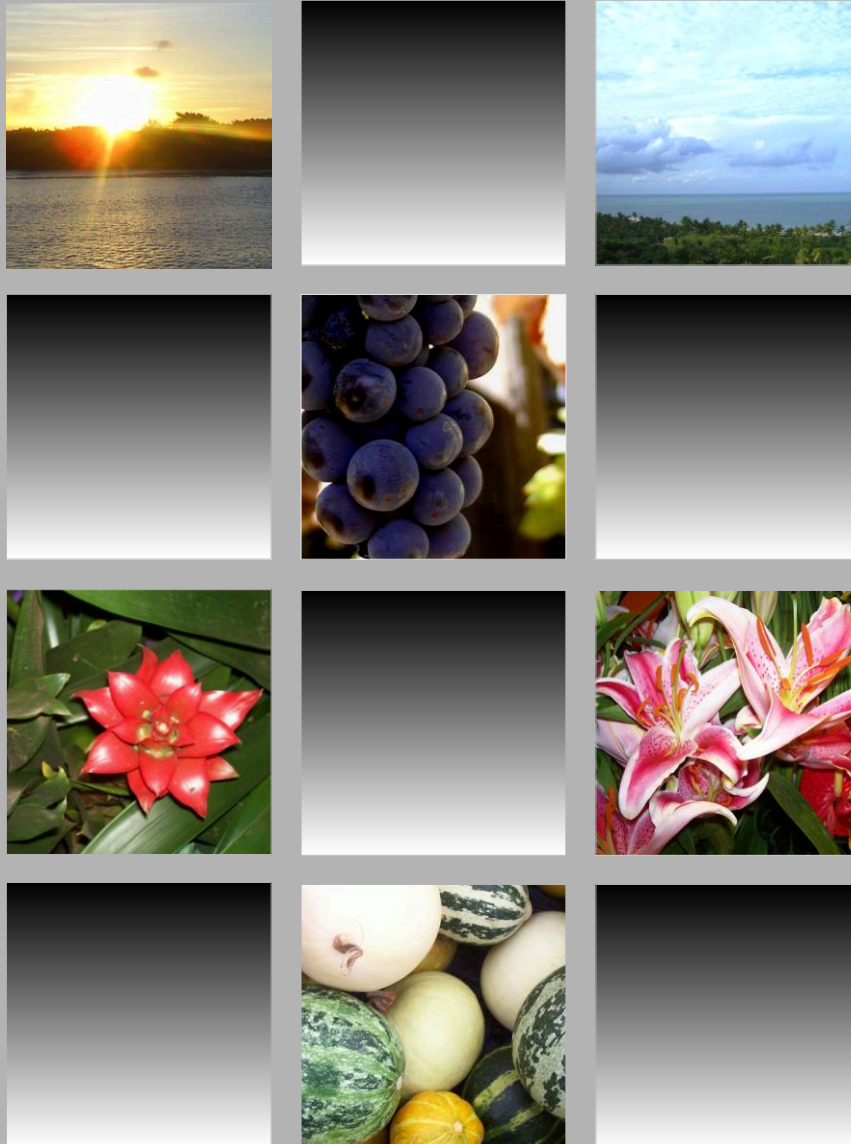


Impacto ambiental do fungicida Metalaxil



Editores

Célia Maria M. S. Silva & Elisabeth F. Fay

Embrapa

Impacto Ambiental do Fungicida Metalaxil

Autores

Andrea Maria Spessoto

Cientista Biológica, doutora em Genética e Evolução, Professora Assistente Nível I, Universidade Cruzeiro do Sul, Campus São Miguel, Av. Dr. Ulisses Cirilo, 225, CEP 08060-070, São Paulo, SP.

Fone: (11) 6137-5700.

e-mail: andrea.spessoto@ufsj.edu.br

Célia Maria Maganhotto de Souza Silva

Graduação em História Natural, doutora em Microbiologia Aplicada, pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP 340, km 127,5, CEP 13820-000, Tanquinho Velho, Jaguariúna, SP.

Fone: (19) 3867-8763.

E-mail: celia@cnpma.embrapa.br

Elisabeth Francisconi Fay

Farmacêutica-bioquímica, M. Sc. em Ciências Biológicas, pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP 340, km 127,5, CEP 13820-000, Tanquinho Velho, Jaguariúna, SP.

Fone: (19) 3867-8737.

E-mail: bethfay@cnpma.embrapa.br

Itamar Soares de Melo

Engenheiro agrônomo, doutor em Genética e Melhoramento de Plantas, pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP 340, km 127,5, CEP 13820-000, Tanquinho Velho, Jaguariúna, SP.

Fone: (19) 3867-8765.

E-mail: itamar@cnpma.embrapa.br

Regina Teresa Rosim Monteiro

Bióloga, doutora em Ecologia, professora do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Avenida Centenário, 303, Caixa Postal 96, CEP 13400-970, Piracicaba, SP.

Fone: (19) 3429-4761.

E-mail: monteiro@cena.usp.br

Rosana Faria Vieira

Engenheira agrônoma, doutora em Agronomia (Microbiologia Agrícola), pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP 340, km 127,5, CEP 13820-000, Tanquinho Velho, Jaguariúna, SP.

Fone: (19) 3867-8716.

E-mail: rosana@cnpma.embrapa.br

Vera Lúcia Ferracini

Química, doutora em Química Orgânica, pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP 340, km 127,5, CEP 13820-000, Tanquinho Velho, Jaguariúna, SP.

Fone: (19) 3867-8789.

E-mail: veraf@cnpma.embrapa.br

Vera Lúcia S.S. de Castro

Médica veterinária, doutora em Patologia Experimental e Comparada, pesquisadora da Embrapa Meio Ambiente, Rodovia SP 340, km 127,5, CEP 13820-000, Tanquinho Velho, Jaguariúna, SP.

Fone: (19) 3867-8739.

E-mail: castro@cnpma.embrapa.br

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Meio Ambiente
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Impacto Ambiental do Fungicida Metalaxil

Editores

*Célia Maria Maganhotto de Souza Silva
Elisabeth Francisconi Fay*

Embrapa Meio Ambiente
Jaguariúna, SP
2006

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Meio Ambiente

Rodovia SP 340 - km 127,5 - Tanquinho Velho
Caixa Postal 69 13820-000 Jaguariúna, SP
Fone: 19-3867-8750 Fax: 19-3867-8740
sac@cnpma.embrapa.br www.cnpma.embrapa.br

Comitê de Editoração:

Heloisa Ferreira Filizola; Manoel Dornelas de Souza; Cláudio César de Almeida Buschinelli; Maria Conceição Peres Young Pessoa; Osvaldo Machado R. Cabral; Marta Camargo de Assis

Normalização bibliográfica

Maria Amélia de Toledo Leme

Projeto gráfico/Editoração eletrônica

Silvana C. Teixeira Estevão

Capa

Itamar Soares de Melo e Silvana C. Teixeira Estevão

1ª edição

1ª impressão (2006)

Todos os direitos reservados.

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei n.º 9610).

É permitida a reprodução parcial do conteúdo deste livro desde que citada a fonte.

CIP. Brasil. Catalogação na publicação.

Silva, Célia Maria Maganhotto de Souza

Impacto ambiental do fungicida metalaxil / editado por Célia Maria Maganhotto de Souza Silva e Elisabeth Francisconi Fay. – Jaguariúna : Embrapa Meio Ambiente, 2006.

94p.

ISBN 85-85771-41-0

1. Metalaxil. 2. Fungicida – Impacto ambiental. I. Fay, Elisabeth Francisconi. II. Título.

CDD: 363.7384

© Embrapa Meio Ambiente, 2006

Apresentação

A equipe de pesquisa da Embrapa Meio Ambiente vem desenvolvendo, com a parceria de especialistas de outras instituições sejam públicas ou privadas, estudos em biodegradação de pesticidas em solos brasileiros. São estudos de caráter básico, que poderão resultar em tecnologias e conhecimentos de aplicação direta na recuperação de ambientes rurais e urbanos contaminados com agrotóxicos.

Como mais um produto dessa parceria de longo prazo, temos a satisfação de apresentar o livro *Metalaxil*, com resultados sobre processos de degradação desse fungicida em condições de solos brasileiros. Trata-se de insumo de uso bastante difundido entre os agricultores brasileiros, sendo recomendado para aplicação foliar em frutas (uva, melão, melancia), hortaliças (batata, cebola, pepino e tomate) e flores (rosa), além do tratamento de sementes de cereais (milho e soja). A obra é composta de seis capítulos, de autoria de seis pesquisadores da Embrapa Meio Ambiente: Célia Maria Maganhotto de Souza Silva, Elisabeth Francisconi Fay, Itamar Soares de Melo, Rosana Faria Vieira, Vera Lúcia Ferracini e Vera Lúcia de Castro; das professoras Andrea Maria Spessoto da Universidade Cruzeiro do Sul e Regina Teresa Rosim Monteiro da Universidade de São Paulo.

No primeiro capítulo é apresentada a caracterização do fungicida metalaxil; no segundo, o efeito desse fungicida na microbiota do solo em condições do semi-árido brasileiro; no terceiro e quarto capítulos, são apresentadas, respectivamente, a quantificação e adsorção e, a mineralização do fungicida metalaxil em solos brasileiros. No quinto capítulo é caracterizada a genética da comunidade bacteriana associada à biodegradação desse fungicida. E, finalmente, no sexto capítulo, são apresentados os aspectos da avaliação dos efeitos da exposição ao metalaxil em organismos não-alvo.

São contribuições valiosas que a equipe de pesquisa da Embrapa Meio Ambiente e instituições parceiras oferecem à sociedade brasileira: ao desvendar os processos de degradação do fungicida metalaxil apresentam as bases para recomendações de boas práticas agropecuárias (BPAs) em termos de uso e manejo desse insumo nos diferentes sistemas de produção, como também indicam caminhos para a gestão da qualidade ambiental a partir da mobilização da microbiota do solo. Esta contribuição é complementada pela revisão e estudo de efeitos toxicológicos decorrentes da exposição ao metalaxil; o que com certeza auxiliará também na gestão da saúde ambiental e por consequência, na qualidade ambiental.

É, portanto, leitura obrigatória para pesquisadores e estudiosos do tema como também para os especialistas que atuam na gestão ambiental da agropecuária nacional.

Paulo Choji Kitamura
Chefe-Geral da Embrapa Meio Ambiente

Prefácio

A população humana e sua demanda por alimentos continua a crescer, sendo que o nível de produtividade que a sociedade atual exige da moderna agricultura não parece ser possível sem o uso de xenobióticos. No entanto, há necessidade de que o aumento do uso dos recursos solo e água ocorra por caminhos que assegurem a produtividade sustentável. Para isso, pesquisadores e usuários destes recursos precisam entender melhor o manejo dos processos que regulam a fertilidade do solo. Estudos sobre a biodiversidade e conservação dos organismos do solo, a estrutura das interações tróficas de suas comunidades e sua função no ecossistema, além das possibilidades para o manejo das práticas de uso agrícola na promoção da sustentabilidade estão entre estes conhecimentos. Além disso, somente o uso e o manejo adequado dos xenobióticos pode resultar em ganhos de produtividade, sem ocasionar contaminação nos alimentos e no ambiente.

O destino de um xenobiótico do seu ponto de aplicação, através da superfície do solo e, dentro do subsolo, é governado pelos processos interativos de adsorção, transformação e transporte. O entendimento da ciência que está por trás destas rotas de dissipação é uma das chaves para assegurar, o seu uso ambientalmente correto.

Existe um consenso que o impacto ambiental de um xenobiótico depende de alguns critérios, entre eles: 1) a quantidade do ingrediente ativo aplicado e o local de aplicação; 2) a partição e a concentração nos compartimentos ar, solo e águas superficiais e subterrânea; 3) a taxa de degradação em cada compartimento e 4) sua toxicidade às espécies presentes nestes compartimentos. Portanto, não é surpreendente a existência de vários métodos para avaliar o impacto ambiental dos xenobióticos.

Este documento considera a avaliação do impacto ambiental do uso do fungicida metalaxil pelos resultados de pesquisas realizadas por pesquisadores de diferentes áreas de conhecimento, envolvendo desde a dispersão até a toxicologia do composto.

Sumário

Capítulo 1

Metalaxil

*Célia Maria Maganhotto de Souza Silva; Elisabeth Francisconi Fay e
Andrea Maria Spessoto..... 13*

Capítulo 2

Efeito do Fungicida Metalaxil na Microbiota do Solo da Região Semi-Árida Brasileira

*Célia Maria Maganhotto de Souza Silva; Rosana Faria Vieira e
Elisabeth Francisconi Fay 21*

Capítulo 3

Quantificação e Adsorção do Fungicida Metalaxil em Solos Brasileiros

Andrea Maria Spessoto; Itamar Soares de Melo e Vera Lucia Ferracini..... 35

Capítulo 4

Mineralização do Fungicida ¹⁴C-Metalaxil em Solos Brasileiros

Andrea Maria Spessoto; Itamar Soares de Melo e Regina Teresa Rosim Monteiro..... 47

Capítulo 5

Caracterização Genética da Comunidade Bacteriana Associada a Biodegradação do Fungicida Metalaxil

Andrea Maria Spessoto..... 61

Capítulo 6

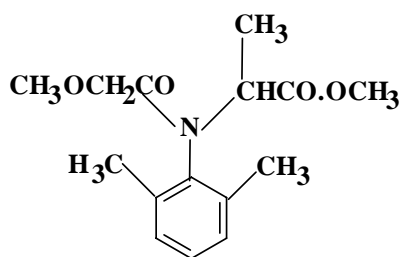
Aspectos da Avaliação da Exposição ao Metalaxil

Vera Lúcia S. S. de Castro 79

Metalaxil

*Célia Maria Maganhotto de Souza Silva;
Elisabeth Francisconi Fay e Andrea Maria Spessoto*

O metalaxil [metil D,L,N-(dimetilfenil)-N-(2-metoxiacetil)alaninato] (Fig. 1) fungicida sistêmico do grupo dos alaninatos (acilaninas), é uma mistura racêmica de enantiômeros R- e S-, com classe toxicológica variando de II a IV, dependendo de sua formulação e comercialização sob vários nomes, incluindo Ridomil®, Apron®, Fonganil Neu®. É extensivamente utilizado na agricultura brasileira, em fruticultura, plantas ornamentais e hortaliças (GELMINI, 1991; SPESSOTO ET AL., 2000; PAPINI & ANDRÉA, 2001; SPESSOTO, 2002). Por ser estável em ampla faixa de pH e luminosidade (SINGH & TRIPATHI, 1982) e devido ao seu amplo espectro de atividade ele é registrado para uso em muitos países, em regiões temperadas, subtropicais e tropicais (MONKIEDJE et al., 2002). Juntamente com o furalaxil, foi primeiramente descrito em 1977 (URECH et al., 1977) e sua fungitoxicidade está associada à função éster da molécula. O metalaxil inibe a síntese do RNA ribossomal, interferindo desta forma na síntese de proteínas (TOMLIN, 2000).



Metalaxil

Fig. 1. Estrutura química do metalaxil

Efeito do metalaxil sobre a microbiota do solo

Apesar do uso dos fungicidas ser uma prática comum no controle de doenças de plantas, ele pode afetar a homeostase do solo, todavia, são poucas as informações sobre o seu prejuízo ambiental. Qualquer alteração no solo pode levar

a uma mudança no equilíbrio desse sistema, afetando diretamente a estrutura e função da comunidade microbiana. Isto foi evidenciado com aplicações de metalaxil em solos cultivados com uva. Foi observado que após três anos, houve inibição significativa do número de microrganismos e da atividade microbiana, mas aumento no número de microrganismos envolvidos na degradação da matéria orgânica (USATAYA et al., 1993). Outros trabalhos relataram que a aplicação sistêmica de metalaxil induziu a uma breve estimulação com subsequente supressão dos fungos e actinomicetos do solo (DVORNIKOVA et al., 1988).

Os problemas relacionados aos efeitos dos fungicidas sobre os processos do solo estão baseados no fato de que muitas reações envolvidas na ciclagem de nutrientes são mediadas por microrganismos, além da possibilidade destes compostos entrarem na cadeia alimentar e desta forma afetar organismos superiores, como o homem. Por exemplo, o metalaxil já foi encontrado em água (READMAN et al., 1997; PETROVIC et al., 1998) e alimentos (OM et al., 1998).

O solo é o último receptor para os agrotóxicos e seu transporte no perfil desse sistema é a maior fonte de contaminação da água subterrânea. Em revisão recente sobre o comportamento do metalaxil em solo, SUKUL & SPITELLER (2000a) concluíram que este composto pode migrar para os mais profundos horizontes desse compartimento ambiental e alcançar a água subterrânea, especialmente em solos com baixo conteúdo de matéria orgânica. Estes autores recomendaram precaução com as aplicações contínuas de metalaxil e, se há aumento no uso deste composto, deve ser reavaliado o risco de sua ocorrência em água subterrânea, nas áreas mais vulneráveis da principal região de uso. Contudo, estudos publicados sobre a adsorção/dessorção de metalaxil, indicam que a baixa adsorção e a alta mobilidade deste composto, e a interrelação desses processos com a matéria orgânica do solo estão relacionados, principalmente, ao seu principio ativo, poucos fazem referência ao produto formulado (SUKOP & COGGER, 1992; SHARMA & AWASTI, 1997; SUKUL & SPITELLER, 2000B; ANDRADES et al. 2001).

Ao estudar o comportamento sortivo do metalaxil, mefenoxan (também chamado R-metalaxil) e de seu metabólito ácido, em solo franco-arenoso, MONKIEDGE & SPITELLER (2002) encontraram valores de K_d de 0,5; 0,5 e 0,1 mL g⁻¹ para os três compostos, respectivamente. Segundo cálculo dos autores, baseados nos resultados obtidos, a concentração do fungicida que poderia adsorver e ficar disponível à microbiota do solo para inibir seu crescimento seria de 4.500, 12.500 e 15.800 µg g⁻¹ solo (peso seco) para mefenoxam, metalaxil e para

o metabólito ácido, respectivamente. Esses valores estão acima da concentração ambiental esperada (MONKIEDGE et al., 2002), indicando assim que os fungicidas, bem como o metabólito, em baixas concentrações não inibem o crescimento dos microrganismos do solo, hipótese esta confirmada pelo estímulo da amonificação e nitrificação após a aplicação dos dois fungicidas. Esta afirmação também está em concordância com as observações de FINKELSTEIN & GOLOVLEVA (1988) que demonstraram que baixas concentrações de metalaxil estimularam o crescimento de bactérias fixadoras de nitrogênio, enquanto altas concentrações inibiram o processo de nitrificação. Da mesma forma, as baixas concentrações de metalaxil aumentaram a atividade enzimática e a inibiram em altas doses (SHETTY & MAGU, 2001). De todas as hidrolases estudadas, as fosfatases ácida e alcalina, em geral, não foram sensíveis ao efeito do metalaxil, provavelmente devido à complexa interação destas enzimas com o solo, mas a atividade da desidrogenase foi bastante sensível (MONKIEDGE et al., 2002).

Em relação a toxicidade do metalaxil em organismos não-alvo de forma geral e, em especial em seres humanos, ainda não se conhece bem seus possíveis efeitos.

Efeito da microbiota do solo sobre o metalaxil

A degradação do metalaxil tem sido relatada como sendo, principalmente, microbiológica e dependente de fatores como tipo de solo, condições climáticas e histórico de aplicação (BAILEY & COFFEY, 1985; 1986). A capacidade de degradar o fungicida tem sido atribuída a muitos microrganismos, sobressaindo as bactérias (SPESSOTO et al., 2000; SPESSOTO, 2002). Em solo arenoso, a população natural apresentou taxa de degradação do metalaxil diferenciada, quando considerada superfície e sub-superfície do solo (DI et al., 1998).

A meia-vida do metalaxil tem sido descrita como variável, podendo ser alguns dias até meses. Por exemplo, estudos realizados com microrganismos isolados de solos com histórico de aplicação do metalaxil apresentaram meia-vida de 14 dias (BAILEY & COFFEY, 1986), enquanto que estudos sobre a mineralização do fungicida, considerando solos com diferentes teores de areia apresentaram meia-vida entre 69 e 159 dias (WANG et al., 1995). Segundo SPESSOTO (2002) uma vez que a molécula esteja disponível na solução do solo ela pode ser rapidamente metabolizada, diminuindo os riscos ambientais provocados pela recalcitrância. A ausência de metabólitos provenientes da

mineralização do anel radiomarcado em estudos realizados pela autora reforçou esta hipótese, sugerindo que a degradação do metalaxil pode ocorrer em um prazo inferior a 70 dias de incubação.

Outros trabalhos demonstraram o aparecimento de dois metabólitos provenientes da degradação do fungicida, após 60 dias de incubação, sendo que apenas um foi identificado, N-(2-metoxiacetil)-N-(2,6 xilil)-D L-alanina (MUSUMECI & RUEGG, 1984). Outros autores detectaram a presença de um metalaxil ácido como sendo o principal metabólito gerado pela degradação do fungicida (DROBY & COFFEY, 1991).

Solos que apresentam histórico de aplicação de agrotóxicos têm sido relatados como capazes de dissipar mais facilmente estas moléculas pelo fato de apresentarem populações microbianas que se caracterizam por um curto período de aclimação e rápida fase exponencial de crescimento (ALEXANDER, 1999). Vários autores demonstraram que em solos onde existe histórico de aplicações constantes de metalaxil foram observadas as maiores taxas de dissipação do fungicida em menor tempo (BAILEY & COFFEY, 1986; DROBY & COFFEY, 1991; NARESH et al., 1997; PAPINI & ANDRÉA 2001; SPESSOTO, 2002). A aplicação repetida do fungicida pode aumentar a seleção dos microrganismos degradadores e conseqüentemente aumentar a taxa de degradação da molécula, cujo fenômeno é conhecido como biodegradação acelerada. DROBY & COFFEY (1991) avaliaram as taxas de biodegradação de metalaxil ¹⁴C em seis solos com características diferentes durante quatro semanas e os resultados variaram de 2,1% até 11,3%. Os solos com histórico de aplicações prévias do fungicida foram os que apresentaram as maiores taxas de biodegradação e, de acordo com as porcentagens remanescentes de radioatividade, determinaram a meia-vida do fungicida como sendo de apenas seis dias.

Um exemplo de degradação acelerada de metalaxil em solos brasileiros é apresentado por PAPINI & ANDRÉA (2001). Os autores estudaram a dissipação do fungicida em dois tipos de solos utilizados para plantio de laranja e limão. Os resultados demonstraram que a degradação acelerada ocorreu somente em um tipo de solo, embora em ambos tenha sido detectado degradação parcial e mineralização do fungicida. Segundo os autores, as amostras de áreas tratadas apresentaram taxa de mineralização pelo menos duas vezes mais altas quando comparadas às áreas nunca expostas ao fungicida (máximo de 26,9% e 11,5%, respectivamente).

Em estudos sobre a degradação acelerada do metalaxil pela ação sinérgica entre bactérias e fungos isolados de três solos diferentes, SOUDAMINI & AWASTHI (1997) observaram que as culturas de fungos não oomicetos de todos os solos interagiram para aumentar a degradação do fungicida. Culturas enriquecidas em solo arenoso, depois de repetidas aplicações de metalaxil, nas condições de seco, alagado e irrigado agiram mais efetivamente na degradação do fungicida que outras culturas obtidas em solos nunca expostos ao agrotóxico.

Considerando quatro solos diferentes, SPESSOTO (2002) verificou que as bactérias demonstraram tendência a beneficiar-se com a presença da molécula do fungicida no solo, sugerindo a existência de populações adaptadas à degradação do composto, cujos resultados ficaram evidentes em solos com histórico de aplicação do fungicida. As maiores taxas de mineralização foram obtidas nestes solos, sugerindo que as aplicações sucessivas do composto estimulariam ou selecionariam o crescimento de microrganismos aptos a degradarem o fungicida. Segundo a autora os *Bacillus* seriam o grupo de degradadores de metalaxil mais indicados como agentes biológicos em estudos de biorremediação de solos contaminados com o fungicida.

Referências

- ALEXANDER, M. *Biodegradation and bioremediation*. 2.ed. New York: Academic Press, 1999. 453 p.
- ANDRADES, M.S.; SANCHEZ, M.J.; SANCHEZ-CAMAZANO, M. Significance of soil properties in the adsorption and mobility of the fungicide metalaxil in vineyard soils. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, v. 49, p. 2363-2369, 2001.
- BAILEY, A. M.; COFFEY, M. D. Biodegradation of metalaxyl in avocado soils. *Phytopathology*, v. 75, n. 2, p. 135-137, 1985.
- BAILEY, A.M.; COFFEY, M.D. Characterization of microorganisms involved in accelerated biodegradation of metalaxyl and metolachlor in soils. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 32, p. 562-569, 1986.
- DI, H. J.; AYLMOORE, L. G. A.; KOOKANA, R. S. Degradation rates of eight pesticides in surface and subsurface soils under laboratory and field conditions. *Soil Science*, v. 163, n. 5, p. 404-411, 1998.
- DROBY, S.; COFFEY, M. D. Biodegradation process and the nature of metabolism of metalaxyl in soil. *Annals of Applied Biology*, v. 118, n. 3, p. 543-553, 1991.
- DVORNIKOVA, T.P.; GRANATSKAYA, T.A.; FINKEL, Z.I.; SHTEIN-TOLOCHKINA, S.A.; PESTREVA, N.S.; NESHINSKII, A.A. Behavior of Ridomil(metalaxil) in soil and its effects on soil microflora. *Agrokimiya*, v.11, p.11-18, 1988.
- FINKELSTEIN, Z.I.; GOLOVLEVA, L.A. Effect of regular application of pesticides on nitrogen bacteria. *Zentralblatt für Mikrobiologie*, v. 143, p. 453-456, 1988.

- GELMINI, G.A. *Agrotóxicos: legislação básica*. Campinas: Fundação Cargill, 1991.
- MONKIEDGE, A.; SPITELLER, M. Sorptive behavior of the phenylamide fungicides, mefenoxam and metalaxyl, and their acid metabolite in typical Cameroonian and German soils. *Chemosphere*, v. 49, p. 659-668, 2002.
- MONKIEDGE, A.; ILORI, M.O.; SPITELLER, M. Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to sandy loam soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 34, p. 1939-1948, 2002.
- MUSUMECI, M. R.; RUEGG, E. F. Microbial degradation of metalaxyl in the soil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 9, n. 3, p. 583-591, 1984.
- NARESH, M.; SAHARAN, G. S.; KATHPAL, T. S. Absorption and degradation of metalaxyl in mustard plant (*Brassica juncea*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 37, p. 119-124, 1997.
- OM, A.S.; CHUNG, K.W.; KO, I.S. Pesticides residues in marketed sesame. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 61, p. 716-721, 1998.
- PAPINI, S.; ANDRÉA, M.M. Enhanced degradation of metalaxyl in agricultural soils of São Paulo State, Brazil. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 36, n. 1, p. 1-5, 2001.
- PETROVIC, A.M.; WILLIAM, C.B.; LARSON-KOVACH, I.M.; REID, C.M.; LISK, D.J. Downward migration of metalaxil fungicide in creeping bentgrass sand lysimeters as affected by organic waste, peat and zeolite amendments. *Chemosphere*, v. 37, p. 249-256, 1998.
- READMAN, J.W.; ALBANIS, T.A.; BARCELO, D.; GALASSI, J.; TRONCZYNSKI-GABRELIDS, G.P. Fungicide contamination of mediterranean estuarine waters: results from a MEDPOL pilot survey. *Marine Pollution Bulletin*, v. 34, p. 259-263, 1997.
- SHARMA, D.; AWASTI, M.D. Adsorption and movement of metalaxyl in soils under unsaturated flow conditions. *Plant and Soil*, v. 195, p. 293-298, 1997.
- SHETTY, P.K.; MAGU, S.P. Metalaxyl effect on nitrogenase activity (acetylene reduction) and yield of mungbean (*Vigna radiata* (L.) wilzek). *Journal of Environmental Biology*, v. 22, p. 79-81, 2001.
- SINGH, U.S.; TRIPATHI, R.K. Physico-chemical and biological properties of metalaxyl. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, v. 12, p. 287-294, 1982.
- SODAMINI-MOHAPATRA, M.; AWASTHI, M. D. Degradation of metalaxyl by enrichment cultures from sandy loam soil developed under different moisture regimes. *Pesticide Research Journal*, v. 9, n. 1, p. 36-40, 1997.
- SPESSOTO, A. M.; MELO, I. S.; FERRACINI, V. L. Dissipação do fungicida metalaxil em solos brasileiros. *Revista Brasileira de Fitopatologia*, v. 25, n. 4, p. 596-601, 2000.
- SPESSOTO, A. M. *Dissipação do fungicida metalaxil em solos brasileiros e caracterização genética por RAPD de isolados envolvidos no processo*. 2002. 93p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2002.
- SUKOP, M.; COGGER, C.G. Adsorption of carbofuran, metalaxyl and simazine: Koc evaluation and relation to soil transport. *Journal of Environment Science and Health*, v. B27, p. 565-590, 1992.
- SUKUL, P.; SPITELLER, M. Metalaxyl: persistence, degradation, metabolism and analytical methods. Review. *Environmental Contamination and Toxicology*, v. 164, p. 1-16, 2000a.
- SUKUL, P.; SPITELLER, M. Sorption study of metalaxyl in soils of different physico-chemical properties. *Fresenius Environmental Bulletin*, v. 9, p. 701-710, 2000b.
- TOMLIN, T. *The pesticide manual*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2000.
- URESH, P.A.; SCHWINN, F.; STAUB, T. CGA 48988, a novel fungicide for the control of late blight downy mildew and related soil borne diseases. In.: BRITISH CROP PROTECTION CONFERENCE. PESTS AND DISEASES, 9., 1977. *Proceedings...* Croydon: BCPC, 1977. p. 623-631.

USATAYA, A.S.; MERENYUK, G.V.; KATRUK, E.A. Biological activity of vineyard soils under the application of fungicides. *Buletinul. Academiei de Stiinte a Republicii Moldova. Stiinte Biologie Chimice*, v. 6, p. 40-42, 1993.

WANG, H.; PENG, G.; QI, M. Study on degradation and residues of ¹⁴C-metalaxyl in soil. *Acta Agriculturae Universitatis Pekinensis*, v. 21, n. 4, p. 395-401, 1995.

Efeito do Fungicida Metalaxil na Microbiota do Solo da Região Semi-Árida Brasileira

Célia Maria Maganhotto de Souza Silva; Rosana Faria Vieira e Elisabeth Francisconi Fay

Introdução

Na região semi-árida brasileira está concentrada uma grande parte da fruticultura do país. As práticas agrícolas utilizadas nestas áreas podem afetar o equilíbrio do ecossistema solo como, por exemplo, no caso do uso de agrotóxicos. Estes compostos orgânicos têm um papel benéfico na produtividade agrícola, no entanto, são potenciais poluidores ambientais. Eles chegam ao solo por meio da aplicação direta e também como resultado de atividades não agrícolas. Uma vez no solo, normalmente afetam os processos bioquímicos e microbiológicos.

A ocorrência de interferência do fungicida metalaxil nas propriedades biológicas e bioquímicas do solo, relacionadas à qualidade deste sistema, restringem-se a alguns poucos trabalhos, principalmente quando se considera solos de regiões áridas. A atividade microbiana é sempre dependente da temperatura do solo, umidade e disponibilidade de C orgânico. Estes solos são difíceis de recuperar após os efeitos do uso e/ou manejo inadequados, o que pode levar a uma permanente degradação e perda de produtividade (PASCUAL et al., 2000).

Efeito do metalaxil sobre a microbiota do solo

Para avaliar o efeito do fungicida metalaxil sobre microbiota de solos da região semi-árida brasileira, foi conduzido um experimento em casa-de-vegetação, utilizando solo coletado em plantio comercial de uva na região de Petrolina, PE. Esse solo foi classificado como latossolo vermelho-amarelo, textura arenosa, com as seguintes características físicas e químicas: pH (H₂O) 5,4; capacidade de troca catiônica 19,4 mmolc dm⁻³; matéria orgânica 9,3 g dm⁻³; argila 142,1 g kg⁻¹, areia 765,1 g kg⁻¹ e silte 82,7 g kg⁻¹.

Em laboratório o solo foi colocado em caixas plásticas brancas, sem drenagem, com capacidade para 4 kg, as quais constituíram as unidades experimentais. A umidade do solo foi corrigida para 60-70% da capacidade de campo e mantida constante até o final do período experimental, por meio de pesagens periódicas. Após um período de repouso de sete dias, os solos foram suplementados com o fungicida metalaxil (0; 3 e 30 µg g⁻¹ de solo), aplicado com um volume de água suficiente para manter a umidade do solo em 60-70% da capacidade de campo. Solos sem adição de fungicida foram utilizados para o controle. As avaliações dos cinco parâmetros microbiológicos ocorreram após 0, 7, 14, 21, 42 e 119 dias de incubação. A temperatura do solo também foi monitorada, tendo permanecido entre 23 a 28°C durante o período.

O efeito dos fungicidas sobre a microbiota do solo foi avaliado pelos parâmetros carbono da biomassa microbiana (Cmic); comprimento de hifa viva, atividade hidrolítica do diacetato de fluoresceína (FDA) e atividades enzimáticas da desidrogenase e fosfatase ácida.

Na avaliação do Cmic foi utilizado o método de extração-fumigação (VAN CE et al., 1987). Os resultados obtidos para este parâmetro (Fig. 2.1) não demonstraram interação significativa entre tempo*tratamento, no entanto, o Cmic foi significativamente afetado pelo período de incubação (P<0,01%). Observou-se que, apesar do efeito negativo do metalaxil sobre este parâmetro estar presente desde o início das avaliações, ele somente foi significativo a partir do 28º dia. Quando comparado à testemunha, o tratamento com suplementação de 3 µg g⁻¹ apresentou inibição de 78% e 52% enquanto que na concentração mais alta (30 µg g⁻¹) esta inibição foi de 45% e 67% aos 28 e 42 dias respectivamente. Posteriormente houve recuperação da microbiota, apresentando no final do período experimental (119 dias) um incremento de 41 e 81% em relação ao controle, para a menor e maior dose

respectivamente, demonstrando que provavelmente houve aporte de nutrientes ou C, provenientes dos microrganismos afetados pelo fungicida.

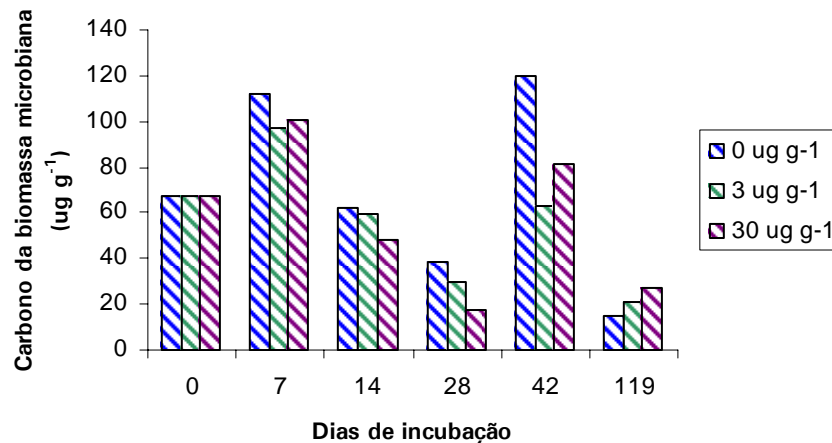


Fig. 2.1. Carbono da biomassa microbiana (C_{mic}) em $\mu\text{g g}^{-1}$ em solos coletados em Petrolina, PE, e suplementados em laboratório com diferentes concentrações de metalaxil (0; 3 e 30 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo). Média de três repetições.

Apesar de NANNIPIERI et al. (1990) observarem que no caso de ecossistemas complexos como os das regiões áridas e semi-áridas, as medidas de parâmetros como a biomassa microbiana ser problemática devido ao desequilíbrio natural destas áreas, GARCIA et al. (1994 e 1997) utilizaram este parâmetro como indicador da atividade microbológica de solos áridos do Mediterrâneo. Os autores observaram que em solos áridos o C_{mic} pode ser um indicador sensível das modificações no conteúdo de matéria orgânica quando relacionadas às atividades microbianas.

Neste estudo, realizado em laboratório, com solos da região semi-árida do Brasil, foi observado que o efeito negativo sobre este parâmetro pode estar relacionado principalmente ao efeito sobre a comunidade fúngica, como demonstra a correlação significativa ($P < 0,01\%$) entre o C_{mic} e a comprimento de hifa viva.

Comprimento de hifa viva: água sob pressão foi adicionada a 20 g de solo contidos em um becker de 500 mL. A suspensão foi vertida em peneiras de 0,71 e 0,25 mm, montadas sobre um funil e um becker de 2 litros. As peneiras foram lavadas com um forte jato de água e a suspensão (1,5 litros) transferida para um liquidificador, onde foi agitada por 10 segundos a baixa velocidade, para garantir a dispersão dos agregados; a mistura permaneceu em repouso por 2 min antes de ser lentamente vertida em uma peneira de 44 mesh. O material retido nesta peneira foi suspenso em tampão fosfato (pH 7,4; KH_2PO_4 0,1 M + NaOH 0,1 M; 10 mL). Para determinação do comprimento de hifas vivas, 5 mL dessa suspensão foi misturada com 5 mL da solução de diacetato de fluoresceína (FDA) (BLOEM et al., 1995). O FDA (5 mg) foi dissolvido em 2 mL de acetona (NOGUEIRA & CARDOSO, 2000). Após incubação a temperatura ambiente por 5 min as hifas foram colhidas por filtração em um filtro Millipore quadriculado (0,45 μm). O comprimento das hifas fluorescentes foi determinado utilizando-se luz ultravioleta emitida em microscópio epifluorescente. Para esse comprimento de onda utilizou-se um filtro azul. O comprimento das hifas foi quantificado em 64 quadrados delineados no centro do filtro, com magnificação de 60X. O comprimento de hifas vivas foi calculado de acordo com a equação de Newman (NEWMAN, 1966).

$$R = (\pi \cdot A \cdot n) / 2 \cdot H \quad [1]$$

onde: R é o comprimento do micélio extraradicular avaliado nos 64 campos do filtro Millipore (mm); A é a área do filtro; n é o número de intersecções das hifas sobre as linhas horizontais do `gride` reticulado da ocular; H é o comprimento total das linhas horizontais do *gride*.

De acordo com MONKIEDJE et al. (2002) a aplicação de metalaxil e mefenoxam aumentou a comunidade bacteriana do solo, provavelmente por ser fonte de C para alguns grupos de bactérias ou por causar a liberação de outras fontes de nutrientes. Em solos da região sudeste do Brasil, MORETINI (2000) observou o mesmo efeito do metalaxil sobre a comunidade bacteriana. Segundo DROBY & COFFEY (1991), as bactérias não são afetadas pela aplicação deste fungicida, mas podem ser as responsáveis pelo desaparecimento da molécula no solo. Os mesmos autores relatam que o metalaxil atinge outras classes de fungos além daqueles para os quais foi sintetizado, o que é preocupante do ponto de vista ambiental. Por outro lado, os resultados evidenciam que o efeito do fungicida foi transitório.

A estimativa da biomassa fúngica, baseada no comprimento de hifa viva, variou de 0,16 a 2,62 m g^{-1} solo seco (Fig. 2.2). Apesar de não significativo, o efeito negativo do fungicida metalaxil sobre este parâmetro foi observado logo aos 7 dias de incubação, com inibição de 39 e 53% para a menor e maior dose aplicada, respectivamente, quando comparado ao tratamento testemunha. Da mesma forma que para o Cmic, aos 28 dias, esta inibição alcançou patamares de 33% na menor dose, enquanto que para a

maior dose a inibição foi de apenas 12%. Posteriormente houve recuperação da biota fúngica.

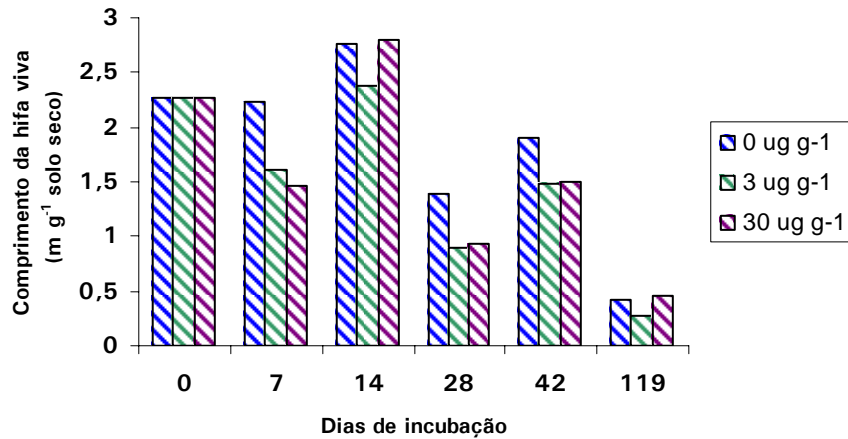


Fig. 2.2. Comprimento da hifa viva (m g^{-1} solo seco) em solos coletados em Petrolina, PE, e suplementados em laboratório com diferentes concentrações de metalaxil (0; 3 e 30 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo). Média de três repetições.

Tanto pelo parâmetro da biomassa microbiana quanto do comprimento de hifa viva pode-se observar que houve recuperação da comunidade microbiana no final do período experimental. Isso pode ter sido conseqüência da recuperação da microbiota original, ou que provavelmente houve aumento da população e atividade das poucas espécies microbianas resistentes ou ainda perda da competição pelos fungos inibidos pelo fungicida, ou ainda da direta utilização do fungicida como fonte de carbono (VYAS, 1988; CHEN et al., 2001). Trabalhos realizados com outros fungicidas (CHEN et al., 2001) demonstram efeitos diferenciados para o benomil, captan e clorotalonil em resposta à respiração do solo e suplementação orgânica. Os solos suplementados com os fungicidas apresentaram sempre uma biomassa microbiana menor quando comparada aos solos sem suplementação. Os resultados deste trabalho, quando comparados aos de CHEN et al. (2001), corroboram o postulado dos autores que enfatizam que o efeito dos fungicidas na atividade microbiana do solo está na dependência do tipo e modo de ação do composto em estudo.

As atividades enzimáticas dos solos também têm sido relatadas como potenciais indicadores de impactos negativos sobre o solo (DICK, 1992; BEYER et al.,

1992; GARCIA et al., 1998; BROHON et al., 2001; SANNINO & GIANFREDA, 2001; QUILCAÑO & MARAÑÓN, 2002). As esterases, lipases e proteases que hidrolisam o diacetato de fluoresceína (FDA) são abundantes no solo e a capacidade de hidrolisar FDA é generalizada entre os fungos e bactérias. A quantificação desta hidrólise fornece uma boa estimativa da atividade microbiana total.

Determinação da hidrólise de FDA: foi utilizada a metodologia descrita por Boehm & Hoitink (1992). Amostras de 5 gramas de substrato de cada vaso foram colocadas em frascos de 250 mL, juntamente com 20 mL de tampão fosfato de potássio 60 mM (8,7 g de K_2HPO_4 e 1,3 g de KH_2PO_4 L⁻¹ de água destilada; pH 7,6). A reação de hidrólise de FDA (Sigma Chemical Co.) foi iniciada adicionando-se 0,2 mL (400 µg) de solução estoque de FDA (2 mg mL⁻¹ de acetona). As amostras foram incubadas por 20 minutos em agitador a 160 rpm a 25°C. Imediatamente após a retirada das amostras do agitador, a reação foi interrompida por meio da adição de 20 mL de acetona por frasco. A seguir, foi feita a filtração em papel de filtro tipo Whatman nº 1, sendo os filtrados recolhidos em tubos de cultura. Logo após, em espectrofotômetro foi determinada a absorbância dos filtrados a 490 nm. Para obter a quantidade de FDA hidrolizado foi determinada uma curva padrão, adicionando-se em tubos de ensaio com rosca, 5 mL de tampão fosfato e 0, 100, 200, 300 e 400 µL de solução estoque de FDA, em duas repetições, para cada concentração, por tratamento. Posteriormente, para hidrolisar o FDA, os tubos foram tampados e submetidos em banho-maria com água fervente por uma hora. Após o resfriamento dos tubos, a solução de FDA hidrolizado foi colocada em frascos de 250 mL contendo 5 g do substrato e 15 mL de tampão fosfato, em duas repetições para cada tratamento. Seguiu-se a mesma metodologia descrita para a incubação, filtração e leitura de absorbância das amostras. Com a equação da reta da curva padrão obtida pela regressão linear entre o FDA hidrolizado e a absorbância, foi calculado o FDA hidrolizado pelos microrganismos nos respectivos tratamentos, expressos em µg min⁻¹ g solo seco⁻¹.

Neste trabalho foi observado um incremento na hidrólise do FDA desde o início das avaliações. Considerando os solos suplementados com o fungicida metalaxil, quando comparados ao tratamento controle, o incremento observado aos 7 dias de incubação foi de 24% para a concentração de 3 µg g⁻¹ (Fig. 2.3). Para a maior concentração não houve efeito. Aos 28 dias, este efeito positivo foi significativo ($P < 0,01\%$), e proporcional à dose aplicada, chegando a patamares de 17 e 39% considerando a maior e menor dose, respectivamente.

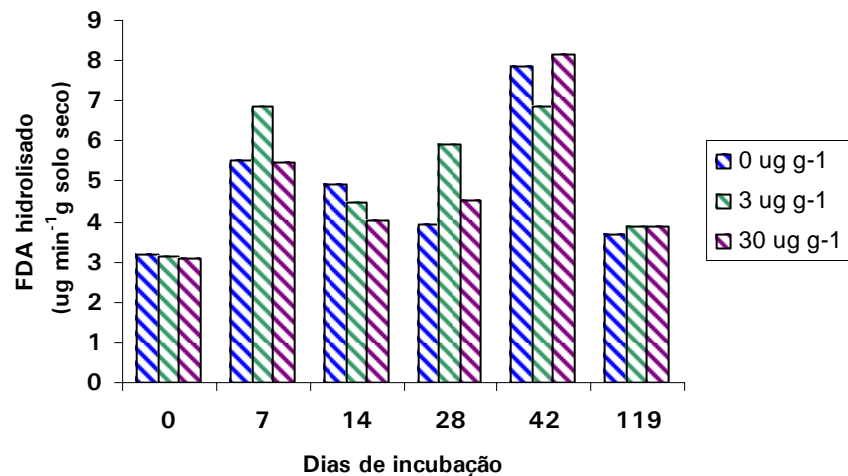


Fig. 2.3. Hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA, $\mu\text{g min}^{-1} \text{g solo seco}$) em solos coletados em Petrolina, PE, e suplementados em laboratório com diferentes concentrações de metalaxil (0; 3 e 30 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo). Média de três repetições.

A atividade hidrolítica do diacetato de fluoresceína apresentou correlação significativa ($P < 0,01\%$) com as atividades enzimáticas da fosfatase ácida e da desidrogenase.

Segundo SPESSOTO (2002), o metalaxil provocou mudanças na atividade total da microbiota em quatro solos avaliados, sendo três da região sudeste e um da região nordeste do Brasil. Para os dois períodos avaliados a microbiota presente no solo da região semi-árida do nordeste aumentou com a suplementação do solo, variando de 0,77 no início do experimento a 4,23 $\mu\text{g FDA hidrolisado g}^{-1}$ de solo seco min^{-1} ao final de 70 dias de incubação. No solo avaliado pelo presente trabalho, coincidentemente também solos da região semi-árida nordestina, esta atividade variou de 3,07 $\mu\text{g FDA hidrolisado g}^{-1}$ de solo seco min^{-1} no início do período de avaliação para 8,70 $\mu\text{g FDA hidrolisado g}^{-1}$ de solo seco min^{-1} aos 42 dias de incubação, considerando a suplementação com metalaxil na concentração de 30 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo. O pico estimulatório foi observado no 28º dia de incubação. Nos outros períodos de avaliação não foi detectado efeito significativo do fungicida nesta atividade. Pelos resultados pode-se inferir que o metalaxil pode ter estimulado a produção do complexo enzimático que hidrolisa FDA. Por outro lado, quando se utiliza acetona como solvente, como neste estudo, há um decréscimo substancial na absorvância da fluoresceína produzida pelas amostras do solo. Esta perda de cor é independente da concentração inicial da

fluoresceína, mas torna a quantificação da atividade hidrolítica do FDA muito difícil em solos com baixa atividade microbiana, como é o caso dos solos de regiões semi-áridas (ADAM & DUNCAM, 2001). Segundo SCHNÜER & ROSWALL (1982), quando a acetona foi utilizada, a medida do FDA em amostras de areia e argila foi muito baixa. Também, as enzimas que hidrolisam FDA são extracelulares e podem formar complexos estáveis com os colóides do solo, subestimando a sua quantificação.

A atividade enzimática da fosfatase também foi considerada por WICK et al. (2002) um indicador sensível da qualidade do solo. Em geral, a adição de fungicidas estimula a atividade dessa enzima (MONKIEDJE et al., 2002; NANNIPIERI, 1990).

Atividade enzimática da fosfatase ácida: a determinação seguiu o método descrito por Alef et al. (1995). Ao solo (1 g) foram adicionados tampão maleato 0,1 M (pH 6,5) e *p*-nitrofenil fosfato preparado na mesma solução tampão (1 mL). A mistura foi incubada a 37°C por 1 hora. Após a incubação foi adicionado CaCl₂ 0,5 M (1 mL) e NaOH 0,5 M (4 mL). O *p*-nitrofenol (PNP) formado foi determinado em espectrofotômetro a 400 nm. Os resultados da atividade foram expressos como µg de *p*-nitrofenol liberado em 1 h g⁻¹ de solo.

O efeito positivo da suplementação do fungicida metalaxil sobre a atividade da fosfatase ácida só foi observado aos 7 e 28 dias de incubação (Fig. 2.4). O incremento, aos 7 dias, apesar de não significativo, foi de 24% em ambas as doses utilizadas e de 20 e 33% (P<0,01%) aos 28 dias, para a menor e maior dose, respectivamente.

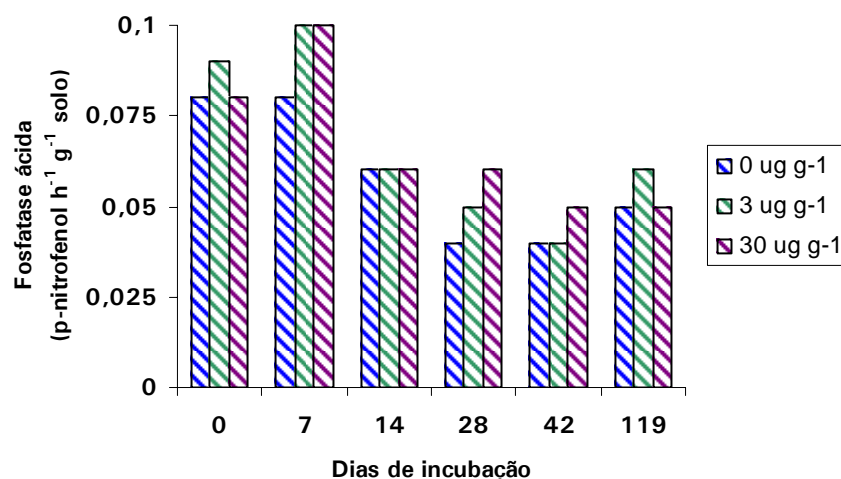


Fig. 2.4. Atividade enzimática da fosfatase ácida em solos coletados em Petrolina, PE, e suplementados em laboratório com diferentes concentrações de metalaxil (0; 3 e 30 µg g⁻¹ de solo). Média de três repetições.

Em estudos realizados em dois tipos de solo, arenosos e argilosos, foi verificado que tanto o mefenoxam quanto o metalaxil apresentaram efeito estimulatório sobre a atividade enzimática da fosfatase ácida, mesmo que a transitoriedade desta estimulação tenha sido menor para o metalaxil (MONKIEDJE et al., 2002). Ainda assim, os autores consideraram que de forma geral os fungicidas quando aplicados nas concentrações de 1 a 200 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo não afetaram a atividade enzimática da fosfatase.

As fosfatases são consideradas ectoenzimas, sendo que a fosfatase ácida é produzida tanto por microrganismos quanto pelas raízes das plantas. Sua atividade é influenciada tanto pela disponibilidade de P inorgânico quanto pela formação de agregados com os componentes do solo (NANNIPIERI, 1988). De acordo com CAMIÑA et al. (1998), as interações abióticas entre substratos e componentes do solo podem levar a uma superestimativa da atividade enzimática.

Segundo BURNS (1982) em solos de textura grossa como os das regiões áridas e semi-áridas, as atividades de enzimas livres na solução do solo são praticamente negligenciáveis. Segundo o autor, em solos com alta porcentagem de areia e baixo conteúdo de matéria orgânica, como é o caso do solo em estudo, a atividade enzimática depende geralmente de enzimas intracelulares como, por exemplo, a atividade da desidrogenase. Essa atividade enzimática é considerada um indicador do metabolismo oxidativo dos solos e assim da atividade microbiana (SKUJINS, 1973), e tem sido usada como indicador da atividade microbiológica tanto em solos áridos do Mediterrâneo (GARCIA et al., 1994) como em solos agrícolas de regiões mais úmidas (BEYER et al., 1992). MALKOME (1987) citado por DICK (1992) recomenda a atividade da desidrogenase em testes de rotina com pesticidas, uma vez que esta atividade permite determinar com sensibilidade a atividade microbiana dentro de 1 a 2 dias, em experimentos de laboratório. De forma geral esta atividade geralmente é inibida na presença de fungicidas.

Atividade enzimática da desidrogenase: a atividade enzimática da desidrogenase no solo foi avaliada segundo a técnica descrita por Alef (1995). Foram pesados 5 g de solo, com a umidade proveniente de campo, em tubos testes e misturados com 5 mL da solução de cloreto de trifênil tetrazólio (TTC) a 0,3%. Os tubos foram selados e incubados no escuro por 24 h a 37°C. Os tubos controles continham somente 5 mL de tampão Tris-HCl 100 mM, sem o TTC. Decorrido o período de incubação, 20 mL de metanol foram adicionados aos tubos, que foram agitados por 1 min e, posteriormente, centrifugados a 2000 rpm por 10 min. O trifênil formazan (TTF), formado pela redução do TTC, foi medido espectofotometricamente a 485 nm contra o branco.

Pelos resultados apresentados na Fig. 2.5, pode-se observar que não houve inibição na atividade da desidrogenase em todos os tratamentos até o 7° dia de incubação. No entanto, a partir do 14° dia foi observado incremento nesta atividade nos solos suplementados com o fungicida. Para ambas as doses do metalaxil, o maior aumento foi de 35%. Do 42° dia em diante, houve inibição significativa ($P < 0,01\%$) desta atividade, chegando a 27 e 46%, para as doses 1 e 2 do metalaxil, respectivamente. No final do período experimental, os resultados não apresentaram diferenças significativas, demonstrando recuperação desta atividade, provavelmente associada a recuperação da microbiota como evidenciado pelo Cmic.

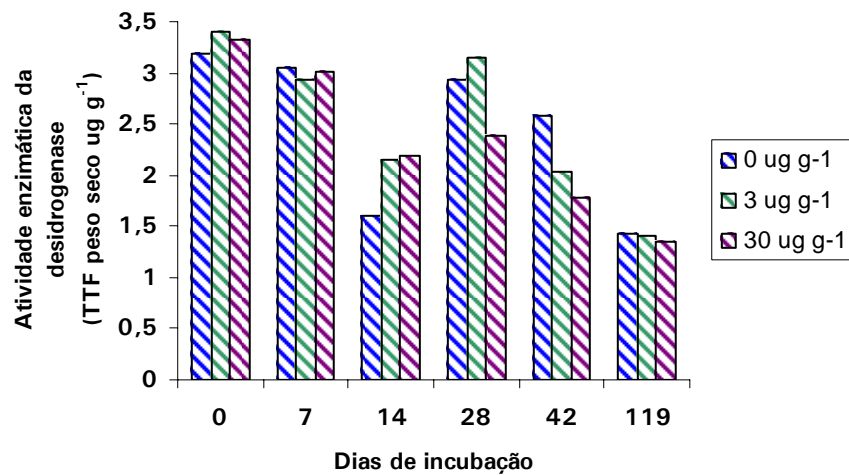


Fig. 2.5. Atividade enzimática da desidrogenase ($\mu\text{g g}^{-1}$) em solos coletados em Petrolina, PE, e suplementados em laboratório com diferentes concentrações de metalaxil (0; 3 e 30 $\mu\text{g g}^{-1}$ de solo). Média de três repetições.

Resultados semelhantes já foram obtidos por MONKIEDJE et al. (2002). Segundo os autores os fungicidas metalaxil e mefenoxam inibiram severamente a atividade da desidrogenase durante todo o período experimental, seguindo o modelo dose-resposta. Neste estudo, com solos da região semi-árida brasileira, esta atividade foi inibida pelos fungicidas metalaxil e fenarimol nos primeiros sete dias de incubação, quando comparada ao solo testemunha, voltando a apresentar um pico de recuperação aos 28 dias. Posteriormente ela voltou a declinar provavelmente devido a depleção de nutrientes uma vez que esta atividade correlaciona-se positivamente com o teor de

matéria orgânica do solo (WLODARCZYK et al., 2002). Nossos resultados também estão de acordo com os obtidos por MORETINI (2000), para os solos da região sudeste do Brasil. O autor observou que a inibição pelo metalaxil sobre a atividade enzimática da desidrogenase ocorreu dentro dos sete primeiros dias, recuperando-se a seguir, comprovando mais uma vez a sensibilidade desta atividade em detectar em curto prazo um efeito negativo sobre a microbiota do solo. A aplicação de outros fungicidas como, por exemplo, o benomil e clorotalonil estimularam a atividade da desidrogenase (18-21% e 8-15%, respectivamente), enquanto que captan inibiu esta atividade em 40-58% (CHEN et al., 2001), demonstrando que os efeitos são específicos para cada fungicida.

Conclusão

Parâmetros microbiológicos como C da biomassa microbiana, comprimento de hifa viva e atividade da desidrogenase podem ser considerados indicadores sensíveis do efeito adverso do metalaxil na microbiota do solo da região semi-árida. Em relação à atividade enzimática da fosfatase o metalaxil não apresentou efeito sobre os microrganismos, assim como sobre o FDA. Foi observado que o efeito do fungicida sobre todos os parâmetros foi transitório no solo.

Referências

- ADAM, G.; DUNCAN, H. Development of a sensitive and rapid method for the measurement of total microbial activity using fluorescein diacetate (FDA) in a range of soils. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 33, p. 943-951, 2001.
- ALEF, K. Dehydrogenase activity. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London: Academic Press, 1995. p. 228-231.
- ALEF, K.; NANNIPIERI, P.; TRAZAR-CEPEDA. Phosphatase activity. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London: Academic Press, 1995. p. 335-344.

- BEYER, L.; WACHENDORF, C.; BALZER, F.M.; BALZER-GRAF, U.R. The effect of soil texture and soil management on microbial biomass and soil enzyme activities in arable soils of Northwest Germany. *Agrobiological Research*, v. 45, p. 276-283, 1992.
- BLOEM, J.; BOLHUIS, P.R.; VENINGA, M.R.; WIERINGA, J. Microscopic methods for counting bacteria and fungi in soil. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. (Ed.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. London: Academic Press, 1995. p. 162-173.
- BOEHM, M.J.; HOITINK, H. A.J. Sustenance of microbial activity in potting mixes and its impact of severity of *Phytophthora* root rot of *Poinsettia*. *Phytopathology*, v. 82, p. 259-264, 1992.
- BROHON, B.; DELOLME, C.; GOURDON, R. Complementarity of bioassays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon-contaminated soils quality. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 33, p. 883-891, 2001.
- BURNS, R.G. Enzyme activity in soil: location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 14, p. 423-427, 1982.
- CAMIÑA, F.; TRASAR-CEPEDA, C.; GIL-SOTRES, F.; LEIRÓS, C. Measurement of dehydrogenase activity in acid soils rich in organic matter. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 30, p. 1005-1011, 1998.
- CHEN, S.-K.; EDWARDS, C.A.; SUBLER, S. Effects of the fungicides benomyl, captan and chlorothalonil on soil microbial activity and nitrogen dynamics in laboratory incubations. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 33, p. 1971-1980, 2001.
- DICK, R.P. A review: long-term effects of agricultural systems on soil biochemical and microbial parameters. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, v. 40, p. 25-36, 1992.
- DROBY, S.; COFFEY, M.D. Biodegradation process and nature of metabolism of metalaxyl in soil. *Annals of Applied Biology*, v. 118, p. 543-553, 1991.
- GARCIA, C.; HÉRNANDEZ, T.; COSTA, F. Microbial activity in soils under Mediterranean environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 26, p. 1185-1191, 1994.
- GARCIA, C.; HÉRNANDEZ, T.; COSTA, F. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, v. 1-2, p. 123-134, 1997.
- GARCIA, C.; HÉRNANDEZ, T.; ALBALADEJO, J.; CASTILLO, V.; ROLDAN, A. Revegetation in semiarid zones: influence of terracing and organic refuse on microbial activity. *Soil Science Society of America Journal*, v. 62, p. 670-676, 1998.
- MONKIEDJE, A.; ILORI, M. O.; SPITELLER, M. Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxil to a sandy loam soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 34, p. 1939-1948, 2002.

- MORETINI, A. *Impacto do fungicida metalaxil sobre a microbiota e atividade enzimática do solo*. 2000. 93p. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, São Paulo.
- NANNIPIERI, P.; GRECCO, S.; CECCANTI, B. Ecological significance of the biological activity in soil. In: BOLLAG, J.M., STOTZKI, G. (Ed.) *Soil Biochemistry*. New York: Marcel Dekker, 1990. v. 6, p. 293-355.
- NANNIPIERI, P.; CECCANTI, B.; BIANCHI, D. Characterization of humus-phosphatase complexes extrated from soil. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 20, p. 683-691, 1988.
- NEWMAN, E.I. A method for estimating the total length of root in a sample. *Journal of Applied Ecology*, v.3, p. 139-45, 1966.
- NOGUEIRA, M. A.; CARDOSO, E.J.B.N. Produção de micélio externo por fungos micorrízicos arbusculares e crescimento de soja em função de doses de fósforo. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 24, p. 329-338, 2000.
- PASCUAL, J. A.; GARCIA, C.; HERNANDEZ, T.; MORENO, J.L.; ROS, M. Soil microbial activity as a biomarker of degradation and remediation process. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 32, p. 1877-1883, 2000.
- QUILCANO, C.; MARAÑÓN, T. Dehydrogenase activity in Mediterranean forest soils. *Biology and Fertility of Soils*, v. 35, p. 102-107, 2002.
- SANNINO, F.; GIANFREDA, L. Pesticide influence on soil enzymatic activities. *Chemosphere*, v. 45, p. 417-425, 2001.
- SCHNÜNER, J.; ROSSWALL, T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 43, p. 1256-1261, 1982.
- SKUJINS, J. Dehydrogenase: an indicator of biological activities in arid soils. *Bulletin of Ecological Research Communications*, Stockholm, v. 17, p. 235-241, 1973.
- SPESSOTO, A.M. *Dissipação do fungicida metalaxil em solos brasileiros e caracterização genética por RAPD de isolados envolvidos no processo*. 2002. 93p. tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2002.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, v.19, p. 703-707, 1987.
- VYAS, S.C. *Nontarget effects of agricultural fungicides*. Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 258-268.
- WEETE, J. D. Structure and function of sterols in fungi. *Advances in Lipid Research*, v. 23, p. 115-167, 1989.
- WICK, B.; KÜHNE, R.F.; VIELHAUER, K.; VLEK, P.L.G. Temporal variability of selected soil microbiological and biochemical indicators under different soil quality conditions in south-western Nigeria. *Biology and Fertility of Soils*, v. 35, p. 155-167, 2002.

WŁODARCZYK, T.; STEPNIEWSKI, W.; BRZEZIŃSKA, M. Dehydrogenase activity, redox potential, and emissions of carbon dioxide and nitrous dioxide from cambisols under flooding conditions. *Biology and Fertility of Soils*, v. 36, p. 200-206, 2002.

Quantificação e Adsorção do Fungicida Metalaxil em Solos Brasileiros

Andrea Maria Spessoto; Itamar Soares de Melo e Vera Lúcia Ferracini

Introdução

Processos importantes determinam o destino dos agrotóxicos no solo, suas perdas para as águas superficiais e subterrâneas e para o ar. Entre esses processos temos a volatilização; sorção pela matéria orgânica e mineral; transformações químicas e biológicas; transporte na fase líquida, sólida e gasosa e absorção pelas plantas e animais. Todos esses processos são influenciados pelo comportamento do composto, o que inclui as propriedades físico-químicas (ex. solubilidade, pressão de vapor), pelo solo e condições ambientais (temperatura, umidade e pH do solo), formulação e método de aplicação do pesticida.

Dentre os fenômenos mais intrinsecamente relacionados à dissipação do metalaxil, a adsorção é o foco de grande interesse e vários estudos têm apontado que este fungicida tem ampla afinidade pelas partículas do solo influenciando diretamente sua biodegradação, transporte e potencial de contaminação para solos e águas (SHAROM & EDINGTON, 1986; SUKOP & COGGER, 1992; PENG et al., 1995; SHARMA & AWASTHI, 1997).

O fenômeno da adsorção foi definido por CHENG (1990) como conseqüência de interações entre o pesticida e a superfície das partículas de solo ou de componentes do solo. É o processo pelo qual a molécula do composto é transferida da fase móvel (líquida ou gasosa) para a fase estacionária (sólida). A adsorção é reversível e pode seguir ambas as direções: adsorção ou dessorção. É considerado um processo chave no destino dos agrotóxicos no solo e está diretamente relacionado à persistência, mobilidade e bioatividade (LUCHINI, 1987).

A sorção dos agrotóxicos é comumente quantificada usando o coeficiente de partição linear ou coeficiente de adsorção (K_d), o qual é a relação da concentração do composto adsorvido no solo ($\mu\text{g g}^{-1}$) com a concentração presente na solução do solo ($\mu\text{g mL}^{-1}$). Altos valores de K_d podem agir de forma a diminuir a ação tóxica do composto para a microbiota presente ou mesmo inibir a ação dos microrganismos ou a atividade das enzimas extracelulares no processo de biodegradação (ALEXANDER, 1999). Quanto maior a força de ligação entre a molécula e as partículas do solo, menor sua biodisponibilidade para a microbiota.

Na avaliação do potencial de contaminação de alguns agrotóxicos em solo australiano, DI & AYLMORE (1997) detectaram a presença de fenamifós, simazina, metribuzin, linurom, fenarimol e metalaxil em concentrações acima de 0,01%, na profundidade de 300 cm. Kookana et al. (1995) relacionaram as taxas de degradação e lixiviação do metalaxil durante 6 meses em diferentes perfis de solo arenoso. O composto foi detectado na profundidade de 18 cm e a meia-vida do fungicida ficou em torno de 70 dias, indicando alto potencial de contaminação de águas subterrâneas.

Para os solos brasileiros, poucos são os relatos envolvendo o comportamento e destino do fungicida metalaxil (MUSUMECI & RUEGG, 1986; OSTIZ & MUSUMECI, 1989; PAPINI & ANDRÉA, 2000). Assim, o presente estudo quantificou as taxas de recuperação desse composto em quatro solos diferentes, bem como determinou os valores do coeficiente de adsorção (K_d) do mesmo, nos solos estudados.

Amostras de quatro tipos de solos com diferentes características física e químicas (Tabelas 3.1 e 3.2) foram coletados nos municípios de Aguaí, Estiva Gerbi e Jaguariúna, no estado de São Paulo, e no município de Petrolina, em Pernambuco. Três deles apresentavam histórico da aplicação do metalaxil para o controle de fitopatógenos, enquanto, o solo de Jaguariúna foi coletado em área de floresta sem histórico da utilização do fungicida.

Tabela 3.1. Propriedades físico-químicas das amostras dos solos

Solos Região	pH CaCl ₂	M.O. g dm ⁻³	P mg dm ⁻³	K	Ca	Mg	H + Al Mmol _c dm ⁻³	SB	CTC	V %
Aguai	5,3	22	75	4,6	54	35	31	93,6	124,6	75
Estiva Gerbi	5	17	37	1,7	35	11	20	47,7	67,7	70
Jaguariúna	3,6	30	6	1,6	1	2	121	4,6	125,6	4
Petrolina	6,15	0,43	25	0,15	1	0,3	0,83	1,5	2,33	64,5

M.O. (matéria orgânica); P (fósforo); K (potássio); Ca (cálcio); Mg (magnésio); H + Al (hidrogênio + alumínio); SB (soma de bases); CTC (capacidade de troca catiônica); V (saturação por bases)

Tabela 3.2. Textura, tipo de cobertura e histórico de aplicação do fungicida das amostras de solo

Solos Região	Areia (%)	Silte (%)	Argila (%)	Textura	Cultura	Última aplicação
Aguai	58	6	36	Argiloso	Citros	Jan/99
Estiva Gerbi	82	4	14	Arenoso	Citros	Jan/98
Jaguariúna	52	6	42	Argiloso	Floresta	*
Petrolina	88.5	3.5	8	Franco Arenoso	Uva	Ab/ 99

* Sem histórico de aplicação.

Determinação da dissipação do metalaxil

Em laboratório, os solos foram suplementados com 3 e 30 µg de metalaxil g⁻¹ de solo, mantendo-se a umidade ajustada para 70% da capacidade de campo. Após 0, 2, 4, 7, 14, 21, 28 e 32 dias de incubação, foram retiradas amostras para quantificação dos resíduos do fungicida.

Determinação da dissipação do fungicida metalaxil: sub-amostras compostas de 200 g (peso seco) de cada solo receberam suplementação do fungicida (3 e 30 μg i.a. g^{-1} de solo), em uma única vez. Os controles foram efetuados com sub-amostras de solo, previamente esterilizadas em autoclave por 3 dias consecutivos, e suplementadas com o fungicida nas doses testadas. A umidade, em todos os tratamentos, foi ajustada para 70% da capacidade de campo. Os solos foram incubados durante 32 dias a temperatura de 28°C. Para as análises, foram retiradas amostras (20 g) nos intervalos de 2, 4, 7, 14, 21 e 32 dias de incubação. A quantificação dos resíduos fungitóxicos, realizada a partir de segundo dia, foi conduzida por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando-se coluna de fase estacionária C_{18} -Bondesil – (25 cm x 4,6 mm, x 5 μm) Varian, fase móvel acetonitrila:água (70:30 v/v); pressão 137 psi; fluxo 1 mL min^{-1} ; *loop* de injeção de 50 μL ; absorvância 210 nm. O tempo de retenção do fungicida metalaxil foi de aproximadamente 5 min. (Fig. 3.1)

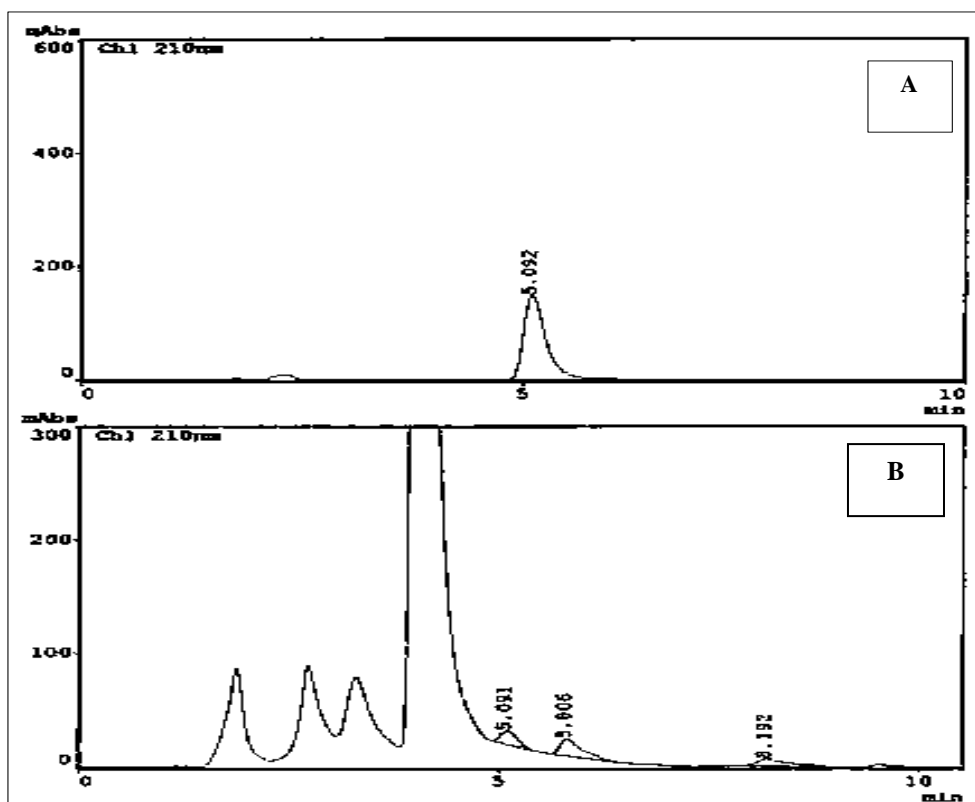


Fig. 3.1. Análise do metalaxil por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). (A) Tempo de retenção em solução padrão de 20 μg a.i. mL^{-1} e (B) nas amostras de solo provenientes de Petrolina, suplementadas com 30 μg i.a. g^{-1} solo, após 32 dias de incubação.

Os resultados apresentados na Tabela 3.3 demonstram a recuperação do fungicida metalaxil após 24 horas de sua suplementação. Os valores variaram de 89,3 a 97,5%, demonstrando a eficiência do método de extração.

Tabela 3.3. Porcentagens de recuperação de metalaxil após 24 horas da suplementação dos solos.

Solos	Recuperação ¹ (%)
Aguai	90,3 (±0,26)
Estiva Gerbi	95,0 (±0,28)
Jaguariúna	89,3 (±0,60)
Petrolina	97,5 (±0,48)

¹ Os valores apresentados são médias de três repetições. Coeficiente de variação 4,2%.

Em todos os solos foram observadas expressivas porcentagens de dissipação do composto. Dentre eles, o solo argiloso de Aguai, quando exposto à menor concentração do fungicida ($3 \mu\text{g g}^{-1}$) foi responsável pelas menores taxas de dissipação. As porcentagens de recuperação obtidas após os 32 dias de incubação foram de aproximadamente 10 % para Aguai, 30 % para Estiva Gerbi, 31 % para Jaguariúna e 38 % para Petrolina (Fig. 3.2). No caso do tratamento com a dose dez vezes maior do que a recomendada em campo, quase não houve alteração nos valores de recuperação para o solo arenoso de estiva Gerbi, mas para Petrolina (30 %) houve uma leve diminuição. Ficou caracterizado o aumento da taxa de dissipação para os solos de Aguai (25 %) e Jaguariúna (45 %) (Fig. 3.3).

Solos que apresentam histórico de aplicação de agrotóxicos têm sido relatados como capazes de dissipar mais facilmente estas moléculas pelo fato de apresentarem populações microbianas que se caracterizam por um curto período de aclimação e rápida fase exponencial de crescimento (ALEXANDER, 1999). Vários autores relataram que, em solos onde existe histórico de aplicações constantes de metalaxil foram observadas as maiores taxas de dissipação do fungicida (BAILEY & COFFEY, 1986; DROBY & COFFEY, 1991). Mas, neste estudo, não foi possível correlacionar as taxas de recuperação e o histórico de aplicação, uma vez que a amostra de solo de Jaguariúna, sem histórico de aplicação do fungicida, apresentou taxas de dissipação similares aos solos de Estiva Gerbi e Petrolina.

Pelos resultados obtidos pode ser observado que, ao longo do período experimental, as porcentagens de recuperação de metalaxil, nas duas concentrações testadas, foram diminuindo em função do tempo de incubação. No entanto, no solo esterilizado não foi observado este comportamento, o que indica a importância da ação microbiana no processo de dissipação.

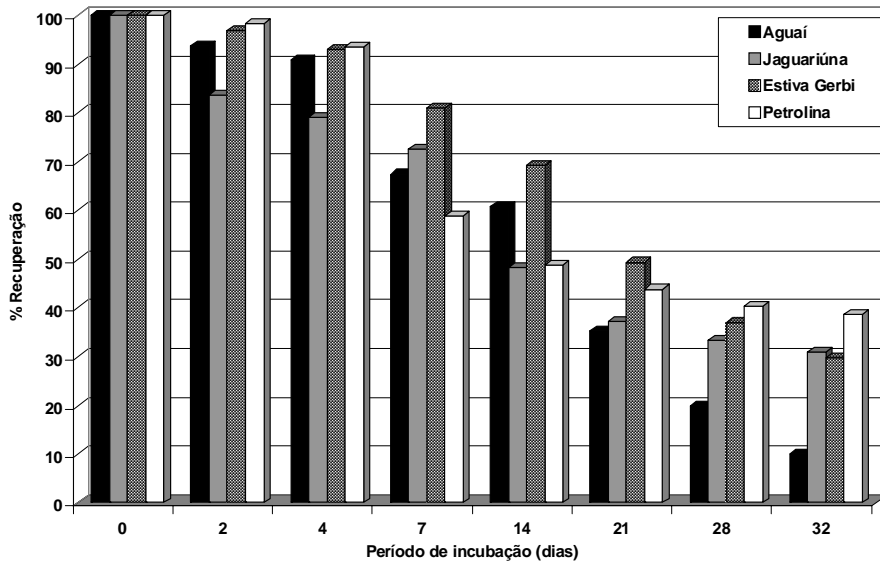


Fig. 3.2. Porcentagens de recuperação de metalaxil nos solos suplementados com $3 \mu\text{g i.a. g}^{-1}$ do fungicida. Dados obtidos por CLAE, no intervalo de 32 dias de incubação, média de três repetições.

Quantificação e Adsorção do Fungicida Metalaxil em Solos Brasileiros

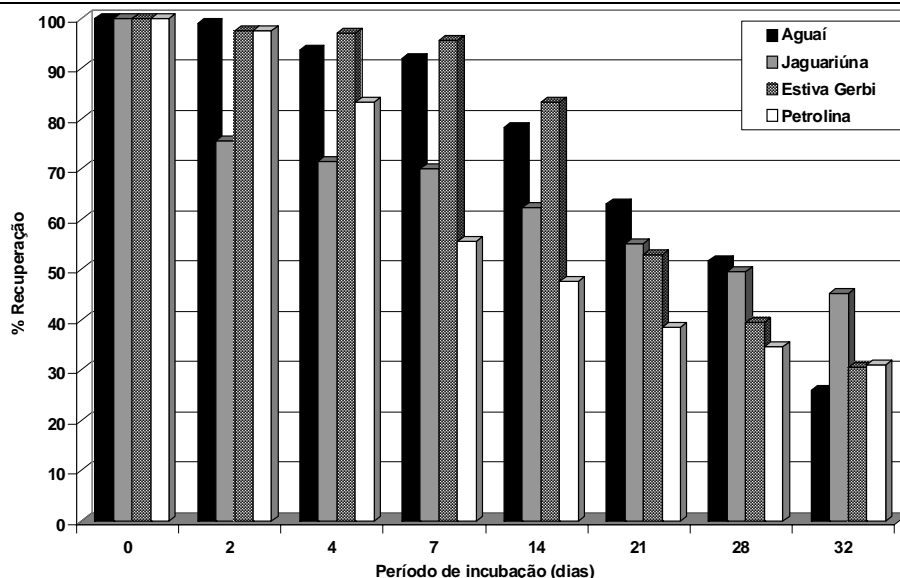


Fig. 3.3. Porcentagens de recuperação de metalaxil nos solos suplementados com 30 µg i.a. g⁻¹ do fungicida. Dados obtidos por CLAE, no intervalo de 32 dias de incubação, média de três repetições

Determinação do coeficiente de adsorção

Os valores de K_d, para os quatro solos estudados, foram determinados de acordo com a metodologia descrita por ALVAREZ-BENEDI et al. (1998).

Determinação da adsorção: foi adicionado a cada sub-amostra (1g) de solo, suplementada com metalaxil (3, 5, 10, 20 e 30 µg i.a. g⁻¹ de solo), 5 mL da solução de CaCl₂ 0,01 M. O tratamento testemunha constou de solos com adição da solução de CaCl₂, sem a suplementação do fungicida. Simultaneamente foram preparadas amostras brancas contendo apenas a solução de CaCl₂ 0,01 M suplementado com as diferentes concentrações de metalaxil. Após 24 horas sob agitação orbital à temperatura de 28°C, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm, por 10 min. Do sobrenadante foram retirados 3 mL, os quais foram novamente centrifugados a 1200 rpm por 15 min. Posteriormente, foi retirado 2,5 mL do sobrenadante para extração e quantificação dos resíduos fungitóxicos. Após a quantificação por CLAE, os resultados foram aplicados na seguinte equação:

$$K_d = \frac{(1-C/c_0)}{C/c_0} \frac{L}{S}$$

onde:

K_d = coeficiente de adsorção;

S = massa (g) de solo;

L = 5 mL de solução de CaCl₂ 0,01 M;

C/c₀ = relação entre a concentração do pico da amostra (c) e a concentração inicial da solução (c₀) menos a concentração do branco em µg g⁻¹.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.4 e demonstram que os valores de Kd variaram em função da dose de metalaxil aplicada e das características do solo.

Tabela 3.4. Valores do coeficiente de adsorção (Kd) do fungicida metalaxil, em diferentes tipos de solos.

Solos	Valores de Kd ¹ (mL g ⁻¹)				
	Concentração de metalaxil (µg i.a. mL ⁻¹)				
	3	5	10	15	30
Aguai	10,94 (±0,32)	10,02 (±0,28)	9,03 (±0,25)	8,32 (±0,34)	7,90 (±0,30)
Estiva Gerbi	3,00 (±0,24)	1,77 (±0,20)	0,85 (±0,07)	0,81 (±0,09)	0,69 (±0,02)
Jaguariúna	14,65 (±0,96)	16,19 (±1,34)	24,30 (±1,97)	33,54 (±1,19)	41,11 (±1,54)
Petrolina	0,27 (±0,03)	0,28 (±0,04)	0,30 (±0,03)	1,15 (±0,11)	2,00 (±0,15)

¹ Os valores apresentados são médias de três repetições. Coeficiente de variação 1,97%

Nas amostras de solos argilosos, os valores encontrados foram mais altos, embora as de Aguai tenham demonstrado uma discreta diminuição do Kd em função do aumento da concentração. No solo de Jaguariúna esta variação foi significativa, tendo os valores de Kd variado em função da concentração testada. Houve correlação positiva entre a dose aplicada de ingrediente ativo e os valores de Kd. Nos solos arenoso e franco-arenoso, foram observados os menores valores de adsorção. Amostras provenientes de Estiva Gerbi apresentaram decréscimo acentuado nos valores de Kd com o aumento da concentração aplicada de metalaxil. No entanto em Petrolina o aumento do valor de Kd foi proporcional a dose aplicada. Estes dados demonstram que a capacidade adsorptiva do metalaxil pode variar em função das características do solo avaliado e das doses aplicadas do fungicida. PENG et al. (1995) estudando a mobilidade de metalaxil em solos arenosos verificaram que a quantidade do composto adsorvido no solo foi proporcional a dose aplicada.

Nos solos argilosos, era esperado que os valores de Kd fossem os maiores, uma vez que, segundo TRIEGEL & GUO (1994) as duas características mais importantes e determinantes na adsorção do pesticida são a presença de partículas argilosas, matéria orgânica e a solubilidade do composto. Além disso, o pH também influencia indiretamente o movimento de alguns pesticidas no solo, afetando fortemente a adsorção. Em geral, a adsorção é fraca em pH neutro e

básico, o que causa um aumento de mobilidade e, como conseqüência maiores taxas de degradação (SOMASUNDARAM & COATS, 1990). Segundo PETROVIC et al. (1998) altos valores de pH favorecem a hidrólise mais rápida do metalaxil em solos. Assim, o pH ácido dos solos de Estiva Gerbi, Aguai e Jaguariúna (5, 5,3 e 3,6, respectivamente), estaria favorecendo uma maior afinidade da molécula do fungicida à fase sólida do solo.

A alta solubilidade em água (TOMLIN, 1995) e os valores do coeficiente de adsorção obtidos para o fungicida metalaxil sugerem uma grande afinidade da molécula à fase sólida dos solos argilosos. Estudos realizados por SUKUL & SPITELLER (2000) sobre a adsorção de metalaxil em solos indianos, demonstraram que este composto é fortemente ligado às partículas do solo, não desorvendo facilmente. Em contrapartida, segundo PETROVIC et al. (1998), por ser altamente solúvel em água e com baixa afinidade para ligação na matéria orgânica ($K_{oc} = 50$) o metalaxil apresenta grande potencial de lixiviação em solos arenosos. Alguns autores como ZAVIEZO et al. (1993); Starret et al. (1996); DI et al. (1998); relataram a movimentação vertical do fungicida em solos com alta porcentagem de areia, facilitando seu deslocamento para regiões mais profundas no perfil do solo. Os baixos valores de K_d obtidos neste estudo para os solos arenoso e franco arenoso de Estiva Gerbi e Petrolina, sugerem que a molécula de metalaxil pode permanecer dissolvida na solução do solo, favorecendo o processo de lixiviação, antes mesmo que ocorra uma significativa degradação do fungicida.

A presença da matéria orgânica pode incrementar a capacidade de dissipação do metalaxil (STARRETT et al., 1996; SHARMA & AWASTHI, 1997). Este incremento, muitas vezes é relacionado com aumento da atividade microbiana em função da presença da matéria orgânica no solo, ou ainda, devido à capacidade que esta matriz possui em adsorver moléculas com caráter hidrofóbico. Segundo BEIGEL et al. (1999) o aumento da matéria orgânica pode aumentar a atividade microbiana por prover substrato para o co-metabolismo. Neste estudo, embora os solos argilosos apresentem os maiores valores de K_d e teores de matéria orgânica, estes resultados não puderam ser relacionados, uma vez que a molécula do metalaxil apresenta caráter hidrofílico, indicando alta afinidade pela fase sólida da matriz do solo. A menor taxa de recuperação obtida nos solos argilosos pode ser explicada pela capacidade adsortiva deste tipo de matriz de solo ou pelo aumento na atividade microbiana, em função da presença da matéria orgânica. Além disso,

a presença de matéria orgânica e elevados teores de argila são capazes de reter parte do fungicida e impedir que seja extraído da matriz por solventes orgânicos. A importância da presença de matéria orgânica no solo para a adsorção de pesticidas já vem sendo discutida por muitos autores (ARIENZO et al., 1994; RÜTTERS et al., 1999; WANG & LIN, 1999) especialmente quando se trata de compostos hidrofóbicos.

Este estudo sugere que no caso dos solos com altas porcentagens de areia, a capacidade de retenção da molécula do metalaxil nessas matrizes seria bem menor quando comparado com os solos argilosos. No caso de Petrolina, os dados aqui apresentados sugerem que a lixiviação seria a principal via de dissipação da molécula na região. Assim, a facilidade do fungicida em percolar pelo perfil desta matriz, tornaria o processo de biodegradação pouco relevante em campo, uma vez que a molécula não estaria disponível à ação microbiana. Em regiões mais profundas, onde a presença de microrganismos é escassa e onde se localizam grandes reservas hídricas, estas estariam propensas a um acúmulo do fungicida.

Conclusão

A capacidade de retenção da molécula de metalaxil diminuiu em função do aumento no teor de areia do solo, isto é, os solos arenosos de Petrolina e Estiva Gerbi apresentaram menor capacidade de retenção quando comparados aos solos argilosos de Aguai (maiores valores de Kd). Em especial, no caso de Petrolina, os dados obtidos comparados aos parâmetros como solubilidade e pH do solo, indicaram a possibilidade de lixiviação da molécula para regiões mais profundas do perfil do solo, tornando o metalaxil um potencial poluente para os lençóis de água presentes na região. Os resultados obtidos demonstraram a necessidade de monitorar o comportamento do metalaxil, em face de sua importância no controle fitossanitário de diversas culturas de interesse comercial.

Referências

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

- ÁLVAREZ-BENEDI, J.; CARTON, A.; FERNANDEZ, J. C. Sorption of tribenuron-methyl, chlorsulfuron, and imazamethabenz-methyl by soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 46, p. 2840-2844, 1998.
- ARIENZO, M.; CRISANTO, T.; SÁNCHEZ-MARTÍN, M. J.; SÁNCHEZ-CAMAZANO, M. Effect of soil characteristics on adsorption and mobility of ¹⁴C diazinon. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 42, p. 1803-1808, 1994.
- BAILEY, A. M.; COFFEY, M. D. Characterization of microorganisms involved in accelerated biodegradation of metalaxyl and metolachlor in soils. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 32, p. 562-569, 1986.
- BEIGEL, C.; CHARNAY, M. P.; BARRIUSO, E. Degradation of formulated and unformulated triticonazole fungicide in soil: effect of application rate. *Soil Biology and Biochemistry*, v. 31, p. 525-534, 1999.
- CHENG, H. H. *Pesticides in the soil environment: processes, impacts, and modeling*. Madison: Soil Science Society of America, 1990. 530 p.
- DI, H. J.; AYLMORE, L. A. G. Modeling the probabilities of groundwater contamination by pesticides. *Soil Science Society of America Journal*, v. 61, n. 1, p. 17-23, 1997.
- DI, H. J.; AYLMORE, L. G. A.; KOOKANA, R. S. Degradation rates of eight pesticides in surface and subsurface soils under laboratory and field conditions. *Soil Science*, v. 163, n. 5, p. 404-411, 1998.
- DROBY, S.; COFFEY, M. D. Biodegradation process and the nature of metabolism of metalaxyl in soil. *Annals of Applied Biology*, v. 118, n. 3, p. 543-553, 1991.
- KOOKANA, R. S.; DI, H. J.; AYLMORE, L. A. G. A field study of leaching and degradation of 9 pesticides in a sandy soil. *Australian Journal of Soil Research*, v. 33, n. 6, p. 1019-1030, 1995.
- LUCHINI, L. C. *Adsorção-dessorção dos herbicidas paraquat, diuron e 2,4-D em seis solos brasileiros*. 1987. 91 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba.
- MUSUMECI, M. R.; RUEGG, E. F. Degradation and residues of trifluralin and metalaxyl in soils treated with ¹⁴C-trifluralin and ¹⁴C-metalaxyl, under laboratory conditions. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 21, p. 1023-1029, 1986.
- MUSUMECI, M. R.; PIMENTEL, C. P. V.; RUEGG, E. F. Degradation in vitro of metalaxyl by pure cultures of plant pathogenic fungi. *Fitopatologia Brasileira*, v. 11, n. 4, p. 957-961, 1986.
- OSTIZ, S. B.; MUSUMECI, M. R. Effect of agrotoxics in biological activity of two soils in laboratory experiments. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 24, p. 19-25, 1989.
- PAPINI, S.; ANDRÉA, M. M. Enhanced degradation of metalaxyl in gley humic and dark red latosol. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 24, p. 469-474, 2000.
- PENG, G.; WANG, H.; QI, M. *Studies on environmental behaviour of ¹⁴C metalaxyl in soil*. Beijing: China Nuclear Information Center, 1995. 12 p.
- PETROVIC, A. M.; BARRET, W. C.; LARSSON-KOVACH, I.; REID, C. M.; LISK, D. J. Downward migration of metalaxyl fungicide in creeping bentgrass sand lysimeters as affected by organic waste, peat and zeolite amendments. *Chemosphere*, v. 37, n. 2, p. 249-256, 1998.
- RÜTTERS, H.; HÖLLRIGL-ROSTA, A.; KREUSIG, R.; BAHADIR, M. Sorption behavior of prochloraz in different soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 1242-1246, 1999.
- SHARMA, D.; AWASTHI, M. D. Adsorption and movement of metalaxyl in soils under unsaturated flow conditions. *Plant and Soil*, v. 195, p. 293-298, 1997.

- SHAROM, M. S.; EDGINGTON, L. V. Mobility and dissipation of metalaxyl in tobacco soils. *Canadian Journal of Plant Science*, v. 66, n. 3, p. 761-771, 1986.
- SOMASUNDARAM, L.; COATS, J. R. Influence of pesticide metabolites on the development of enhanced biodegradation. In: RACKE, K. D.; COATS, J. R. *Enhanced biodegradation of pesticides in the environment*. Washington: ACS Press, 1990. p. 128-140. (ACS Symposium Series).
- STARRETT, S. K.; CHRISTIANS, N. E.; ALAUSTIN, T. Movement of pesticides under two irrigation regimes applied to turf grass. *Journal of Environmental Quality*, v. 25, n. 3, p. 566-571, 1996.
- SUKOP, M.; COGGER, C. G. Adsorption of carbofuran, metalaxyl and simazine: Koc evaluation and relation to soil transport. *Journal of Environmental Science and Health*, v. 27, n. 5, p. 565-590, 1992.
- SUKUL, P.; SPITELLER, M. Sorption study on metalaxyl in soils of different physicochemical properties. *Fresenius Environmental Bulletin*, v. 9, n. 11-12, p. 701-710, 2000.
- TOMLIN, T. *The pesticide manual*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1995.
- TRIEGUEL, E. K.; GUO, L. Overview of the fate of pesticides in the environment, water balance; runoff vs. leaching. In: HONEYCUTT, R. C.; SCHALACKER, D. J. *Mechanisms of pesticide movement into groundwater*. Boca Raton: CRC Press, 1994. p.1-13.
- WANG, Q.; LIN, W. Correlation of imazapyr adsorption and desorption with soil properties. *Soil Science*, v. 164, p. 411-416, 1999.
- ZAVIEZO, T.; LATORRE, B. A.; TORRES, R. Effectiveness of 3 phenylamide fungicides against *Phytophthora cryptogea* isolated from kiwi and their mobility in soil. *Plant Disease*, v. 77, n. 12, p. 1239-1243, 1993.

Mineralização do Fungicida ¹⁴C-Metalaxil em Solos Brasileiros

Andrea Maria Spessoto; Itamar Soares de Melo e Regina Teresa Rosim Monteiro

Introdução

A necessidade de reduzir o impacto no ambiente provocado pela utilização dos agrotóxicos na agricultura, já vem a algum tempo, despertando o interesse científico para os processos envolvidos na degradação destes compostos e moléculas relacionadas.

É conhecido que, depois de liberados no ambiente, os agrotóxicos podem se adsorver as partículas do solo, percolarem entre suas diversas camadas, volatilizarem ou, ainda, serem degradados. A degradação pode ocorrer pela ação da luz (fotodegradação), reações químicas (degradação química) ou por grupos de microrganismos presentes no ambiente (biodegradação).

Assim, quanto mais rápida for a degradação de um agrotóxico no ambiente, menor será sua capacidade poluente. Por outro lado, quanto mais lenta for sua degradação, maior poderá ser seu acúmulo no ambiente, e no caso dos agrotóxicos, que em muitas culturas são aplicados diversas vezes em curtos períodos de tempo, a degradação é fundamental para a detoxificação destes locais.

Degradação do fungicida metalaxil

Dentre as classes de agrotóxicos, os fungicidas têm sido largamente empregados na agricultura mundial, no controle de fitopatógenos que atacam as mais diversas culturas. De acordo com a literatura, o fungicida metalaxil é degradado,

principalmente, pela ação de microrganismos. Esta habilidade em degradar o fungicida tem sido conferida a muitos microrganismos, tanto em culturas puras como mistas, por diversos autores (MUSUMECI et al., 1986; ZHENG, et al., 1989; ANAN'EVA et al., 1997; SOUDAMINI-MOHAPATRA et al., 1997; TYKVA et al., 1999; SOUDAMINI-MOHAPATRA et al., 1999). Entretanto, o papel de populações naturais presentes em solos na degradação desta molécula ainda é pouco conhecido. DROBY & COFFEY (1991) conseguiram demonstrar que fungos, bactérias e actinomicetos presentes nos solos foram capazes de quebrar a molécula do fungicida.

BAILEY & COFFEY (1986) estudaram o metabolismo do metalaxil em solo e em meio líquido e observaram que o composto foi prontamente metabolizado em um solo com histórico de tratamento com o fungicida, mas não no solo controle sem histórico de aplicação. Segundo os autores, a meia-vida do metalaxil foi de aproximadamente 14 dias. PAPINI & ANDREA (2000) investigaram a biodegradação acelerada do ¹⁴C-metalaxil em dois solos brasileiros (gley húmico e latossolo vermelho escuro) com históricos de aplicação do composto e observaram que as taxas de mineralização do fungicida variaram de 8 a 48%. Neste caso, a biodegradação acelerada foi observada apenas no solo gley húmico. MUSUMECI & RUEGG (1984) observaram o aparecimento de dois metabólitos provenientes da degradação do metalaxil, após 60 dias de incubação do solo. Apenas um deles foi identificado como N-(2-metoxiacetil)-N-(2,6xilil)-DL-alanina. DROBY & COFFEY (1991) detectaram a presença de um metalaxil ácido como sendo o maior metabólito gerado da degradação do fungicida.

Mineralização do ¹⁴C-metalaxil em solos brasileiros

A mineralização do fungicida ¹⁴C-metalaxil, analisada durante 70 dias em laboratório, através da técnica de radiorespirometria, foi investigado em quatro solos brasileiros, coletados em locais com e sem histórico de aplicação e suplementados nas doses de 3 e 30 µg i.a. g⁻¹ do fungicida.

Mineralização do fungicida ¹⁴C-metalaxil: as sub-amostras, retiradas de cada solo, foram submetidas aos tratamentos com o fungicida metalaxil nas concentrações de 3 e 30 µg i.a. g⁻¹ solo, de modo que cada 1g (peso seco) de solo recebesse 5 KBq de radioatividade. A solução de aplicação foi preparada com o fungicida radiomarcado e o composto padrão analítico em acetona. A suplementação foi realizada misturando a solução de aplicação em 1 kg de cada sub-amostra de solo, dentro de um saco de polietileno. Em seguida, efetuou-se a agitação manual vigorosa destes solos por 15 min. Após este período, alíquotas de 50 g foram transferidas para frascos biométricos (BARTHA & PRAMER, 1965) (Fig. 4.1), quatro repetições por tratamento, seguido do ajuste para 70% da capacidade de campo, pela adição de água destilada. Alíquotas de 10 mL de NaOH (0,2 N) foram colocadas nos frascos de cada sistema para retenção de todo o CO₂ produzido pela atividade da microbiota presente nos solos. Os frascos foram incubados em sala escura, com temperatura controlada de 28°C. Os controles foram preparados com solo de Petrolina, esterilizado por 3 dias consecutivos em autoclave e suplementado com a solução do fungicida nas duas doses testadas. A cada 7 dias de incubação, todo o volume da solução de NaOH (0,2 N) foi substituído por outros 10 mL da mesma solução. Este procedimento foi repetido a cada semana até 35 dias de incubação. Após este período novas trocas da solução foram efetuadas e todos os frascos foram novamente incubados, ininterruptamente, até completar o período de 70 dias. Ao final de cada período de coleta, as soluções retiradas foram armazenadas a temperatura de 4°C, até o início das análises. Após 70 dias de incubação foi observada a produção de ¹⁴CO₂ em todos os solos avaliados, exceto no caso do solo de Petrolina esterilizado e utilizado como controle.

Cálculo da meia-vida: o cálculo da meia-vida foi efetuado com base na fórmula a seguir:

$$\text{Log A} = \frac{\text{Log A}_0 - \text{Log 2} \cdot t}{T_{1/2}}$$

onde;

A = radioatividade encontrada no tempo t;

A₀ = radioatividade aplicada;

t = tempo (dias);

T_{1/2} = meia vida

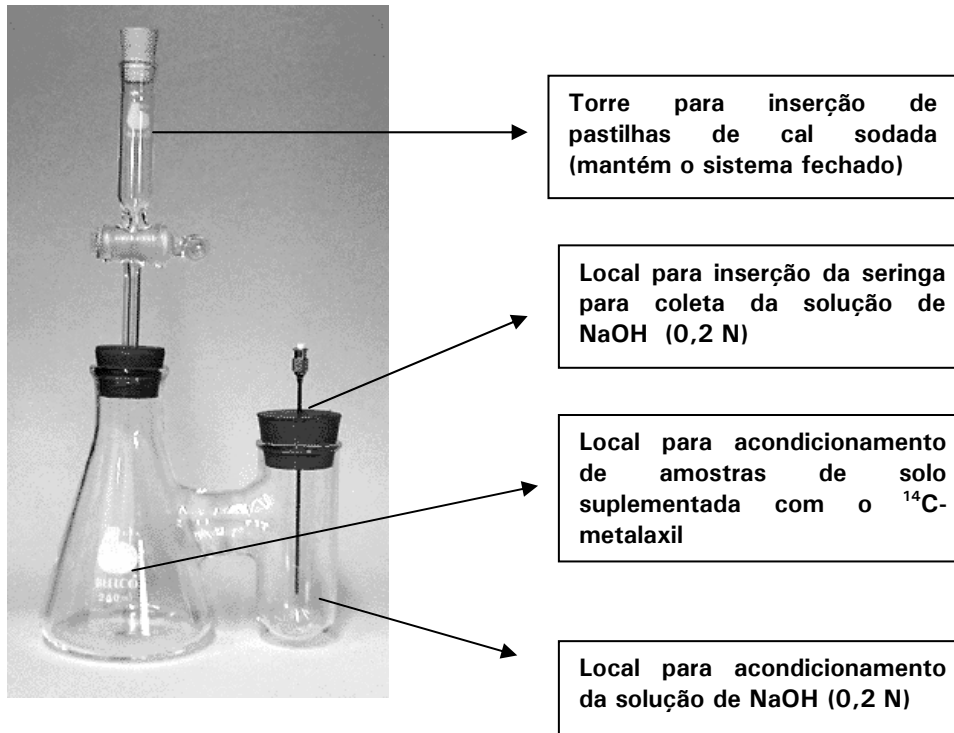


Fig. 4.1. Frasco biométrico (BARTHA & PRAMER, 1965).

Após 70 dias de incubação dos solos com metalaxil foi observada a produção de $^{14}\text{CO}_2$ em todos os solos avaliados, exceto no caso do solo de Petrolina esterilizado e utilizado como controle.

O solo de Petrolina apresentou as maiores porcentagens de produção de $^{14}\text{CO}_2$ (53%) enquanto que os demais solos com históricos de aplicação de metalaxil (Aguai e Estiva Gerbi) apresentaram porcentagens menores, mas similares (43 e 47%, respectivamente), quando o fungicida foi suplementado na dose de $3 \mu\text{g i.a. g}^{-1}$. No caso de Jaguariúna foram observados os menores valores de produção de $^{14}\text{CO}_2$ (30%) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Porcentagens de ¹⁴CO₂ acumulados após 70 dias de incubação dos solos suplementados com 3 e 30 µg i.a. g⁻¹ de metalaxil. Média de 4 repetições.

Tratamentos ¹	Período de incubação (dias)						% ¹⁴ CO ₂ total
	7	14	21	28	35	70	
Aguai 3µg i.a. g ⁻¹	0,58(±1,22)	2,03(±1,16)	6,02(±2,16)	9,19(±2,12)	11,81(±1,67)	13,60(±1,98)	43,23
Estiva Gerbi 3µg i.a. g ⁻¹	0,65(±0,94)	4,92(±1,04)	6,32(±0,95)	9,12(±1,12)	12,2(±1,00)	14,03(±1,21)	47,24
Jaguariúna 3µg i.a. g ⁻¹	0,32(±2,31)	0,63(±2,33)	0,76(±2,23)	7,32(±2,34)	10,02(±2,67)	11,90(±2,67)	30,95
Petrolina 3µg i.a. g ⁻¹	1,37(±0,87)	6,54(±1,10)	8,19(±0,67)	10,24(±1,19)	12,71(±1,16)	14,60(±1,07)	53,65
Aguai 30µg i.a. g ⁻¹	0,41(±2,36)	1,52(±2,24)	5,75(±2,12)	7,24(±2,67)	9,01(±2,60)	10,43(±2,56)	34,36
Estiva Gerbi 30µg i.a. g ⁻¹	0,49(±0,64)	2,66(±1,16)	6,41(±1,03)	8,23(±1,12)	9,95(±1,11)	11,21(±1,24)	38,95
Jaguariúna 30µg i.a. g ⁻¹	0,27(±2,03)	0,42(±2,40)	0,58(±3,14)	5,03(±2,67)	8,29(±2,67)	9,4(±2,67)	23,99
Petrolina 30µg i.a. g ⁻¹	0,57(±0,98)	2,89(±0,95)	8,14(±1,14)	12,55(±0,67)	13,85(±1,13)	15,23(±1,02)	52,66
Petrolina est. 3µg i.a. g ⁻¹	0,05(±0,02)	0,04(±0,67)	0,04(±1,03)	0,04(±1,07)	0,05(±1,04)	0,04(±0,99)	0,22

1-Os valores apresentados são médias de quatro repetições. Coeficiente de variação:3,9%

Na dose de 30 µg i.a. g⁻¹ de metalaxil, o solo de Petrolina apresentou porcentagens de produção de ¹⁴CO₂ semelhantes àquelas observada na menor dose. Nos demais solos, o aumento da dose de suplementação refletiu num decréscimo nas porcentagens de ¹⁴CO₂ observadas.

Ficou evidenciada uma fase de adaptação da microbiota em todos os solos, com pequena taxa de mineralização seguida de uma fase de acentuada liberação de ¹⁴CO₂, na qual ocorreu a quebra do anel aromático radiomarcado presente na molécula do fungicida. Nos solos com histórico de aplicação (Aguai, Estiva Gerbi e Petrolina) este período foi de apenas 7 dias enquanto que no solo de Jaguariúna, chegou até 21 dias de incubação. O mesmo comportamento foi observado quando os solos foram suplementados com 30 µg i.a. g⁻¹ de metalaxil.

A Tabela 4.2 apresenta os resultados do balanço de recuperação do metalaxil ¹⁴C, para as duas doses testadas do fungicida, após 70 dias de incubação dos solos. Os resultados observados comprovaram que não houve perdas de radioatividade por outros processos que não os avaliados neste estudo.

Tabela 4.2. Porcentagens de recuperação do total de ¹⁴C aplicado nos solos, nos diversos tratamentos efetuados.

Tratamentos	Produção de ¹⁴ CO ₂ (%)	Recuperação total do ¹⁴ C aplicado (%)	Meia Vida (T _{1/2})
Aguaí 3µg i.a. g ⁻¹	43,23	103,11	41 dias
Estiva Gerbi 3µg i.a. g ⁻¹	47,24	102,52	37 dias
Jaguariúna 3µg i.a. g ⁻¹	30,95	103,88	54 dias
Petrolina 3µg i.a. g ⁻¹	53,65	98,95	31 dias
Aguaí 30µg i.a. g ⁻¹	34,36	101,40	50 dias
Estiva Gerbi 30µg i.a. g ⁻¹	38,95	100,19	53 dias
Jaguariúna 30µg i.a. g ⁻¹	23,99	101,73	62 dias
Petrolina 30µg i.a. g ⁻¹	52,66	100,23	34 dias
Petrolina est. 3µg i.a. g ⁻¹	0,22	100,83	

A maior meia-vida observada foi de 62 dias para o solo de Jaguariúna, na dose de 30 µg i.a. g⁻¹ do fungicida metalaxil enquanto que a dose de 3 µg i.a. g⁻¹ foi a que apresentou a menor meia-vida (T_{1/2}) do composto, nos solos estudados.

No solo franco-arenoso de Petrolina a meia-vida não foi superior a 40 dias, em condições de laboratório. O aumento da dose de aplicação para 30 µg i.a. g⁻¹ não refletiu em aumento da meia-vida, indicando que a mineralização ocorre também, nas mesmas taxas que quando este solo foi suplementado com a menor dose. Nas condições estudadas, a molécula apresentou persistência baixa (meia vida entre 0 e 90 dias) em todos os solos, nos dois tratamentos efetuados (Tabela 4.2).

A estrutura química, quantidade de água presente no solo, pH, temperatura, nutrientes disponíveis, doses de aplicação, bem como enzimas ou células ativas para degradar a molécula, são fatores importantes para o comportamento dos agrotóxicos no solo (FOMSGAARD, 1995). Em estudos como os de ANDERSON (1978) e BAILEY & COFFEY (1985) tem sido demonstrado que os fungicidas seriam responsáveis por favorecer o aumento do número de populações bacterianas em solos, indicando uma capacidade deste segmento em se tornar tolerantes, resistentes ou ainda degradadores deste tipo de composto químico. No presente estudo, os resultados confirmaram a biodegradação da molécula do metalaxil e dentre os segmentos avaliados, as bactérias foram predominantes durante todo o experimento, enquanto que actinomicetos e fungos tiveram uma supressão em função da presença da molécula do fungicida.

Quantificação de resíduos extraíveis e não-extraíveis (ligados)

Entende-se por resíduos extraíveis aqueles que podem ser removidos através de processos de extração exaustivo com solventes apropriados. Resíduos ligados (ou não extraíveis) são definidos pela “International Union of Pure and Applied Chemistry” (IUPAC) como espécies químicas originárias dos agrotóxicos e que não são extraíveis, tanto em plantas como em solos, por métodos que não mudem significativamente a natureza química do composto.

Neste trabalho as extrações dos resíduos de metalaxil dos solos avaliados foram realizadas no tempo zero (logo após aplicação) e após 70 dias de incubação, seguindo metodologia descrita por DROBY & COFFEY (1991).

Combustão das amostras de solo (determinação de resíduos não-extraíveis): a radioatividade das amostras de solos não extraída pelo solvente e a radioatividade inicial aplicada nos solos antes da incubação foram determinadas. Amostras de 1 g de solo (em três repetições), de cada tratamento foram colocadas em barquinhas de cerâmica e levadas para a combustão a 900°C em oxidador biológico (Biological Oxidizer-OX-500/Harvey Instruments). Assim, através deste procedimento, foi possível quantificar as porcentagens de radioatividade ainda presente nos solos, liberadas após combustão sob a forma de ¹⁴CO₂. Todo o ¹⁴CO₂ retido em uma solução de monoetanolamina dissolvida na solução cintiladora foram quantificados em espectrômetro de cintilação líquida (ECL), durante 15 min. A eficiência da combustão foi de 98,2%, de acordo com testes realizados com amostras de ¹⁴C-glicose, como controle, antes do início da combustão das amostras de solo.

Os valores obtidos dos resíduos de ¹⁴C-metalaxil extraíveis e de resíduos ligados, após combustão seca das amostras dos solos estão na Tabela 4.3. Verificou-se que os valores de resíduos extraíveis foram maiores nos solos de textura arenosa e franco-arenosa (aproximadamente 40%), nos dois tratamentos efetuados. Em contrapartida, os maiores valores de resíduos ligados foram observados no solo argiloso de Jaguariúna (aproximadamente 60%), na dose de 30 µg i.a. g⁻¹ metalaxil.

Os resultados observados demonstraram que nos solos argilosos, as porcentagens de resíduos extraídos pelo método foram baixas e de resíduos ligados foram altas. O significado dos resíduos não-extraíveis para o ambiente é bastante discutido na literatura, mas geralmente é tido que valores acima de 10% são indesejáveis, podendo ocasionar acúmulo destas moléculas em culturas subseqüentes, solos ou animais.

No presente estudo, a persistência do fungicida foi determinada como baixa nas duas doses de suplementação, sugerindo que uma vez disponível na solução dos solos, a molécula pode ser rapidamente metabolizada, diminuindo os riscos ambientais provocados pela recalcitrância. Esta confirmação pode ter implicações diretas com o processo de mineralização do fungicida, uma vez que quanto maior for a sua persistência, menor sua taxa de degradação.

Tabela 4.3. Porcentagens de resíduos extraíveis e resíduos ligados nos solos, após 70 dias de incubação com o ¹⁴C-metalaxil. Dados obtidos por cromatografia de cintilação líquida e combustão dos solos.

Tratamentos	%Resíduos extraíveis ¹	% Resíduos ligados ²
Aguaí 3 µg i.a. g ⁻¹	25,72(±2,77)	34,16(±2,16)
Estiva Gerbi 3 µg i.a. g ⁻¹	34,76(±1,98)	20,52(±1,71)
Jaguariúna 3 µg i.a. g ⁻¹	26,26(±3,69)	46,67(±2,57)
Petrolina 3 µg i.a. g ⁻¹	40,11(±1,54)	5,19(±1,52)
Aguaí 30 µg i.a. g ⁻¹	29,11(±4,16)	37,93(±2,93)
Estiva Gerbi 30 µg i.a. g ⁻¹	39,15(±3,01)	22,09(±1,80)
Jaguariúna 30 µg i.a. g ⁻¹	18,56(±4,93)	59,18(±2,41)
Petrolina 30 µg i.a. g ⁻¹	35,67(±2,21)	11,90(±1,69)
Petrolina est. 30 µg i.a. g ⁻¹	96,51(±1,15)	4,10(±0,75)

1-Os valores apresentados são médias de duas repetições.

2- Os valores apresentados são médias de três repetições. Coeficiente de variação: 3,6%

Detecção de metabólitos

Para verificar a presença de metabólitos provenientes da biodegradação do metalaxil, os extratos totais, provenientes das extrações de resíduos foram concentrados por rotaevaporação e analisados em cromatografia de camada delgada (CCD) (Berthold).

Análise de metabólitos: alíquota de 100 µL de cada amostra (aproximadamente 2000 Bq de radioatividade) e 10 µL do padrão metalaxil ¹⁴C foram aplicadas em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck), com o auxílio de aplicador automático (Carmag-Linomat IV) e desenvolvidas em 100 mL de acetato de etila. A distribuição dos resíduos de ¹⁴C- metalaxil e dos metabólitos ¹⁴C nas placas foi observada através de manchas visualizadas após a exposição em luz U.V. Através de CCD estas placas foram analisadas quanto à radioatividade e valores de R_fs (quociente entre distância percorrida pelo composto e solvente).

Não foi detectada a presença de nenhum metabólito radiomarcado nas placas de sílica gel dos extratos dos solos após o término do período de incubação dos solos nos frascos biométricos. O valor do R_f para o fungicida metalaxil foi de 0,47 (Fig. 4.3).

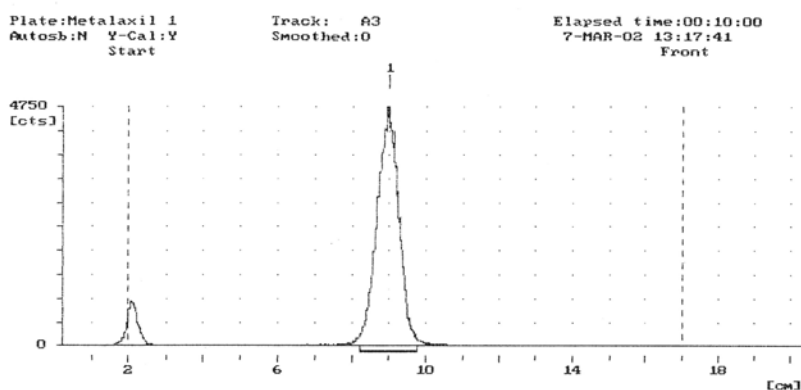


Fig. 4.3. Cromatografia de camada delgada obtida ao final de 70 dias de incubação, a partir do extrato do solo de Aguai suplementado com 3 µg i.a. g⁻¹ metalaxil. O número 1 indica a presença do fungicida metalaxil ¹⁴C.

A ausência de metabólitos provenientes da mineralização do anel radiomarcado do fungicida reforça a hipótese sobre a mineralização do fungicida, sugerindo que

processos de degradação do metalaxil ocorreriam num prazo inferior aos 70 dias de incubação avaliados neste estudo. Outra hipótese seria que parte dos metabólitos formados estaria altamente adsorvida nas matrizes dos solos e não extraíveis pelo método utilizado neste estudo. DROBY & COFFEY (1991) utilizando a mesma metodologia observaram a formação de um metabólito ácido proveniente da degradação do fungicida, porém dentro de um prazo menor de incubação.

Avaliação da atividade microbiana

A atividade microbiana foi determinada pela hidrólise do diacetato de fluoresceína (FDA), para o tempo zero e após 70 dias de incubação das amostras, segundo metodologia descrita por BOEHM & HOITING (1992).

Hidrólise do diacetato de fluoresceína: pesou-se 5 g (peso seco) de amostras de solo (em duas repetições) em frascos de 250 mL de capacidade, juntamente com 20 mL de tampão fosfato de potássio (8,7 g de K₂HPO₄ e 1,3 g de KH₂PO₄ L⁻¹ de água destilada; pH 7,6) e 0,2 mL da solução de FDA (2 mg mL⁻¹ acetona) (Sigma Chemical Co). Da mesma forma, outras amostras dos solos foram preparadas para a construção de uma curva padrão contendo 0, 100, 200, 300 e 400 µg de FDA, as quais foram hidrolisadas em banho-maria por uma hora. Todos os frascos foram agitados por 20 min a 160 rpm em agitador orbital a 25°C. Em seguida, todas as reações foram interrompidas pela adição de 20 mL de acetona e filtradas em papel de filtro (Whatman n°1). Os volumes filtrados foram levados para leitura em espectrofotômetro a 490nm (Beckman DU-8B). Os resultados foram expressos em µg FDA hidrolisados g⁻¹ de solo seco min⁻¹. A umidade de cada amostra de solo foi determinada pela incubação de 10 g de solo em estufa de secagem a 100°C por 24 horas e, em seguida, foram calculados os fatores de correção pela relação peso seco (Ps)/peso úmido (Pu).

Os valores da atividade enzimática microbiana obtida nos solos estudados foram maiores após 70 dias de incubação quando comparados aos valores obtidos no tempo zero (Fig. 4.4). Isso indicou que a molécula do fungicida provocou mudanças na atividade total da microbiota avaliada. Para os dois períodos da avaliação, a microbiota presente no solo de Petrolina foi o que mais se beneficiou com a suplementação com o fungicida, indo de 0,77 no início do experimento até 4,23 µg FDA hidrolisado g⁻¹ de solo seco min⁻¹ ao final de 70 dias de incubação, diferentemente do que ocorreu no solo de Jaguariúna, onde foram observadas as menores variações nestes valores. Resultados apresentados no Capítulo 2 corroboram o incremento da atividade hidrolítica do FDA nos solos de Petrolina, quando suplementados com metalaxil.

A avaliação da atividade enzimática no período referente à incubação dos solos reforçou a importância da presença do fungicida no aumento da atividade microbiana nos solos avaliados. Embora a atividade enzimática tenha sido monitorada em apenas dois intervalos de tempo, mudanças nas taxas de hidrólise do FDA foram evidenciadas ao final do experimento. Estes resultados, bem como o número de UFC g⁻¹ solo indicaria a utilização do fungicida como substrato por bactérias e o stress provocado pela sua presença em populações de actinomicetos e fungos dos solos. Deve-se ressaltar que estes resultados foram obtidos a partir de diluições dos solos em placas contendo meio de cultura, método que investiga apenas uma pequena porção da comunidade microbiana. No entanto, diferenças foram detectadas e quantificadas e puderam, desta forma, serem consideradas.

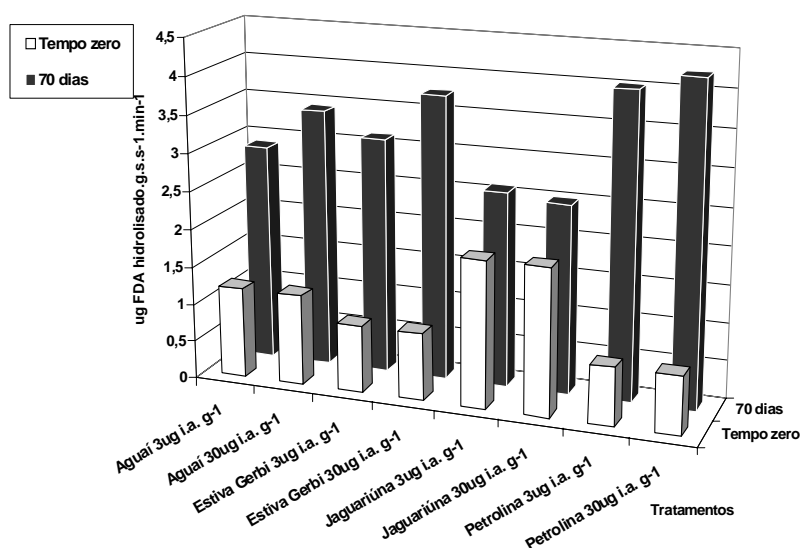


Fig. 4.4. Avaliação da atividade enzimática microbiana nos quatro solos antes e após 70 dias de incubação dos solos suplementados com 3 e 30 µg i.a. g⁻¹ metalaxil. A leitura foi efetuada em espectrofotômetro a 490 nm e os resultados expressos em µg FDA hidrolisados g⁻¹ de solo seco min⁻¹.

Do ponto de vista ecológico, a mineralização do fungicida metalaxil nos solos avaliados promoveria uma rápida detoxificação destas áreas, onde a molécula seria utilizada com freqüência. No entanto, do ponto de vista fitossanitário, estes resultados seriam preocupantes, uma vez que com a baixa persistência do fungicida nos solos, sua ação fúngica poderia ficar comprometida, sendo necessário o aumento nas doses de

aplicação ou mesmo redução no intervalo entre as aplicações em campo. A manutenção da capacidade produtiva sem comprometer a qualidade de vida das regiões avaliadas neste estudo é necessária para a conservação do ambiente. Neste sentido, o presente trabalho alerta para adoções de práticas agrícolas e alternativas de controle de fitopatógenos que diminuam estes efeitos.

Conclusão

Nas condições estudadas, a degradação do fungicida metalaxil envolveu a ação de microrganismos, portanto foi biológica. Após a suplementação com o fungicida metalaxil, em ambas as doses testadas, nos solos com históricos de aplicação as bactérias foram beneficiadas. O solo franco-arenoso de Petrolina, em condições de laboratório, foi capaz de mineralizar o fungicida em taxas superiores a 50%, nas doses de 3 e 30 µg i.a. g⁻¹ de metalaxil, ao final de 70 dias de incubação dos solos e, conseqüentemente; teve os menores valores de meia-vida para o fungicida, nas duas doses testadas. A não detecção de metabólitos, nas condições experimentais utilizadas, ao final dos 70 dias de incubação, foi relacionada à provável alta adsorção destas moléculas às partículas dos solos. O aumento na atividade enzimática da microbiota dos solos avaliados, observado ao final de 70 dias de incubação, foi relacionado com a presença da molécula do fungicida nos solos.

Referências

- ANAN'-EVA, N. D.; DEMKINA, T. S.; BLAGODATSKAYA, E. V.; SUKHOPAROVA, V. P.; ABELTSEV, V. I. A complex approach to the study of the behaviour of pesticides in soil. *Pochvovedenie*, New York, v. 6, p. 763-769, 1997.
- ANDERSON, J. P. E. Pesticide effects on non-target soil microorganisms. In: HILL, I. R.; WRIGHT, S. J. E. *Pesticide microbiology*. New York: Academic Press, 1978. p. 611-628.
- BAILEY, A. M.; COFFEY, M. D. Biodegradation of metalaxyl in avocado soils. *Phytopathology*, v. 75, n. 2, p. 135-137, 1985.
- BAILEY, A. M.; COFFEY, M. D. Characterization of microorganisms involved in accelerated biodegradation of metalaxyl and metolachlor in soils. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 32, p. 562-569, 1986.
- BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of a flask an methods for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil. *Soil Science*, v. 100, n. 1, p. 68-70, 1965.

- BOEHM, M. J.; HOITINK, H. A. J. Sustenance of microbial activity in potting mixes and its impact of severity of *Phythium* root rot of *Poinsettia*. *Phytopathology*, v. 82, n. 3, p. 259-264, 1992.
- DROBY, S.; COFFEY, M. D. Biodegradation process and the nature of metabolism of metalaxyl in soil. *Annals of Applied Biology*, v. 118, n. 3, p. 543-553, 1991.
- FOMSGAARD, I. S. Degradation of pesticides in subsurface soils, unsaturated zone. A review of methods and results. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, v. 58, p. 231-245, 1995.
- MUSUMECI, M. R.; RUEGG, E. F. Microbial degradation of metalaxyl in the soil. *Fitopatologia Brasileira*, v. 9, n. 3, p. 583-591, 1984.
- MUSUMECI, M. R.; PIMENTEL, C. P. V.; RUEGG, E. F. Degradation in vitro of metalaxyl by pure cultures of plant pathogenic fungi. *Fitopatologia Brasileira*, v. 11, n. 4, p. 957-961, 1986.
- PAPINI, S.; ANDRÉA, M. M. Enhanced degradation of metalaxyl in gley humic and dark red latosol. *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, v. 24, p. 469-474, 2000.
- SOUDAMINI-MOHAPATRA, A.; AWASTHI, M. D.; MOHAPATRA, S. Enhancement of metalaxyl degradation by synergistic interaction among bacterial and fungal isolates. *Pesticide Research Journal*, v. 9, n. 1, p. 62-66, 1997.
- SOUDAMINI-MOHAPATRA, A.; AWASTHI, M. D.; MOHAPATRA, S. Enhanced degradation of metalaxyl by enrichment cultures from different soils. *Journal of the Indian Society of Soil Science*, v. 47, n. 2, p. 217-221, 1999.
- TYKVA, R.; MORAIS, C.; DEL-RE, A. A. M.; BROWN, C.; CAPRI, E.; ERRERA, G.; EVANS, S. P.; TREVISAN, M. Human and environmental exposure to xenobiotics. In: SYMPOSIUM ON PESTICIDE CHEMISTRY, 11., 1999, Cremona. *Proceedings...* Cremona, Italy, 1999.
- ZHENG, Z.; SHU-YEN, L.; FREYER, A. J.; BOLLAG, J. M. Transformation of metalaxyl by the fungus *Syncephalastrum racemosum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55, n. 1, p. 66-71, 1989.

Caracterização Genética da Comunidade Bacteriana Associada a Biodegradação do Fungicida Metalaxil

Andrea Maria Spessoto

Introdução

Um dos focos principais da biotecnologia ambiental está na biorremediação de solos contaminados por moléculas xenobióticas. Esta envolve o uso de organismos vivos e seus produtos para degradarem poluentes resultando em outros produtos menos tóxicos ou não tóxicos e, também, para concentrar ou imobilizar elementos tóxicos tais como metais pesados ou agrotóxicos, tentando dessa forma minimizar impactos provocados pelas indústrias e recuperar áreas contaminadas. Entretanto, para que haja sucesso em estudos deste tipo, a geração de conhecimentos sobre os organismos envolvidos é de extrema importância e devem cumprir algumas etapas como: 1) entender a estrutura das comunidades microbianas e sua dinâmica em resposta a variações normais do ambiente e no caso de estresses antropogênicos; 2) determinar os mecanismos bioquímicos, incluindo vias enzimáticas envolvidas na degradação aeróbica e anaeróbica dos poluentes; 3) expandir o conhecimento da genética microbiana e suas bases para aumentar a capacidade dos microrganismos em degradar os poluentes.

Os microrganismos exibem um alto grau de plasticidade genética ou mutabilidade e a análise de seu material genético pode revelar a natureza desta plasticidade e sugerir como organismos geneticamente modificados podem ser usados em processos de biorremediação. Neste contexto, as bactérias são uma importante fração da microbiota presente no solo. Estima-se que a diversidade de espécies de bactérias seja em torno de 4 a 7 mil diferentes genomas por grama de

solo, com números acima da ordem de 10^9 células por grama de solo e com um gama de atividades metabólicas (RANJARD et al., 2000). Diversas espécies têm sido descritas como hábeis em degradar as mais diversas formas moleculares de agrotóxicos no ambiente, através de reações de caráter oxidativo, redutor, ou ainda hidrolítico.

Métodos baseados em PCR (Polymerase Chain Reaction) têm gerado dados para detecção e enumeração de microrganismos em amostras ambientais possibilitando a obtenção de dados ecológicos de comunidades microbianas, monitoramento de genes, além de informações importantes sobre interações entre diferentes populações. A detecção e análise de polimorfismo presentes no DNA representam um dos mais significativos avanços da biologia molecular. Na técnica RAPD-PCR (Random amplified polymorphic DNA), a análise de polimorfismo gerado por marcadores de RAPD permite a obtenção de mapas mais saturados, além de possibilitar que estudos de sistemática e divergência evolutiva sejam conduzidos com expressivos resultados. Os rRNAs de bactérias são classificados de acordo com suas taxas de sedimentação por centrifugação em 5S, 16S ou 23S. O 16S rRNA está associado com a menor subunidade do ribossomo e é a molécula mais bem estudada. Dessa forma, a amplificação da subunidade 16S do rRNA pode ser utilizada para identificação de microrganismos. Estes fragmentos amplificados e sequenciados, uma vez inseridos em banco de dados (Ex. BLAST: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), permitem que a similaridade entre a seqüência de cada isolado seja comparada com aquelas seqüências depositadas no Gene Bank.

Caracterização genética de bactérias degradadoras de metalaxil

Neste estudo foi analisada a variabilidade de bactérias degradadoras de metalaxil isoladas em diferentes solos com e sem histórico de utilização do composto.

Isolamento de bactérias em meio simples (MS) suplementado com metalaxil: os isolamentos foram feitos em meio mínimo MS (ágar 16 g; NaNO₃ 3 g; KH₂PO₄ 1 g; MgSO₄ · 7H₂O 0,5 g; KCl 0,5 g FeSO₄ · 7H₂O 0,01 g; q.s.p. água destilada 1000 mL), suplementado com 3 µg i.a mL⁻¹ do fungicida Apron® e 25 mg L⁻¹ do indicador de crescimento cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC). TTC é usado como indicador da atividade metabólica, onde o TTC em células ativas é convertido a um composto insolúvel colorido (vermelho intenso), o formazan. Assim, as colônias foram selecionadas de acordo com a intensidade desta coloração e intervalo de tempo para um bom crescimento.

A técnica utilizada foi a de diluição em série e plaqueamento no meio de cultura MS, com posterior incubação a temperatura de 28°C. Os microrganismos isolados foram caracterizados morfológicamente de acordo com a cor, textura da colônia e coloração de Gram. A freqüência de isolamento para cada solo foi determinada baseada na fórmula a seguir:

$$\text{Freqüência} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de isolados de cada solo nos grupos}}{\text{n}^\circ \text{ de isolados total por solo}} \times 100$$

Foram isoladas 106 bactérias capazes de crescer na presença de metalaxil como única fonte de carbono, provenientes do solo de Aguaí (34), de Estiva Gerbi (15), de Jaguariúna (13) e de Petrolina (44). Inicialmente, alguns actinomicetos e fungos também foram isolados, sem, contudo, permanecerem viáveis após repiques sucessivos em meio de cultura MS líquido suplementado com metalaxil. Entre as bactérias isoladas foram observados 5 morfo-grupos diferentes (Tabela 5.1).

Tabela 5.1. Grupos morfológicamente semelhantes obtidos de acordo com cor e textura de colônia e coloração de Gram.

Grupo	Número de isolados	Textura da colônia	Coloração da colônia	Coloração de Gram
G I	34	lisa	branca	negativo
G II	12	lisa	amarelo	negativo
G III	06	rugosa	amarelo-claro	positivo
G IV	47	lisa	amarelo-claro	positivo
G V	07	rugosa	branca	negativo

Caracterização Genética da Comunidade Bacteriana Associada a Biodegradação do Fungicida Metalaxil

De acordo com a Tabela 5.2, foi observado que os 5 morfo-grupos bacterianos foram isolados do solo de Aguaí, enquanto que nos demais locais, nem todos os grupos estiveram representados.

Tabela 5.2. População relativa dos grupos bacterianos obtidos dos quatro solos para os cinco grupos morfológicos descritos.

Solos	Grupo					Total
	G I	G II	G III	G IV	G V	
Aguaí	26,47%	8,83%	5,9%	47,06%	11,76%	34
Estiva Gerbi	53,34%	nc	6,67%	20%	20%	15
Jaguariúna	46,20%	15,40%	nc	38,50%	nc	13
Petrolina	25%	27,30%	6,82%	52,30%	nc	44

nc: não foi observado

Os grupos I e IV foram isolados em todos os solos avaliados, indicando se tratar de uma importante parte da comunidade microbiana presente nestes solos. Os isolados destes dois morfo-grupos (I e IV) foram identificados por sequenciamento de parte do gene que codifica a subunidade 16S do rRNA (rDNA).

Os resultados apontaram, no grupo GI, a presença de *Acinetobacter calcoaceticus*, *Ralstonia*, *Burkholderia* sp. e *Burkholderia cepacia*, enquanto que o grupo GIV foi composto basicamente por *Bacillus* sp. e *Bacillus sphaericus* (Tabela 5.4).

Desta forma ficou evidenciado que dentre os isolados identificados no grupo GI, na suas maiorias provenientes dos solos de Estiva Gerbi e Aguaí, houve a predominância das proteobactérias das subdivisões gama (gênero *Acinetobacter*) e beta (gênero *Burkholderia* e *Ralstonia*). No caso do GIV, com maior frequência de isolamento no solo de Petrolina, os isolados identificados são bactérias gram positivas do gênero *Bacillus*.

Extração do DNA genômico: para os estudos de variabilidade genética foram escolhidos os dois grupos de bactérias mais representativos dentre os obtidos no isolamento. A metodologia utilizada para extração do DNA genômico total foi baseada em Pitcher et al. (1989), para bactérias, em escala mínima. As bactérias foram crescidas em meio MS suplementado com metalaxil ($3 \mu\text{g i.a mL}^{-1}$) por 24 horas. Em seguida, 1,5 mL de cada cultura foram transferidos para tubos de 1,5 mL de capacidade e levados para centrifugação por 2 min a 12000 rpm. As células concentradas foram ressuspensas em 100 μL de tampão TE pH 8 (10 mM EDTA, 1 mM de Tris-HCl) contendo lisozima (2 mg mL^{-1}) e incubadas por 2 horas a 37°C . Após este período, foram adicionados 500 μL da solução de tiocianato de guanidina 5 M em cada tubo e estes foram incubados à temperatura ambiente por 10 min. A suspensão foi, então, resfriada no gelo e recebeu 250 μL de acetato de amônio (7,5 M). Os tubos foram todos agitados gentilmente por inversão e incubados novamente no gelo por mais 10 min. Em seguida, foram adicionados 500 μL de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v/v), homogeneizado e levado para centrifugação a 12000 rpm por 10 min. A fase aquosa foi coletada e esta recebeu 0,54 volume de isopropanol. O tubo foi invertido várias vezes até a visualização de um precipitado fibroso branco. Novamente o tubo foi centrifugado a 6500 rpm por 20 seg, o sobrenadante descartado e o pellet lavado com etanol 70% (v/v). O pellet foi ressuspensado em 200 μL de TE, contendo 10 μL da enzima RNase (10 mg mL^{-1} de RNase A pancreática em 10 mM de Tris-HCl pH 7,5 e 15 mM de NaCl) e levado para incubação a 37°C por 60 min. Posteriormente, foram adicionados nos tubos 20 μL de cloreto de lítio 4 M e 1 volume de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1, v/v), os quais foram homogeneizados e centrifugados a 12000 rpm por 10 min. A fase aquosa foi coletada e esta recebeu 2 volumes de etanol absoluto gelado. O tubo foi invertido por várias vezes e levado para centrifugação a 6500 rpm por 20 seg. O precipitado foi lavado com etanol 70% (v/v) por duas vezes e o DNA ressuspensado em 50 μL de água Milli-Q e estocado a 4°C . A integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose 0,8% (p/v) e quantificado (SAMBROOK et al., 1989).

Reação de RAPD: as reações de RAPD foram efetuadas num volume total de 25 μL contendo: 1 μL (10-20 ng) de DNA molde; 200 μM de cada dNTP (dCTP, dGTP, dATP e dTTP da Life Technologies®); 1,25 mM de MgCl_2 ; 0,5 U de Taq DNA polimerase (Life Technologies®) e 1 μM de cada primer (Tabela 5.3) em tampão da enzima (50 mM de KCl_2 e 10 mM de Tris-HCl pH 9). Os controles negativos foram efetuados sem a adição do DNA molde. As amplificações foram realizadas em termociclador (Programable Thermal Controller MJ Research Inc. USA - Modelo PTC-100™), programado para uma desnaturação inicial de: 4 min a 92°C , seguido de 40 ciclos de 1 min a 92°C , 1,3 min a 37°C , 2 min a 72°C e extensão a 72°C por 3 min. Os padrões de amplificação foram avaliados em gel de agarose 1,4% (p/v).

Tabela 5.3. Características dos primers utilizados na detecção de polimorfismo de bactérias isoladas de quatro solos brasileiros.

Oligonucleotídeos	Sequência 5' → 3'	Conteúdo de bases C G (%)
OPP 07	CCT GGA GCGA	70%
OPP 19	TGG TCG CAGA	60%
OPJ 19	GGA CAC CACT	60%
OPJ 20	AAG CGG CCTC	70%

Caracterização Genética da Comunidade Bacteriana Associada a Biodegradação do Fungicida Metalaxil

PCR – Amplificação da subunidade 16S do rRNA e seqüenciamento. : As reações de PCR para seqüenciamento foram realizadas em um volume final de 50µL, contendo 1 µL (0,5 a 10 ng) de DNA molde, 0,2 µM do premier P027F (5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3') e do contendo 1 µL (0,5 a 10 ng) de DNA molde, 0,2 µM do premier P027F (5'-GAG AGT TTG ATC CTG GCT CAG-3') e do primer R1387 (5'-CGG TGT GTA CAA GGC CCG GGA ACG-3'); 200 µM de cada dNTP; 3,75 mM de MgCl₂; 0,5U de TAQ DNA polimerase (Life Technologies®), em tampão de enzima (50 mM de KCl₂ e 10 mM de Tris-HCl pH 9). O programa utilizado para a reação de amplificação foi realizado em termociclador programado para uma desnaturação inicial por 4 min a 94°C, 2 ciclos a 94°C, 1 min a 60°C, 1min a 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 59°C, 1min a 72°C; 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min, 58°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 57°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 2 ciclos a 94°C, 1 min; 56°C, 1 min; 72°C, 2 min; mais 20 ciclos a 94°C, 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 2 min e uma extensão final de 10 min a 72°C. Um fragmento de aproximadamente 450 pb foi observado correndo 5µL da reação em gel de agarose (1,2%). Posteriormente, o produto de PCR foi purificado com o Kit GFX PCR (Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com as instruções do fabricante.

Tabela 5.4. Identificação das bactérias degradadoras de metalaxil baseado no 16S rDNA.

Isolados	Grupo	Local de isolamento	Identificação	Similaridade (%)
A1	GI	Aguai	<i>Burkholderia</i> sp.	99%
A4	GI	Aguai	<i>Ralstonia</i> sp.	99%
E2	GI	Estiva Gerbi	<i>Burkholderia cepacia</i>	99%
E8	GI	Estiva Gerbi	<i>Burkholderia</i> sp.	99%
F1	GI	Jaguariúna	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	99%
F6	GI	Jaguariúna	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	99%
N1	GI	Petrolina	<i>Burkholderia</i> sp.	99%
N4	GI	Petrolina	<i>Burkholderia</i> sp.	99%
A6	GIV	Aguai	<i>Bacillus</i> sp.	99%
E11	GIV	Estiva Gerbi	<i>Bacillus</i> sp.	99%
F9	GIV	Jaguariúna	<i>Bacillus</i> sp.	99%
F10	GIV	Jaguariúna	<i>Bacillus</i> sp.	99%
F11	GIV	Jaguariúna	<i>Bacillus</i> sp.	99%
N11	GIV	Petrolina	<i>Bacillus sphaericus</i>	99%
N14	GIV	Petrolina	<i>Bacillus sphaericus</i>	99%
N18	GIV	Petrolina	<i>Bacillus</i> sp.	99%

Análise estatística dos dados gerados por RAPD

As análises dos dados obtidos por amplificação ao acaso do DNA genômico (RAPD) foram transformados em variáveis binárias, ou seja, o número 1 significou a presença de banda e o número 0 a ausência de banda. Desta forma os dados foram introduzidos no programa NTSYS (Numerical Taxonomy System of Multivariate Programs - Applied Biostatistics, Inc.). Este programa produz uma matriz de similaridade com os dados a serem introduzidos, utilizando o coeficiente de similaridade de Jaccard, calculado de acordo com a fórmula: $J=M/P$; onde M é o número de concordâncias positivas e o P o número total de variáveis, menos concordâncias negativas. Os dados da matriz de similaridade foram utilizados pelo programa para a construção de dendrogramas pelo método de agrupamento hierárquico UPGMA (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetical Average).

Nas Figs. 5.1 e 5.2 estão apresentados os padrões de bandas dos grupos GI e GIV, respectivamente, gerados pela amplificação dos DNA de bactérias degradadoras de metalaxil, isoladas dos solos estudados. Como mostra as figuras, foi observada uma grande diversidade nestas populações. Os 4 "primers" utilizados produziram 69 e 73 bandas polimórficas para o GI e GIV, respectivamente.

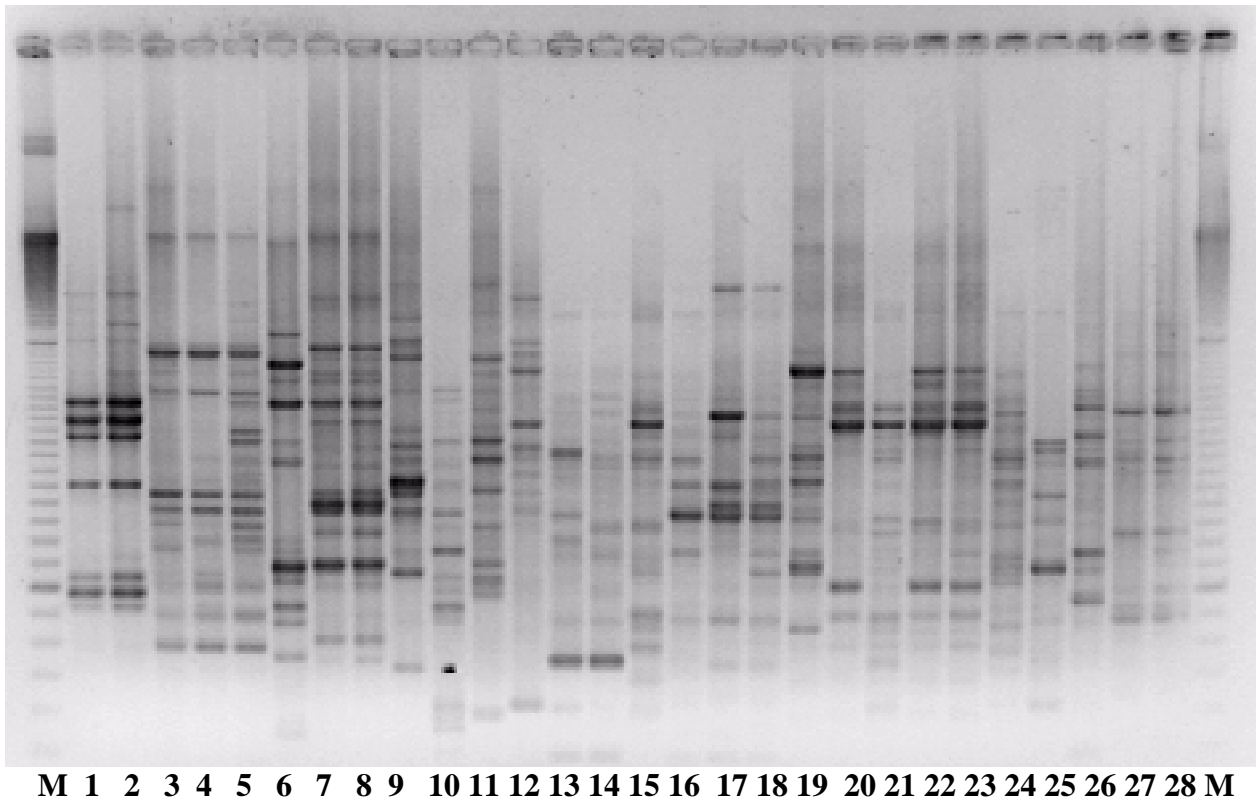


Fig. 5.1. Gel de amplificação do grupo GI com o primer OP20, na concentração de 20 ng de DNA genômico. O marcador de peso molecular (100 pb) está indicado pela letra M. Os isolados são: 1-A1; 2-A2; 3-E1; 4-E2; 5-E3; 6-A3; 7-A4; 8-A5; 9-F1; 10-F2; 11- F3; 12- F4; 13-E4; 14-E5; 15- F5; 16- F6; 17- N1; 18- N2; 19- P7; 20- E6; 21- E7; 22- E8; 23- E9; 24- P8; 25- E10; 26- N3; 27- N4; 28- N5. As siglas A = Aguaí; E = Estiva Gerbi, F = Jaguariúna e N = Petrolina.

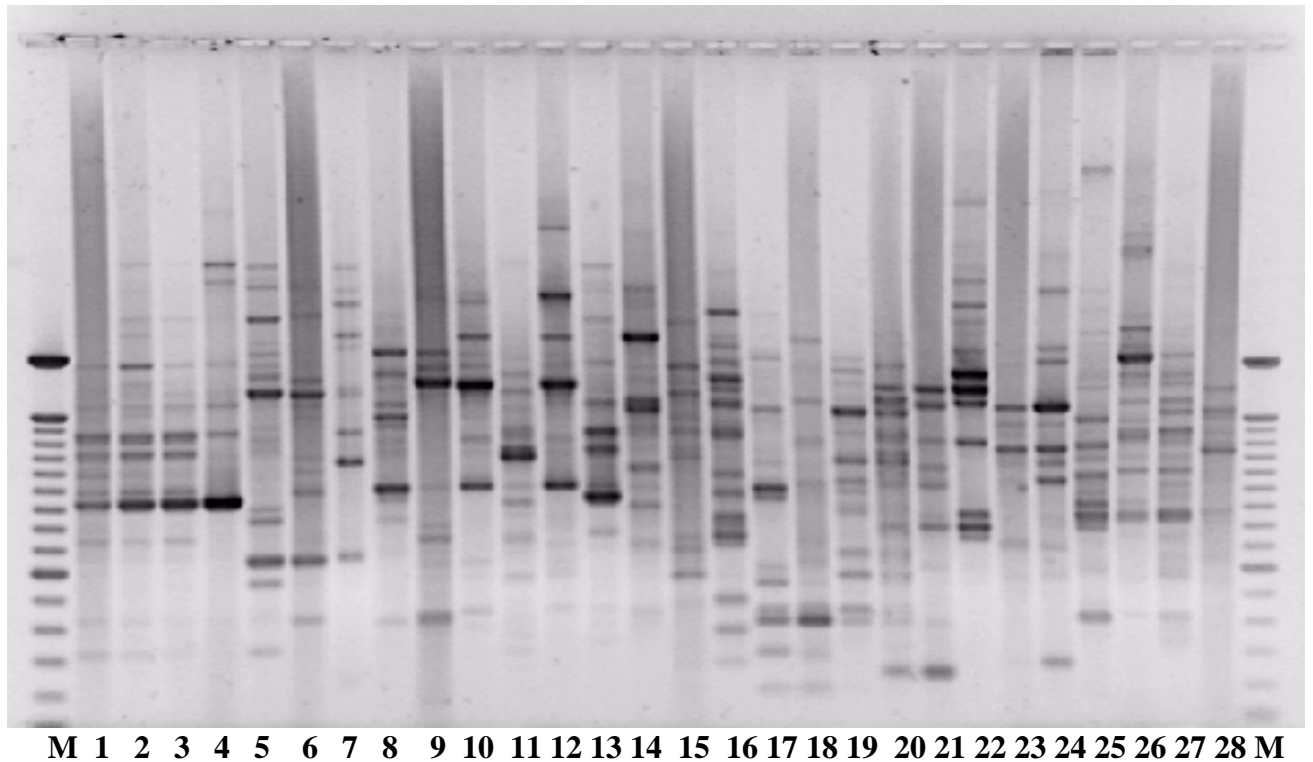


Fig. 5.2. Gel de amplificação do grupo GIV com o primer OP19, na concentração de 20ng de DNA genômico. O marcador de peso molecular (100 pb) está indicado pela letra M. Os isolados são: 1-N10; 2- N11; 3- N12; 4- N13; 5- N14; 6- N15; 7-F9; 8- F10; 9- F11; 10-A6; 11- F12; 12-A7; 13-N16; 14- A8; 15- F14; 16- E 11; 17- F15; 18- E12; 19- A9; 20- A10; 21- N17; 22- E13; 23- A11; 24- A12; 25- A13; 26- N18; 27- N19; 28- A14. As siglas A = Aguaí; E = Estiva Gerbi, F = Jaguariúna e N = Petrolina.

A análise conjunta dos 4 "primers" foi realizada para a construção de uma matriz de similaridade e elaboração de um dendrograma para cada grupo estudado (Figs. 5.3 e 5.4). Como já observado nos géis de agarose, a análise demonstrou a existência de alta variabilidade dentro dos dois grupos (GI e GIV) avaliados neste estudo. Para o grupo GI foram observados 4 sub-grupos (A, B, C e D). O sub-grupo B foi formado somente por bactérias provenientes dos solos de Estiva Gerbi e Jaguariúna, pertencentes ao gênero *Burkholderia*. No caso do sub-grupo C foram observados isolados provenientes de Estiva Gerbi, Jaguariúna e Petrolina, constituído por *Acinetobacter* e *Burkholderia*. Isolados provenientes de Aguaí agruparam somente nos sub-grupos A e D, sendo o isolado identificado como *Burkholderia* no sub-grupo A e *Ralstonia* no sub-grupo D.

Caracterização Genética da Comunidade Bacteriana Associada a Biodegradação do Fungicida Metalaxil

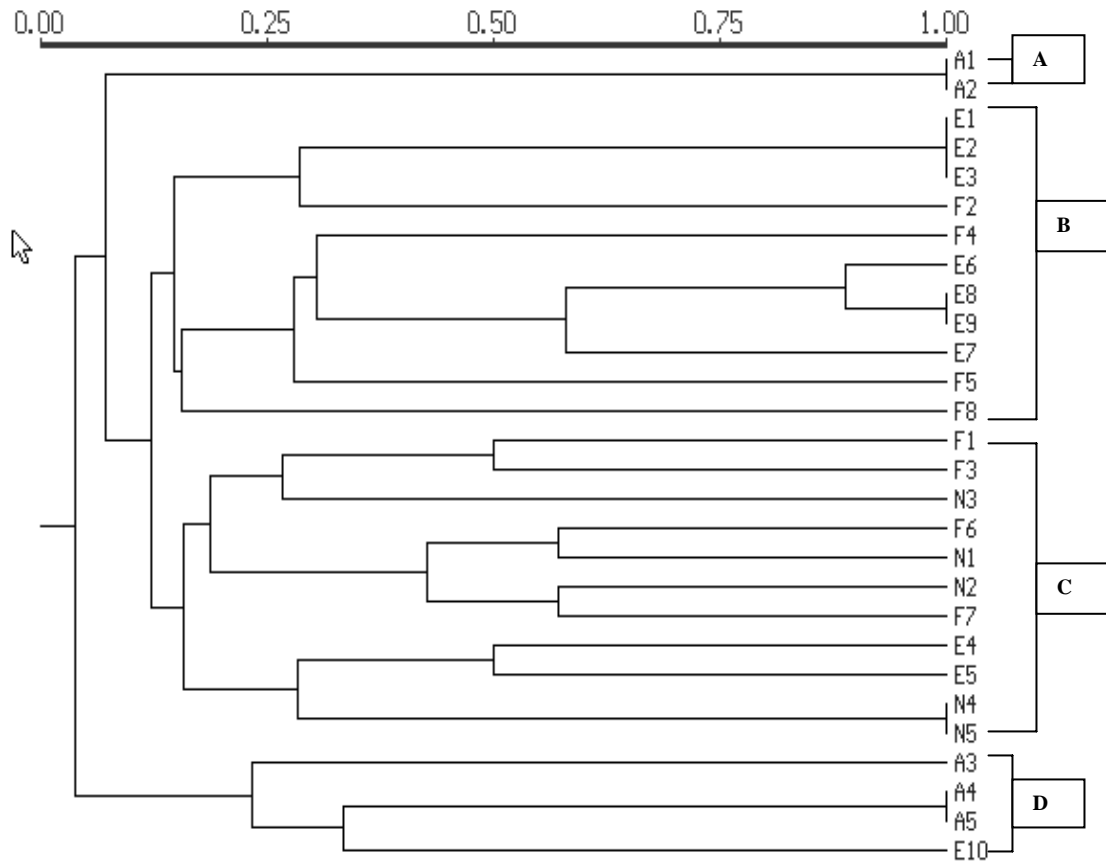


Fig. 5.3. Dendrograma gerado pelo método UPGMA, a partir de dados de RAPD de bactérias degradadoras de metalaxil pertencentes ao grupo morfológico GI. A letra A corresponde aos isolados do solo de Aguaí, E = Estiva Gerbi, F = Jaguariúna e N = Petrolina.

No grupo GIV foram observados 8 sub-grupos, mostrando que a diversidade genética neste caso foi maior que a observada para o grupo GI. A maioria dos isolados provenientes de Petrolina formaram sub-grupos (E e F), enquanto que os isolados de Aguaí foram observados nos sub-grupos F e K, preferencialmente.

De acordo com os resultados de agrupamento dos dendrogramas, alguns isolados não identificados tiveram 100% de similaridade com outros identificados por sequenciamento de parte do gene que codifica a subunidade 16S do rRNA. Os isolados E1 e E3 agruparam ao isolado E2 (*Burkholderia cepacia*); o E9 com E8 (*Burkholderia* sp.); N5 com N4 (*Burkholderia* sp.); A5 com A4 (*Ralstonia* sp.) e N12 com N11 (*Bacillus sphaericus*).

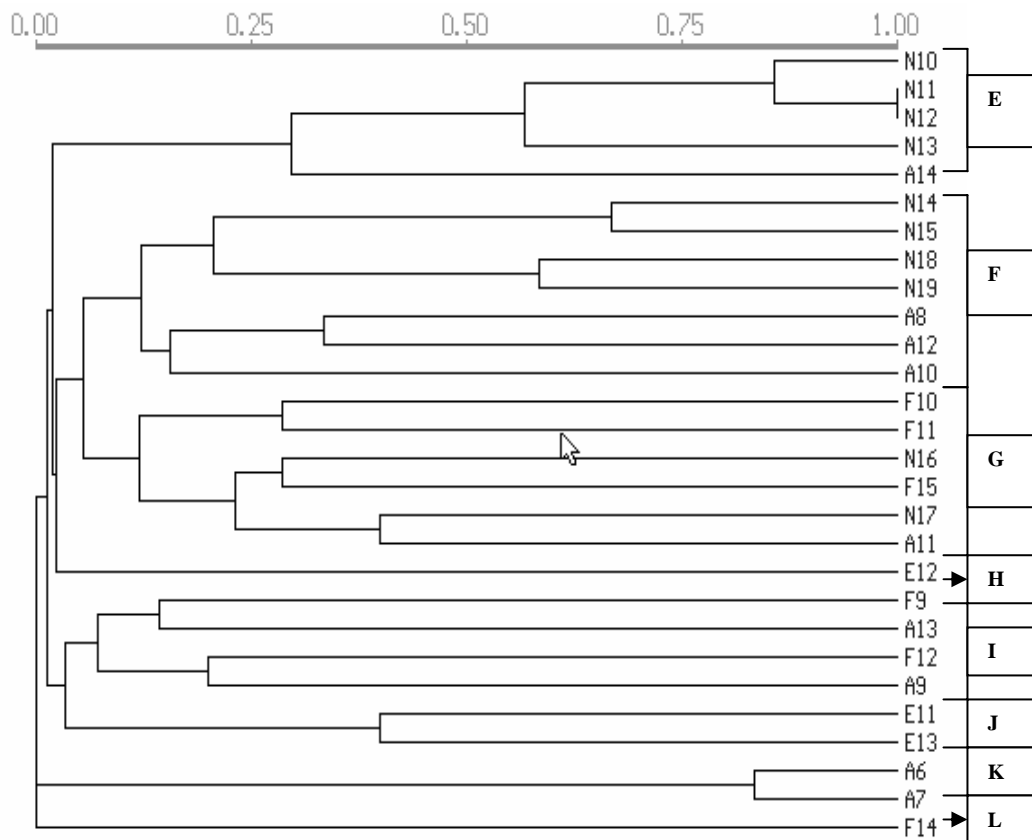


Fig. 5.4. Dendrograma gerado pelo método UPGMA, a partir de dados de RAPD de bactérias degradadoras de metalaxil pertencentes ao grupo morfológico GIV. A letra A corresponde aos isolados do solo de Aguaí, E = Estiva Gerbi, F = Jaguariúna e N = Petrolina.

No entanto, os dados gerados por RAPD demonstraram uma grande quantidade de bandas polimórficas, que indicaram a existência de grande variabilidade dentro destes grupos. Isso não era esperado, pois a adaptação às condições ambientais específicas geradas pela presença da molécula nos solos, poderia reduzir a variabilidade genética destes grupos. O alto grau de variabilidade observada nos grupos GI e GIV foi caracterizado para 56 microrganismos avaliados e que, após identificação e comparação com os resultados dos dendrogramas (total de 22 identificações) revelaram apenas 4 gêneros, sendo que no caso de *Ralstonia* e *Burkholderia*, estas pertenciam ao grupo dos pseudomonados e, portanto, até pouco tempo eram classificadas como sendo do gênero *Pseudomonas*. As maiores taxas de variabilidade foram detectadas entre os isolados provenientes do solo de Jaguariúna, único sem histórico de utilização de metalaxil em campo. Deve-se ressaltar que, uma

vez adotadas estratégias de análises moleculares, não foram utilizados testes bioquímicos neste estudo, por se tratar de técnicas muito dispendiosas e desnecessárias neste caso. Mas, o sucesso de ferramentas bioquímicas na identificação de agentes microbianos degradadores de moléculas xenobióticas são evidentes, embora necessitem de um amplo conhecimento ao nível de taxonomia de microrganismos.

Embora não tenham sido identificadas todas as bactérias avaliadas neste estudo, algumas considerações a respeito da distribuição espacial puderam ser observadas. No caso da *Acinetobacter calcoaceticus* (proteobactérias do grupo gama, gram negativa), por exemplo, sua ocorrência só pode ser observada no solo de Jaguariúna enquanto que proteobactérias do grupo beta (*Ralstonia e Burkholderia*) foram predominantes nos solos com histórico de aplicação do metalaxil. *Bacillus*, no entanto, foram observados nos quatro solos estudados. Os valores de frequência de isolamento mostraram que o grupo GI (gram negativas) é mais expressivo nos solos de Jaguariúna e Estiva Gerbi, enquanto que o grupo GIV é mais expressivo no solo arenoso de Petrolina e Aguaí.

Populações microbianas são conhecidas por sua habilidade em suportar variações temporárias na estrutura genética pela pressão de seleção exercida pelo ambiente, as quais causariam trocas genéticas dentro da população local e migrações entre populações distintas (DI CELLO et al. 1997). A ação antropogênica pela aplicação de agrotóxicos no solo tem indicado a existência de favorecimento de algumas espécies de microrganismos, que se tornariam estáveis e predominantes dentro da comunidade. Esta estabilidade, mantida dentro das populações as custas de fenômenos de troca de informações genéticas, seria o fator pelo qual algumas espécies conseguiriam se sobrepor a outras em consequência da pressão de seleção exercida pela presença da molécula, no caso dos solos com constantes aplicações do fungicida (ALEXANDER, 1999).

Embora alguns trabalhos envolvendo moléculas xenobióticas tenham tido sucesso na identificação de marcadores genéticos para processos degradativos (JOSHI & WALIA, 1995; FRANKLIN et al., 1999), no presente estudo não foi possível detectar a presença de qualquer fragmento amplificado que fosse comum em todos os padrões de bandas gerados nas reações de RAPD e que pudesse estar sendo relacionado com a habilidade degradativa destes microrganismos. Esta ausência estaria relacionada, principalmente, com a grande variabilidade genética

observada nos dois grupos de bactérias analisados, indicando a necessidade de se avaliar esta diversidade em apenas um grupo taxonômico.

Bactérias do gênero *Burkholderia* e que compreende um grupo bem heterogêneo de bactérias encontradas em ambientes endofíticos, solo e rizosfera, segundo diversos autores (LESSIE et al., 1996; DI CELLO et al., 1997; CHANG & ZYLSTRA, 1999; BALANDREAU et al., 2001) exibem uma complexidade genômica e plasticidade que favorecem a variabilidade intraespecífica, a qual confere a estes organismos alta capacidade adaptativa aos mais diversos ambientes. Da mesma forma, espécies do gênero *Ralstonia* (ZHOU et al., 2001; HICKEY et al., 2001; STEINLE et al., 1998), *Acinetobacter* (MIRGAIN & MONTEIL, 1993; MARIN et al., 1995; VANECHOUTTE et al., 1999; ROJAS et al., 1999; BARBERIO et al., 1998; IJAH, 1998) e *Bacillus* (KADIYALA & SPAIN, 1998; JOSHI & WALIA, 1995; ROJAS et al., 1999; RAMINEZ et al., 1998) tem sido destacadas pela presença de um grande número de genes envolvidos em processos de biodegradação das mais diversas moléculas.

Perspectivas na utilização das bactérias isoladas nos solos de Aguaí, Estiva Gerbi, Jaguariúna e Petrolina, estariam em métodos como o de controle biológico integrado ao tratamento químico de *Pythium* e *Phytophthora*. Dados publicados por MELO et al. (2001) revelaram que alguns fungos do gênero *Trichoderma* spp. seriam hábeis em degradar o fungicida metalaxil ao mesmo tempo em que estariam inibindo *P. parasitica* e *P. citrophthora*. Da mesma forma, alguns experimentos envolvendo várias espécies de *Bacillus* no controle da *Phytophthora* e *Pythium* são citados na literatura (HANDELSMAN et al., 1991; HWANG et al., 1996). Os resultados apresentados neste estudo sugerem que, dentre os microrganismos avaliados, bactérias do gênero *Bacillus* seriam as mais indicadas para testes em campo, envolvendo estratégias de biorremediação de áreas contaminadas com metalaxil. Esta afirmação estaria baseada nas taxas observadas de crescimento destas bactérias em meio de cultura mínimo tendo o fungicida como fonte de carbono, sem a dependência de fontes extras de nitrogênio e com uma fase de aclimação em torno de 6 horas. Características particulares deste grupo como é o caso da produção de endósporos (estruturas de resistência), apareceria como outro fator importante na seleção de biodegradadores do fungicida metalaxil, principalmente em locais com condições ambientais extremas, como é o caso de regiões semi-áridas. Outro fator que tornaria este grupo de bactérias potencialmente interessantes do ponto de vista da

biorremediação é o fato de ter sido isolado em todos os solos avaliados neste trabalho, aumentando dessa forma a sua chance de sobrevivência caso seja reintroduzido nestes ambientes. Esta biorremediação poderia minimizar os efeitos de aplicações repetidas de metalaxil no ambiente, como vem ocorrendo nos últimos anos na região do semi-árido nordestino nos um

Avaliação da dissipação do metalaxil

A degradação do metalaxil pelos diferentes grupos de bactérias foi quantificada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Dissipação do metalaxil em meio de cultura MS: dez isolados bacterianos foram avaliadas quanto à taxa de degradação do composto em meio mínimo MS líquido suplementado com metalaxil (3 e 30 $\mu\text{g i.a. mL}^{-1}$). Frascos com 50 mL de meio de cultura suplementado com o fungicida foram incubados a 30°C, sob agitação (150 rpm) por 14 dias. Após este período, a cultura foi filtrada em filtro de 0,2 μm de diâmetro (Millipore) e levada para análise por CLAE. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna de fase estacionária C₁₈-Bondesil – (25 cm x 4,6 mm, x 5 μm) Varian, fase móvel acetonitrila:água (70:30 v/v); pressão 137 psi; fluxo 1 mL min⁻¹; *loop* de injeção de 50 μL ; absorvância 210 nm. O tempo de retenção do fungicida metalaxil foi de aproximadamente 5 min.

As porcentagens de recuperação obtidos nos testes de dissipação nas concentrações de 3 e 30 $\mu\text{g i.a. mL}^{-1}$ do fungicida para bactérias pertencentes ao grupo GI e GIV estão apresentados nas Tabelas 5.5 e 5.6.

A taxa de recuperação de resíduo do metalaxil em meio líquido diminuiu com o aumento do tempo de incubação. As menores taxas foram obtidas pelas bactérias provenientes do grupo GIV (representado pelo gênero *Bacillus*). Em contrapartida, dentre as bactérias testadas, as isoladas do solo de Jaguariúna foram as que apresentaram as maiores porcentagens de recuperação, nos dois grupos avaliados.

Caracterização Genética da Comunidade Bacteriana Associada a Biodegradação do Fungicida Metalaxil

Tabela 5.5. Porcentagem de recuperação em meio de cultura MS suplementado com 3 e 30 µg i.a. mL⁻¹ de metalaxil inoculado com bactérias do GI, dados obtidos por CLAE, no intervalo de 14 dias de incubação

Isolados	% Recuperação do fungicida metalaxil									
	0 dia		2 dias		4 dias		7 dias		14 dias	
	3µg	30µg	3µg	30µg	3µg	30µg	3µg	30µg	3µg	30µg
A1 (<i>Burkholderia</i> sp.)	100	100	87,54	83,12	77,16	72,45	70,18	68,45	65,16	61,12
E8 (<i>Burkholderia</i> sp.)	100	100	87,40	82,03	77,02	71,16	69,78	67,60	64,12	60,03
F1 (<i>A. calcoaceticus</i>)	100	100	90,53	87,60	84,01	80,29	77,20	73,26	72,16	69,87
N1 (<i>Burkholderia</i> sp.)	100	100	87,12	80,23	76,90	73,29	69,34	61,24	63,29	57,34
N4 (<i>Burkholderia</i> sp.)	100	100	87,09	80,12	76,78	73,11	69,03	60,89	63,11	56,90

Tabela 5.6. Porcentagem de recuperação em meio de cultura MS suplementado com 3 e 30 µg i.a. mL⁻¹ de metalaxil inoculado com bactérias do GIV. Dados obtidos por CLAE, no intervalo de 14 dias de incubação

Isolados	% Recuperação do fungicida metalaxil									
	0 dia		2 dias		4 dias		7 dias		14 dias	
	3µg.	30µg	3µg	30µg	3µg	30µg	3µg	30µg	3µg	30µg
A6 (<i>Bacillus</i> sp.)	100	100	80,23	80,04	70,45	67,29	67,70	62,34	60,45	57,12
E11 (<i>Bacillus</i> sp.)	100	100	78,78	79,23	68,12	66,87	65,39	60,78	60,20	56,98
F10 (<i>Bacillus</i> sp.)	100	100	87,45	86,90	83,67	79,34	78,90	74,90	64,12	60,27
N11 (<i>B. sphaericus</i>)	100	100	78,60	78,12	65,67	63,23	60,16	58,56	57,60	53,23
N14 (<i>Bacillus</i> sp.)	100	100	77,98	78,10	65,03	63,08	59,90	58,34	56,10	52,89

Poucos são os relatos de isolamento e caracterização de grupos de bactérias em estudos de biodegradação do fungicida metalaxil. Alguns microrganismos descritos como degradadores do fungicida são os fungos do gênero *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium* (DROBY & COFFEY, 1991; MUSUMECI et al., 1986), *Phytophthora boehmeriae* (BAILEY & COFFEY, 1985) *Syncephalastrum racemosum* (ZHENG et al., 1989) e bactérias do gênero *Bacillus* (DROBY & COFFEY, 1991).

A identificação através da amplificação da subunidade 16S do RNA ribossômico revelou que *Bacillus*, *Ralstonia*, *Burkholderia* e *Acinetobacter* estão envolvidos nos processo de biodegradação da molécula do agrotóxico nestes solos, embora não esteja excluída a hipótese de que outras espécies também sejam aptas a metabolizar o composto.

Conclusões

Bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Burkholderia* e *Ralstonia* foram isoladas e identificadas como aptas à degradação do fungicida metalaxil. Foi detectado um alto grau de polimorfismo gerado pelos padrões de bandas de RAPD nos grupos bacterianos avaliados. As bactérias do gênero *Bacillus*, dentre os isolados avaliados, foi considerada a mais indicada para aplicação em estudos de biorremediação de áreas contaminadas com o fungicida metalaxil.

Referências

- ALEXANDER, M. *Biodegradation and bioremediation*. 2. ed. New York: Academic Press, 1999. 453 p.
- BAILEY, A. M.; COFFEY, M. D. Biodegradation of metalaxyl in avocado soils. *Phytopathology*, v. 75, n. 2, p. 135-137, 1985.
- BALANDREAU, J.; VERONIQUE, V.; BENOIT, C.; TOM C.; LAEVENS, S.; VANDAMME, P. *Burkholderia cepacia* genomovar III is a common plant-associated bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 67, n. 2, p. 982-985, 2001.
- BARBERIO, C.; FANI, R. Biodiversity of an *Acinetobacter* population isolated from activated sludge. *Research in Microbiology*, v. 149, n. 9, p. 665-673, 1998.
- CHANG, H. K.; ZYLSTRA, G.J. Role of quinolinate phosphoribosyl transferase in degradation of phthalate by *Burkholderia cepacia* DB 01. *Journal of Bacteriology*, v. 181, n. 10, p. 3069-3075, 1999.
- DI CELLO, F.; BEVIVINO, A.; CHIARINI, L.; FANI, R.; PAFFETTI, D.; TABACCHIONI, S.; DALMASTRI, C. Biodiversity of a *Burkholderia cepacia* population isolated from maize rhizosphere at different plant growth stages. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 63, n. 11, p. 4485-4493, 1997.
- DROBY, S.; COFFEY, M. D. Biodegradation process and the nature of metabolism of metalaxyl in soil. *Annals of Applied Biology*, v. 118, n. 3, p. 543-553, 1991.
- FRANKLIN, B. R.; DOUGLAS, R. T.; AARON, L. M. Characterization of microbial communities using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Journal of Microbiological Methods*, v. 35, p. 225-235, 1999.
- HANDELSMAN, J.; NESMITH, W. C.; RAFFEL, S. J. Microassay for biological and chemical control of infection of tobacco by *Phytophthora parasitica* var *nicotinae*. *Current Microbiology*, v. 22, n. 5, p. 317-319, 1991.
- HICKEY, W. J.; SABAT, G.; YUROFF, A. S.; ARMENT, A. R.; PEREZ-LESHER, J. Cloning, nucleotide sequencing and functional analysis of a novel, mobile cluster of biodegradation genes from *Pseudomonas aeruginosa* strain JB2. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 6, p. 4603-4609, 2001.
- HWANG, S. F.; CHANG, K. F.; HOWARD, R. J.; DENEKA, B. A.; TURNBULL, G. D. Decrease in incidence of *Phythium* damping-off of field pea by seed treatment with *Bacillus* spp and metalaxyl. *Journal of Plant Diseases and Protection*, v. 103, n. 1, p. 31-41, 1996.

Caracterização Genética da Comunidade Bacteriana Associada a Biodegradação do Fungicida Metalaxil

- IJAH, U. J. J. Studies on relative capabilities of bacterial and yeast isolates from tropical soil in degrading crude oil. *Waste Management*, v. 18, n. 5, p. 293-299, 1998.
- JOSHI, B.; WALIA, S. PCR amplification of catechol 2,3-dioxygenase gene sequences from naturally occurring hydrocarbon degrading bacteria isolated from petroleum hydrocarbon contaminated groundwater. *FEMS Microbiology and Ecology*, v. 19, p. 5-15, 1995.
- KADIYALA, V.; SPAIN, J. C. A two-component monooxygenase catalyses both hydroxylation of p-nitrophenol and the oxidative release of nitrite from 4-nitrocatechol in *Bacillus sphaericus* JS 905. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 7, p. 2479-2484, 1998.
- LESSIE, T. G.; HENDRICKSON, W.; MANNING, B. D.; DEVEREUX, R. Genomic complexity and plasticity of *Burkholderia cepacia*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 144, p. 117-121, 1996.
- MARIN, M.; PEDREGOSA, A.; RIOS, S.; ORTIZ, M. L.; LABORDA, F.; BEECH, I. B.; SYLVESTRE, M. Biosorption and bioremediation. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 35, p. 269-285, 1995.
- MELO, I. S.; LEVANTEZI, K.; SPESSOTO, A. M.; FEICHTENBERGER, E. Degradação do fungicida metalaxil por linhagens de *Trichoderma* spp. isolados de solos rizosféricos. In: WORKSHOP SOBRE BIODEGRADAÇÃO, 2., 2001, Jaguariúna. *Anais... Jaguariúna: Embrapa MeioAmbiente*, 2001. p. 353-359.
- MIRGAIN, L.; GREEN, G. A.; MONTEIL, H. Degradation of atrazine in laboratory microcosms: isolation and identification of the biodegrading bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 12, n. 9, p. 1627-1634, 1993.
- MUSUMECI, M. R.; PIMENTEL, C. P. V.; RUEGG, E. F. Degradation in vitro of metalaxyl by pure cultures of plant pathogenic fungi. *Fitopatologia Brasileira*, v. 11, n. 4, p. 957-961, 1986.
- PITCHER, D. G.; SAUNDERS, N. A.; OWEN, R. J. L. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters in Applied Microbiology*, v. 8, p. 151-56, 1989.
- RAMIREZ, F.; MONROY, O.; FAVELA, E.; GUYOT, J. P.; CRUZ, F. Acetamide degradation by a continuous-fed batch culture of *Bacillus sphaericus*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 70-72, p. 215-223, 1998.
- RANJARD, L.; FRANCK, P.; NAZARET, S. Monitoring complex bacterial communities using culture-independent molecular techniques: applications to soil environment. *Research in Microbiology*, v. 151, p. 167-177, 2000.
- ROJAS, A. N. G.; RODRIGUEZ, V. R.; ENRIQUEZ, V. F.; MARTINEZ, C. J.; POGGI, V. H. M. Transformer oil degradation by an indigenous microflora isolated from a contaminated soil. *Resources, Conservation and Recycling*, v. 27, p. 15-26, 1999.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- STEINLE, P.; STUCKI, G.; STETTLER, R.; HANSELMANN, K. W. Aerobic mineralization of 2,6-dichlorophenol by *Ralstonia* sp. Strain RK1. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 64, n. 7, p. 2566-2571, 1998.
- VANEECHOUTTE, M.; TJERNBERG, I.; BALDI, F.; PEPI, M.; FANI, R.; SULLIVAN, E. R.; VAN DER TOORN, J., DIJKSSHOORN, L. Oil-degrading *Acinetobacter* strain RAG-1 and strains described as *Acinetobacter venetianus* sp nov.¹ belong to the same genomic species. *Research in Microbiology*, v. 150, n. 1, p. 69-73, 1999.
- ZHENG, Z.; SHU-YEN, L.; FREYER, A. J.; BOLLAG, J. M. Transformation of metalaxyl by the fungus *Syncephalastrum racemosum*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 55, n. 1, p. 66-71, 1989.

Caracterização Genética da Comunidade Bacteriana Associada a Biodegradação do Fungicida Metalaxil

ZHOU, Y. N.; FUENMAYOR, L.; WILLIAMS, P. A. *nag* genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. Strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism. *Journal of Bacteriology*, v. 183, n. 2, p. 700-708, 2001.

Aspectos da Avaliação da Exposição ao Metalaxil

Vera Lúcia S. S. de Castro

Introdução

Atualmente a noção de sustentabilidade é considerada como relevante para a sociedade moderna e passa a concentrar a interface produção alimentar/meio ambiente. Assim é que a proposta de um desenvolvimento sustentável, incluindo a atividade agrícola, contempla a conservação dos recursos naturais, a utilização de tecnologias apropriadas e a viabilidade econômica e social. A medida que o ambiente torna-se essencial no plano da saúde da coletividade, o desenvolvimento sustentável tornou-se parte integrante de decisão política de saúde ambiental.

É, portanto, a relação risco benefício que deve nortear a escolha da utilização desses produtos. O risco refere-se à probabilidade de que um organismo ou uma determinada população sofra um dano. Esta avaliação é realizada, quanto à saúde ambiental, identificando órgãos ou sistemas afetados que podem levar a enfermidades e desequilíbrios, e estabelecer as condições de exposição e dose ao agroquímico que levam ao dano e/ou enfermidade.

O estudo de uma determinada substância e seu potencial para causar danos durante o desenvolvimento animal, envolve a avaliação e a integração de dados de diversas categorias de observações. Assim, utilizam-se diferentes testes envolvendo diferentes organismos na tentativa de obter-se uma visão imparcial dos efeitos da substância em estudo.

Sobre os agrotóxicos e os possíveis efeitos decorrentes da exposição ao metalaxil

1. Considerações gerais

O modelo de agricultura utilizado no Brasil visa geralmente obter uma máxima produtividade possível de acordo com o local e a capacidade biológica da planta. Entretanto, tal modelo, muitas vezes, desestabiliza os agroecossistemas, provocando danos à saúde animal e humana. Os sistemas de produção intensivos elevam a necessidade de uso de agroquímicos, os quais aumentam as concentrações residuais e a deriva de agroquímicos ocorridas durante o processo de aplicação dos produtos, causando entre outros problemas, prejuízo à saúde do trabalhador rural e às comunidades vizinhas.

O Brasil é o oitavo maior consumidor de agrotóxicos por hectare no mundo (FAIRBANKS, 2001), e o uso indiscriminado desses compostos no campo pode resultar na intoxicação dos trabalhadores rurais com diferentes graus de severidade, constituindo-se um grave problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento (PIRES et al., 2005). Mais ainda, muitas vezes, o baixo nível sócio-econômico do trabalhador rural em especial no que se refere à saúde e educação, resulta em um padrão de exploração do meio ambiente além da capacidade de suporte, causando impactos negativos sobre a biodiversidade e sobre os recursos naturais. Os fatores de risco associados à maior ocorrência de acidentes são a classe social mais baixa (OLIVEIRA-SILVA et al., 2001; FEHLBERG et al., 2001), a cor não-branca e a insatisfação com o trabalho realizado (FEHLBERG et al., 2001). Outros fatores como a linguagem técnica empregada em ações educativas e de treinamento e a pressão da indústria/comércio podem também ajudar no processo de comunicação que realimenta a inserção desfavorável do homem do campo em uma economia de mercado mais ampla (PERES et al., 2001). Contudo, muitas vezes o trabalhador desenvolve estratégias de defesa frente a percepção da situação de potencial dano a saúde (PERES et al., 2004).

Além do aplicador, esses produtos podem se distribuir no ambiente – solo, água - podendo provocar agravos à saúde da população do entorno quer em sua forma original quer como metabólitos. Eles podem entrar em um organismo por diversas vias de exposição. Por exemplo, quando os pesticidas são dispersos no ambiente, as populações das áreas próximas serão possivelmente expostas por inalação de gases ou

partículas, ingestão de água ou comida, ou absorção pela pele através do contato com água de chuva, mar, rio, de uso doméstico, etc.. Tal exposição pode ocorrer por uma série de motivos, entre eles: presença de agrotóxicos estocados na proximidade da moradia; proximidade de algumas residências à área de trabalho; ao manuseio doméstico da lavagem de roupas utilizadas na aplicação e divisão social do trabalho, que destina às mulheres pequenas tarefas, como a aplicação manual de produtos químicos (CASTRO et al., 1999).

Devido à complexidade, interações e variabilidade dos ecossistemas e seus organismos, é difícil prever riscos mesmo com base em respostas biológicas pois uma mesma perturbação pode levar a diferentes respostas dependendo das variações das condições ambientais.

2. Efeitos do metalaxil na saúde

O metalaxil é um fungicida largamente utilizado em várias culturas no Brasil e no mundo (DUREJA et al., 2000; MATTHEWS et al., 2003) e pertence à classe dos fungicidas sistêmicos do grupo dos alaninatos. Em relação à toxicidade do metalaxil no organismo não-alvo de forma geral e, em especial em seres humanos, ainda não se conhece bem seus possíveis efeitos. A degradação do metalaxil no rato ocorre primeiramente pela via hidrólise do éster metílico, seguida da N-dealquilação, clivagem do éter metílico e finalmente por oxidação do metil benzeno com subsequente formação de conjugados com ácido glucurônico.

Depois de uma única dose oral de ^{14}C Metalaxil em ratos machos e fêmeas foi observado que mais de 60% da radioatividade administrada foi excretada dentro de 24 horas. Após seis dias da aplicação, 37-63% da radioatividade foi excretada na urina e 35-66% nas fezes; principalmente na forma de metabólitos. Muitos dos metabólitos excretados na urina do rato estavam tanto na sua forma livre quanto conjugado com ácidos glucurônicos (FAO, 1983). Foi ainda encontrada radioatividade residual em gordura, sangue e vários órgãos como fígado, rim, músculo, cérebro, coração, pulmões, e ovários. Comparativamente, em outros trabalhos foram observadas no sangue altas concentrações de metalaxil e seus metabólitos em períodos superiores a 6 horas e até 18 horas (KALOYANOVA et al., 1991). Em uma avaliação da excreção de metalaxil com ratas, em doses que não provocaram sinais evidentes de toxicidade, foi observado aumento da concentração eliminada, nos dias seguintes às administrações. Contudo, o

fato que a proporção entre as quantidades de metalaxil excretado em relação ao tempo não permaneceu constante e sim aumentou em relação às doses estudadas (10 e 20 mg kg⁻¹), pode indicar que ocorreu um certo acúmulo do produto pelo organismo. Considerando que o fungicida também é extensivamente excretado na forma de metabólitos, não dosados no trabalho, uma outra possibilidade é a de que com o aumento da dose haveria um aumento da quantidade de metalaxil excretado sem ter sofrido metabolização (CASTRO et al., 2004). Estudos mais detalhados a respeito do metabolismo do metalaxil deverão esclarecer esses pontos.

O metalaxil ainda pode afetar a atividade de algumas monooxigenases em camundongos tratados intraperitonealmente com dose única de 200 ou 400 mg Kg⁻¹ ou 200 mg Kg⁻¹ por três dias (PAOLINI et al., 1996). Ele inibe a atividade da monoaminoxidase (MAO) - o que promove o acúmulo da dopamina, da norepinefrina e a serotonina nos seus sítios de ação - provavelmente por interferir com o metabolismo das aminas (NAIDU, 1989). O metalaxil induz bradicardia em ratos de forma dose-dependente. Após a administração intraperitoneal de metalaxil, os ratos podem desenvolver sintomas de intoxicação do sistema nervoso central tais como: tremores, extensão tônica, ataxia e hipnoses, na dependência da dose (NAIDU & RADHAKRISHNAMURTY, 1988). Devido ao fato de interferir com os sistemas catecolaminérgicos, o fungicida pode eventualmente ocasionar prejuízos endócrinos por vários mecanismos uma vez que desde que a diferenciação e a maturação sexual em ratos machos dependem de complexas interações entre o hipotálamo, pituitária anterior e eixo gonadal, os agrotóxicos podem afetar a maturação sexual (DUTTA & MEIJER, 2003; CUMMINGS & KAVLOCK, 2004).

Atualmente além da preocupação quanto aos riscos de intoxicação por exposição aguda e crônica aos agrotóxicos, também estão sendo estudados os potenciais efeitos teratogênico e mutagênico. Apesar do metalaxil não possuir uma atividade clastogênica evidente do DNA, ele pode provocar alterações na homeostase celular que podem estar implicadas no processo de carcinogênese (HRELIA et al., 1996). Além disso, apesar do metalaxil possuir baixa toxicidade para mamíferos, a combinação de impurezas presentes nos produtos técnicos provenientes dos processos de síntese e estocagem, podem levar a diferenças marcantes na toxicidade desses produtos (DUREJA et al., 2000). Uma das impurezas identificadas do metalaxil, o 2,6-xilidina, é um carcinógeno nasal em ratos (TYDEN et al., 2004).

Biomarcadores

A avaliação dos efeitos da exposição humana aos agroquímicos, conta atualmente com um número limitado de indicadores biológicos ou biomarcadores reconhecidos e validados como aqueles utilizados na avaliação da exposição e intoxicação por inseticidas organofosforados. Assim, o estudo de alguns dos mecanismos envolvidos na exposição aos agroquímicos e o conhecimento dos processos através dos quais os agroquímicos possam afetar os organismos alvo e não-alvo são essenciais para o desenvolvimento de parâmetros a serem empregados na avaliação dos riscos à saúde pública e na tomada de decisões quanto à segurança de seu uso (LESKO & ATKINSON, 2001).

A análise do risco de contaminação de populações expostas envolve o conhecimento das fontes de emissão dos contaminantes e de suas transformações, do transporte e do acúmulo dos mesmos no ambiente, das rotas de ingresso no organismo, da biodisponibilidade, da dose biologicamente efetiva e de possíveis efeitos prejudiciais a saúde desses organismos. Desta forma, pode-se realizar dois tipos de monitoramento da exposição de uma população: (a) o monitoramento ambiental que é uma avaliação direta e que qualifica e/ou quantifica a exposição no ambiente (água, ar solo), e (b) o monitoramento biológico que é uma avaliação indireta e que qualifica e/ou quantifica a exposição de um indivíduo da população ou de uma amostra da população em amostras biológicas.

Para a realização do monitoramento biológico é necessário o conhecimento de um indicador biológico ou biomarcador. Estes indicadores devem expor os problemas e suas causas e serem úteis para alcançar os objetivos das políticas referentes à saúde (AMORIM, 2003). O biomarcador deve, tanto quanto possível, prover uma análise dos efeitos de estressantes ambientais, envolvendo a medida de respostas biológicas em uma escala temporal que evidencie alterações sutis, além de trazer informações quanto ao seu mecanismo de ação. A observação desses efeitos pode indicar sinais iniciais de alerta (AITIO & KALLIO, 1999). Nesse aspecto, é adequado desenvolver escalas de respostas biológicas em relação ao tempo que sejam sensíveis a severidade da exposição (efeito dose-resposta) e que espelhem a suscetibilidade de dano, principalmente aquele que se reflete no desenvolvimento dos jovens da população, após a exposição aos agroquímicos. Contudo, nem sempre é possível aos biomarcadores determinar um efeito específico ocasionado por um agroquímico e expressar correlações

diretas lineares devido à presença de vários agroquímicos no ambiente ou ainda estabelecer o poder estatístico adequado dos parâmetros usados nas correlações entre os efeitos observados e a exposição em amostras populacionais (ALONSO et al., 2004; CONOLLY & LUTZ, 2004; GAYLOR et al., 2004).

A fim de proceder ao monitoramento biológico, podem-se utilizar indicadores biológicos: a) de dose interna, acúmulo ou depósito que quantificam a substância e/ou seus metabólitos no organismo e relacionam a exposição ambiental à dose interna (relação dose-resposta); b) de efeito, que avaliam os efeitos biológicos que se traduzem em alterações funcionais celulares capazes de evidenciar as alterações que se instalam no órgão-alvo, como as alterações bioquímicas e celulares. O indicador biológico de efeito estabelece a relação entre a exposição e o efeito tóxico refletida em alterações pré-clínicas e agravos à saúde (hepatotoxicidade, neurotoxicidade); e c) de suscetibilidade ou genético, que procura o entendimento dos mecanismos relacionados a ação tóxica e o grau de resposta nos indivíduos (AMORIM, 2003).

Os biomarcadores de dose interna podem ser incorporados a modelos baseados na toxicocinética (*Physiologically Based Pharmacokinetic Models* - PBPK) para sua calibração e validação. A toxicocinética inclui os processos envolvidos desde a disponibilidade química até a concentração do toxicante nos órgãos alvo (absorção, distribuição, armazenamento, biotransformação e eliminação das substâncias inalteradas ou dos seus metabólitos). Esses estudos permitem avaliar as diferenças das vias de biotransformação entre diferentes espécies e a possível extrapolação para o homem através de modelos biológicos experimentais, ou mesmo estudar diferenças toxicocinéticas entre crianças e adultos. Assim, os biomarcadores podem ser usados para avaliar as relações dose-resposta em uma população e que possibilitam prever a distribuição do toxicante no organismo após diferentes períodos da exposição (GENTRY et al., 2003; DIACK & BOIS, 2005).

Influência do fator idade na toxicidade

O reconhecimento dos fatores que influenciam a toxicidade de um determinado nível de exposição a um agroquímico é fundamental na determinação do risco de exposição a estes agentes em populações. Entre os diversos fatores, a idade reveste-se de especial importância, uma vez que a fisiologia difere entre recém-nascidos, crianças e adultos. Em vários casos, os organismos mais jovens são mais suscetíveis aos efeitos

tóxicos dos contaminantes ambientais. Em crianças, a sensibilidade a possíveis efeitos tóxicos dos agroquímicos é por vezes maior que nos adultos, podendo sofrer danos com doses menores (MOSER et al., 2001; SCHEUPLEIN et al., 2002; COSTA et al., 2004). Esta sensibilidade seria resultante da diferença entre a fisiologia dos recém-nascidos, crianças e adultos em decorrência de alguns fatores como área corporal, relação da massa cerebral e corporal, período de desenvolvimento, ventilação, função renal e atividade enzimática (GENTRY et al., 2003).

Entre o grande número de pesticidas atualmente utilizados muitos possuem potencial mutagênico e embriofetotóxico. A exposição de fêmeas a pesticidas durante a fase reprodutiva pode levar a alterações no desenvolvimento animal (CASTRO, 2000a; 2000b; 2004). Embora o organismo materno possa alterar um químico ou pelo menos reduzir sua concentração, a função da placenta como barreira é limitada. Moléculas de muitas substâncias podem atravessá-la, tanto por simples difusão como por algum tipo de transporte ativo. Portanto, muitos toxicantes ou quaisquer outras substâncias que penetrem na fêmea prenhe, podem atingir o feto. A ocorrência de períodos críticos no desenvolvimento animal, durante a prenhez e imediatamente após o nascimento, permite o entendimento de algumas destas modificações (COSTA et al., 2004).

Contudo, diferentes suscetibilidades não implicam necessariamente em maiores riscos em crianças. O efeito real vai depender dos mecanismos fisiometabólicos e das características do produto em estudo (SCHEUPLEIN et al., 2002; ZWART et al., 2004). O biomonitoramento das possíveis conseqüências à exposição aos agroquímicos é, portanto, importante no que se refere a efeitos no desenvolvimento animal e potencial neurotoxicidade (NEWLAND et al., 2003; CHELONIS et al., 2004) e efeitos genotóxicos (TAIOLI & BONASSI, 2002). Baseado no fato de que as crianças são geralmente mais sensíveis que os adultos aos efeitos neurotóxicos e comportamentais, a reversibilidade dos efeitos neurotóxicos com o amadurecimento do organismo deve ser avaliada com cuidado em testes experimentais, mesmo na ausência da observação de sinais evidentes de dano neurológico (KIMMEL & MAKRIS, 2001).

Testes com animais

Os dados laboratoriais (testes com animais) aliados aos de campo (estudos epidemiológicos) são fundamentais no processo de avaliação de risco no tocante ao estabelecimento de quais são os efeitos na saúde decorrentes da exposição ambiental a

um contaminante. Assim, os modelos de estudo com animais tem sido amplamente utilizados na avaliação de possíveis prejuízos em decorrência da exposição aos agroquímicos.

Muitos agroquímicos afetam o sistema reprodutivo e os testes confirmam informações de seus efeitos sobre vários aspectos deste, incluindo gestação, parto, lactação, desmame, crescimento e desenvolvimento da prole (CLAUDIO et al., 1999). Tem-se procurado melhorar os protocolos experimentais disponíveis e adicionar alvos de estudo que possam fornecer uma melhor caracterização dos efeitos da exposição a esses compostos (LIMA, 2003). A fim de determinar os riscos através da exposição a substâncias químicas em humanos, muitas agências nacionais (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis- IBAMA) ou internacionais (U.S. Environmental Protection Agency- USEPA e *Organization for Economic Co-operation and Development*- OECD) requerem testes toxicológicos específicos. Uma revisão dos protocolos de testes requeridos pela USEPA levou à extensão do período de exposição a termo nos estudos de toxicidade pré-natal, neurotoxicidade, carcinogenicidade, entre outros, consistindo numa bateria de estudos de toxicidade, utilizando roedores e não roedores (KIMMEL & MAKRIS, 2001; REUTER et al., 2003). A evolução dos métodos de avaliação referentes aos testes de efeitos reprodutivos e no desenvolvimento animal aliada à adequação da legislação tem respondido ao estudo desses efeitos e estimulado a melhora dos protocolos de avaliação de neurotoxicidade decorrentes da exposição aos agroquímicos; o que será capaz de otimizar a detecção de possíveis efeitos relacionados à exposição (MEYER, 2003).

As avaliações cuidadosas sobre o desenvolvimento animal freqüentemente incluem, além das observações quanto ao aparecimento de sinais físicos, os aspectos referentes ao desenvolvimento neurocomportamental (ALDER, 1983). Na maioria das vezes, a toxicidade e em especial a neurotoxicidade ocasionada pela exposição a substâncias tóxicas é avaliada de acordo com algumas baterias de testes, descritas na literatura internacional. Contudo, tais baterias variam de acordo com as recomendações e/ou legislação de cada país ou de acordo com critérios estabelecidos pelos pesquisadores envolvidos no trabalho. Essas baterias podem ser realizadas através: (a) da aplicação de questionários, exames clínicos (ex: dano de condutividade nervosa periférica) e avaliações comportamentais no caso de seres humanos ou (b) da realização de protocolos experimentais em animais de laboratório. Um exemplo de bateria de testes

descrito é denominado FOB (*Functional Observational Battery*) (MOSER et al., 2001; 2004).

Exposição de ratas ao metalaxil e avaliação de alguns parâmetros reprodutivos

O objetivo do presente estudo foi avaliar os possíveis efeitos do metalaxil na reprodução e desenvolvimento animal em organismos expostos perinatalmente para o estabelecimento de indicadores desta exposição. Para tanto, foram realizados testes com alguns parâmetros reprodutivos em ratas expostas ao metalaxil bem como foram procedidas as observações de alguns possíveis efeitos neuromotores e comportamentais em seus filhotes.

Os animais utilizados foram ratos Wistar, mantidos em condições padronizadas de luz, umidade e temperatura no Biotério do Laboratório de Ecotoxicologia CNPMA – Embrapa Meio Ambiente (Jaguariúna – SP), sendo as matrizes fornecidas pelo Biotério Central da UNICAMP (Universidade de Campinas). Os animais foram alojados em grupo de 3 a 4 em gaiolas de polipropileno com cama de maravalha autoclavada. As gaiolas foram devidamente colocadas em salas com temperatura e umidade controladas ($22 \pm 2^\circ \text{C}$ e 65 a 70%, respectivamente) por meio de aparelhos de ar condicionado, ventilação e sistema de exaustão; iluminação artificial com um ciclo de luz claro – escuro 12h/12 horas, com início da fase clara às 7:00 horas. Água e comida (ração) foram fornecidas a vontade aos animais durante todo o período dos procedimentos experimentais.

Ratas fêmeas foram previamente examinadas e selecionadas para que estivessem nas fases de proestro/estro e tivessem ciclo estral regular, sendo distribuídas ao acaso em número de duas em gaiolas de polipropileno com um rato macho adulto para que ocorresse o acasalamento. Na manhã seguinte, o rato era retirado da gaiola e os esfregaços vaginais das fêmeas coletados. A presença de espermatozóide no lavado vaginal das ratas foi considerada como indicativa do 1º dia de prenhez e todas as fêmeas que apresentavam diagnósticos positivos foram, neste momento, separadas em gaiolas individuais.

O fungicida foi testado em várias doses. O metalaxil foi suspenso em água destilada esterilizada para que a dose administrada fosse de 10 e 20 mg kg⁻¹. O produto quando administrado na dosagem 20 mg kg⁻¹, mostrou-se tóxico aos animais utilizados que apresentaram tremores e insuficiência respiratória após a exposição.

As ratas foram divididas ao acaso, em grupos, conforme abaixo:

1. Grupo controle 1 (**Salina A**): Animais que receberam apenas o veículo (solução fisiológica) no período 1° ao 6° dia de prenhez;
2. Grupo controle 2 (**Salina B**): Animais que receberam apenas o veículo (solução fisiológica) no período de 6° ao 15° dia de prenhez;
3. Grupo Metalaxil **A1 (MET A1)**: Animais que receberam metalaxil na concentração 10 mg kg⁻¹ no período 1° ao 6° dia de prenhez;
4. Grupo Metalaxil **A2 (MET A2)**: Animais que receberam metalaxil na concentração 20 mg kg⁻¹ no período 1° ao 6° dia de prenhez;
5. Grupo Metalaxil **B1 (MET B1)**: Animais que receberam metalaxil na concentração 10mg kg⁻¹ no período 6° ao 15° dia de prenhez;
6. Grupo Metalaxil **B2 (MET B2)**: Animais que receberam metalaxil na concentração 20mg kg⁻¹ no período 6° ao 15° dia de prenhez;

As taxas de viabilidade ao nascimento e ao desmame foram avaliadas conforme (Tabela 6.1): VN = 100 x (número de filhotes natimortos / nascidos vivos) e VD = 100 x (número de filhotes desmamados / nascidos vivos)

As ratas foram mantidas em gaiolas-moradias com as suas respectivas crias. O número de ratos usados em cada grupo é apresentado nas tabelas entre parênteses. O peso das fêmeas e de suas proles foi observado diariamente durante todo o teste e do nascimento ao desmame (1° – 21° dias /vida) no período da manhã. Os filhotes continuaram sendo observados e pesados até a fase adulta nos dias 30, 60 e 90 de idade (Tabelas 6.2, 6.3 e 6.4).

Tabela 6.1: Avaliação da taxa de viabilidade ao nascimento e da taxa de viabilidade ao desmame, em ratas expostas por grupo ao fungicida metalaxil.

Grupos	Taxa de viabilidade (%)	
	Nascimento	Desmame
Sal A (10)	96,00 (96/100)	61,00 (61/100)
Met A1 (7)	89,48 (34/38)	100,00 (38/38)
Sal B (10)	98,70 (77/78)	67,53 (52/77)
Met B1 (9)	100,00 (87/87)	87,35 (76/87)

Tabela 6.2. Peso em gramas das ratas expostas ao metalaxil no 1º, 7º, 14º. e 20º. dias de prenhez. São apresentadas as médias e os respectivos desvios padrões.

Grupos/ dias	1º	7º	14º	21º
Sal A (10)	223,24 ± 26,91	247,13 ± 25,68	264,30 ± 23,43	327,19 ± 24,89
Met A1 (7)	233,40 ± 22,96	252,14 ± 20,30	266,48 ± 18,83	314,75 ± 21,13
Sal B (10)	215,71 ± 15,19	236,31 ± 12,56	249,46 ± 12,54	295,55 ± 21,04
Met B1 (9)	240,35 ± 16,14	254,21 ± 20,11	259,48 ± 21,57	321,24 ± 19,87

Tabela 6.3. Peso em gramas dos filhotes das ratas no período de lactação (1º- 23º dias de vida). São apresentados as médias e os respectivos desvios padrões.

Grupos	Dias de vida			
	1º	7º	14º	21º
Salina A (10)	6,26 ± 0,56	11,30 ± 2,45	22,57 ± 4,19	37,37 ± 5,59
Met A1 (7)	6,47 ± 0,61	14,98 ± 2,22	25,78 ± 4,91	41,31 ± 8,06
Salina B (10)	6,39 ± 0,37	11,53 ± 2,23	21,19 ± 5,42	35,63 ± 6,75
Met B1 (9)	6,57 ± 0,35	12,53 ± 1,06	22,14 ± 2,49	35,07 ± 4,29

Tabela 6.4: Média e os respectivos desvios-padrões dos pesos (em gramas) dos filhotes no 30º., 60º. e 90º. dias de vida.

Grupos	30	60	90
Sal A (27)	70,00 ± 10,09	174,28 ± 29,19	230,13 ± 49,87
Met A1 (15)	81,16 ± 4,76	186,52 ± 36,89	240,66 ± 66,62
Sal B (27)	66,85 ± 8,14	172,22 ± 28,87	223,08 ± 47,79
Met B1 (18)	70,00 ± 5,85	173,77 ± 35,51	234,11 ± 42,28

Foram observadas a presença e a ausência de: a) reflexo de endireitamento: três filhotes de cada ninhada foram colocados sobre a mesa, em decúbito dorsal; mediu-se o tempo gasto para que voltassem a posição anterior, ou seja, apoiados sobre as quatro patas e, b) geotaxia negativa: três filhotes de cada ninhada foram colocados com a cabeça para baixo em uma plataforma a 25° e mediu-se o tempo gasto em segundos para que se reorientem, ou seja, vire o corpo em 180°. Os filhotes tiveram 1 minuto para se reorientar. A observação desses dois testes foi feita de acordo com a idade dos filhotes e por determinado número de dias consecutivos, respectivamente entre os dias 2 a 5 e 7 a 11 (Tabela 6.5 e 6.6).

Tabela 6.5. Latência em segundos para o reflexo de endireitamento de filhotes de ratas expostos ao metalaxil com 2 a 5 dias de vida. São apresentados as médias e os respectivos desvios-padrões.

Grupos	Dias de vida			
	2º	3º	4º	5º
Salina A (30)	3,59 ± 3,22	2,16 ± 0,93	2,29 ± 1,64	2,13 ± 0,75
Met A2 (21)	5,52 ± 5,33	3,56 ± 3,25	1,80 ± 0,63	2,02 ± 1,03
Salina B (30)	4,76 ± 2,38	3,26 ± 1,62	1,26 ± 0,43	1,10 ± 0,31
Met B2 (27)	3,37 ± 1,20	4,74 ± 6,98	2,03 ± 0,87	1,95 ± 0,93

Tabela 6.6. Latência em segundos para a geotaxia negativa de filhotes de ratas expostos ao metalaxil ao 7º ao 11º dias de vida. São apresentados as médias e os respectivos desvios padrões.

Grupos	Dias de Vida				
	7º	8º	9º	10º	11º
Sal A (30)	23,66 ± 17,81	22,46 ± 17,94	18,03 ± 13,28	14,80 ± 12,83	13,26 ± 12,48
Met A2 (21)	29,57 ± 20,94	30,57 ± 22,04	28,65 ± 19,50	21,23 ± 17,60	11,28 ± 9,72
Sal B (30)	51,03 ± 18,47	39,90 ± 23,92	24,20 ± 23,25	22,40 ± 22,34	14,06 ± 17,01
Met B2 (27)	27,07 ± 20,53	18,92 ± 15,88	13,55 ± 13,50	15,11 ± 14,88	10,38 ± 7,27

Os dados de literatura a respeito do metalaxil em relação ao tema aqui abordado são geralmente escassos. Não se observaram alterações, quer na taxa de viabilidade ao nascimento quer na viabilidade ao desmame. De igual forma não se observaram modificações produzidas pelo fungicida na duração da prenhez, no peso dos filhotes ao nascer, no peso das ratas prenhes e ao desmame até a idade adulta. A inibição da MAO (monoamina oxidase) (NAIDU, 1989) pode estar envolvida nos prejuízos observados com a administração de doses maiores de metalaxil as ratas, uma vez que esta enzima é a principal rota de inativação de catecolaminas intraneurais. Estudos posteriores poderão confirmar essa hipótese.

Com o avanço do período gestacional, a unidade fisiológica mãe/placenta/feto passa por consideráveis alterações fisiológicas. Estas alterações promovem variações nos processos de absorção, distribuição e eliminação de xenobióticos. Tais alterações evidenciam-se melhor quando os organismos estão expostos às doses altas de um pesticida. Problema maior surge na tentativa de determinarem-se prejuízos das doses menores às sub-clínicas (que não produzem sinais tóxicos evidentes), que podem confundir-se com outros fatores alterando a reprodução animal e causando, por sua vez, efeitos mais sutis e não menos importantes. O desenvolvimento dos reflexos aqui estudados aparentemente não foram alterados pela exposição ao metalaxil.

Conclusão

De forma geral, conclui-se que o metalaxil não produziu efeitos prejudiciais no desenvolvimento dos filhotes na dose de 10 mg kg⁻¹ durante os períodos analisados no presente trabalho. Contudo, em doses maiores e em um período maior de observação,

ocorreram sinais de toxicidade nas ratas que receberam 20 mg kg⁻¹ do metalaxil, com dificuldade respiratória.

Agradecimento

Agradecemos a valiosa colaboração das estagiárias Helen Juliana Herget de Jesus e Karina Kleinfelder do Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança na realização das análises apresentadas nesse texto.

Referências

- AITIO, A.; KALIO, A. Exposure and effect monitoring: a critical appraisal of their practical application. *Toxicology Letters*, v.108, p.137-147, 1999.
- ALDER, S. Behavioral teratology. In: ZBINDEN, Q.; RACAGNI, G.; CUOMO, V.; WEISS, B. *Application of behavioral pharmacology in toxicology*. New York: Raven Press, 1983. p. 57-66.
- ALONSO, A.; GEYS, H.; MOLENBERGHS, G.; KENWARD, M.; VANGENEUGDEN, T. Validation on surrogate markers in multiple randomized clinical trials with repeated measurements: canonical correlation approach. *Biometrics*, v. 60, p. 845-853, 2004.
- AMORIM, L. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v. 6, supl. 1, p. 1-13, 2003.
- CASTRO, V.; CHIORATO, S.; PINTO, N. Biological monitoring of embryo-fetal exposure to methamidophos or chlorothalonil on rat development. *Veterinary and Human Toxicology*, v.42, p. 361-365, 2000a.
- CASTRO, V.; CHIORATO, S.; PINTO, N. Relevance of developmental testing of exposure to methamidophos during gestation to its toxicology evaluation. *Toxicology Letters*, v.118, p.93-102, 2000b.
- CASTRO, V.; FERRACINI, V.; KLEINFELDER, K.; TESSARI, C. *Biomonitoramento de fungicidas na urina de ratas prenhas: estudo do metalaxil*. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, 2004. (Embrapa Meio Ambiente. Boletim de Pesquisa).
- CASTRO, V.; GÓES, K.; CHIORATO, S. Developmental toxicity potential of paclobutrazol in the rat. *International Journal of Environmental Health Research*, v. 14, n. 5, p. 371-380, 2004.
- CASTRO, V.; SILVEIRA, M.; PEREZ, M. Application of clinical indicators of exposition in the evaluation of family agriculture health: the Sumaré case – Brazil. *International Journal of Sustainable and Developmental World Ecology*, v. 6, p.172-184, 1999.
- CHELONIS, J.; FLAKE, R.; BALDWIN, R.; BLAKE, B.; PAULE, M. Developmental aspects of timing behavior in children. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 26, p. 461-476, 2004.
- CLAUDIO, L.; BEARER, C.F.; WALLINGA, D. Assessment of the U.S. Environmental Protection Agency methods for identification of hazards to developing organisms, part I: The reproduction and fertility testing guidelines. *American Journal of Industrial Medicine*, v. 35, p. 543-553, 1999.

- CONOLLY, R.; LUTZ, W. Nonmonotonic dose-response relationships: mechanistic basis, kinetic modeling, and implications for risk assessment. *Toxicological Sciences*, v. 77, p.151-157, 2004.
- COSTA, L.; ASCHNER, M.; VITALONE, A.; SYVERSEN, T.; SOLDIN, O. Developmental neuropathology of environmental agents. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v.44, p. 87-110, 2004.
- CUMMINGS, A.; KAVLOCK, R. Gene-environment interactions: a review of effects on reproduction and development. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 34, n. 6, p. 461-485, 2004.
- DIACK, C.; BOIS, F. Pharmacokinetic-pharmacodynamic models for categorical toxicity data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.41, p. 55-65, 2005.
- DUREJA, P.; TANWAR, R. S.; CHOUDHARY, P. P. Identification of impurities in technical metalaxyl. *Chemosphere*, v. 41, p.1407-1410, 2000.
- DUTTA, H.; MEIJER, H. Sublethal effects of diazinon on the structure of the testis of bluegill, *Lepomis macrochirus*: a microscopic analysis. *Environmental Pollution*, v.125, n.3, p. 355-60, 2003.
- FAIRBANKS, M. Defensivos agrícolas ampliam o mercado. *Química e Derivados*, n. 396, p. 398-403, 2001.
- FAO. Pesticide residues in food: 1982 evaluations. *FAO Plant Production and Protection Paper*, v. 61, p. 259-302, 1983.
- FEHLBERGA, M.F.; SANTOS, I.; TOMASIB, E. Prevalência e fatores associados a acidentes de trabalho em zona rural. *Revista de Saúde Pública*, v. 35, n. 3, p. 269-275, 2001.
- GAYLOR, D.; LUTZ, W.; CONOLLY, R. Statistical analysis of nonmonotonic dose-response relationships: research design and analysis of nasal cell proliferation in rats exposed to formaldehyde. *Toxicological Sciences*, v. 77, p.158-164, 2004.
- GENTRY, P.; COVINGTON, T.; CLEWELL III, H. Evaluation of the potential impact of pharmacokinetic differences on tissue dosimetry in offspring during pregnancy and lactation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 38, p. 1-16, 2003.
- GOLDEN, N.; RATTNER, B. Ranking terrestrial vertebrate species for utility in biomonitoring and vulnerability to environmental contaminants. *Reviews of Environmental Contamination Toxicology*, v. 176, p. 67-136, 2003.
- HRELIA, P.; MAFFEI, F.; FIMOGNARI, C.; VIGAGNI, F.; CANTELLI-FORTI, G. Cytogenetic effects of metalaxyl on human and animal chromosomes. *Mutation Research*, v. 369, n.1-2, p. 81-86, 1996.
- KALOYANOVA, F.; IVANOVA-CHEMISHANSKA, L.; ZAYKOV, H.R.; BAYNOVA, A.; MIHAYLOVA, A.; MIRCHEVA, V.; ANTON, G.; SHUMKOV, N.; VERGIEVA, T.; HALKOVA, Z.H.; ILIEVA, P.; BARDAROV, V. Toxicological evaluation of agromet (metalaxyl) preparation. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology and Immunology*, v. 35, p. 375-382, 1991.
- KIMMEL, C.; MAKRIS, S. Recent developments in regulatory requirements for developmental toxicology. *Toxicology Letters*, v.120, p. 73-82, 2001.
- LESKO, L.; ATKINSON, JR., J. Use of biomarkers and surrogate endpoints in drug development and regulatory decision making: Criteria, validation, strategies. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, v. 41, p. 347-366, 2001.
- LIMA, B. Juvenile animals in safety testing: the european regulatory perspective. *Reproductive Toxicology*, v. 17, n. 4, p. 476-477, 2003.
- MATTHEWS, G.; WILES, T.; BALEGUEL, P. A survey of pesticide application in Cameroon. *Crop Protection*, v. 22, p. 707-714, 2003.
- MEYER, O. Testing and assessment strategies, including alternative and new approaches. *Toxicology Letters*, v.140-141, p. 21-30, 2003.

- MOSER, V.; PHILLIPS, P.; LEVINE, A.; McDANIEL, K.; SILLS, R.; JORTNER, B.; BUTT, M. Neurotoxicity produced by dibromoacetic acid in drinking water of rats. *Toxicological Sciences*, v.79, p.112-122, 2004.
- MOSER, V.; SHAFER, T.; WARD, T.; MEACHAM, C.; HARRIS, M.; CHAPIN, R. Neurotoxicological outcomes of perinatal heptachlor exposure in the rat. *Toxicological Sciences*, v.60, p.315-326, 2001.
- NAIDU, K.; RADHAKRISHNAMURTY, R. Metalaxyl-induced bradycardia in rats: mediated by α -adrenoreceptors. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 23, n. 4, p. 495-498, 1988.
- NAIDU, K. Inhibition of monoamine oxidase by the fungicide metalaxil. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 27, n. 3, p. 395-398, 1989.
- NEWLAND, M.; PENNYPACKER, H.; ANGER, W.; MELE, P. Transferring behavioral technology across applications. *Neurotoxicology and Teratology*, v. 25, p. 529-542, 2003.
- OLIVEIRA-SILVA, J.; ALVES, S.; MEYER, A.; PEREZ, F.; SARCINELLI, P.; MATTOS, R.; MOREIRA, J. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 35, n. 2, p. 130-135, 2001.
- PAOLINI, M.; MESIRCA, R.; POZZETTI, L.; SAPONE, A.; CANTELLI-FORTI, G. Biomarkers of effect in evaluating metalaxyl cocarcinogenesis. Selective induction of murine CYP 3A isoform. *Mutation Research*, v. 361, n. 2-3, p. 157-164, 1996.
- PERES, F.; DE LUCCA, S.; DA PONTE, L.; RODRIGUES, K.; ROZEMBERG, B. Percepção das condições de trabalho em uma tradicional comunidade agrícola em Boa Esperança, Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 20, p. 1059-1068, 2004.
- PERES, F.; ROZEMBERG, B.; ALVES, S.; MOREIRA, J.; OLIVEIRA-SILVA, J. Comunicação relacionada ao uso de agrotóxicos em região agrícola do Estado do Rio de Janeiro. *Revista de Saúde Pública*, v. 35, n. 6, p. 564-570, 2001.
- PIRES, D.; CALDAS, E.; RECENA, M.C. Uso de agrotóxicos e suicídios no Estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 21, p. 598-605, 2005.
- REUTER, U.; HEINRICH-HIRSCH, B.; HELLWIG, J.; HOLZUM, B.; WELSCH, F. Evaluation of OECD screening tests 421 (reproduction/developmental toxicity screening test) and 422 (combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 38, p.17-26, 2003.
- SCHEUPLEIN, R.; CHARNLEY, G.; DOURSON, M. Differential sensitivity of children and adults to chemical toxicity I. Biological basis. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v.35, p.429-447, 2002.
- TAIOLI, E.; BONASSI, S. Methodological issues in pooled analysis of biomarker studies. *Mutation Research/ Reviews in Mutation Research*, v.512, p.85-92, 2002.
- TYDEN, E.; TJALVE, H.; LARSSON, P. Metabolic activation of 2,6-xylidine in the nasal olfactory mucosa and the mucosa of the upper alimentary and respiratory tracts in rats. *Toxicological Sciences*, v. 81, p. 263-272, 2004.
- ZWART, L.; HAENEN, H.; VERSANTVOORT, C.; WOLTERINK, G.; VAN ENGELEN, J.; SIPS, A. Role of biokinetics in risk assessment of drugs and chemicals in children. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 39, p. 282-309, 2004.

Embrapa

Meio Ambiente

**Ministério da
Agricultura, Pecuária
e Abastecimento**

