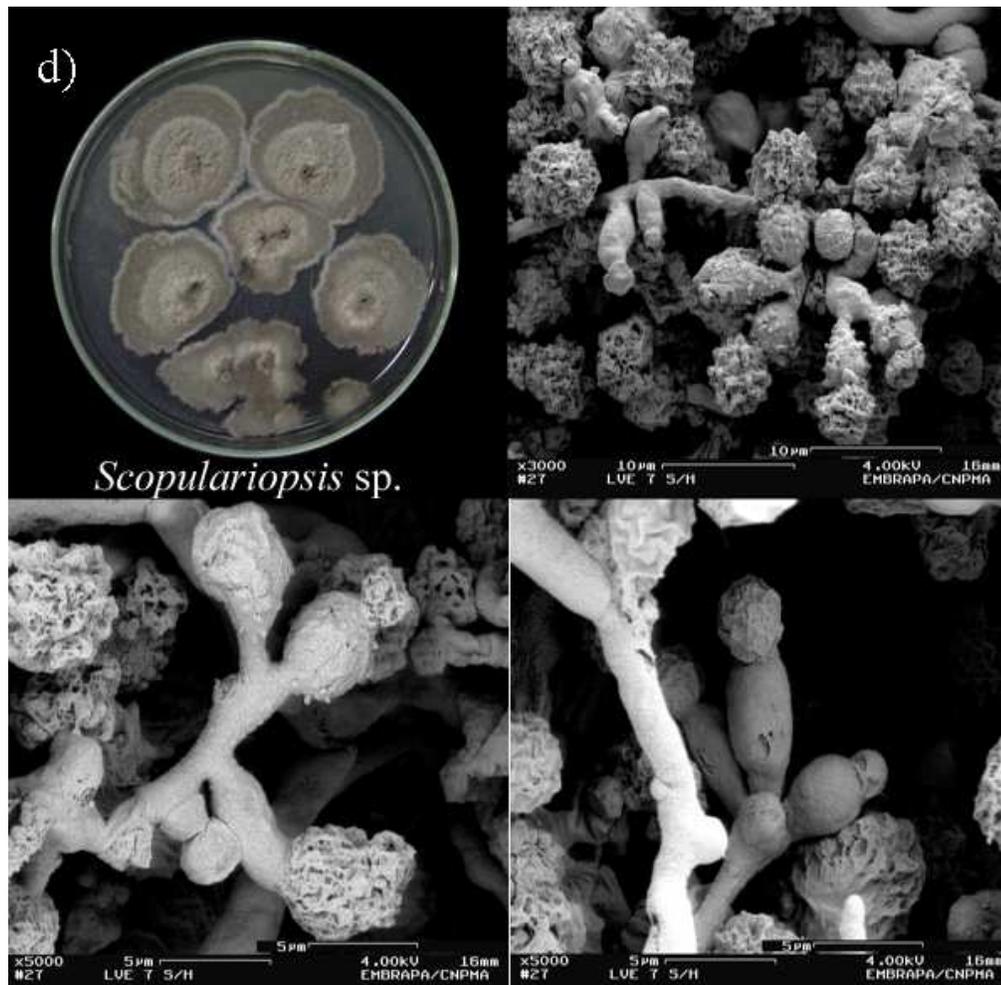
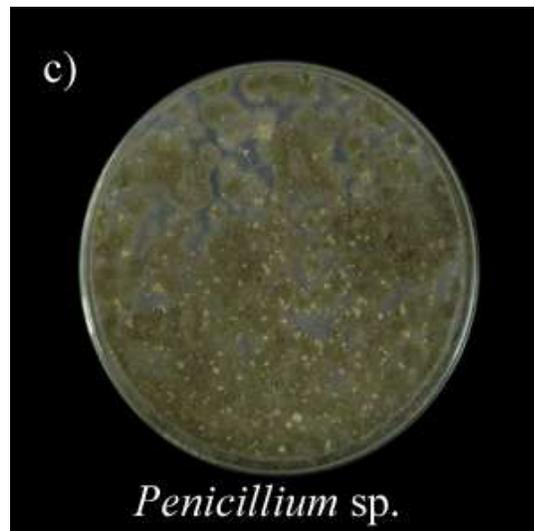
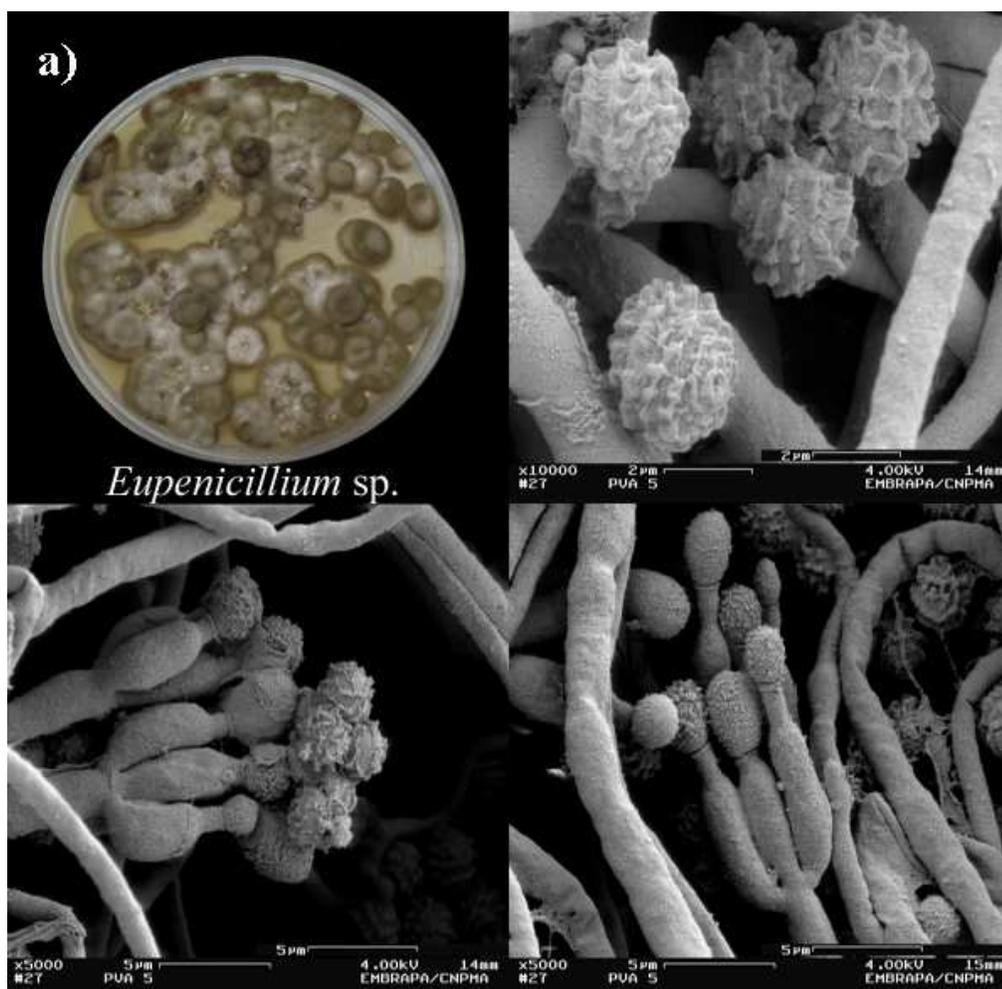
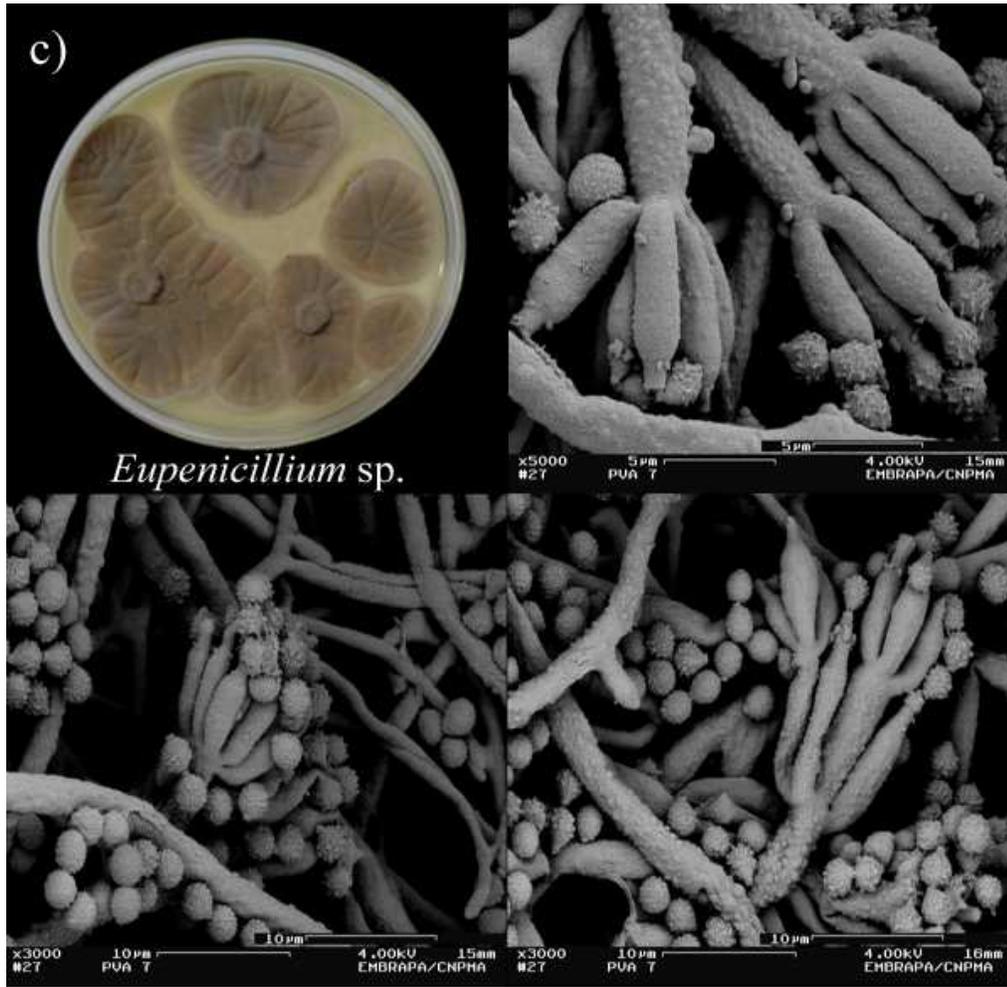
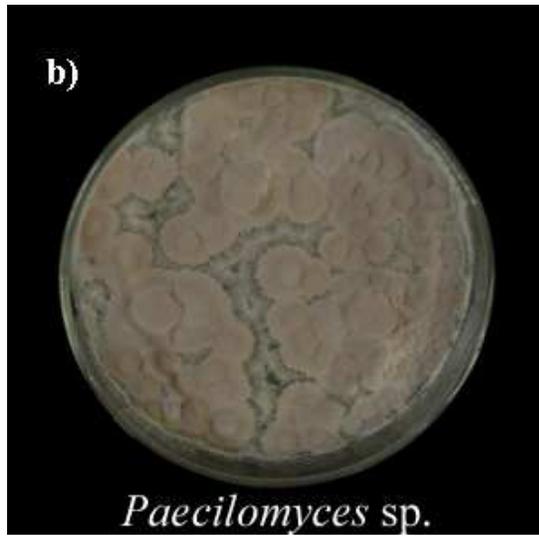
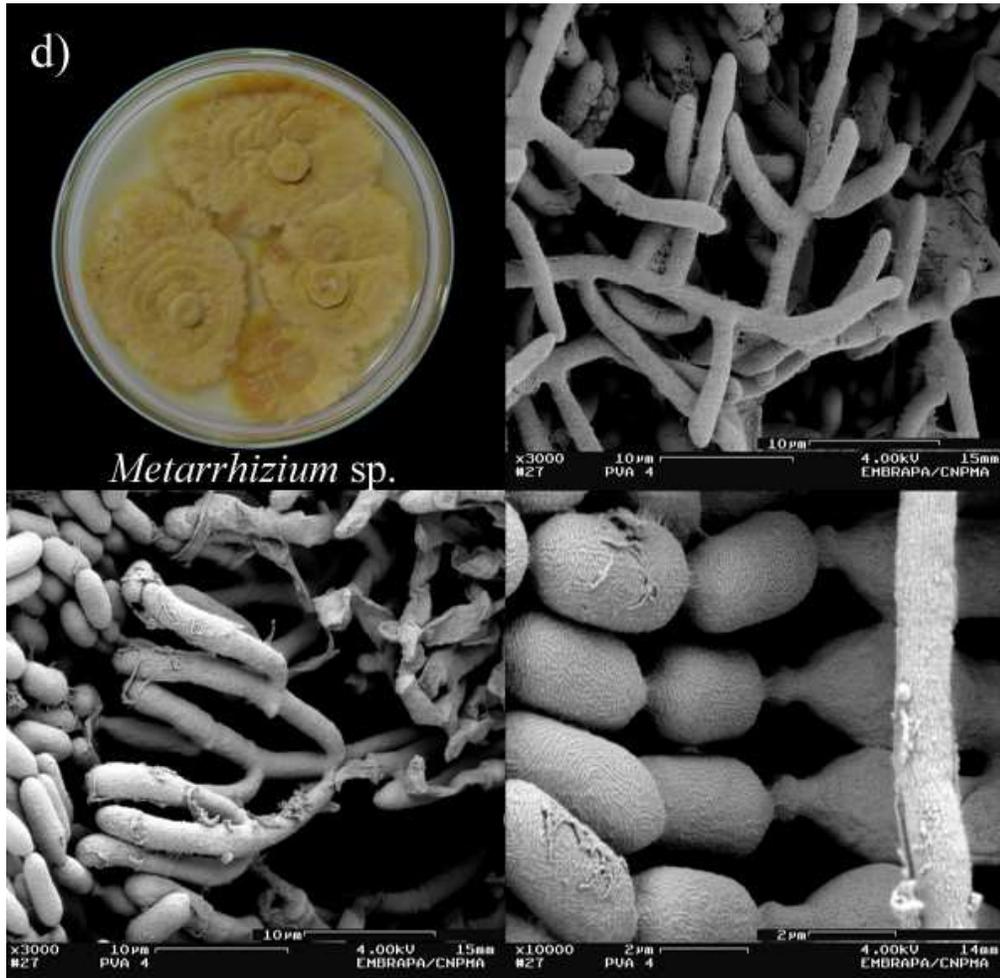


Figura 14 – Fungos isolados do solo LVE sem adição do herbicida sulfentrazona com 18 (a, b, c) e 30 dias (d) de crescimento, em meio Ágar Sabouraud.

Foram isolados e identificados do solo AVA como possíveis degradadores do herbicida os fungos *Chrysosporium* sp., duas linhagens de *Eupenicillium* sp., *Metarrhizium* sp. e *Paecilomyces* sp. (Figuras 15). *Penicillium* sp. (Figura 16) foi isolado e identificado do solo controle.







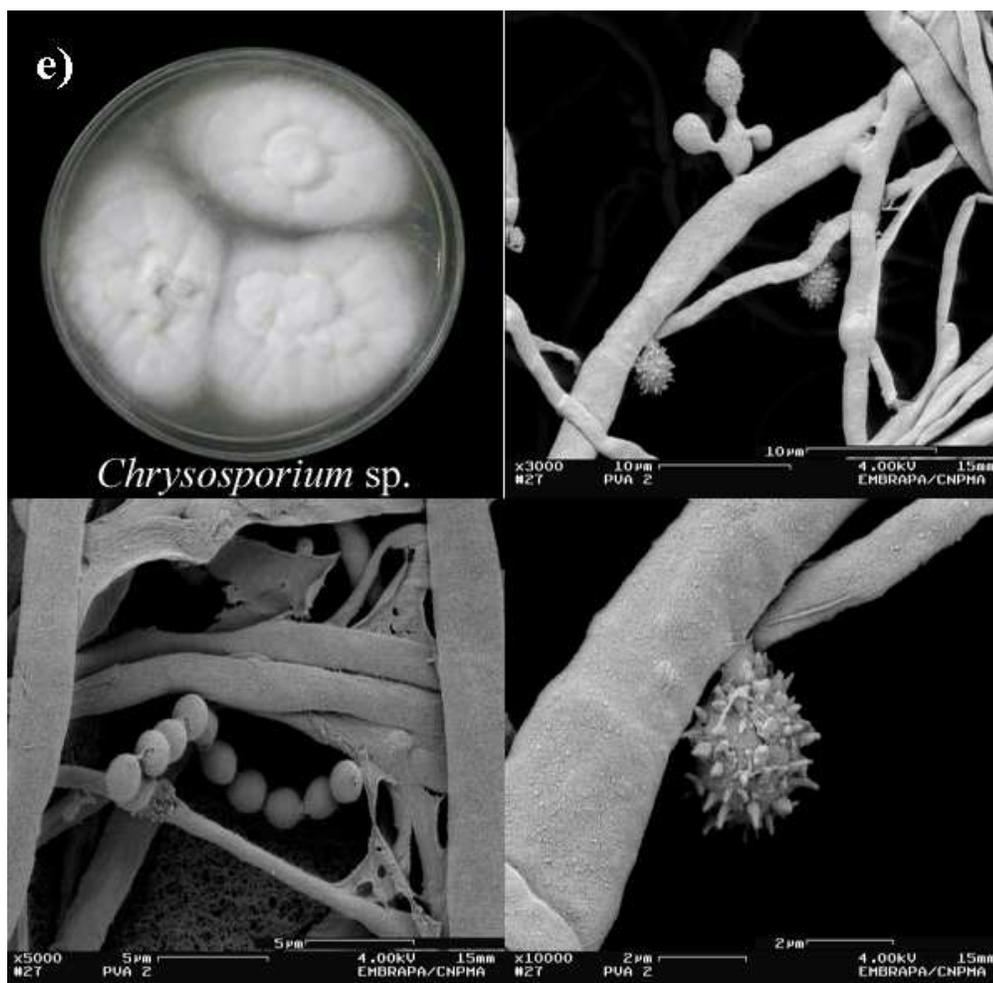


Figura 15 – Fungos isolados do solo AVA com herbicida sulfentrazone, com 4 (a), 7 (b, c, d) e 25 dias (e) de crescimento, em meio Ágar Sabouraud.



Figura 16 – Fungo isolado do solo AVA sem adição do herbicida, com 14 dias de crescimento (a), em meio Ágar Sabouraud.

Dentre as linhagens fúngicas isoladas não foi possível proceder a identificação dos isolados CCMA247 (do solo LVE) e CCMA248 (AVA) advindos do solo controle (Figura 17), e CCMA244 (LVA), CCMA245 (AVA) e CCMA246 (AVA), advindos do solo com adição do herbicida (Figura 18).



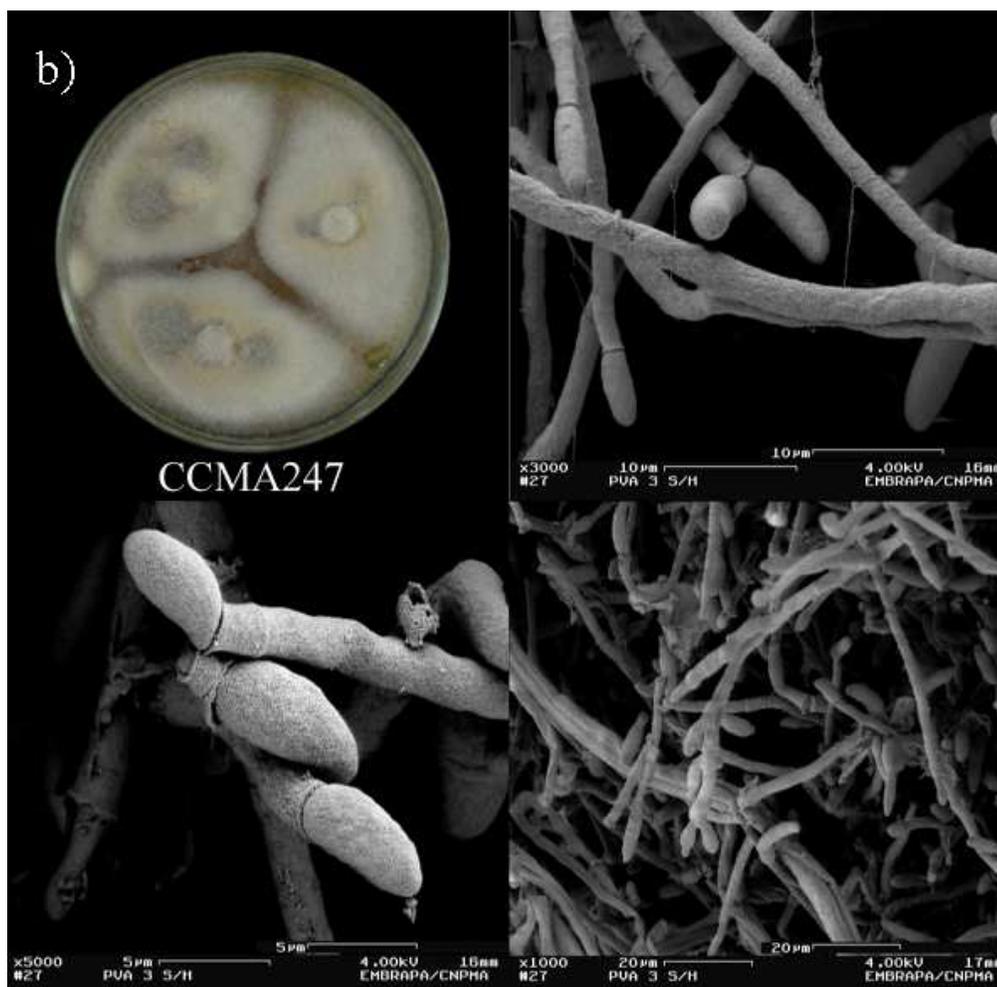
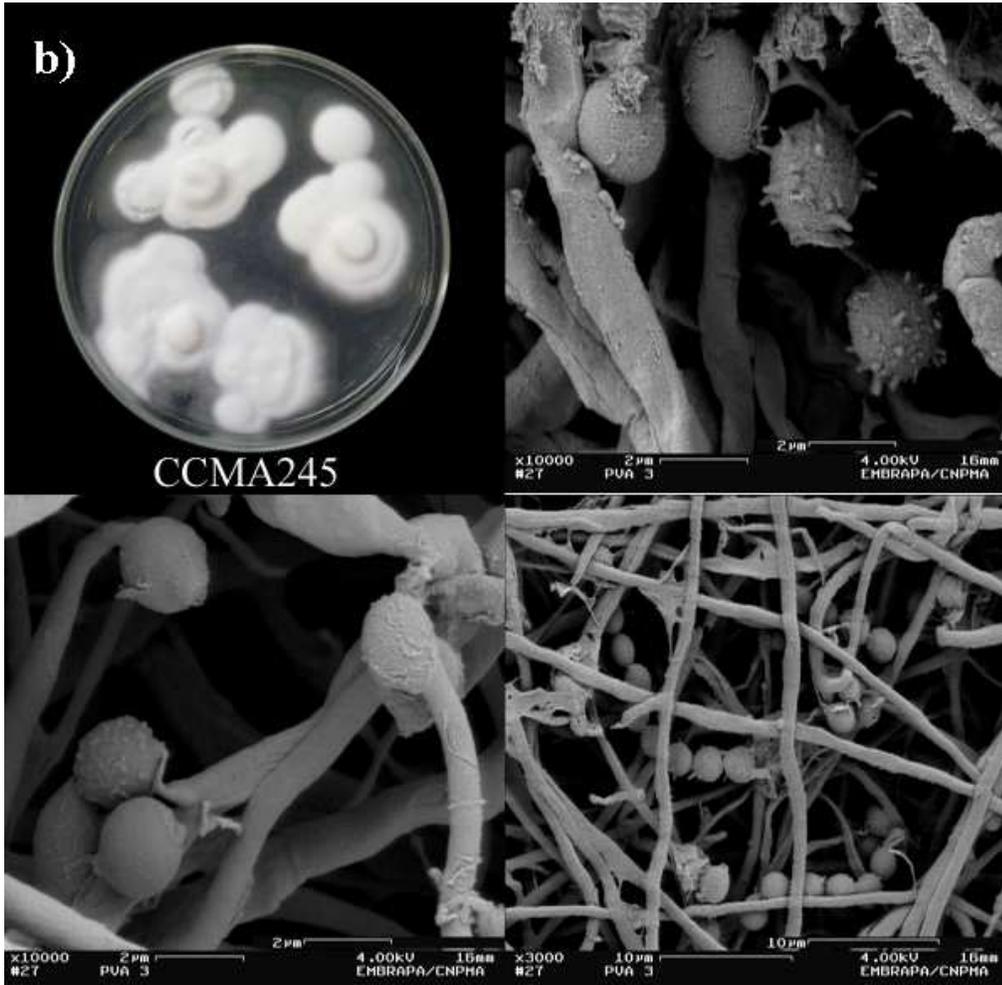


Figura 17 – Fungos isolados do solo LVE (a) e AVA (b) sem adição do herbicida sulfentrazona, com 4 e 18 dias de crescimento respectivamente, em meio Ágar Sabouraud.



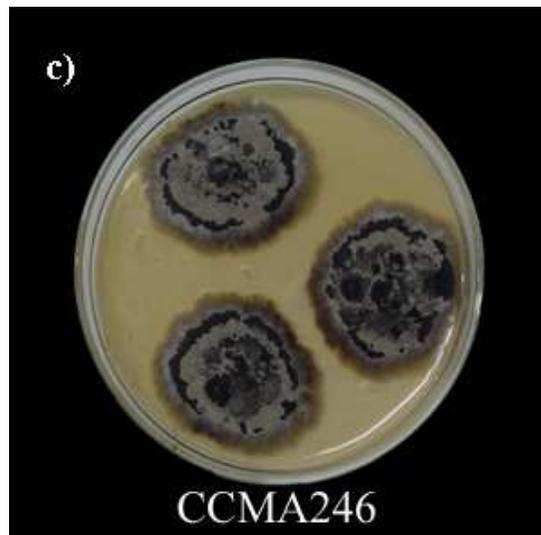


Figura 18 – Fungos isolados do solo LVA (a) e AVA (b, c) com herbicida sulfentrazone, com 10, 7 e 30 dias de crescimento respectivamente, em meio Ágar Sabouraud.

5 DISCUSSÃO

A sulfentrazone está entre os herbicidas mais utilizados nas principais culturas do estado de São Paulo (soja e cana-de-açúcar). Porém não há estudos referentes a biotransformação deste composto em solos brasileiros, o que é um aspecto importante a ser explorado devido às suas características e o seu potencial de contaminação (AGROFIT, 2002; EPA, 2003). Além disso, Ohmes *et al.* (2000) mostraram que a degradação microbiana é um mecanismo importante na dissipação de sulfentrazone, uma vez que a degradação foi muito lenta em solos autoclavados.

Segundo o Instituto do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 1990), este composto foi classificado como tendo uma persistência média (com meia-vida entre 90 e 180 dias), o que corrobora os valores de meia-vida obtidos no presente estudo: 91,63; 146,52 e 172,41 dias, para os solos LVE, LVA e AVA, respectivamente.

O herbicida apresentou meia-vida maior no solo AVA, apesar deste solo ter um teor maior de areia em relação aos demais solos, o que diminui a adsorção e favorece a biotransformação da molécula (GREY *et al.* 1997). Isso pode ser devido a um potencial menor da microbiota presente neste solo para degradar o composto.

Devido a este herbicida apresentar de média a alta persistência há necessidade de cuidado no intervalo de sua aplicação, disponibilizando o tempo necessário para sua degradação, e minimizando o risco de injúrias às culturas e espécies não-alvo. Ohmes *et al.* (2000) observaram grande injúria no algodão pela redução no peso de planta, devido a aplicações de sulfentrazone (420 e 840g ha⁻¹) no ano antecedente na cultura da soja, quando a meia-vida do herbicida foi maior ou igual a 85 dias.

A persistência pode estar relacionada a fatores como: a molécula pode estar inacessível devido a adsorção; o ambiente pode ser deficiente em algum fator essencial para o crescimento dos microrganismos capazes de degradar a molécula; insolubilidade do composto e, portanto, indisponibilidade ao ataque microbiano; os microrganismos presentes nos solos podem não apresentar potencial enzimático para degradar o composto; a célula pode ser incapaz de absorver a molécula; a concentração ou a natureza física do composto pode inibir os microrganismos e suas enzimas (FAY; SILVA, 2004). Além disso, fatores

como temperatura e umidade influenciam a persistência por afetarem a degradação microbiana e o comportamento do composto no solo (HANEY *et al.*, 2000).

Reddy e Locke (1998) mostraram uma taxa de mineralização de sulfentrazone, advinda da mineralização do anel fenílico da molécula, menor do que 2,1% para três tipos de solos, após 77 dias de incubação. A umidade foi mantida próxima da capacidade de campo e os solos não tinham histórico de aplicação do herbicida. Isso indica, segundo os autores, um baixo potencial para biotransformação desse herbicida em solos que nunca foram expostos a ele.

Quando um agrotóxico é sujeito a degradação microbiana, sendo aplicado ao solo pela primeira vez, um período de adaptação é usualmente observado, antes que a degradação ocorra a taxas significativas. É nesta fase que os microrganismos produzem enzimas capazes de degradar o composto, sendo esta seguida por um período de “enriquecimento”, quando os microrganismos adaptados multiplicam-se utilizando o substrato como fonte de carbono (ALEXANDER, 1999).

Dellamatrice e Monteiro (2004) mostraram a ocorrência da fase lag em solo sem aplicação anterior do herbicida diuron. Neste solo a degradação do herbicida foi baixa e a meia-vida do composto foi de 444 dias, enquanto em solo que já recebia aplicação de diuron há 3 anos, a meia-vida foi de 77 dias.

Comportamento semelhante foi observado neste estudo, uma vez que os solos utilizados não tiveram contato anterior com a sulfentrazone e observou-se uma fase de adaptação (fase lag) dos microrganismos, ao composto, que variou de acordo com o tipo de solo e os tratamentos (temperatura e umidade) utilizados. Esta variação foi de menos que 14 dias a mais de 60 dias.

Os microrganismos, após o período de adaptação, foram capazes de degradar o herbicida sob diferentes condições de umidade e temperatura. Detectou-se a formação do metabólito 3-hidroximetilsulfentrazone nos três tipos de solo, mostrando que esta molécula está na rota metabólica de degradação deste herbicida.

A biotransformação de sulfentrazone foi afetada, de maneira significativa, pela temperatura. No solo LVA houve maior degradação a 30°C, e no solo LVE, não houve diferença estatística na degradação a 30 e 40°C, mas esta foi superior à degradação a 15°C.

Em escala de campo, a degradação de compostos orgânicos é ótima em temperatura mesofílica (ao redor de 25°C a 40°C), e, embora as linhagens termofílicas possam ser encontradas na maioria dos solos, as linhagens mesofílicas que sobrevivem às altas temperaturas como esporos dormentes, são provavelmente as mais difundidas.

No solo AVA houve certa evidência ($p < 0,16$) do efeito da temperatura sobre a degradação do herbicida, que foi maior a 15°C. De acordo com Moreale e van Bladel (1979), uma diminuição da temperatura pode diminuir a adsorção do herbicida, visto que a camada de água ligada a superfície do solo é liberada em altas temperaturas e, assim, mais sítios de adsorção tornam-se vazios e mais herbicida é adsorvido em altas temperaturas. Além da temperatura, as propriedades físico-químicas do solo, tais como pH, conteúdo de matéria orgânica e composição elementar, em conjunto com a atividade dos microrganismos do solo, afetam a taxa de degradação.

Em relação a umidade, sob o teor de 100%CC, onde os microrganismos anaeróbios, obrigatórios e facultativos, são predominantes, houve uma degradação mais lenta do herbicida sulfentrazone nos solos LVA e AVA, enquanto no solo LVE não houve degradação durante o período de avaliação (255 dias de incubação). Outros trabalhos já demonstraram diminuição na velocidade de dissipação de herbicidas em condições de anaerobiose, como para o herbicida flufenacete em três tipos de solos submersos em água (GUPTA; GAJBHIYE, 2002).

Todos os solos estudados apresentaram pH ácido, o que pode ter diminuído a influência do conteúdo de água na degradação de sulfentrazone, mediante a ocorrência de adsorção favorecida pela acidez.

A adsorção e a mobilidade do herbicida são dependentes do pH e do tipo de solo. A adsorção do herbicida aumenta com o aumento da acidez do solo (GREY *et al.*, 1997; REDDY; LOCKE, 1998). O herbicida sulfentrazone é um ácido fraco com pKa de 6,56. Em solos com $pH < 6,56$, como nos solos em estudo, a adsorção da sulfentrazone é maior do que sua disponibilidade para estar na solução do solo (TONLIM, 2000), porque o herbicida está na forma neutra, onde a ocorrência de dissociação é mínima, e conseqüentemente sua solubilidade em água é reduzida ($< 110\text{mg L}^{-1}$), aumentando, desse modo, sua afinidade pela matéria orgânica do solo. Quando o herbicida se encontra na

forma aniônica ($\text{pH} > \text{pKa}$), o que não ocorreu nos solos em estudo ($\text{pH} < \text{pKa}$), ele sofre maior dissociação e sua afinidade pela água aumenta, permanecendo uma fração maior na solução do solo.

Além do efeito do pH sobre a molécula de sulfentrazone e nos processos de adsorção e dessorção, este também influencia a atividade microbiana. A ação do pH sobre os microrganismos do solo pode ser avaliada através de efeitos diretos sobre o metabolismo, permeabilidade das membranas e absorção; ou indiretos sobre a fisiologia, interação com outros organismos, disponibilidade de nutrientes, solubilização de elementos tóxicos e adsorção de substrato (SIQUEIRA, 1993).

Em geral, as bactérias são neutrófilas, no entanto o pH da suspensão de solo não reflete o pH do micro-habitat, o que dificulta generalizações sobre as relações ecológicas do pH. Devido à plasticidade fisiológica dos microrganismos, é possível selecionar estirpes nativas ou obter mutantes tolerantes a estresses provocados pela acidez. Estirpes ou isolados nativos tolerantes à acidez elevada são mais facilmente obtidos de populações adaptadas a estes ambientes, sendo inclusive já encontrados genes para tolerância à acidez (SIQUEIRA *et al.*, 1994).

Outro fator que interfere no comportamento de sulfentrazone no solo é a variabilidade na CTC. A CTC do solo teve um efeito maior do que o pH na tolerância da cultura do girassol ao herbicida sulfentrazone, mediante aplicação de 184g i.a ha^{-1} e pH 7,8. O peso seco das plantas de girassol foi menor em solos com CTC 8,2 comparado com aqueles com CTC de $13,7\text{cmol Kg}^{-1}$ ou maior do que esta, onde não houve alteração do peso seco (KERR *et al.*, 2004). Isso demonstra que mesmo a um pH elevado (básico), onde o herbicida teoricamente seria encontrado na solução do solo e causaria maior dano a planta, a CTC influenciou o comportamento de sulfentrazone no solo, pois valores maiores de CTC causaram aumento da adsorção do herbicida.

Os solos LVA, LVE e AVA apresentaram valores baixos de CTC, além de baixo teor de carbono orgânico, embora tenham apresentado pH ácido que corrobora para maior adsorção do herbicida.

Observou-se que ao invés de reprimir a atividade microbiana, o herbicida sulfentrazone não afetou ou então induziu o crescimento microbiano nos solos LVA e

AVA, no entanto, reduziu o crescimento da comunidade bacteriana no solo LVE, o que pode ter sido consequência do estímulo na comunidade fúngica, influenciado também pelo pH ácido do solo. Corroborando os resultados obtidos sobre o menor número de UFCs bacterianas quando comparado aos demais solos; as bactérias isoladas neste solo, quando inoculadas em doses maiores de sulfentazona, mostraram um crescimento muito pequeno ($< 63 \text{ UFC placa}^{-1}$, em diluição 10^{-2}) em todas as doses testadas (2,13; 4,22 e $7,0 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Em geral, as bactérias são neutrófilas e menos tolerantes a pH ácido em relação aos fungos, os quais toleram amplas variações de pH, embora os valores mais favoráveis para seu crescimento estejam entre 5 e 7. Também, o herbicida pode ter apresentado certa toxicidade às bactérias presentes nesse solo, diminuindo, assim, sua comunidade.

Para os solos LVA e AVA houve estímulo das comunidades bacteriana e de actinomiceto na presença do herbicida, sugerindo que essas foram responsáveis pela degradação da sulfentazona nesses solos. Já, no solo LVE o herbicida estimulou o crescimento de fungos e actinomicetos, sugerindo que a degradação da molécula esteve associada a essas duas comunidades.

Resultados obtidos por Chang *et al.*, (2001) demonstraram que a aplicação conjunta dos herbicidas atrazina, dicamba, fluometuron, metolaclor e sulfentazona causou impacto na estrutura da população microbiana oxidante de amônia, e em sua abundância no solo. O tratamento de 10ppm induziu ao aumento da comunidade microbiana, devido provavelmente à provisão de substrato de crescimento pelo herbicida fluometuron. Já na dose de 100ppm houve rápida diminuição do número de bactérias oxidantes de amônia e sob 1000ppm a população caiu abaixo do limite do método de detecção (reação de cadeia da polimerase com alvo no gene *amo A*). Esses resultados demonstram que a aplicação de herbicidas em altas concentrações pode prejudicar as comunidades bacterianas do solo (BOLDT; JACOBSEN, 1998).

No entanto, as bactérias isoladas dos solos AVA e LVA apresentaram um ótimo crescimento em meio suplementado com alta concentração de sulfentazona ($7,0 \mu\text{g mL}^{-1}$), indicando um alto potencial degradativo dessas linhagens. Há relatos de várias bactérias com capacidade de crescimento sob doses elevadas de herbicidas. Sette *et al.* (2005) mostraram que 6 linhagens do gênero *Streptomyces* foram capazes de crescer em altas

concentrações de alaclor (72mg L^{-1}), degradando mais de 50% do herbicida em 7 dias. Dentre estas, somente as linhagens *Streptomyces* sp. LS166, LS177, e LS182 foram capazes de crescer em 144mg L^{-1} do herbicida.

Não foram encontrados na literatura artigos que abordem o isolamento e a identificação de microrganismos degradadores do herbicida sulfentrazone. No presente trabalho linhagens bacterianas e fúngicas foram selecionadas como degradadoras deste herbicida, mediante sua transformação.

As bactérias responsáveis pela degradação do herbicida foram *Acinetobacter calcoaceticus* (no solo AVA), *Ralstonia pickettii* e *Rhizobium radiobacter* (no solo LVA), e o actinomiceto *Nocardia brasiliensis* no solo LVE. Entre os fungos, os gêneros *Eupenicillium* sp. e *Paecilomyces* sp. foram isolados nos solos LVA e AVA, *Cladosporium* sp. no solo LVA, *Chrysosporium* sp. e *Metarrhizium* sp. no solo AVA e *Penicillium* sp. no solo LVE.

Trabalhos, como o de Mulbry *et al.* (2002) demonstraram a participação de bactérias do gênero *Nocardia* na degradação do herbicida atrazina, revelando novas rotas metabólicas para mineralização desse composto. Também um consórcio bacteriano de oito espécies, contendo *Nocardia* sp. e *Rhizobium* sp., foi responsável pela degradação de 100% de atrazina em 4 dias, porém, esta não foi mineralizada na ausência de *Nocardia* sp, confirmando assim, o papel essencial desta linhagem na decloração de atrazina para seu posterior uso pelas demais bactérias (SMITH *et al.*, 2005). Outra bactéria, a *Ralstonia pickettii* foi capaz de conduzir a decloração do herbicida atrazina (SEFFERNICK *et al.*, 2000). A linhagem *Ralstonia eutropha* JMP134 (pJP4) possui o plasmídeo pJP4 que abriga o gene *tfd*, que além de proporcionar a degradação do herbicida 2,4-D, produz a permease TfdK que induz a quimiotaxia em relação a este (HAWKINS; HARWOOD, 2002).

Entre as *Acinetobacter* sp., de cinco linhagens bacterianas isoladas em solo contaminado com atrazina, apenas uma foi capaz de crescer na presença de $250\ \mu\text{g mL}^{-1}$ do herbicida, utilizando-o como fonte de carbono e como fonte secundária de nitrogênio. A mesma linhagem foi capaz de utilizar cianazine, prometon, simazine e terbutrin como fontes de energia (SINGH *et al.*, 2004). Portanto, as *Acinetobacter* sp. freqüentemente contêm a maquinaria enzimática necessária para mineralizar muitos compostos orgânicos.

Já, as linhagens *Methylobacterium organophilum* e *Methylobacterium radiotolerans* apresentaram capacidade de degradar tebutiuron, e *Rhodococcus equi*, o herbicida hexazinona (MOSTAFA; HELLING, 2003).

A influência de agrotóxicos sobre grupos bacterianos com importante função na transformação do nitrogênio do solo tem sido o foco de muitos estudos. Em geral, os herbicidas têm pouca influência sobre a amonificação do solo (DAS; MUKHERJEE, 1998). Segundo Olson e Lindwall (1991) os herbicidas glifosato e 2,4-D, quando aplicados em doses de campo ou dez vezes maiores, não têm demonstrado efeitos negativos sobre a nitrificação do solo. No presente estudo a bactéria *Rhizobium radiobacter*, no solo LVA, não foi afetada pelo herbicida sulfentrazone, crescendo em dose 10 vezes maior do que a dose de campo ($7.0\mu\text{g g}^{-1}$ solo).

Linhagens de *Penicillium* também têm sido isoladas como degradadoras de herbicidas. O fungo *Penicillium steckii* degradou o herbicida simazine (50mg L^{-1}), com redução de 53% após 5 dias de cultivo a 30°C (KODAMA *et al.*, 2001). Segundo Benezet e Knowles (1982), dentre 13 espécies fúngicas, o fungo *Penicillium cyclopium* foi o mais ativo na degradação de fototiazuron, um fotoproduto do herbicida tidiazuron. Já Klimek *et al.* (2001) isolaram a linhagem *Penicillium chrysogenum*, por sua habilidade de crescer em meio mínimo contendo o herbicida glifosato (5mM) como única fonte de nitrogênio.

O fungo *Cladosporium oxysporum* degradou 89% do inseticida endosulfan (1.83mg kg^{-1}) em 15 dias. O inseticida apresentou meia-vida igual a 5 dias, e o fungo se mostrou efetivo para detoxificação deste composto nos ambientes solo e água (MUKHERJEE; MITTAL, 2005). Vroumsia *et al.* (2005) mostraram a degradação de 2,4-diclorofenol (49%), um metabólito do herbicida 2,4-D, pelo fungo *Cladosporium cladosporioides*, após 5 dias de incubação.

Fungos do gênero *Paecilomyces* tem mostrado capacidade para metabolização de diferentes compostos orgânicos como herbicidas e lignina (ODA *et al.*, 1997). Dois fungos de solo, *Paecilomyces varioti* e *Fusarium oxysporum*, em meio de cultura, degradaram pendimetalim para os metabólitos N-(1-etilpropil)-3,4-dimetil-2-nitrobenzene-1,6-diamine e 3,4-diemtil-2,6-dinitroanilina (SINGH; KULSHRESTHA, 1991). Duas linhagens fúngicas de *Paecilomyces inflatus* foram isoladas de amostras de adubo advindo de resíduos

municipais, pedaços de papel e de madeira. As linhagens mineralizaram aproximadamente 6,5% de lignina sintética durante o cultivo do fungo no estado sólido em adubo autoclavado. A lacase foi a única enzima ligninolítica detectada e sua produção dependeu das condições de cultivo. Em contraste com os fungos de decomposição branca, os isolados degradaram a lignina durante o metabolismo primário (TURPEINEN *et al.*, 2001).

Não foram encontrados relatos sobre a capacidade de fungos *Metarhizium* sp. na metabolização de substâncias antropogênicas.

6 CONCLUSÕES

- ❖ Os microrganismos presentes nos solos foram capazes de degradar o herbicida sulfentrazone.
- ❖ Não houve efeito significativo da umidade sobre a degradação de sulfentrazone, no decorrer do tempo. Quanto à temperatura, esta teve efeito na degradação do herbicida nos solos LVE e LVA, se destacando as temperaturas de 30 e 40°C para o primeiro e de 30°C para o segundo.
- ❖ O herbicida afetou negativamente o crescimento bacteriano no solo LVE.
- ❖ Nas condições 70% CC a 27°C para os solos AVA e LVA, e 40°C para o solo LVE, a meia-vida da sulfentrazone foi de 172,41; 146,52 e 91,63 dias, respectivamente.
- ❖ Foram identificadas linhagens fúngicas e bacterianas como possíveis degradadoras de sulfentrazone. Dentre as linhagens bacterianas se destacaram o actinomiceto *Nocardia brasiliensis* (do solo LVE), e as bactérias *Acinetobacter calcoaceticus* (do solo AVA), e *Ralstonia pickettii* e *Rhizobium radiobacter* (do solo LVA). E dentre os fungos, os gêneros *Eupenicillium* sp. e *Paecilomyces* sp. (dos solos LVA e AVA), *Cladosporium* sp. (do solo LVA), *Chrysosporium* sp. e *Metarrhizium* sp. (do solo AVA), e *Penicillium* sp. (do solo LVE).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-MALLEK, A.Y.; ABDEL-KADER, M.I.A.; OMAR, S.A. Effect of the herbicide fluazifop-butyl on fungal populations and activity in soil. *Water, Air and Soil Pollution*, v. 86, p. 151-157, 1996.

AGÊNCIA Interior: Número um do Brasil. Disponível em: <<http://www.aginterior.com.br/agricultura.php>> Consultado em: 10 fev. 2004.

AGROFIT. Disponível: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons> Consultado em: 25 set. 2004.

AISLABIE, J.; LOYD-JONES, G. A review of bacterial degradation of pesticides. *Australian Journal of Soil Research*, v. 33, p. 925–942, 1995.

AISLABIE, J.; BEJ, A. K.; RYBURN, J.; LLOYD, N.; WILKINS, A. Characterization of *Arthrobacter nicotinovorans* HIM, an atrazine-degrading bacterium, from agricultural soil of New Zealand. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 52, p.279-286, 2004.

ALEXANDER, M. *Biodegradation and biorremediation*. 2nd ed. New York: Academic Press, 1999. 453 p.

ANG, E. L.; ZHAO, H.; OBBARD, J. P. Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 37, p. 487-496, 2005.

ARRUDA, J. S.; LOPES, N. F.; BACARIN, M. A. Nodulação e fixação do dinitrogênio em soja tratada com sulfentrazona. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v.36, p.325-330, 2001.

ARSHAD, M. A.; MARTIN, S. Identifying critical limits for soil quality indicators in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 88, p. 153-160, 2002.

ATLAS, R.M.; HOROWITZ, A.; KRICHEWSKI, M.; BEJ, A.K. Response of microbial populations to environmental disturbance. *Microbial Ecology*, v. 22, p. 249-256, 1991.

BARD, J. Comparison of gradient methods for the solution of the nonlinear parameter estimation problem. *SIAM Journal of Numerical Analysis*, v. 7, p.157–186, 1970.

BARNETT, H L; HUNTER, B. B. *Illustrated genera of imperfect fungi*. 3rd. ed. Minneapolis: Burges Publishing Company, 1972. 241 p.

BELTRÁN, E.; FENET, H.; COOPER, J. F.; COSTE, C. M. Fate of isoxaflutole in soil under controlled conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 146-151, 2003.

BENEZET, H. J.; KNOWLES, C. O. Microbial degradation of thidiazuron and its photoproduct. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 11, p. 107-110, 1982.

BEULKE, S.; BROWN, C. D.; FRYER, C. J; BEINUM, W. van. Influence of kinetic sorption and diffusion on pesticide movement through aggregated soils. *Chemosphere*, v. 57, p. 481-490, 2004.

BOESTEN, J. J. T. I. From laboratory to field: uses and limitations of pesticide behaviour models for the soil/plant system. *Weed Research*, v. 40, p. 123-138, 2000.

BOIVIN, A.; AMELLAL, S.; SCHIAVON, M.; GENUCHTEN van, M. T. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) sorption and degradation dynamics in three agricultural soils. *Environmental Pollution*, v. 138, p. 92-99, 2005.

BOLDT, T.S.; JACOBSEN, C.S. Different toxic effects of the sulphonylurea herbicides metsulfuron methyl, chlorsulfuron and thifensulfuron methyl on fluorescent pseudomonads isolated from an agricultural soil. *FEMS Microbiology Letters*, v. 161, p. 29-35, 1998.

BOUWER, E.; DURANT, N.; WILSON, L.; ZHANG, W.; CUNNINGHAM, A. Degradation of xenobiotic compounds in situ: capabilities and limits. *FEMS Microbiology Reviews*, v.15, n.2/3, p. 307-317, Oct. 1994.

CARACCILO, A. B.; GIULIANO, G.; CORCIA, A.D.; CRESCENZI, C.; SILVESTRI, C. Microbial degradation of terbuthylazine in surface soil and subsoil at two different temperatures. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 67, p. 815-820, 2001.

CARACCILO, A. B.; GIULIANO, G.; GRENNI, P.; GUZELLA, L.; POZZONI, F.; BOTTONI, P.; FAVA, L.; CROBE, A.; ORRÙ, M.; FUNARI, E. Degradation and leaching of the herbicides metolachlor and diuron: a case study in an area of Northern Italy. *Environmental Pollution*, v. 134, p. 525-534, 2005.

CARTER, A. D. Herbicide movement in soils: principles, pathways and processes. *Weed Research*, v. 40, p.113-122, 2000.

CASTILHO, L. E.; CRUZ DE LA, E.; RUEPERT, C. Ecotoxicology and pesticides in tropical ecosystems of Central América. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v.16, p. 41-51, 1997.

CHANG, Y-J.; ANWAR HUSSAIN, A. K. M.; STEPHEN, J. R.;MULLEN, M. D.; WHITE, D. C.; PEACOCK, A. Impact of herbicides on the abundance and structure of indigenous β -subgroup ammonia-oxidizer communities in soil microcosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 20, p. 2462-2468, 2001.

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

CHEN, A. Sulfentrazone. In: LEE, P. W. *Handbook of residue analytical methods for agrochemical*. Chichester: John Wiley, 2003. v.1, p. 564-577.

CULLINGTON, J. E.; WALKER, A. Rapid biodegradation of diuron and other phenylurea herbicides by a soil bacterium. *Soil Biology and Biochemistry*, v.31, p.677-686, 1999.

DAS, A.; MUKHERJEE, D. Persistence of phorate and carbofuran in relation to their effect on the mineralization of C, N and P in alluvial soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v.61, p.709-715, 1998.

DAYAN, F. E.; WEETE, J. D.; DUKE, S. O. Soybean (*Glycine max*) cultivar differences in response to sulfentrazone. *Weed Science*, v. 45, p. 634-641, 1997.

DAYAN, F. E.; ARMSTRONG, B. M.; WEETE, J. D. Inhibitory activity of sulfentrazone and its metabolic derivatives on soybean (*Glycine max*) protoporphyrinogen oxidase. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 2024-2029, 1998.

DEJONGHE, W.; BERTELOOT, E.; GORIS, J.; BOON, N.; CRUL, K.; MAERTENS, S.; HOFTE, M.; VOS, P. D.; VERSTRAETE, W.; TOP, E.M. Synergistic degradation of linuron by a bacterial consortium and isolation of a single linuron degrading *Variovorax* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 1532-1541, 2003.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Isolation of diuron-degrading bacteria from treated soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 47, p. 999-1003, 2004.

De SOUZA, M. L.; WAKETT, L. P.; SADOWSKI, M. J. The atzABC genes encoding atrazine catabolism are located on a self-transmissible plasmid in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, p. 2323-2326, 1998.

DONNELLY, P.; ENTRY, J. A.; CRAWFORD, D. L. Degradation of atrazine and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by mycorrhizal fungi at three nitrogen concentrations in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 59, p. 2642-2647, 1993.

DORAN, J. W.; ZEISS, M. R. Soil health and sustainability: managing the biotic component of soil quality. *Applied Soil Ecology*, v. 15, p. 3-11, 2000.

DORAN, J. J.; STAMATIODIS, S. I. J.; HABEREN, J. Soil health as an indicator of sustainable management. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 88, p. 107-110, 2002.

DORES, E. F.; DE-LAMONICA-FREIRE, E. M. Contaminação do ambiente aquático por agrotóxicos: vias de contaminação e dinâmica dos agrotóxicos no ambiente aquático. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, Curitiba, v. 9, p.1-18, 1999.

EDWARDS, C.A.; BATER, J.E. An evaluation of laboratory and field studies for the assessment of the environmental effects of pesticides. In: *Proceedings of the Brighton Crop Protection Conference on Pests and Diseases*. Brighton, UK: The British Crop Protection Council, 1990. p. 963-968.

EL-FANTROUSSI, S.; VERSCHUERE, L.; VERSTRAETE, W.; TOP, E.M. Effect of phenylurea herbicides on soil microbial communities estimated by analysis of 16SrRNA gene fingerprints and community-level physiological profiles. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 65, p. 982-988, 1999.

EL-FANTROUSSI, S. Enrichment and molecular characterization of a bacterial culture that degrades methoxy-methyl urea herbicides and their aniline derivatives. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 5110-5115, 2000.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. *Manual de métodos de análise de solo*. 2.ed. Rio de Janeiro, 1997. 212 p.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Monitoramento e Avaliação de Impacto Ambiental. *Monitoramento da qualidade das águas para o desenvolvimento do semi-árido brasileiro: ecoágua*. Jaguariúna, 1999. 30 p. Projeto 11.0.99.240.

EPA. Federal Register: Sulfentrazone; Pesticide Tolerances, 2003. Disponível em: <<http://www.epa.gov/fedrgstr/EPA-PEST/2003/September/Day-4/p24011.htm>> Consultado em: 25 set. 2004.

FAIRBANKS, M. Defensivos agrícolas ampliam mercado. Disponível em: <http://www.quimica.com.br/revista/qd396/defensivos_agricolas.htm> Consultado em: 03 mar. 2005.

FAY, E. F.; SOUZA SILVA, C. M. G. de, MELO, I. S. de. Degradação abiótica de xenobióticos. In: MELO I. S.; AZEVEDO J. L. (Ed.). *Microbiologia ambiental*. Jaguariúna: EMBRAPA-CNPMA, 1997. p. 125-140.

FAY, E. F.; SILVA, C. M. M. S. Persistência de moléculas xenobióticas. In: SILVA, C. M. S.; FAY, E. F. (Ed.). *Agrotóxicos & ambiente*. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 221-257.

FELICONIO, A. E. Agrotóxicos: riscos para a saúde e o meio ambiente. Disponível em: <<http://www.sitiodomoinho.com/jornal/Powervoice/DefaultNewsShow.asp?Editoria=6&Noticia=35>> Acesso em: 31 maio 2006.

FERREIRA, C.R.R.P.T.; SILVA, J.R.; ASSUMPÇÃO, R. Distribuição territorial das vendas de herbicidas no Brasil, 1991-2000. *Informações Econômicas*, v. 32, n. 6, p.15-23, 2002.

FERREY, M. L.; KOSKINEN, W. C.; BLANCHETTE, R. A.; BURNES, T. A. Mineralization of alachlor by lignin-degrading fungi. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 40, p. 795–798, 1994.

FMC Corporation. *Technical bulletin of sulfentrazone*. Philadelphia: FMC Corporation, 1995. 6p.

FUNARI, E.; BARBIERI, L.; BOTTONI, P.; CARLO DEL, G.; FORTI, S.; GIULIANO, G.; MARINELLI, A.; SANTINI, C.; ZAVATTI, A. Comparison of the leaching properties of alachlor, metolachlor, triazines and some of their metabolites in an experimental field. *Chemosphere*, v. 36, p.1759-1773, 1998.

GARCÍA-VALCÁRCEL, A. I.; TADEO, J. L. Influence of soil moisture on sorption and degradation of hexazinone and simazine in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 3895-3900, 1999.

GARVEY, P. V.; MONKS, D. W. Response of vegetable crops grown in rotation to sulfentrazone treated soybean. *Proceedings of the Southern Weed Science Society*, p.91-92, 1998.

GERECKE, A. C.; TIXIER, C.; BARTELS, T.; SCHWARZENBACH, R. P.; MULLER, S. R. Determination of phenylurea herbicides in natural waters at concentrations below 1ng L^{-1} using solid-phase extraction, derivatization, and solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography (A)*, v. 930, p. 9-19, 2001.

GOLOVLEVA, L. A.; ALIYEVA, R. M.; NAUMOVA, R. P.; GVOZDYAK, P. I. Microbial bioconversion off pollutants. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 124, p. 41-78, 1992.

GOVERNO do Estado de São Paulo. Agricultura. Disponível em: <<http://www.saopaulo.sp.gov.br/invista/numeros/agric.htm>> Consultado em: 29 set. 2005.

GRAYMORE, M.; STAGNITTI, F.; ALLINSON, G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environment International*, v. 26, p. 483-495, 2001.

GREY, T. L.; WALKER, R. H.; HANCOCK, H. G. Sulfentrazone adsorption and mobility affected by soil and pH. *Weed Science*, v. 45, p. 733-738, 1997.

GREY, T. L.; WALKER, R. H.; DAYAN, F. E.; WEETE, J. D.; HANCOCK, H. G.; KWON, O. Behavior of sulfentrazone in ionic exchange resins eletrophoresis gels, and cation-saturated soils. *Weed Science*, v. 48, p. 239-247, 2000.

GRIFFINI, O.; BAO, M. L.; BARBIERI, C.; BURINI, D.; PANTANI, F. Ocurrance of pesticides in the Arno River and in potable water – a survey of period 1992-1995. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 59, p. 202-209, 1997.

GUPTA, S. GAJBHIYE, V. T. Effect of concentration, moisture and soil type on the dissipation of flufenacet from soil. *Chemosphere*, v. 47, p. 901-906, 2002.

GUSTAFSON, D. I. Groundwater ubiquity score: a simple method for assessing pesticide leachability. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 8, p. 339-357, 1989.

HANEY, R. L.; SENSEMAN, S. A.; HONS, F. M.; ZUBERER, D. A. Effect of glyphosate on soil microbial activity and biomass. *Weed Science*, v. 48, p. 89-93, 2000.

HAWKINS, A. C.; HARWOOD, C. S. Chemotaxis of *Ralstonia eutropha* JMP134(pJP4) to the herbicide 2,4-Dichlorophenoxyacetate. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 68, p. 968-972, 2002.

HULTGREN, R. P.; HUDSON, R. J. M.; SIMS, G. K. Effects of soil pH and soil water content on prosulfuron dissipation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 3236-3243, 2002.

IBAMA. *Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos*. 2.ed. Brasília, 1990. 351 p.

ISMAIL, B. S.; AZLIZAN, B. A. Persistence and bioactivity of metsulfuron-methiy in three soils. *Journal of Environmental Science and Health*. Part. B, v. 37, p. 345-353, 2002.

JOHNSEN, K.; JACOBSEN, C. S.; TORSVIK, V.; SORENSEN, J. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils – a review. *Biology and Fertility of Soils*, v. 33, p. 443-453, 2001.

JURADO-EXPOSITO, M.; WALKER, A. Degradation of isoproturon, propyzamide and alachlor in soil with Constant and variable incubation conditions. *Weed Research*, v. 38, p. 309-318, 1998.

KAARE, J.; JACOBSEN, C.; TORSVIK, V. Pesticide effects on bacterial diversity in agricultural soils – a review. *Biology and Fertility of Soils*, v. 33, p. 443-453, 2001.

KAUFMANN, D. D.; EDWARDS, D. F. Pesticide/microbe interation effects on persistence in soil. In: MIYAMOTO, J.; KERNEY, P. C. *Pesticide chemistry*. Oxford: Pergamon Press, 1982. p. 1777-1792.

KERR, G.W.; STAHLMAN, P. W.; DILLE, J. A. Soil pH and cation exchange capacity affects sunflower tolerance to sulfentrazone. *Weed Technology*, v.18, p.243-247, 2004.

KLIMEK, M.; LEJCZAK, B.; KAFARSKI, P.; FORLANI, G. Metabolism of the phosphonate herbicide glyphosate by a non-nitrate-utilizing strain of *Penicillium chrysogenum*. *Pest Management Science*, v. 57, p. 815-821, 2001.

KODAMA, T.; DING, L.; YOSHIDA, M.; YAJIMA, M. Biodegradation of an s-triazine herbicide, simazine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v.11, p. 1073-1078, 2001.

KOLPIN, D. W.; BARBASH, J. E.; GILLIOM, R. J. Occurrence of pesticides in shallow ground water of the United States: initial results from the national water-quality assessment program. *Environmental Science and Technology*, v. 32, p. 558-566, 1998.

KOLPIN, D. W.; THURMAN, E. M.; LINHART, S. M. Finding minimal herbicide concentrations in ground water? Try looking for their degradates. *The Science of the Total Environment*, v. 248, p. 115-122, 2000.

KOOKANA, R. S.; BASKARAN, S.; NAIDU, R. Pesticide fate and behaviour in Australian soils in relation to contamination and management of soil and water: a review. *Australian Journal of Soil Research*, v. 36, p. 715-764, 1998.

KOROLEVA, O. V.; STEPANOVA, E. V.; LANDESMAN, E. O. VASIL'CHENKO, L. G.; KROMONYGINA, V. V.; ZHERDEV, A. V.; RABINOVICH, M. L. [Immunoenzyme analysis of decomposition of herbicides by soil and wood-rot fungi]. *Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia*, v. 38, p. 413-418, 2002.

KRIEGER, M. S.; PILLAR, F.; OSTRANDER, J. A. Effect of temperature and moisture on the degradation and sorption of florasulam and 5-Hydroxyflorasulam in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 48, p. 4757-4766, 2000.

KUMAR, M.; PHILIP, L. Enrichment and isolation of a mixed bacterial culture for complete mineralization of endosulfan. *Journal of Environmental Science and Health. Part. B. Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, v. 41, p. 81-96, 2006.

LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A.; ALTSTAEDT, A.; ZECH, W. Leaching and degradation of corn and soybean pesticides in an Oxisol of the Brazilian Cerrados. *Chemosphere*, v. 41, p.1441-1449, 2000.

LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A.; ALTSTAEDT, A.; ZECH, W. Fate of pesticides in tropical soils of Brazil under field conditions. *Journal of Environmental Quality*, v.31, p.256-268, 2002.

LAMB, J. A.; DOWDY, R. H.; ANDERSON, J. L.; ALLMARAS, R. R. Water quality in na irrigates sandy soil: ridge tillage in rotated corn and soybean compared with full-width tillage en continuous corn. *Soil & Tillage Research*, v. 48, p. 167-177, 1998.

LEONARD, R. A. Movement of pesticides into surface waters. In: CHENG, H. H. *Pesticides in the soil environment*. Madison: Soil Science Society of America, 1990. p.303-349.

LEUNG, L.Y.; LYGA, J.W.; ROBINSON, R.A. Metabolism and distribution of the experimental triazoline herbicide F6285 [1-[2,4 - Dichloro-5-[N-(methylsulfonyl) amino] phenyl]-1,4-dihydro-3-methyl -4-(difluoromethyl)-5 H -triazol -5-one] in the rat, goat, and hen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 39, p.1509-1514, 1991.

LI, Q. X.; HUANG, E.-C.; GUO, F. Occurrence of herbicides and their degradates in Hawaii's groundwater. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 66, p. 653-659, 2001.

LOVELL-TAYLOR, S.; SIMS, G. K.; WAX, L. M. Effects of moisture, temperature, and biological activity on the degradation of isoxaflutole in soil. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 50, p. 5626-5633, 2002.

MELO, I. S.; SILVA, C. M. M. S.; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. *Biodegradação*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001. 440 p.

MÉTODOS de isolamento e identificação de rizobactérias de importância na agricultura. *Apostila*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2001.

MICROBIAL identification system operating manual. Newark: MIDI, Inc, 2001. 145 p.

MONTEIRO, R. T. R. Biodegradação de pesticidas em solos brasileiros. In: MELO, I. S.; SILVA, C. M. M. S.; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. *Biodegradação*. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 2001. p. 1-14.

MONTGOMERY, D. C. *Design and analysis of experiments*. 3. ed. New York: John Wiley, 1991. 672 p.

MOREALE, A.; VAN BLADEL, R. Soil interaction of herbicide derived aniline residues: a thermodynamic approach. *Soil Science*, v. 127, p. 1-9, 1979.

MOSTAFA, F. I.; HELLING, C. S. Isolation and 16S DNA characterization of soil microorganisms from tropical soils capable of utilizing the herbicides hexazinone and tebuthiuron. *Journal of Environmental Science and Health. Part B*, v. 38, p. 783-797, 2003.

MUKHERJEE, I.; MITTAL, A. Bioremediation of endosulfan using *Aspegillus terreus* and *Cladosporium oxysporum*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 75, p. 1034-1040, 2005.

MULBRY, W. W.; ZHU, H.; NOUR, S. M.; TOPP, E. The triazine hydrolase gene *atzN* from *Nocardioides* sp. strain C190: cloning and construction of gene-specific primers. *FEMS Microbiology Letters*, v. 206, p. 75-79, 2002.

NOGUEIRA, N. L.; BARROSO, P. A. V. Microscopia eletrônica aplicada aos estudos de ecologia microbiana. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. *Ecologia microbiana*. Jaguariúna: Embrapa-CNPMA, 1998. p.279-307.

ODA, Y.; OSAKA, H.; URAKAMI, T.; TONOMURA, K. Purification and Properties of Poly(3-Hydroxybutyrate) Depolymerase from the Fungus *Paecilomyces lilacinus* D218. *Current Microbiology*, v. 34, p. 230-232, 1997.

OHMES, G. A.; HAYES, R. M.; MUELLER, T. C. Sulfentrazone dissipation in surface soil. *Proceedings of the Southern Weed Science Society*, p.23, 1998.

OHMES, G. A.; HAYES, R. M.; MUELLER, T. C. Sulfentrazone dissipation in a Tennessee soil. *Weed Technology*, v.14, p.100-105, 2000.

OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; KOSKINEN, W. C.; FERREIRA, F. A. Sorption and leaching potential of herbicides on Brazilian soils. *Weed Research*, v. 41, p. 97-110, 2001.

OLSON, B. M.; LINDWALL, C. W. Soil microbial activity under chemical fallow conditions: effect of 2,4-D and glyphosate. *Soil Biology & Biochemistry*, v. 23, p. 1071-1075, 1991.

OSANO, O.; ADMIRAAL, W.; KLAMER, H. J. C.; PASTOR, D.; BLEEKER, E. A. J. Comparative toxic and genotoxic effects of chloroacetanilides, formamidines and their degradation products on *Vibrio fischeri* and *Chironomus riparius*. *Environmental Pollution*, v. 119, p. 195-202, 2002.

PACHIONE, R. Química e Derivados. Disponível em: <<http://www.quimica.com.br/revista/qd429/defensivos1.htm>> Consultado em: 03 out. 2005.

PARAÍBA, L.C.; CERDEIRA, A.L.; SILVA, E.F. da; MARTINS, J. S.;COUTINHO, H.L.C. Evaluation of soil temperature effect on the herbicide leaching potential into groundwater in the brazilian cerrado. *Chemosphere*, v. 53, p. 1087-1095, 2003.

PARK, J. H.; FENG, Y.; JI, P.; VOICE, T. C.; BOYD, S. A. Assessment of bioavailability of soil-sorbed atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 69, p. 3288–3298, 2003.

PARSONS, B.; WITT, J.M. Pesticides in groundwater in the USA. A report of a 1988 survey of US States. EM 8406; Oregon State University Extension Service. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 25, n. 8, p.1097-1105, 1989.

PICK, F. E.; van DYK, L. P.; BOTHA, E. Atrazine in ground and surface water in maize production areas of the Transvaal, South Africa. *Chemosphere*, v. 25, p. 335-341, 1992.

PIMENTA, L. O grão de ouro. Disponível em: <<http://www.revelacaoonline.uniube.br/economia/grao.htm>> Consultado em: 10 fev. 2004.

PLANAS, C.; CAIXACH, J.; SANTOS, F. J.; RIVERA, J. Occurrence of pesticides in Spanish surface waters. Analysis by high resolution gas chromatography coupled to mass spectrometry. *Chemosphere*, v. 34, p. 2393-2406, 1997.

POINTING, S. B. Feasibility of birremediation by with-rot fungi. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 57, p. 20-33, 2001.

POTHULURI, J. V.; EVANS, F. E.; DOERGE, D. R.; CHURCHWELL, M. I.; CERNIGLIA, C. E. Metabolism of metolachlor by the fungus *Cunninghamella elegans*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 32, p. 117-125, 1997.

REDDY, K. N.; LOCKE, M. A. Sulfentrazone sorption, desorption, and mineralization in soils from two tillage systems. *Weed Science*, v. 46, p.494-500, 1998.

REGITANO, J. B.; ALLEONI, L. R. F.; TORNISIELO, V. L. Atributos de solos tropicais e a sorção de imazaquin. *Scientia Agricola*, v. 58, p. 801-807, 2001.

RICHARDSON, M. Pesticides-friend or foe? *Water Science and Technology*, v. 37, p. 19-25, 1998.

RIGHETTO, R. T. S. Impacto ambiental decorrente do uso de pesticidas. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. (Ed). *Microbiologia Ambiental*. Jaguariúna, SP: Embrapa CNPMA, 1997. p. 415-438.

ROY, C.; GAILLARDON, P.; MONTFOT, F. The effect of soil moisture content on the sorption of five sterol biosynthesis inhibiting fungicides as a function of their physicochemical properties. *Pest Management Science*, v. 56, p.795-803, 2000.

SADOWSKY, M. J.; TONG, Z. K.; de SOUZA, M.; WACKETT, L. P. AtzC is a new member of the amidohydrolase protein superfamily and is homologous to other atrazine-metabolizing enzymes. *Journal of Bacteriology*, v. 180, p.152-158, 1998.

SANYAL, D.; KULSHRESTHA, G. Metabolism of metolachlor by fungal cultures. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, p. 499-505, 2002.

SAS Institute Inc. *SAS/STAT[®] 9.1 Users Guide*. Cary, NC: SAS Institute Inc, 2004.

SATSUMA, K. Characterisation of new strains of atrazine-degrading *Nocardioide* sp. isolated from Japanese riverbed sediment using naturally derived river ecosystem. *Pest Management Science*, v. 62, p. 340-349, 2006.

SATTERTHWAITE, F. W. An approximate distribution of estimates of variance components. *Biometrics Bulletin*, v. 2, p. 110-114, 1946

SAXENA, A.; ZHANG, R.; BOLLAG, J.-M. Microorganisms capable of metabolizing the herbicide metolachlor. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 53, p. 390–396, 1987.

SCOW, K. M.; JOHNSON, C. R. Effect of sorption on biodegradation of soil pollutants. *Advances in Agronomy*, v. 58, p.1-56, 1997.

SEFFERNICK, J. L.; JOHNSON, G.; SADOWSKY, M. J.; WACKETT, L. P. Substrate Specificity of Atrazine Chlorohydrolase and Atrazine-Catabolizing Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 66, p. 4247-4252, 2000.

SETTE, L. D.; OLIVEIRA, V. M.; MANFIO, G. P. Isolation and characterization of alachlor-degrading actinomycetes from soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, v. 87, p. 81-89, 2005.

SHULA, A.K.; MISHRA, R.R. Influence of herbicides on microbial population and enzyme activity in potato (*Solanum tuberosum*) – field soil. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, v. 67, n. 12, p. 610-611, 1997.

SILVA, A. A.; OLIVEIRA JUNIOR, R. S.; CASTRO FILHO, J. E. Avaliação da atividade residual no solo de imazaquin e trifluralin através de bioensaios com milho. *Acta Scientiarum*, v.20, p.291-295, 1998.

SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S.; FAY, E. F. Biotransformação de agrotóxicos e biorremediação. In: SILVA, C. M. S.; FAY, E. F. (Ed.). *Agrotóxicos & ambiente*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 145-192.

SINGH, S. B.; KULSHRESTHA, G. Microbial degradation of pendimethalin. *Journal of environmental science and health. Part. B, Pesticides, food contaminants, and agricultural wastes*, v. 26, p. 309-321, 1991.

SINGH, P.; SURI, C. R.; CAMEOTRA, S. S. Isolation of a member of Acinetobacter species involved in atrazine degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 317, p. 697-702, 2004.

SIQUEIRA, J. O. *Biologia do solo*. Lavras, MG: ESAL/FAEPE, 1993, 230p.

SIQUEIRA, J. O.; MOREIRA, F.M. DE S.; GRISI, B. M.; HUNGRIA, M.; ARAUJO, R. S. *Microrganismos e processos biológicos do solo: perspectiva ambiental*. Brasília: EMBRAPA-SPI, 1994, 142 p.

SMITH, D.; ALVEY, S.; CROWLEY, D. E. Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 53, p.265-273, 2005.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. *Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. 29 p.

TOMLIN, C. D. S. *The pesticide manual: A world compendium*. 12th. ed. Croydon: British Crop Protection Council, 2000. 1250 p.

TRUMAN, C. C.; LEONARD, R. A.; DAVIS, F. M. GLEAMS-TC: a two-compartment model for simulating temperature and soil water content effects on pesticide losses. *Soil Science*, v.163, p.362-373, 1998.

TURNBULL, G. A.; OUSLEY, M.; WALKER, A.; SHAW, E.; MORGAN, J. A. W. Degradation of substituted phenylurea herbicides by *Arthrobacter globiformis* strain D47 and characterization of a plasmid-associated hydrolase gene, *puhA*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, p. 2270-2275, 2001.

TURPEINEN, B. K.; TUOMELA, M.; HATAKKA, A.; HOFRICHTER, M. Lignin degradation in a compost environment by the deuteromycete *Paecilomyces inflatus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 61, p. 374–379, 2001.

VAN RAIJ, B.; ANDRADE, J. C.; CANTARELLA, H.; QUAGGIO, A. J. *Análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais*. Campinas: Instituto Agrônômico, 2001. 285 p.

VROUMSIA, T.; STERIMAN, R.; MURANDI, F. S.; GUYOD, J. L. B.; GEDEXE. Fungal bioconversion of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and 2,4-dichlorophenol (2,4DCP). *Chemosphere*, v. 60, p. 1471-1480, 2005.

WIDEHEM, P.; AIT-AISSA, S.; TIXIER, C.; SANCELME, M.; VESCHAMBRE, H.; TRUFFAUT, N. Isolation, characterization and diuron transformatin capacities of a bacterial strain *Arthrobacter* sp. N2. *Chemosphere*, v. 46, p. 527-534, 2002.

YEN, P. Y.; KOSKINEN, W. C.; SCHWEIZER, E. E. Dissipation of alachlor in four soils as influenced by degradation and sorption process. *Weed Science*, v. 42, p. 233–240, 1994.

YEN, J. H.; SHEU, W. S.; WANG, Y. S. Dissipation of the herbicide oxy.uorfen in subtropical soils and its potential to contaminate groundwater. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 54, p.151–156, 2003.

APENDICE A

Médias referentes a concentração de sulfentrazona ($\mu\text{g g}^{-1}\text{solo}$) detectada no decorrer do tempo sob o efeito umidade*data, nos solos AVA, LVA e LVE.

Efeito	Solo	Data	Umidade (%CC)	Valor estimado ($\mu\text{g g}^{-1}\text{solo}$)	Erro padrão
Umidade*data	AVA	30	30	0,8992	0,1293
Umidade*data	AVA	30	70	0,6214	0,1293
Umidade*data	AVA	30	100	0,5959	0,1293
Umidade*data	AVA	60	30	0,7741	0,1293
Umidade*data	AVA	60	70	0,6173	0,1293
Umidade*data	AVA	60	100	0,6365	0,1293
Umidade*data	AVA	120	30	0,4142	0,1293
Umidade*data	AVA	120	70	0,4035	0,1293
Umidade*data	AVA	120	100	0,5991	0,1293
Umidade*data	AVA	180	30	0,3595	0,1293
Umidade*data	AVA	180	70	0,3704	0,1293
Umidade*data	AVA	180	100	0,4968	0,1293
Umidade*data	AVA	255	30	0,2628	0,1293
Umidade*data	AVA	255	70	0,1653	0,1293
Umidade*data	AVA	255	100	0,4418	0,1293
Umidade*data	LVA	30	30	0,4346	0,08485
Umidade*data	LVA	30	70	0,5678	0,08485
Umidade*data	LVA	30	100	0,6214	0,08485
Umidade*data	LVA	60	30	0,4798	0,08485
Umidade*data	LVA	60	70	0,6203	0,08485
Umidade*data	LVA	60	100	0,5988	0,08485
Umidade*data	LVA	120	30	0,3861	0,08485
Umidade*data	LVA	120	70	0,3972	0,08485

Efeito	Solo	Data	Umidade (%CC)	Valor estimado ($\mu\text{g g}^{-1}\text{solo}$)	Erro padrão
Umidade*data	LVA	120	100	0,4983	0,08485
Umidade*data	LVA	180	30	0,2524	0,08485
Umidade*data	LVA	180	70	0,2314	0,08485
Umidade*data	LVA	180	100	0,3628	0,08485
Umidade*data	LVA	255	30	0,2727	0,08485
Umidade*data	LVA	255	70	0,2151	0,08485
Umidade*data	LVA	255	100	0,3493	0,08485
Umidade*data	LVE	30	30	0,8376	0,08725
Umidade*data	LVE	30	70	0,6368	0,08725
Umidade*data	LVE	30	100	0,8618	0,08725
Umidade*data	LVE	60	30	0,7355	0,08725
Umidade*data	LVE	60	70	0,5567	0,08725
Umidade*data	LVE	60	100	1,1242	0,08725
Umidade*data	LVE	120	30	0,5342	0,08725
Umidade*data	LVE	120	70	0,6963	0,08725
Umidade*data	LVE	120	100	1,3345	0,08725
Umidade*data	LVE	180	30	0,3860	0,08725
Umidade*data	LVE	180	70	0,4215	0,08725
Umidade*data	LVE	180	100	0,5160	0,08725
Umidade*data	LVE	255	30	0,4142	0,08725
Umidade*data	LVE	255	70	0,4474	0,08725
Umidade*data	LVE	255	100	0,6309	0,08725

APENDICE B

Médias referentes a concentração de sulfentrazona ($\mu\text{g g}^{-1}\text{solo}$) detectada no decorrer do tempo sob o efeito temperatura*data, nos solos AVA, LVA e LVE.

Efeito	Solo	Data	Temperatura (C°)	Valor estimado ($\mu\text{g g}^{-1}\text{solo}$)	Erro padrão
Temperatura*data	AVA	14	15	0,8643	0,06810
Temperatura*data	AVA	14	30	0,6466	0,06810
Temperatura*data	AVA	14	40	0,8845	0,06810
Temperatura*data	AVA	30	15	0,6125	0,06810
Temperatura*data	AVA	30	30	0,5351	0,06810
Temperatura*data	AVA	30	40	0,7096	0,06810
Temperatura*data	AVA	60	15	0,7431	0,06810
Temperatura*data	AVA	60	30	0,5714	0,06810
Temperatura*data	AVA	60	40	0,6414	0,06810
Temperatura*data	AVA	120	15	0,3910	0,06810
Temperatura*data	AVA	120	30	0,5330	0,06810
Temperatura*data	AVA	120	40	0,5298	0,06810
Temperatura*data	LVA	14	15	0,5257	0,04354
Temperatura*data	LVA	14	30	0,5789	0,04354
Temperatura*data	LVA	14	40	0,6334	0,04354
Temperatura*data	LVA	30	15	0,5601	0,04354
Temperatura*data	LVA	30	30	0,4255	0,04354
Temperatura*data	LVA	30	40	0,5946	0,04354
Temperatura*data	LVA	60	15	0,5519	0,04354
Temperatura*data	LVA	60	30	0,5483	0,04354
Temperatura*data	LVA	60	40	0,5597	0,04354
Temperatura*data	LVA	120	15	0,4466	0,04354
Temperatura*data	LVA	120	30	0,3149	0,04354

Efeito	Solo	Data	Temperatura (C°)	Valor estimado (µg g⁻¹solo)	Erro padrão
Temperatura*data	LVA	120	40	0,4778	0,04354
Temperatura*data	LVE	14	15	0,7936	0,05234
Temperatura*data	LVE	14	30	0,6122	0,05234
Temperatura*data	LVE	14	40	0,5563	0,05234
Temperatura*data	LVE	30	15	0,5643	0,05234
Temperatura*data	LVE	30	30	0,4605	0,05234
Temperatura*data	LVE	30	40	0,5476	0,05234
Temperatura*data	LVE	60	15	0,7045	0,05234
Temperatura*data	LVE	60	30	0,6006	0,05234
Temperatura*data	LVE	60	40	0,5074	0,05234
Temperatura*data	LVE	120	15	0,4414	0,05234
Temperatura*data	LVE	120	30	0,3029	0,05234
Temperatura*data	LVE	120	40	0,2573	0,05234