

AVALIAÇÃO DE BIODEGRADAÇÃO E MINERALIZAÇÃO DE AMETRINA RADIOMARCADA, EM SOLOS, UTILIZANDO TRÊS SISTEMAS DE CAPTURA DE $^{14}\text{CO}_2$

VICENTE XAVIER COMPTE *
VALDEMAR LUIZ TORNISIELO **

Neste estudo foram comparados três sistemas de coleta de dióxido de carbono, que são usados para estudar a degradação e mineralização de agroquímicos em solos, ou seja, frasco de cal sodada, frasco de Bartha-Pramer e frasco de 500 mL (boca larga). Os solos utilizados foram o Latossolo Vermelho Escuro (LE) (33 g dm^{-3} de M.O.) e o Glei Húmico (GH) (130 g dm^{-3} de M.O.). O herbicida escolhido foi a Ametrina, de alta persistência e muito utilizada em culturas como abacaxi, café, citros, cana-de-açúcar e milho para controle de monocotiledôneas e dicotiledôneas. Efetuou-se incubação de 50 g de solo (peso seco) por 63 dias no escuro a $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, com o solo mantido a 60% de sua capacidade de retenção de água. O dióxido de carbono desprendido foi medido por espectrometria de cintilação líquida e as amostras de solos foram oxidadas para se verificar a permanência do produto no solo. Os metabólitos produzidos aos 28° e aos 63° dias foram extraídos e identificados por cromatografia de camada delgada (TLC) e scanner. Os três sistemas de coleta de $^{14}\text{CO}_2$ não apresentaram diferença entre si com relação à percentagem de dióxido de carbono desprendido, em relação ao aplicado. Não se verificou a presença de metabólito. A Ametrina foi classificada como herbicida de alta persistência em ambos os solos (LE e GH). Após 63 dias de incubação, 1,3% de dióxido de carbono foi detectado no solo LE e 0,1% no solo GH.

1 INTRODUÇÃO

Grande quantidade de insumos agrícolas é utilizada na agricultura moderna com a finalidade de aumentar a produtividade e garantir a produção de alimentos para a humanidade. Muitos destes insumos

* Doutorando em Química Analítica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, São Paulo (e-mail: lepton@usp.br).

** Pesquisador, Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, São Paulo (e-mail: vltornis@cena.usp.br).

apresentam efeito nocivo ao ambiente, sendo o seu uso recomendado de maneira criteriosa a fim de reduzir o risco de impacto ambiental (5).

A verificação da ocorrência ou não da degradação de determinado herbicida pela biomassa do solo pode ser feita pela técnica da respirometria, que consiste em se medir a taxa de oxigênio consumido ou a taxa de dióxido de carbono produzido (3).

O isótopo ^{14}C apresenta meia-vida de 5770 anos, o que permite sua utilização como traçador em experimentos de longa duração. Sua desintegração ocorre pela emissão de partículas beta negativas de 156 keV de energia.

Um dos sistemas utilizados na respirometria, emprega pastilhas de cal sodada para coletar o dióxido de carbono desprendido (2), a qual permite a entrada e saída do oxigênio no interior do frasco (3).

O frasco descrito por BARTHA & PRAMER (4) pode ser usado em experimentos de longa duração, com matrizes sólidas, líquidas e também com sedimentos. Na década de 1960 este frasco substituiu as tubulações e armadilhas que eram montadas para se fazer a respirometria (sistema Wasburg).

Vários autores utilizam frascos com pequenos volumes de soda (armadilhas para coletar o dióxido de carbono), que não apresentam semelhança com o frasco de Bartha-Pramer e nem com o frasco de cal sodada (1, 11, 12, 13, 14, 17, 18, 20, 21, 22).

O objetivo deste trabalho foi avaliar três sistemas diferentes de coleta de dióxido de carbono radiomarcado, utilizando herbicida de alta persistência (Ametrina) e dois tipos de solos, ou seja, Latossolo Vermelho Escuro (LE) e Gleí Húmico (GH).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 SOLO

Foram utilizados os solos, Latossolo Vermelho Escuro (LE) e Gleí Húmico (GH) com as características físico-químicas mostradas na Tabela 1. Ao chegar do campo o solo foi peneirado (2 mm) para destorroamento, retirando-se também amostras para análise química e granulométrica.

2.2 HERBICIDA

Escolheu-se a Ametrina (2-etilamino-4-isopropilamino-6-metil-1,3,5-triazina) pela alta persistência e uso em culturas como abacaxi, café, citros, cana-de-açúcar e milho para controle de monocotiledôneas e dicotiledôneas. Foram aplicados $175,54 \text{ Bq g}^{-1}$ na dosagem de $3,46 \text{ mg i.a. kg}^{-1} \text{ solo}$, o que equivale $4,15 \text{ kg ha}^{-1}$.

TABELA 1 - CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DOS SOLOS LATOSSOLO VERMELHO ESCURO (LE): DISTRÓFICO, A MODERADO, TEXTURA MÉDIA (CULTURA CITROS) E GLEI HÚMICO (GH): ÁLICO, TB, TEXTURA ARGILOSA (CULTURA: PASTAGEM NATURAL)

Solo	pH CaCl ₂	M.O. g dm ⁻³	T mmol _c	Arg. dm ⁻³	Silte g kg ⁻¹	A. F.	A. G.	A. T.	Textura
LE	4.7	33	101	330	40	360	230	590	m
GH	3.7	130	291	350	340	300	10	310	m/a

M.O. = Matéria Orgânica; T = Capacidade de Troca de Cátions.

m = média; m/a = média a argilosa.

A.F.= areia fina; A.G.= areia grossa; A.T.= areia total.

2.3 SISTEMAS DE COLETA DE ¹⁴CO₂ (ARMADILHA)

O sistema de cal sodada, descrito por ANDERSON (2), consiste num erlenmeyer de 300 mL com boca esmerilhada, sobre o qual se encaixa uma coluna com junta esmerilhada, que apresenta tubo lateral para aeração, fechado com rolha de borracha. Nesta coluna coloca-se uma camada de lã de vidro, 10 g de cal sodada, outra camada de lã de vidro, 4 g de cal sodada (para proteger o sistema da entrada de dióxido de carbono atmosférico) e outra camada de lã de vidro.

O sistema de Bartha-Pramer (4) usa erlenmeyer de 250 mL, com tubo fundido lateralmente de 50 mL e fundo arredondado. Neste são depositados 10 mL de KOH 0,1 N para coletar o ¹⁴CO₂ desprendido do solo que está no erlenmeyer. Sobre o registro localizado na abertura do frasco coloca-se cal sodada para proteger o sistema da entrada de CO₂ atmosférico.

O sistema do frasco de 500 mL consiste em frasco (semelhante aos utilizados em comptotas), no qual se coloca 50 g de solo, com espaço aberto no centro para inserir pequeno frasco suporte. Dentro deste é colocado outro frasco com capacidade de 20 mL, contendo 1 mL de NaOH 0,2N, conforme COSTA (9).

2.4 AMOSTRAGEM DO ¹⁴CO₂

No sistema de cal sodada foi passado fluxo de 11,0 mL min⁻¹ de ar comprimido por 15 minutos. Posteriormente extraiu-se o ¹⁴CO₂ da cal sodada com 50 mL de HCl 6 M para cada 10 g de cal sodada. Capturou-se

o $^{14}\text{CO}_2$ desprendido por dois coletores com 20 mL de solução de metanol-monoetanolamina 7:3 (v:v). Retiraram-se duas alíquotas de 1 mL cada, procedeu-se a detecção por cintilometria, calculou-se a média e somou-se o valor, utilizando fator de correção de 20 vezes.

Já no sistema de Bartha-Pramer, duas alíquotas de 1 mL foram retiradas de cada amostra de 10 mL existente, procedendo-se a detecção por cintilometria. A média obtida foi multiplicada pelo fator 10.

No sistema do frasco de 500 mL a amostragem foi feita com a detecção por cintilometria do $^{14}\text{CO}_2$ coletado na armadilha, que continha 1 mL de NaOH 0,2 N, diretamente, não requerendo fator de multiplicação.

2.5 EXTRAÇÃO

O herbicida Ametrina foi extraído segundo metodologia descrita por RAMSTEINER et al. (19). Transferiram-se 30 g de solo LE para cartucho de filtração, acrescentou-se ao balão de 250 mL, de fundo arredondado 100 mL de metanol e procedeu-se extração em Soxhlet por 2 horas. Após este tempo o solo extraído foi retirado e transferido para envelope de folha de papel de alumínio, completando-se o volume de metanol para 100 mL. Colocou-se o solo restante (no mesmo cartucho) para ser extraído por 2 horas.

Os extratos alcoólicos foram transferidos para funil de separação. Lavou-se o balão com 1 mL de metanol por 4 vezes e adicionou-se ao extrato alcoólico 200 mL de água destilada, 20 mL de solução aquosa saturada de NaCl e 100 mL de clorofórmio. Agitou-se o funil, vigorosamente, recolhendo-se a fase orgânica (clorofórmio) após a separação das fases. A partição com clorofórmio foi feita novamente com adição de mais 100 mL ao extrato alcoólico. O extrato resultante da combinação dos extratos orgânicos foi filtrado com 17 g de sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para eliminação de água. O filtrado foi coletado em balão de fundo redondo e concentrado para 3 mL em evaporador rotativo. O concentrado foi transferido para frasco de 20 mL e o balão de fundo arredondado foi enxaguado por quatro vezes com 2 mL de clorofórmio. O extrato foi evaporado sob fluxo de ar até a secura e armazenado em "freezer" a $-18\text{ }^\circ\text{C}$ para posterior aplicação em placas de cromatografia de camada delgada (CCD), para determinação dos metabólitos.

2.6 CROMATOGRAFIA DE CAMADA DELGADA

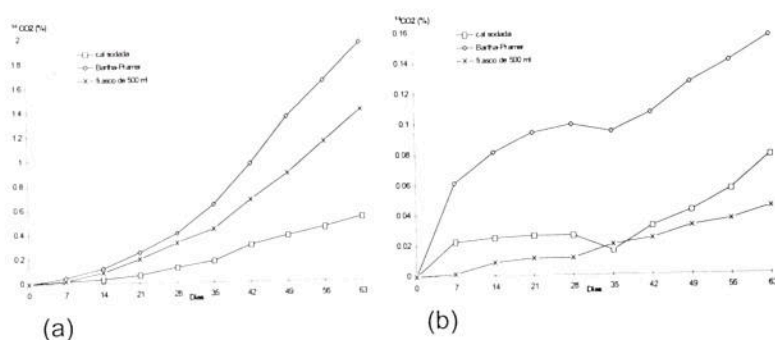
A mistura de solventes utilizada foi acetonitrila:água:ácido fórmico 94:5:1 (v:v), (8) e o volume de 100 mL. As relações de frente (Rf) foram determinadas por "scanner" e luz ultra-violeta.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 PORCENTAGEM DE $^{14}\text{CO}_2$ DESPRENDIDO

A porcentagem de dióxido de carbono desprendido durante 63 dias de incubação, resultantes da mineralização do herbicida Ametrina, nos solos LE e GH, nos três sistemas, pode ser visualizada na Figura 1.

FIGURA 1 - PORCENTAGEM DE $^{14}\text{CO}_2$ ACUMULADO NAS ARMADILHAS DOS MÉTODOS CAL SODADA, BARTHA-PRAMER E FRASCO DE 500 mL, DO HERBICIDA AMETRINA NOS SOLOS LE (A) E GH (B) - ATÉ 63 DIAS



O herbicida Ametrina apresentou baixo desprendimento de $^{14}\text{CO}_2$ ao final de 63 dias, o que o caracteriza como herbicida de alta persistência em ambos os solos. Os resultados mostrados na Figura 1 e nas Tabelas 2 e 3 estão de acordo com os dados apresentados por BLANCO & OLIVEIRA, EL-SHERBENI et al., LEON et al. e MESA (6, 10, 15, 16). Estes usaram em seus experimentos doses que variaram de 2,8 kg i.a. ha⁻¹ até 6 kg i.a. ha⁻¹ e 90 a 240 dias de incubação. Obtiveram mineralização lenta da Ametrina (0,1 ppm 20 dias⁻¹), persistência maior que 3 meses e meia vida de 38,9 dias ou de 20 dias.

Ao final de 28 dias de incubação (Tabela 3) (período proposto pelo IBAMA para testes de mineralização) a Ametrina foi classificada como herbicida "de persistência alta" (meia vida maior que 180 dias) (7).

TABELA 2 - RESULTADOS DA APLICAÇÃO DO TESTE T NA COMPARAÇÃO DE MÉDIAS DA PORCENTAGEM DE $^{14}\text{CO}_2$, ACUMULADO DURANTE 63 DIAS NAS ARMADILHAS DOS SISTEMAS CAL SODADA, BARTHA-PRAMER E FRASCO DE 500 mL, DO HERBICIDA AMETRINA, NOS SOLOS LE E GH

Solo	Sistema	Média % $^{14}\text{CO}_2$	Teste t
LE	Cal sodada	0,5	a
	Bartha-pramer	2	a
	Frasco 500 ml	1	a
GH	Cal sodada	0,078	a
	Bartha-pramer	0,156	a
	Frasco 500 ml	0,044	a

TABELA 3 - PORCENTAGEM DE $^{14}\text{CO}_2$ DESPRENDIDO DE AMETRINA, EM 28 DIAS NOS SOLOS LE E GH

Sistema	Solos	
	LE	GH
Cal sodada	0,1	0,03
Bartha-pramer	0,4	0,10
Frasco 500 ml	0,3	0,01

Pode-se observar que, tanto no solo LE como no solo GH o desprendimento de dióxido de carbono foi menor que 1%.

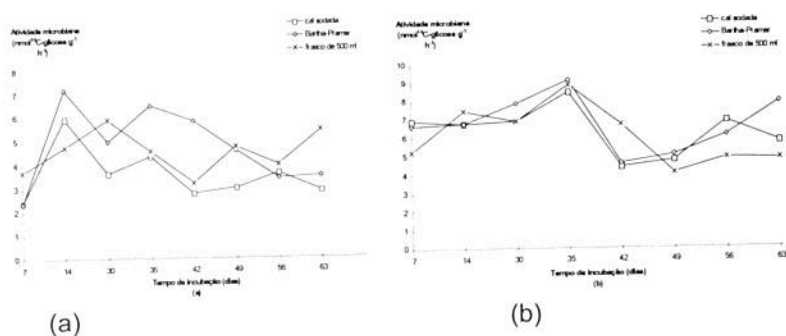
3.2 METABÓLITOS

O herbicida Ametrina não produziu metabólito, isto é, como sua degradação foi lenta (alta persistência), não houve tempo suficiente para formação de metabólitos, ou a quantidade formada foi muito pequena, e não detectada.

3.3 ATIVIDADE MICROBIANA

A atividade microbiana avaliada ao longo dos 63 dias de incubação apresentou, como pode ser visto na Figura 2, oscilações insignificantes, consideradas como ocorrência natural.

FIGURA 2 - ATIVIDADE MICROBIANA SEMANAL DURANTE 63 DIAS DE INCUBAÇÃO PARA OS SOLOS LE (A) E GH (B), PELOS MÉTODOS CAL SODADA, BARTHA-PRAMER E FRASCO DE 500 mL



4 CONCLUSÃO

Não foi verificada diferença significativa entre a coleta de $^{14}\text{CO}_2$ pelos sistemas cal sodada, Bartha-Pramer e frasco de 500 mL para o herbicida Ametrina.

O sistema do frasco de 500 mL mostrou-se mais prático que os sistemas cal sodada e Bartha-Pramer, considerando o tempo de troca das armadilhas, não exigir extração posterior do $^{14}\text{CO}_2$ e principalmente, por evitar correções dos valores obtidos no cintilador.

A Ametrina foi classificada como herbicida de "persistência alta" em ambos os solos (LE e GH).

Não foi observada presença de metabólitos do herbicida Ametrina.

Abstract

When agrochemicals enter the environment they can suffer chemical, photochemical, biological degradation, leaching, adsorption, desorption, leaf uptake root, gaseous loss, besides being incorporated into the biomass which is existent in the environment. With the purpose of understanding better all these mechanisms, many agrochemicals have been

studied all over the world, mainly of its intense use in agriculture. To that end, respirometry techniques are deployed as well as radiolabelled techniques with radioisotope ^{14}C . In this study there were compared three different systems of carbon dioxide trapping, which are world wide used for mineralization and degradation of agrochemicals in soils: soda lime flask. The soils that were used in the experiment were Humic Gley (13% o.m.) and Dark Red Latosol (3,3% o.m.); the herbicide used was Ametryn. Each flask was incubated with 50 g of soil (dry weight), during 63 days, in the dark, at $25 \pm 2^\circ\text{C}$. The soil was maintained at 60% of its retention water capacity. The carbon dioxide that was emitted, was detected by liquid scintillation spectrometry and the soil samples were combusted to check the bound residue. The metabolites produced on the 28 th and 63 th days were identified by thin layer chromatography (TLC), and scanner. The three systems did not show any differences amongst themselves in relationship to the percentage of emitted carbon dioxide in comparison to the applied one. No metabolites were found from Ametryn herbicide. Ametryn showed high persistence in both soils. After 63 days the Dark Red Latosol showed 1,3% of carbon dioxide emitted from the Ametryn. The Humic Gley showed 0,1% of carbon dioxide emitted from Ametryn. There are no differences in the capacity of trapping carbon dioxide between different trapping systems.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AMONETTE, J., O'CONNOR, G.A. Nonionic surfactant effects on adsorption and degradation of 2,4-D. **Soil Science Society of America Journal**, v. 44, p. 540-544, 1980.
- 2 ANDERSON, J.P.E. Einfluss von temperatur und feuchte auf verdampfung, abbau und festlegung von diallat im boden. **Zeitschrift Pflanzenkrankh Pflanzenschutz Sonderheft**, v. 7, p. 141-46, 1975.
- 3 ANDERSON, J.P.E. Principles of and assay systems for biodegradation. In: KAMELY, D., CHAKRABARTY, A., OMENN, G. **Biotechnology and biodegradation**. Woodlands : Portfolio, 1990. p. 528. (Advances in Applied Biotechnology Series, 4).
- 4 BARTHA, R., PRAMER, D. Features of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, v. 100, n. 1, p. 68-70, 1965.
- 5 BISWAS, M.R. Agriculture and environment: a review, 1972-1992. **Ambio**, v. 23, n. 3, p. 192-197, 1994.
- 6 BLANCO, H.G., OLIVEIRA, D.A. Persistência de ametryne, atrazine, simazine e diuron no solo após aplicações anuais, em cultura de cana-de-açúcar. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 24, n. 9, p. 1161-1168, 1989.

- 7 BRASIL. Ministério do Interior. **Manual de testes para avaliação da ecotoxicidade de agentes químicos**. Brasília : MINTER-Secretaria Especial do Meio Ambiente, 1988.
- 8 BURKHARD, N., GUTH, J.A. Photodegradation of atrazine, atraton and ametryne in aqueous solution with acetone as a photosensitiser. **Pesticide Science**, v. 7, n. 1, p. 65-71, 1976.
- 9 COSTA, M.A. **Biodegradação de ¹⁴C-Ametrina em areia quartzosa com adição de palha de cana e solo rizosférico**. Piracicaba, 1992. 107p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo.
- 10 EL-SHERBENI, A.E., ABD EL-BAKI, M.A., SHADY, M.F.A. Movement, persistence and phytotoxicity of ametryne herbicides in soil. **Journal Agricultural Research Tanta University**, v. 19, n. 1, p. 234-244, 1993.
- 11 FOURNIER, J.C., CODACCIONI, P., SOULAS, G. Soil adaptation to 2,4-D degradation in relation to the application rates and the metabolic behaviour of the degrading microflora. **Chemosphere**, v. 10, n. 8, p. 977-984, 1981.
- 12 JACOBSEN, C.S., PEDERSEN, J.C. Mineralization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in soil inoculated with *Pseudomonas cepacia* DBO1 (pRO101), *Alcaligenes eutrophus* AE106 (pRO101) and *Alcaligenes eutrophus* JMP134 (pJP4): effects of inoculation level and substrate concentration. **Biodegradation**, v. 2, p. 253-263, 1992.
- 13 KUNC, F., RYBÁROVÁ, J. Mineralization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soil previously enriched with organic substrates. **Folia Microbiologica**, v. 29, p. 156-161, 1984.
- 14 KUNC, F., RYBÁROVÁ, J., LASÍK, J. Mineralization of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in soil simultaneously enriched with saccharides. **Folia Microbiologica**, v. 29, p. 148-155, 1984.
- 15 LEON, L., CONSTENLA, M., BORNEMISZA, E. Residuos, degradación y comportamiento de la ametrina en un vertisol de Guanacaste, Costa Rica. **Turrialba**, v. 28, n. 1, p. 3-7, 1978.
- 16 MESA, A.C. Cinética de la degradación de los herbicidas bromacil y ametrina en piña y los residuos en suelo ferralítico rojo. **Revista Centro Agrícola**, v. 16, n. 3, p. 79-87, 1989.

- 17 O'CONNOR, G.A., FAIRBANKS, B.C., DOYLE, E.A. Effects of sewage sludge on phenoxy herbicide adsorption and degradation in soils. **Journal of Environmental Quality**, v. 10, n. 4, p. 510-515, 1981.
- 18 PIGNATELLO, J.J. Dark and photoassisted Fe³⁺ catalyzed degradation of chlorophenoxy herbicides by hydrogen peroxide. **Environmental Science and Technology**, v. 26, n. 5, p. 944-951, 1992.
- 19 RAMSTEINER, K., HÖRMANN, W.D., EBERLE, D.O. Multiresidue method for the determination of triazine herbicides in field-grown agricultural crops, water and soils. **Journal of the AOAC**, v. 57, n. 1, p. 192-201, 1974.
- 20 SOULAS, G., LAGACHERIE, B. Modelling of microbial processes that govern degradation of organic substrates in soil, with special reference to pesticides. **Philosophical Transaction of the Royal Society of London, Serie B**, v. 329, p. 369-373, 1990.
- 21 WALKER, A., WELCH, S.J. Enhanced degradation of some soil-applied herbicides. **Weed Research**, v. 31, p. 49-57, 1991.
- 22 WILSON JR., R.G., CHENG, H.H. Fate 2,4-D in a naff silt loam soil. **Journal of Environmental Quality**, v. 7, n. 2, p. 281-286, 1978.

Agradecimentos

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro a este projeto: "Biodegradation and mineralization of ¹⁴C-Ametryn in LE and GH soils in three systems of ¹⁴CO₂ trapping".