

RAPHAÉL MEREB NEGRISOLI

**EFEITO DE HERBICIDAS REGISTRADOS PARA MANEJO INTEGRADO DE
VEGETAÇÃO EM DIREITOS DE PASSAGEM, NA RESPIRAÇÃO
HETEROTRÓFICA GLOBAL DO SOLO E EXTRAÇÃO DOS RESPECTIVOS
INGREDIENTES ATIVOS**

Botucatu

2023

RAPHAÉL MEREB NEGRISOLI

**EFEITO DE HERBICIDAS REGISTRADOS PARA MANEJO INTEGRADO DE
VEGETAÇÃO EM DIREITOS DE PASSAGEM, NA RESPIRAÇÃO
HETEROTRÓFICA GLOBAL DO SOLO E EXTRAÇÃO DOS RESPECTIVOS
INGREDIENTES ATIVOS**

Tese apresentada à Faculdade de
Ciências Agronômicas da Unesp Câmpus
de Botucatu, para obtenção do título de
Doutor em Agronomia (Proteção de
Plantas)

Orientador: Prof. Dr. Edivaldo Domingues
Velini

Botucatu

2023

N392e

Negrisoli, Raphael Mereb

Efeito de herbicidas registrados para manejo integrado de vegetação em direitos de passagem, na respiração heterotrófica global do solo e extração dos respectivos ingredientes ativos / Raphael Mereb Negrisoli. -- Botucatu, 2023
85 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu

Orientador: Edivaldo Domingues Velini

1. Atividade microbiana. 2. Impacto ambiental. 3. Resíduo de herbicidas. I.
Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: EFEITO DE HERBICIDAS REGISTRADOS PARA MANEJO INTEGRADO DE VEGETAÇÃO EM DIREITOS DE PASSAGEM, NA RESPIRAÇÃO HETEROTRÓFICA GLOBAL DO SOLO E EXTRAÇÃO DOS RESPECTIVOS INGREDIENTES ATIVOS

AUTOR: RAPHAÉL MEREB NEGRISOLI

ORIENTADOR: EDIVALDO DOMINGUES VELINI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Agronomia (Proteção de Plantas), pela Comissão Examinadora:

Edivaldo Domingues Velini
Prof. Dr. EDIVALDO DOMINGUES VELINI (Participação Presencial)
Proteção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu

Robinson Antonio Mitelli
Pesquisador Dr. ROBINSON ANTONIO MITELLI (Participação Presencial)
/ EcoSafe Agricultura e Meio Ambiente

Plinio Saulo Simões
Prof. Dr. PLÍNIO SAULO SIMÕES (Participação Presencial)
Pós-Doutorando - Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas - UNESP

Edivaldo Domingues Velini
Professor Adjunto ROQUE DE CARVALHO DIAS (Participação Virtual)
/ Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Ana Karollyna Alves de Matos
Prof.ª Dr.ª ANA KAROLLYNA ALVES DE MATOS (Participação Presencial)
Pós-Doutoranda - Produção Vegetal / Faculdade de Ciências Agrônomicas de Botucatu

Botucatu, 31 de maio de 2023

*A Deus e à minha família,
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela sua infinita misericórdia, concedeste graças para completar mais essa conquista. Por estar sempre presente, pelo Amor, saúde, coragem e força. Conceda-nos, sua Graça.

A minha amada esposa Mayara, pelo apoio incondicional e amor durante todo o tempo; por ser minha companheira e amiga; pela nossa filha Maria Helena;

Ao Edson e Vanuza, meus pais, por estarem sempre presentes e apoiarem a todo tudo. Por todo amor, apoio, paciência e suporte, essenciais para chegar a esse momento.

Aos meus irmãos, Matheus e Patrícia, pelo apoio incondicional e companheirismo que fizeram toda a diferença na minha vida;

A todos os meus parentes de que alguma forma participaram e auxiliaram, sobretudo ao Eduardo Negrisoni, por todo apoio, ensino, e auxílio pessoal e profissional;

À UNESP-Faculdade de Ciências Agrônômicas – Campus de Botucatu que me receberam para a oportunidade desse projeto e que tanto contribuiu para minha formação;

Ao meu orientador e professor Dr. Edivaldo Domingues Velini, por todo apoio, ensino, orientação, disponibilidade, paciência e suporte durante todos esses anos trabalhando juntos. Muito obrigado;

Ao prof. Caio Carbonari, por todo apoio, orientação, paciência e suporte;

Ao prof. Robinson A. Pitelli, pela orientação, disponibilidade, paciência e suporte durante todo o projeto. Por todo auxílio e ensinamentos.

Aos Docentes do Programa de Proteção de Plantas, funcionários da FEPE e Seção de Pós-Graduação por toda a orientação, ensino, oportunidade e convivência;

Aos companheiros de trabalho e amigos do NUPAM, amigos que serão sempre lembrados e queridos. Por todo companheirismo, amizade e apoio. Aos queridos amigos Saulo, Diego, Guilherme, Roberto, Marcelo, Renato, Leandro, Roque, Victor, Ivana, Tamara, Gisleide, Marina e todos que conviveram comigo nesse período.

Ao CNPQ – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de estudos concedida (140170/2020-0)

Esta pesquisa foi apoiada pelo programa de pesquisa e desenvolvimento tecnológico da Companhia Paranaense de Energia - Copel Distribuição S.A., por

intermédio do projeto de P&D-2866-480/2017 "Manejo Integrado de Vegetação em abertura de faixa de passagem em linhas de distribuição de alta e média tensão", regulado pela Agência Nacional de Energia Elétrica - ANEEL.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil – CAPES – Código de financiamento 001.

“Christo nihil praeponere”

(São Cipriano de Cartago)

RESUMO

O manejo integrado de vegetação (MIV) pode ser classificado como um manejo complexo que abrange conhecimento básico e aplicado com o objetivo de controlar plantas, sobretudo arbustivas, localizados em instalações e locais onde há linhas de transmissão de energia, subestações de energia, linhas de distribuição de energia elétrica, linhas férreas ou rodoviárias, conhecidos como 'direitos de passagem'. O MIV busca o manejo consciente de vegetação, controlando apenas as plantas que oferecem riscos as atividades realizadas em cada local. O MIV é utilizado para entender, justificar e escolher os tratamentos corretamente, aplicando de forma seletiva quando necessário e, por fim, monitorando os diferentes tratamentos com o objetivo de permitir um manejo sustentável e socialmente responsável. O uso de herbicidas em áreas de MIV são de grande importância no processo. No entanto, grande parte das áreas de MIV consistem em áreas ambientais não agrícolas, o que, conseqüentemente, exige maior atenção no manejo com herbicidas. Assim, o objetivo do trabalho foi de avaliar o efeito de cinco herbicidas registrados para áreas não-agrícolas (Arsenal NA®, Dominum NA®, Garlon NA®, Glyphosate NA® e Pluris NA®) na respiração heterotrófica global do solo em diferentes volumes de calda; avaliar o efeito de cinco adjuvantes na respiração heterotrófica global do solo; avaliar o efeito dos cinco herbicidas utilizando os solos das áreas de linha de transmissão de energia (MIV); e desenvolver e validar a metodologia para detecção e extração dos herbicidas Arsenal NA®, Dominum NA®, Garlon NA®, Glyphosate NA® e Pluris NA® presentes no solo. No estudo do impacto dos herbicidas na atividade microbiana do solo em diferentes taxas de aplicação (50, 150 e 200 L ha⁻¹), avaliou-se o efeito dos tratamentos na respiração heterotrófica global do solo durante 28 dias utilizando solos provenientes de Botucatu-SP. Além disso, foram analisados o efeito dos adjuvantes Agral®, Assist®, Aureo®, Silwet® e VegetOil® na atividade microbiana. Na segunda etapa do estudo, foram avaliados o efeito dos herbicidas na atividade microbiana utilizando solos de áreas que serão utilizadas com o MIV, no estado do Paraná, aplicando os herbicidas a 200 L ha⁻¹. A terceira parte do estudo desenvolveu e validou a metodologia para detecção e quantificação de Arsenal NA®, Dominum NA®, Garlon NA®, Glyphosate NA® e Pluris NA® por meio de cromatografia líquida (LC-MS/MS). Por fim, o estudo desenvolveu metodologia de extração desses ingredientes ativos presentes no solo. Com base nos resultados, observou-se que não houve efeito das

taxas de aplicação na atividade microbiana com os solos de Botucatu-SP. No entanto, analisando a atividade microbiana dos solos do Paraná, observou-se estímulo na atividade microbiana nos solos aplicados com os herbicidas, com destaque aos herbicidas Garlon NA® e Pluris NA®. Por fim, o método proposto para detecção e quantificação mostrou-se altamente eficiente e com altos limites de quantificação. Além disso, observou-se maior extração dos ingredientes ativos no solo por meio da fase '20% Metanol: 80% Água', sendo possível recuperar com grande precisão todos os ativos.

Palavras-chave: atividade microbiana, respiração edáfica, impacto ambiental, cromatografia, plantas daninhas.

ABSTRACT

Integrated vegetation management (IVM) can be classified as a complex management that encompasses basic and applied knowledge and requires great effort in its maintenance, therefore used to understand, justify, choose the treatments correctly, apply them in a selective and, finally, to monitor the different treatments with the objective of allowing a sustainable and socially responsible management. The use of herbicides in IVM areas are of great importance in the process. However, most of the IVM areas consist of non-agricultural environmental places, which, consequently, require greater attention in herbicide management. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of five herbicides (Garlon NA®, Glyphosate NA®, Pluris NA®, Dominum NA®, and Arsenal NA®) on the global heterotrophic respiration of the soil in different spray volumes; to evaluate the effect of the five herbicides using the soils in the areas of the power transmission line (IVM) and to develop and validate the methodology for detection and extraction of the growth regulator herbicides present in the soil. In the study of the impact of herbicides on soil microbial activity at different application rates (50, 150 and 200 L ha⁻¹), the effect of treatments on overall soil heterotrophic respiration was evaluated for 28 days using soils from Botucatu- SP. Furthermore, the effect of adjuvants (Agral®, Assist®, Aureo®, Silwet®, VegetOil®) on microbial activity was analyzed. In the second part of the study, the effect of herbicides on microbial activity was evaluated using soils from areas that will be used with the IVM, in Tunas do Paraná-PR and Piên-PR, applying the herbicides at 200 L ha⁻¹. The third part of the study developed and validated the methodology for detection and quantification of the active ingredients picloram, aminopyralid, triclopyr, imazapyr and fluroxypyr through liquid chromatography (LC-MS/MS). Finally, the study developed a methodology for extracting these active ingredients present in the soil. Based on the results, it was observed that there was no effect of application rates on microbial activity with Botucatu-SP soils. Furthermore, herbicides had no effect on soil microbial activity. However, analyzing the microbial activity of soils in Paraná, a stimulus was observed in microbial activity in soils applied with herbicides, with emphasis on Garlon NA® and Pluris NA® herbicides. Finally, the proposed method for detection and quantification proved to be highly efficient and with high limits of quantification. In addition, there was a greater active ingredient extraction in the soil using the '20% Methanol: 80% Water' phase, making it possible to recover all the actives with great precision.

Keywords: microbial activity, edaphic respiration, environmental impact, chromatography, weeds.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 MANEJO INTEGRADO DE VEGETAÇÕES	20
2.2 RESPIRAÇÃO HETEROTRÓFICA GLOBAL DO SOLO	25
2.3 HERBICIDAS UTILIZADOS NO MIV E DETECÇÃO DE INGREDIENTES ATIVOS POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 EXPERIMENTO 1: EFEITO DE HERBICIDAS REGULADORES DE CRESCIMENTO E ADJUVANTES NA RESPIRAÇÃO HETEROTRÓFICA GLOBAL DO SOLO	32
3.1.1 Coleta e preparo das amostras de solo	33
3.1.2 Incubação e aplicação dos tratamentos	33
3.1.3 Quantificação do CO ₂	36
3.1.3 Análise estatística dos dados	38
3.2 EXPERIMENTO 2: EFEITO DOS HERBICIDAS NA RESPIRAÇÃO HETEROTRÓFICA GLOBAL DO SOLO UTILIZANDO OS SOLOS DE TUNAS DO PARANÁ-PR E PIÊN-PR	38
3.2.1 Incubação e aplicação dos tratamentos	39
3.2.2 Análise dos dados	42
3.3 EXPERIMENTO 3. DETERMINAÇÃO E EXTRAÇÃO DE HERBICIDAS PRESENTES NO SOLO	42
3.3.1 Análise estatística dos dados	46
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1 EFEITO DE HERBICIDAS REGULADORES DE CRESCIMENTO E ADJUVANTES NA RESPIRAÇÃO HETEROTRÓFICA GLOBAL DO SOLO.....	47
4.1.1 Efeito dos herbicidas na respiração heterotrófica global do solo em diferentes taxas de aplicação utilizando os solos de Botucatu-SP.....	47
4.1.2 Efeito dos adjuvantes na respiração heterotrófica global do solo utilizando os solos de Botucatu-SP.....	51
4.1.3 Efeito dos herbicidas na respiração heterotrófica global do solo utilizando os solos de Tunas do Paraná-PR.....	52
4.1.4 Efeito dos herbicidas na respiração heterotrófica global do solo utilizando os solos de Piên-PR.	55
4.2 DETERMINAÇÃO E EXTRAÇÃO DE HERBICIDAS PRESENTE NO SOLO.....	59
4.2.1. Detecção e quantificação dos ingredientes ativos	59
4.2.2 Determinação do método de extração dos ingredientes ativos.....	69
6 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS.....	83

1 INTRODUÇÃO

Desde que a humanidade passou a fazer uso de faixas de direito de passagem para suas infraestruturas de transporte, distribuição de combustíveis, linhas de eletricidade e outras, a vegetação espontânea das faixas de segurança desses empreendimentos lineares teve de ser manejada para manutenção funcional dessas áreas. Desde que se iniciou o processo de transmissão e distribuição de energia elétrica, a manutenção da vegetação das faixas de segurança dos cabos e estruturas de sustentação dos cabos, tem sido uma necessidade fundamental, de elevado custo e motivo de grande preocupação do setor elétrico.

O manejo adequado da vegetação é necessário para prevenir que algumas plantas possam promover riscos diretos nas funções de transmissão e distribuição de energia elétrica e no meio ambiente. Os riscos de interferências da vegetação em faixas de segurança de linhas de transmissão e de distribuição de energia elétrica mais frequentes são: (i) aterramento de cabos, (ii) danos aos cabos e estruturas por queda ou toque de árvores, (iii) formação de arco voltaico com plantas que se aproximam dos cabos, (iv) dificuldades de acesso à equipe de manutenção e (v) propagação de incêndios. O calor do fogo, mesmo quando não atinge diretamente os cabos elétricos, junto da fuligem levada pelo vento e grandes volumes de fumaça, também pode provocar curtos-circuitos ou rompimento de cabos. O ar quente gerado pode criar um campo ionizado, propiciando o fechamento de arcos elétricos que desligam as linhas de eletricidade.

A manutenção da vegetação nas faixas de segurança das linhas de eletricidade em níveis de colonização e de crescimento que não interfiram nos propósitos econômicos sociais e econômicos dessa infraestrutura é uma atividade fundamental para as concessionárias e representa custo bastante elevado, além de ser impactante no meio ambiente. O controle dessa vegetação historicamente vinha sendo realizada com roçada manual ou tratorizada das áreas totais das faixas de segurança. Raramente, a roçada era seletiva.

Com o tempo, as roçadas sucessivas começaram a mostrar alguns efeitos indesejáveis como: (i) criação de habitats adequados para instalação de populações de plantas exóticas invasoras, (ii) formação de barreira ecológica ao livre deslocamento de animais nativos de pequeno porte entre as partes de vegetação

fragmentada, (iii) corredor para invasão de animais exóticos, (iv) riscos à segurança dos operadores de manutenção da vegetação, muitas vezes formados por equipes de trabalhadores pouco qualificados, (v) formação de ambientes favoráveis ao início e propagação de incêndios, seja pelos resíduos secos da vegetação cortada, seja pelas plantas que formam grandes quantidades de biomassa seca nos períodos de estiagem, especialmente gramíneas e (vi) facilidade acesso de pessoas sem a devida educação ambiental que caçam, coletam espécimes vegetais e animais, descartam resíduos de forma inadequada e elevam o risco de incêndios. Também é muito importante destacar que o processo de roçada vem se tornando cada vez mais oneroso em função das dificuldades de obtenção de mão de obra fixa pelas prestadoras de serviço.

Em função desses problemas com a roçada consecutiva, pesquisadores do EUA desenvolveram um sistema alternativo mais eficiente, ambientalmente mais seguro e com redução expressiva dos custos. Esse novo sistema, denominado manejo integrado da vegetação (MIV) envolve a combinação inteligente de técnicas de controle e de incentivo de populações para o desenvolvimento de vegetação nativa de baixo porte e diversificada, de modo que reduza a frequência e intensidade de intervenções, o que representa redução dos custos e importantes benefícios ambientais.

O MIV pode ser classificado como um sistema complexo de controle e incentivos de populações vegetais que utiliza conhecimentos básicos e aplicados e que requer grande esforço em sua manutenção. Esses conhecimentos são utilizados no decorrer do MIV para entender, justificar, escolher as opções corretamente, aplicá-las de forma seletiva e, por fim, monitorar os diferentes resultados com o objetivo de permitir um manejo sustentável e socialmente responsável.

A integração de métodos de manejo das plantas daninhas pode ser vista de dois modos. O primeiro, voltado a eficiência de um processo, buscando integrar um conjunto de medidas sobre uma ou mais espécie(s) para obtenção de resultado que seja necessário no momento. O segundo refere-se ao planejamento global de utilização em longo prazo de uma área, demandando exata noção das estratégias, englobando toda a variação em termos edáficos, climáticos, biológicos e socioeconômicos locais.

A modalidade de MIV que tem sido empregada em maior escala em vários países envolve a aplicação localizada de herbicidas seletivos apenas nas plantas

indesejadas nas faixas de segurança, mantendo as demais espécies para colonização mais efetiva daquele ambiente. Com isso, a vegetação desejada passa a exercer forte pressão competitiva, reduzindo a recuperação das plantas indesejadas.

O uso de herbicidas dentro do MIV é geralmente realizado por aplicadores experientes utilizando aparelhos costais, dirigindo a aplicação para as folhas, ou para o caule, ou para o corte do toco após a roçada ou por injeção no tronco.

Como toda metodologia que se inicia em áreas ambientais, há grande necessidade de conhecimentos dos seus impactos sobre populações ou comunidades que exercem importantes serviços ambientais, como é o caso da microbiota do solo;

Os microrganismos do solo são muito importantes nas relações solo-planta-fauna, atuando na dinâmica de nutrientes e da matéria orgânica, na degradação de moléculas e produtos introduzidos no ambiente, na fixação de alguns nutrientes da atmosfera, no controle de pragas e outros. Assim, optou-se nesse trabalho de pesquisa avaliar os efeitos dos herbicidas registrados no Brasil para o uso no MIV sobre um indicador da atividade microbiana em solos em que o MIV será implantado, iniciando pela atividade heterotrófica global. Dessa forma, o estudo da respiração edáfica é utilizado como um indicador indireto para avaliação do efeito de um herbicida na atividade microbiana do solo.

Mais especificamente foram avaliados em condições de laboratório os efeitos de doses crescentes de cinco herbicidas não agrícolas (Glyphosate NA®, Garlon NA®, Pluris NA®, Dominum NA® e Arsenal NA®) na respiração heterotrófica global das amostras de solos coletadas das áreas de linha de transmissão de energia no Paraná, em Piên e Tunas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Manejo integrado de vegetações

O manejo integrado da vegetação (MIV) compreende a aplicação programada de várias medidas de controle de plantas indesejadas, sobretudo arbóreas, exóticas, trepadeiras e facilitadoras de incêndios, que ocorrem em direito de passagem de serviços públicos, sobretudo em faixas de segurança de linhas de transmissão e distribuição de energia elétrica (JACKSON, 1997).

No caso de linhas de eletricidade, o MIV é uma prática necessária para garantir a limpeza da faixa de segurança, permitindo as manutenções das linhas e para evitar que haja o comprometimento da rede elétrica na entrega de energia ao consumidor. O MIV também é extremamente útil em áreas de difícil acesso e com vegetações de variados tamanhos, desde gramíneas a árvores de grande porte (MONEY, 2000 e YAHNER; HUTNIK, 2005). Além disso, o MIV dentro dessas áreas pode ser dividido em duas etapas, sendo a primeira o controle mecânico das plantas indesejadas (grande porte ou risco de incêndio) seguido de aplicação de herbicidas (Figura 1); e a segunda etapa a manutenção e desenvolvimento das espécies que podem ser usadas como coberturas, controlando a vegetação indesejada (YAHNER; HUTNIK, 2005; BRAMBLE; BYRNES, 1996).

Figura 1 - Área de MIV localizada em Piên-PR com aplicação de herbicidas no manejo integrado

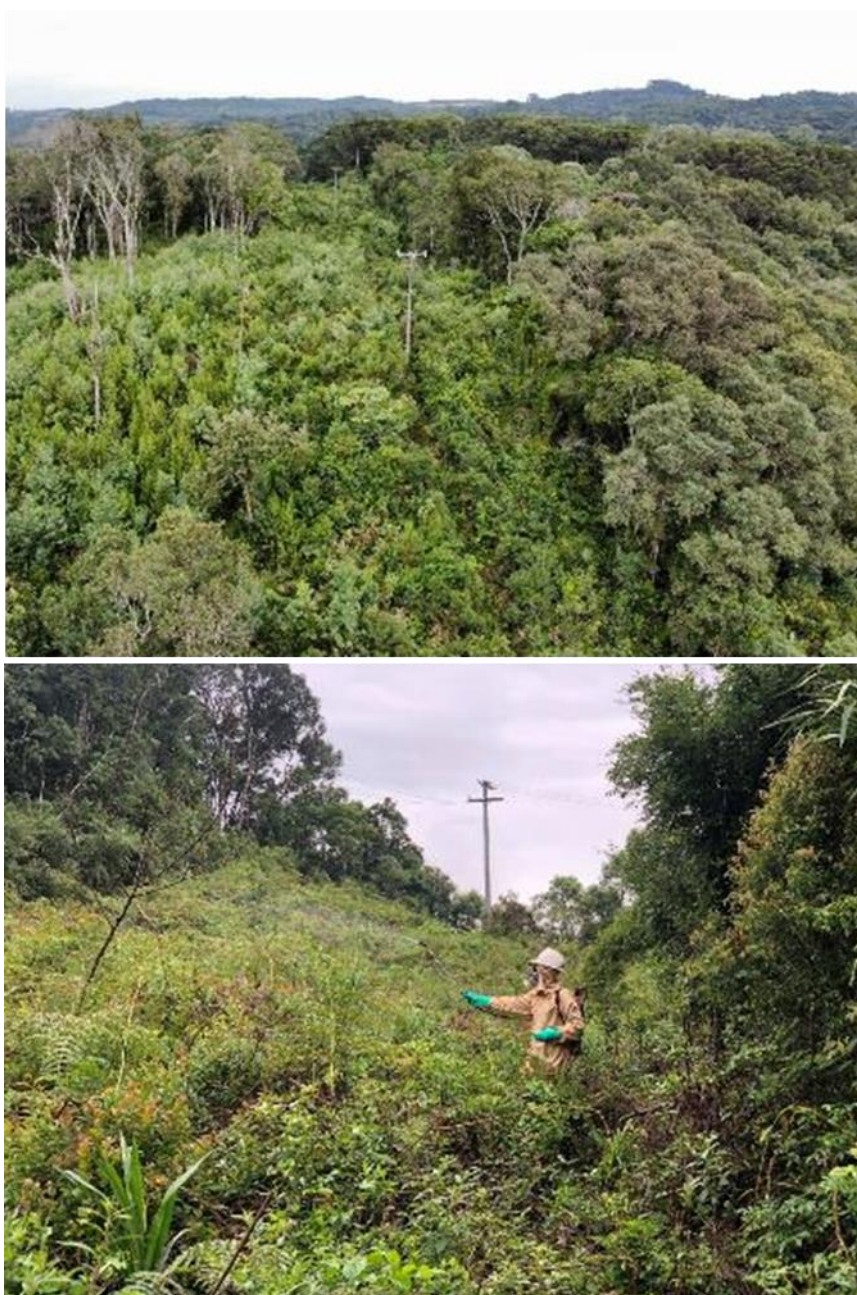


Foto: Raphael Mereb Negrisoni (2022)

Existe grande variedade de modos de condução no MIV, podendo integrar os métodos mecânicos, manuais, culturais, biológicos e químicos (MONEY, 2000). O método mecânico consiste no uso de maquinário para realizar o corte ou entouceiramento das vegetações, podendo variar desde pequenos tratores a maquinário pesado. Já o método manual compreende o uso de equipamentos manuais como foices, facões e motosserra. O uso do método manual é realizado em

lugares de difícil acesso ou em áreas com vegetações menores. O controle cultural abrange o uso de cobertura vegetal para controle de gramíneas ou mesmo o plantio de plantas que são desejadas. Já o controle biológico dentro do MIV consiste no uso de animais para o controle das vegetações, como gado ou cabras, por exemplo. Por fim, o manejo químico compreende o uso de herbicidas que são regulamentados para esse uso específico, a saber, herbicidas 'não-agrícolas' (NA).

A roçada inicial para o começo da instalação da modalidade MIV em linhas de eletricidade é realizado de forma manual ou mecanizada, dependendo da acessibilidade ao local, da topografia e da densidade de vegetação. Um dos problemas encontrados no manejo manual ou mecanizado é a rebrota da vegetação após o corte, aumentando consideravelmente a densidade de plantas e onerando o processo. Além disso, com o aumento das rebrotas, há a tendência do aumento do número de caules a serem roçados. Portanto, é desejável a integração de métodos para aumentar a eficiência do manejo (PITELLI, 1987; MONEY, 2000).

Assim, surge a combinação do manejo mecânico das vegetações com o manejo químico, resultando em controle efetivo das vegetações ao longo dos anos. O uso dos herbicidas no MIV é recomendado em aplicações seletivas, buscando somente o controle das vegetações de grande porte ou que oferecem risco a rede elétrica (incêndios), eliminando definitivamente o problema com as brotações.

É de comum o paradigma público de que os métodos mecânicos e manuais oferecem menor prejuízo ao ambiente e aos aplicadores. No entanto, o uso consciente do controle químico em vegetações não adiciona riscos ao manejo. Os métodos mecânicos podem resultar em compactação do solo com o uso de maquinários pesados, erosão do solo, exposição e risco de injúrias físicas pelos equipamentos, aumento no risco de incêndios e, devido à grande alteração realizada pelo controle mecânico, o significativo risco de alteração do habitat natural do local (MONEY, 2000). Os métodos de MIV, por permitir que não haja o corte total das vegetações, produz melhorias econômicas e estéticas, além dos grandes benefícios para a fauna e flora local (YAHNER, 2004). Além disso, estudos realizados há anos já demonstraram a eficácia do MIV para o controle das vegetações de porte alto assim como a manutenção da área abaixo da linha com vegetação de baixo porte, proporcionando grandes resultados e maior segurança para as companhias elétricas. O objetivo a longo termo de um programa de MIV é de conseguir controlar eficientemente as plantas desejáveis ao passo de garantir a sustentabilidade do ambiente, provocando

a menor alteração possível do habitat local. Além disso, o MIV traz benefícios econômicos em comparação com o manejo mecânico tradicional.

O MIV, que originalmente foi retirado das práticas de manejo integrado de pragas, o MIP (JACKSON, 1997), contém diversos elementos chave desse manejo integrado, tais como (NOWAK; BALLARD, 2005): (i) o controle do alvo integralizando diversos métodos, incluindo prevenção do alvo e uso de controle biológico; (ii) incentivo ao monitoramento e avaliação das áreas de manejo e das espécies; (iii) definição de bases para níveis de tolerância; (iv) seguir recomendações de tratamentos a nível profissional e de qualidade; (v) esforços para determinar a eficácia ao longo termo do manejo assim como a eficiência de cada tratamento utilizado.

Além disso, Nowak e Ballard (2005) sugerem seis passos para formalizar a relação entre as fases críticas no MIV em linhas de transmissão elétrica, sendo o primeiro passo o estudo das plantas alvo e dinâmica do ecossistema. O segundo é determinar os objetivos e níveis de tolerância do manejo, seguido pelo terceiro passo, que compreende selecionar todas as opções de tratamentos para o MIV. O quarto é o estudo dos efeitos econômicos e ambientais dos tratamentos a serem utilizados. O quinto e o sexto compreendem a implementação dos tratamentos na área seguido pela manutenção e monitoramento, respectivamente.

Considerando que um dos primeiros passos para a implementação do MIV em uma área é o estudo e entendimento das vegetações e da dinâmica do ecossistema (NOWAK; BALLARD, 2005), o conhecimento básico de plantas e animais presentes na área se torna essencial. Além disso, com o uso de herbicidas, é necessário o estudo do impacto ambiental que as aplicações podem acarretar ao ambiente, observado no quarto passo proposto por Nowak e Ballard (2005), como por exemplo, o efeito na microbiota local.

Estudando os efeitos e praticabilidade do MIV por cerca de três anos em uma área com linha de transmissão de energia, Bramble et al. (1996) relataram que o MIV, pelo uso dos herbicidas, resultou na diminuição da invasão de árvores indesejadas, o que reduziu o custo de mão-de-obra e de uso de herbicidas ao longo dos anos. Além disso, os autores reportaram que as comunidades de plantas se mantiveram estáveis durante os anos de estudo, demonstrando o potencial de uso dessa técnica tanto para as empresas quanto para o meio-ambiente.

Dentre os benefícios que um programa de MIV poderá resultar ao longo dos anos, destaca-se a redução no custo de manejo por área, sobretudo relacionado as

reduções de entradas nas áreas para o manejo manual, reduzindo custos de mão-de-obra e de equipamentos (NAVIE et al., 2010; YAHNER; HUTNIK, 2005). Ademais, o MIV deverá trazer alguns benefícios ambientais, como a redução na emissão de carbono, na redução de biomassa, reduzir problemas com erosão, suprimir banco de sementes de plantas indesejadas e, por fim, apresentar uso da água mais eficiente (NAVIE et al., 2010).

Em alguns casos, certas plantas são escolhidas para se desenvolver e dominar a região onde o MIV é conduzido, como a *Solidago rugosa*, *Dennstaedtia punctilobula*, e *Danthonia spicata*, resultando em uma área com maior supressão das árvores, possibilitando manter a área sem cortes ou manutenções por mais tempo (BRAMBLE et al., 1996). Ademais, essas plantas podem interferir na germinação das sementes das árvores, na predação de animais silvestres às sementes e plântulas, e pelo poder competitivo dessas plantas em relação as árvores.

Com o objetivo de analisar o efeito do MIV na riqueza e abundância de flores nativas na área e na quantidade de árvores indesejadas (com portes muito altos, trepadeiras, exóticas ou com risco de incêndios) em comparação com o manejo manual das plantas, Mahan et al. (2020) reportaram que não foi encontrada nenhuma correlação entre a quantidade de herbicidas aplicados e número de espécies de flores ou abundância de árvores. Diversos herbicidas foram testados dentro dos tratamentos com MIV, sendo eles glyphosate, imazapyr, aminopyralid, triclopyr e picloram. No entanto, a inclusão do glyphosate nos tratamentos resultou em diminuição na abundância de flores em comparação com os demais herbicidas. Além disso, foram observados aumentos significativos no número de árvores com os tratamentos utilizando apenas corte manual. Portanto, o estudo demonstrou que, com a seleção ideal de herbicidas dentro do MIV, pode-se manter a abundância de flores mantendo a área com menor incidência de árvores indesejadas.

Além do aumento na abundância de flores, outros trabalhos na literatura apontam para as melhorias do MIV em relação ao manejo manual. Por exemplo, em uma área com dois anos consecutivos de MIV, foram encontrados maior incidência de abelhas selvagens em comparação com as áreas com manejo manual, influenciando a fauna e flora local (RUSSEL et al., 2018).

2.2 Respiração heterotrófica global do solo

Os organismos da microbiota atuam na distribuição, transformação, disponibilização e no sequestro de carbono e nutrientes no solo (ROSE et al., 2016). Ademais, uma das grandes vantagens da microbiota do solo é seu papel fundamental na formação da matéria orgânica, participando desde a quebra e transformação de pequenos fragmentos de matéria orgânica até na clivagem enzimática de polímeros em monômeros como ocorre na hidrólise da celulose em glicose (ROSE et al., 2016).

Atualmente os microrganismos do solo estão sendo considerados como um aspecto importante na prosperidade agrícola (SINGH et al., 2020). Além da importância na relação entre solo-planta-fauna, os microrganismos do solo são importantes agentes na degradação de herbicidas (RAJ; SYRIAC, 2017).

O fluxo de CO_2 no solo, ou a respiração total do solo, pode ser dividido em duas partes: respiração autotrófica (R_a) e respiração heterotrófica (R_h) (BROWN; MARKEWITZ, 2018). A respiração autotrófica provém dos processos de crescimentos de raízes e produção de exsudatos pelas plantas (autotróficas), enquanto a respiração heterotrófica provém dos processos de decomposição e mineralização de materiais orgânicos no solo (TANG et al., 2020). Assim, respiração heterotrófica é utilizada como indicador da atividade microbiana do solo. No entanto, a respiração do solo pode ser influenciada pela temperatura e umidade do solo e da vegetação local (BROWN; MARKEWITZ, 2018).

Alguns produtos fitossanitários podem afetar a atividade microbiana do solo. Como exemplo, alguns herbicidas são capazes de induzir alterações na abundância, diversidade e na atividade das comunidades microbianas do solo (LUPIWAYI et al., 2004). Assim, uma das formas de se avaliar o efeito dos herbicidas na atividade microbiana do solo é por meio da respiração heterotrófica global, monitorando as quantidades de CO_2 liberadas para o ar de recipientes fechados (respiração) (ROSE et al., 2016). Ou seja, a quantidade de CO_2 liberada não corresponde à respiração dos organismos no solo, mas ao balanço entre os processos que consomem e liberam esse gás. Ao eliminar a disponibilidade de luz e evitar a presença de plantas nos potes utilizados como unidades experimentais, é possível minimizar os processos autotróficos para seja possível avaliar a respiração a partir da quantidade de CO_2 liberada do solo para o ar. Quanto mais CO_2 é capturada nas armadilhas químicas, maior a respiração do solo. Ainda há um cuidado adicional em estudos com pesticidas,

em que é considerar um tratamento padrão sem a adição das substâncias cujos efeitos sobre a respiração do solo se pretende avaliar, um controle sem aplicação (OCDE, 2000).

O interesse em avaliar o efeito dos herbicidas no ambiente aumentou consideravelmente nos anos 70, devido a grande quantidade de herbicidas que estavam sendo aplicado na agricultura (LEWIS et al., 1977). Considerando a importância da microbiota do solo, diversos estudos da época observaram que muitos herbicidas não tinham efeito algum no solo (KAISER et al., 1970; HOROWITZ et al., 1974) ou apresentaram alguns efeitos indiretos na microbiota, como alterações na nitrificação do solo (CHANDRA, 1964). Além disso, Kaiser et al. (1970) observou que alguns herbicidas do grupo das triazinas apresentaram efeitos na quantidade, qualidade e atividade dos microrganismos do solo.

No entanto, nota-se que a retirada da vegetação deve afetar a respiração global do solo, sendo influenciada pelos diferentes tipos de manejo, como na retirada total da biomassa da vegetação ou retirada parcial (superior) (WEBSTER et al., 2016). Assim, o uso de herbicidas pode influenciar na Ra do solo em comparação com a roçagem da parte superior da vegetação, sobretudo pela redução da atividade da raiz das plantas, o que, conseqüentemente, irá diminuir a produção de exsudatos da raiz.

Os herbicidas podem afetar a microbiota do solo de diferentes maneiras, sendo positivamente (PANETTIERI et al., 2013), negativamente (ZABALOY et al., 2008) ou indiferentemente (ROSE et al., 2016). Ademais, os herbicidas podem alterar a microbiota do solo alterando a composição das plantas do local, indiretamente podendo selecionar algumas comunidades de microrganismos. Ainda há pouco conhecimento sobre o impacto dos herbicidas na microbiota do solo e no ecossistema em que eles atuam, sobretudo pela grande variedade de ativos utilizados assim como pela vasta diversidade de comunidades ecológicas do solo (ROSE et al., 2016).

Considerando que os herbicidas utilizados tanto em áreas agrícolas, como em não-agrícolas, são comercializados em diferentes formulações, podem conter substâncias junto aos ingredientes ativos que auxiliam na aplicação, seja pela estabilidade, mistura ou diluição da formulação (TOMINACK, 2000). Com isso, deve-se atentar aos efeitos encontrados na atividade microbiana sendo geralmente da formulação como um todo, não apenas do ingrediente ativo (ROSE et al., 2016).

De modo geral, acredita-se que o herbicida aplicado ao solo poderá acarretar alterações quantitativas e qualitativas na microbiota do solo, podendo aumentar ou

diminuir a sua atividade (ZAIN et al., 2013). Os efeitos mais recorrentes dos herbicidas na atividade microbiana do solo é com relação a sua função biológica, tal qual a respiração, atividade enzimática ou na reciclagem de nutrientes (SINGH et al., 2020). No entanto, grande parte dos impactos na atividade microbiana pelos herbicidas são encontrados quando são testados doses superiores a recomendadas (SINGH et al., 2020).

Analizando o efeito da combinação de 25 herbicidas na atividade microbiana do solo, Lewis et al. (1977) observaram que nenhum dos herbicidas afetaram a produção de CO₂ no solo. Além disso, não houve efeito na atividade microbiana do solo mesmo quando utilizado os herbicidas em solos com diferentes pH.

Estudando o efeito do herbicida mesotrione na atividade microbiana do solo, Crouzet et al. (2010) testaram três doses do herbicida (1x, 10x e 100x a dose de bula – 100 g i.a. L⁻¹) observando as alterações na respiração do solo utilizando cromatografia gasosa. Desse modo, os autores observaram que não houve efeito do herbicida na menor dose, mantendo a respiração similar a testemunha. No entanto, houve um aumento exponencial na atividade microbiana com as doses de 10x e 100x. Os autores acreditam que as alterações na atividade microbiana se deve pelo aumento dos microrganismos que são capazes de degradar o herbicida e pela promoção da atividade de grupos de microrganismos heterotróficos resistentes ao herbicida pela morte dos grupos que são suscetíveis aos herbicidas.

O herbicida glyphosate, comumente utilizado no mundo, é frequentemente questionado sobre os efeitos na microbiota do solo (NGUYEN et al., 2018). No entanto, estudos presentes na literatura demonstram que o herbicida, isolado ou em diferentes formulações, não apresentaram efeito na atividade microbiana do solo (CHERNI et al., 2015; NGUYEN et al., 2018).

Determinando o efeito de herbicidas agrícolas na atividade microbiana do solo, Zabaloy et al. (2008) testaram os herbicidas glyphosate (150 mg a.i. kg⁻¹ solo), 2,4-D (5 mg a.i. kg⁻¹ solo) e metsulfuron-methyl (1mg a.i. kg⁻¹ solo). As doses utilizadas correspondem a dose 10x maior que a dose de bula. Assim, os autores observaram efeito negativo na atividade microbiana com o herbicida 2,4-D, reduzindo a atividade microbiana aos 10 dias após aplicação. No entanto, o efeito foi transiente e, de modo geral, apresentaram resultados similares ao controle sem aplicação. Já para o glyphosate, os autores relataram estímulo na atividade microbiana na primeira avaliação, aos 5 dias após aplicação, apresentando resultados similares ao controle

nas avaliações seguintes. O herbicida metsulfuron-methyl não apresentou nenhum efeito a atividade microbiana do solo.

Latha e Gopal (2010) observaram reduções significativas na população de bactérias quando foram submetidos a doses de 2,4-D nos primeiros trinta dias após aplicação. No entanto, Pinna et al. (2022) relataram aumento na atividade bacteriana. Em ambos os trabalhos, as populações de bactérias normalizaram trinta dias após aplicação e voltaram a níveis iguais ao do controle sem aplicação.

Doses de atrazina foram utilizada para avaliar o efeito do herbicida na atividade microbiana do solo (SERAFINI et al., 2022). Desse modo, os autores observaram aumento da atividade microbiana, pelo aumento da respiração, logo a partir do primeiro dia após aplicação, indicando que os microrganismos que atuam na degradação da atrazina sejam os responsáveis pelo aumento na respiração.

2.3 Herbicidas utilizados no MIV e detecção de ingredientes ativos por cromatografia líquida

Dentre os herbicidas utilizados em áreas de MIV e com registro não-agrícola (NA), podemos citar o Glyphosate NA®, Dominus NA® (aminopyralid e fluroxypyr), Arsenal NA® (imazapyr), Garlon NA® (triclopyr) e o Pluris NA® (picloram, triclopyr e aminopyralid), sendo o último um herbicida lançado recentemente.

Cada ingrediente ativo apresenta uma característica diferente em composição química, formulação e propriedades químicas (MONQUERO; SILVA, 2021). Desse modo, espera-se que cada herbicida apresente dinâmica diferente no solo e nas plantas, podendo variar quanto a mobilidade, persistência e riscos ambientais (MONQUERO; SILVA, 2021). Algumas das características importantes dos herbicidas é relacionada ao coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), a capacidade de dissociação eletrolítica (pK_a), a solubilidade (S), a pressão de vapor (PV), a meia vida do ativo, entre outros.

As propriedades físico-químicas dos herbicidas que serão utilizados nos estudos dessa tese estão apresentados na Tabela 01, segundo informações de PPDB (2022). Com exceção do picloram com solubilidade moderada, todos os herbicidas apresentam solubilidade alta em água. Além disso, os herbicidas apresentam K_{ow} baixo e mobilidade alta em solo, com exceção do glyphosate. Os herbicidas picloram

e triclopyr apresentam persistência moderada, com 50 a 30 dias de persistência no solo, enquanto o restante dos herbicidas apresentam baixa persistência no solo.

É importante que haja o entendimento das propriedades e particularidades de cada herbicida para recomendação e aplicação em áreas agrícolas ou não-agrícolas. Além disso, o conhecimento das propriedades físico-químicas dos herbicidas auxiliará no entendimento da dinâmica desses herbicidas no solo e planta. Assim, no estudo da dinâmica dos herbicidas, o monitoramento, com detecção e quantificação cromatográfica, dos ingredientes ativos podem auxiliar na compreensão e determinação das dinâmicas de cada herbicida.

Segundo Niessen (2006), cromatografia refere-se ao método de separação física em que os componentes a serem separados são distribuídos seletivamente em duas fases, um móvel e outra estacionária. Além disso, as técnicas de cromatografia são nomeadas segundo a fase móvel, podendo ser cromatografia gasosa (GC), líquida (LC) ou com fluidos supercríticos (SFC). Esse presente trabalho abordará apenas a cromatografia líquida (LC, '*liquid chromatography*').

Para posterior análise de detecção e quantificação de cada ingrediente ativo aplicados ao solo é necessário a extração do mesmo para então serem analisados nos equipamentos. Desse modo, variados são os métodos de extração desses herbicidas no solo, podendo ser realizadas de diversas formas e com diferentes extratores, como acetona, metanol, carbonato de amônio, cloreto de potássio e clorofórmio. (LIU et al., 1992; HALIMAH; ISMAIL, 2004; PASSOS et al., 2018).

O processo de cromatografia ocorre pelo resultado de repetidas sorções e dessorções durante o movimento dos analitos durante a fase estacionária (NIESSEN, 2006). A separação dos analitos ocorrem pelas diferenças no coeficiente de distribuição de cada analito. Os cromatógrafos modernos são chamados de HPLC ('*high-performance liquid chromatography*'), apresentando tecnologias cada vez mais avançadas e com maior sensibilidade de detecção (MEYER, 2013). Os HPLC's são geralmente acoplados a um equipamento de espectrometria de massas, chamados de LC-MS/MS, proporcionando maior sensibilidade de detecção de analitos (COVEY et al., 1986).

As amostras são injetadas no HPLC por meio de uma porta de injeção na fase móvel através de um fluxo fornecido pela bomba de alta pressão, sendo então transportado pela coluna em que ocorrerá a separação, sendo monitorado por detectores (NIESSEN, 2006). Ademais, na coluna, os compostos vão ser separados

e eluidos com diferentes tempos de retenção (RT), dependendo da interação entre a coluna e fase móvel. Após a injeção das amostras e a separação na coluna, as amostras passam pela espectrometria de massas (MS), possibilitando detectar as massas dos analitos e determiná-los (NIESSEN, 2006). O MS, com base na produção de íons da amostra, resultará o gráfico em relação a abundância de íons gerados pela função da massa pela carga (m/z), detectando e filtrando cada analito encontrado. Ou seja, após a determinação da relação massa/carga, os compostos são encaminhados para uma célula de colisão, para então colidir com N e formar os fragmentos para detecção. As análises utilizando o LC-MS/MS em conjunto permitem o controle dos íons moleculares e de transições iônicas provenientes da fragmentação dos compostos, alcançando a sensibilidade e especificidade para realizar a quantificação dos analitos (QUEIROGA, 2009).

Tabela 1 - Propriedades físico-químicas dos herbicidas picloram, aminopyralid, triclopyr, fluroxypyr, imazapyr e glyphosate

Grupo químico	Picloram Piridina	Aminopyralid Piridina	Triclopyr Piridina	Fluroxypyr Piridina	Imazapyr Imidazolinona	Glyphosate Fosfoglicina
Peso Molecular (g mol ⁻¹)	241,46	207,03	256,47	255,03	261,28	169,1
Densidade (g mL ⁻¹)	1,81	1,76	1,3	1,09	1,34	1,71
Solubilidade em água (mg L ⁻¹)	488 (moderado)	2480 (alto)	8100 (alto)	6500 (alto)	9740 (alto)	100000 (alta)
Log Kow	1,92 (baixo)	0,20 (baixo)	0,45 (baixo)	0,04 (baixo)	0,11 (baixo)	6,28 (baixo)
Pka	1,8 (ácido forte)	2,56 (ácido forte)	3,97 (fraco)	2,94 (forte)	1,9 (forte); 3,6 (fraco); 11,0 (fraco)	2,34 (forte); 5,73 (fraco)
Pressão de vapor (mPA)	2,0 x 10 ⁻³ (baixo)	2,59 x 10 ⁻⁹ (baixo)	0,2 (baixo)	3,8x10 ⁻⁵ (baixo)	0,0013 (baixo)	0,0131 (baixo)
DT50 solo (dias)	50 (moderada)	12,1 (baixo)	30 (moderado)	3 (baixo)	11 (baixo)	6,45 (baixo)
Koc (mL g ⁻¹)	13 (muito móvel)	1-24 (muito móvel)	27 (móvel)	50-130 (móvel)	9 (móvel)	1424 (pouco móvel)
Índice de potencial de lixiviação (GUS)	4,14 (lixiviação alta)	3,34 (alto)	3,30 (alto)	1,03 (baixo)	1,98 (médio)	0,21 (baixo)

Fonte: PPDB (2022).

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho avaliou a hipótese de que herbicidas aplicados em áreas de MIV (registro NA) sob linha de transmissão elétrica causam impacto negativo na atividade microbiana do solo, diminuindo a respiração heterotrófica global do solo. Além disso, o estudo desenvolveu um método de detecção e extração de cinco ingredientes ativos de herbicidas reguladores de crescimentos frequentemente utilizados em MIV.

Os estudos e avaliações foram conduzidos em laboratório localizado no Núcleo de Pesquisas Avançadas em Matologia (NUPAM), na Faculdade de Ciências Agronômicas (FCA/UNESP), situado na cidade de Botucatu/SP. Este trabalho foi conduzido em dois estudos, um determinando o efeito na respiração heterotrófica global do solo (experimentos 1 e 2) e outro determinando a detecção e extração cromatográfica dos herbicidas (experimento 3)

O estudo da respiração heterotrófica global do solo foi dividido em duas etapas: i) determinação do efeito da taxa de aplicação na respiração heterotrófica global do solo utilizando a mescla de solos de Botucatu-SP; ii) estudo do efeito dos herbicidas em solos retirados dos locais de pesquisa de Piên-PR e Tunas do Paraná-PR, diretamente das linhas de transmissão de energia da COPEL Energia.

O estudo para desenvolver e validar a detecção e quantificação dos herbicidas avaliou primeiro o desenvolvimento do método analítico para detectar os ingredientes ativos e, posteriormente, determinou o método de extração mais eficaz para cada ingrediente ativo.

3.1 EXPERIMENTO 1: Efeito de herbicidas reguladores de crescimento e adjuvantes na respiração heterotrófica global do solo

O objetivo deste estudo é avaliar o efeito dos herbicidas com registro não agrícola (NA) utilizados no manejo integrado de vegetação sobre a atividade heterotrófica global do solo em diferentes vazões de aplicação.

3.1.1 Coleta e preparo das amostras de solo

A coleta e o preparo das amostras seguiram as recomendações da OECD Guidelines 217 (2000). O solo utilizado nesses estudos foram compostos por uma mistura de cinco coletas de diferentes locais dentro da FCA/UNESP, na cidade de Botucatu-SP. Os cinco locais consistem em áreas de pastagem permanente ou florestas, sem histórico de uso de pesticidas ou fertilizantes nos últimos cinco anos. A coleta foi realizada na profundidade de 0 a 20 cm e o solo peneirado em tamis de 2,0 mm (TSFA). Após a coleta, peneiramento e mistura o solo foi acondicionado em recipientes com tampa e armazenado na ausência de luz até o início dos estudos. As atividades experimentais foram conduzidas no NUPAM, na Faculdade de Ciências Agrônomicas da Universidade Estadual Paulista (FCA/UNESP), em Botucatu, SP. A mistura utilizada nos estudos para respiração do solo apresentaram as seguintes características granulométricas (%): Areia- 64; Argila- 28; Silte- 7, representando um solo franco argiloso arenoso. Os resultados da análise química desse solo estão apresentados na Tabela 02.

Tabela 2 - Resultados da análise química do solo proveniente de Botucatu-SP utilizado nos estudos com respiração heterotrófica global do solo

pH	M.O.	S	P	K	Ca	Mg	Al ³	$\frac{H^+}{Al^{3+}}$	CTC	SB	V%
CaCl ₂	Oxidação	PO ₄ ³	Resina			mmolc dm ⁻³					
-	g dm ⁻³	mg dm ⁻³									
5,2	11	52	36	0,34	18	8	0	25	52	26	51

3.1.2 Incubação e aplicação dos tratamentos

A incubação do solo foi realizada em recipientes plásticos de 2,7 litros com 500g de solo seco. Após a inserção do solo nos potes plásticos foi adicionada água em quantidade suficiente para alcançar 70% da capacidade máxima de retenção de água do solo estudado. Todos os experimentos, com herbicidas ou adjuvantes, foram repetidos duas vezes. Para o experimento com herbicidas e taxas de aplicação, foi utilizado o delineamento experimental com blocos ao acaso, com dezesseis tratamentos em esquema fatorial 5 x 3 (cinco herbicidas e três taxas de aplicação)

mais o controle sem aplicação, com cinco repetições. Os herbicidas foram aplicados a 2,5% de cada formulação comercial alterando apenas a quantidade de produto que atingiria o solo de acordo com a taxa de aplicação (Tabela 03).

Para o experimento analisando o efeito dos adjuvantes na respiração heterotrófica global do solo, foi utilizado o delineamento experimental com blocos ao acaso com cinco tratamentos mais um controle sem aplicação (Tabela 04). Foram utilizados as doses recomendadas por cada fabricante nesse estudo.

Após aplicação dos tratamentos, foi adaptado uma estrutura metálica para acomodar um copo plástico de 50 mL acima da superfície do solo, evitando contato com o solo e alteração das trocas gasosas (Figura 2). Ademais, após a fixação da estrutura metálica, foram adicionados 30 mL de NaOH a 1M em cada copo plástico e os recipientes foram fechados, tomando-se o cuidado de incluir um filme plástico maleável para melhorar o isolamento e evitar a troca de gases com ar exterior. Para confirmar a eficiência do fechamento dos potes, foram adicionados cinco recipientes vazios, chamados 'brancos', para a determinação do CO₂ contidos no mesmo. Por fim, todos os tratamentos foram acomodados em uma câmara climática *walk-in* para possibilitar o controle preciso de temperatura e luz (Figura 03). A temperatura foi mantida a 25°C ($\pm 2^\circ\text{C}$) no escuro durante toda a incubação.

Tabela 3 - Formulações comerciais de herbicidas NA e quantidades que atingem o solo (taxa de aplicação) utilizados para os tratamentos experimentais

Trat.	Herbicida	Ingrediente ativo	Concentração por ativo (g e.a. L ⁻¹) *	Taxa de aplicação (L ha ⁻¹)	Dose (p.c.) ¹ (L ha ⁻¹)
1	Arsenal NA®			50	1,25
2	Arsenal NA®	Imazapyr	250	150	3,75
3	Arsenal NA®			200	5,00
4	Dominum NA®	Aminopyralid	40	50	1,25
5	Dominum NA®			150	3,75
6	Dominum NA®	Fluroxypyr	80	200	5,00
7	Garlon NA®			50	1,25
8	Garlon NA®	Triclopyr	480	150	3,75
9	Garlon NA®			200	5,00
10	Glyphosato NA®			50	1,25
11	Glyphosato NA®	Glyphosate	360	150	3,75
12	Glyphosato NA®			200	5,00
13	Pluris NA®	Triclopyr,	150	50	1,25
14	Pluris NA®			150	3,75
15	Pluris NA®	Aminopyralid	50	200	5,00
16	Controle	-		0	0

(*) - gramas de equivalente ácido L⁻¹; (1) - produto comercial

Tabela 4 – Formulações comerciais de adjuvantes, seus ingredientes ativos e dose utilizada para os tratamentos experimentais

Tratamentos	Adjuvante	Ingrediente ativo	Dose $\frac{\text{v}}{\text{v}} \text{v}^{-1}$
1	Agral	Etilenoxi-etanol	0,5
2	Assist	Óleo mineral	0,5
3	Aureo	Éster metílico de óleo de soja	0,5
4	Silwet	Surfatante siliconado	0,1
5	VegetOil	Óleo vegetal	0,1
6	Controle	-	-

Figura 2 - Incubação dos recipientes. A) Recipientes com solo e ‘branco’ incubados em câmara climática; B) Estrutura metálica utilizada para segurar copos plásticos de 50 mL

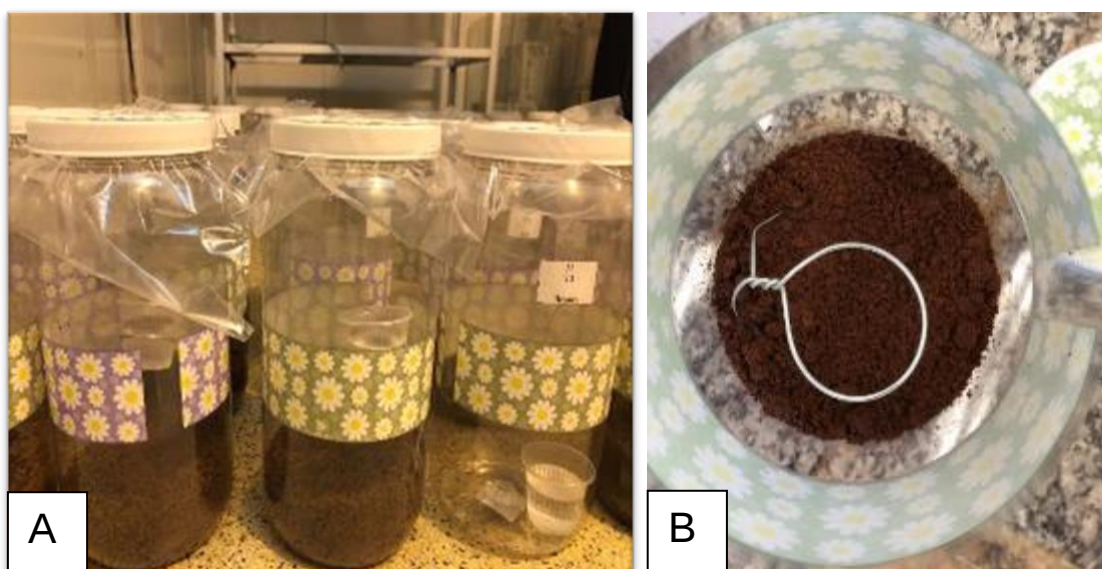
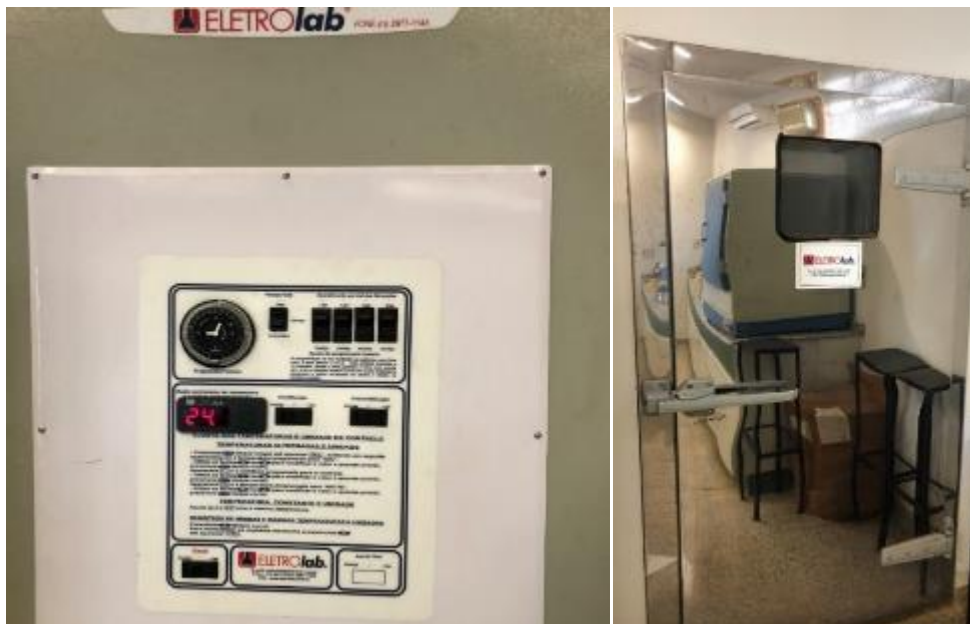


Figura 3 - Câmara climática tipo *walk-in* mantida no escuro e a 25°C ±2



3.1.3 Quantificação do CO₂

A quantificação do CO₂ liberado em cada recipiente foi avaliado aos 14 e 28 dias após tratamento (DAT). Aos 14 DAT, o copo plástico incubado com NaOH a 1N foi retirado do recipiente e uma nova solução repostada para a avaliação aos 28 DAT. As soluções coletadas nos recipientes passaram por titulação para quantificação do CO₂ liberado. Para isso, primeiramente foi utilizado cinco gotas de solução alcoólica de fenolftaleína a 0,1%, realizando-se titulação com HCl a 0,65 N (Figura 4). Após a primeira viragem, foram adicionadas cinco gotas de solução alcoólica de di-metil-orange a 0,5% e titulado com HCl a 0,65N até a segunda viragem (Figura 5). A quantidade de HCl utilizada para a segunda viragem foi anotada e utilizada nos cálculos para estimar a liberação do CO₂, calculada por meio da expressão (CORREA et al., 2005):

$$g \text{ CO}_2 \text{ liberado} = Neq\text{CO}_2 \times 44$$

$$\text{em que } Neq\text{CO}_2 = V(\text{titulado em litros}) \times 0,65.$$

A análise dos resultados considerou cada avaliação isolada (14 e 28 DAA) e também a respiração acumulada aos 28 DAA, ou seja, somado os resultados da respiração aos 14 e 28 DAA. Do valor da liberação de CO_2 de cada recipiente foi subtraída a quantidade encontrada nos recipientes 'brancos' com volume de ar similar ao volume de ar presente nos recipientes com solo.

Figura 4 - Primeira viragem da titulação da solução de NaOH com HCl a 0,65 N



Figura 5 - Segunda viragem das amostras



3.1.3 Análise estatística dos dados

Os resultados de respiração heterotrófica global com herbicidas e adjuvantes foram submetidos à ANOVA pelo teste F a 5% de probabilidade e as médias comparadas pelo teste de LSD, também a 5% de probabilidade. Os dados referentes ao experimento com herbicidas (fatorial) também foram analisados por meio de contrastes a 5% de probabilidade entre os tratamentos e o controle. Todas as análises e gráficos foram realizados por meio do software R utilizando os pacotes *agricolae*, *ggplot2*, *emmeans* e *dplyr*.

3.2 EXPERIMENTO 2: Efeito dos herbicidas na respiração heterotrófica global do solo utilizando os solos de Tunas do Paraná-PR e Piên-PR

A segunda parte desse estudo determinou o efeito dos herbicidas na respiração heterotrófica global do solo utilizando solos da área de pesquisa em que será realizado o MIV com aplicação dos herbicidas. Portanto, são áreas onde não houve aplicações prévias de qualquer herbicida. Desse modo, foram selecionados dois locais de coletas distintas, sendo uma na cidade de Tunas do Paraná-PR e outra na cidade de Piên-PR. Ambas as áreas são pertencentes a COPEL Energia. A coleta dos solos e preparo de amostras foram realizados conformes a metodologia citada no item 3.1.1. A amostragem do solo em cada local foi feita utilizando a coleta de seis pontos dentro da área de pesquisa, formando uma amostra composta (Figura 6). Assim, para cada área, a amostra composta de solo foi a utilizada nos estudos.

A amostra composta utilizada nos estudos com o solo de Tunas do Paraná-PR apresentaram as seguintes características granulométricas (%): Areia- 25; Argila- 32; Silte- 43, representando um solo franco argiloso. Enquanto isso, a mistura utilizada nos estudos com o solo de Piên-PR apresentaram as seguintes características granulométricas (%): Areia- 23; Argila- 35; Silte- 37, representando um solo franco argiloso. Os resultados da análise química dos solos de ambas as localidades estão apresentados na Tabela 05.

Tabela 5 - Resultados da análise química do solo proveniente de Tunas do Paraná-PR e Piên-PR utilizado nos estudos com respiração heterotrófica global do solo

pH	M.O.	S	P	K	Ca	Mg	Al ³	H ⁺ Al ³	CTC	SB	V%
CaCl ₂	Oxidação	PO ₄ ³	Resina								
-	g dm ⁻³	mg dm ⁻³	—————			mmolc dm ⁻³			————— %		
Tunas do Paraná-PR											
4,5	42	9	9	2	35	17	8	59	115	55	45
Piên-PR											
4,9	48	-	28	4	51	25	1	50	115	80	50

Figura 6 - Preparo das amostras e separação por pontos



3.2.1 Incubação e aplicação dos tratamentos

Para esses experimentos, com base nos resultados da primeira parte do estudo, foram utilizados os tratamentos a uma dose de 2.5% v v⁻¹ com taxa de aplicação de 200 L ha⁻¹. Desse modo, foram utilizados cinco tratamentos mais um controle sem aplicação, com cinco repetições e os estudos para cada área foram repetidos duas vezes (Tabela 06).

A incubação dos tratamentos da segunda parte do estudo foi realizada em frasco reagente de 500 mL contendo 70 gramas da mistura composta dos solos (Figura 7). Um sistema coletor com 5 mL de solução NaOH a 0.5M foi adaptado para a determinação da liberação de CO₂ de cada solo (Figura 7). Os recipientes foram incubados no escuro a 25°C em BOD (Figura 8). A determinação do CO₂ foi realizada

14 e 28 DAA. Aos 14 DAA, a solução de NaOH a 0,5M foi retirada para determinação de CO₂ liberado e uma nova solução repostada. A quantificação do CO₂ foi realizada conforme descrito no item 3.1.3.

A análise dos resultados considerou cada avaliação isolada (14 e 28 DAA) e também a respiração acumulada aos 28 DAA, ou seja, somado os resultados da respiração aos 14 e 28 DAA. Do valor da liberação de CO₂ de cada recipiente foi subtraída a quantidade encontrada nos recipientes 'brancos' com volume de ar similar ao volume de ar presente nos recipientes com solo.

Tabela 6 - Tratamentos e respectivos ingredientes ativo utilizados no estudo do efeito dos herbicidas na atividade heterotrófica global do solo de Tunas do Paraná-PR e Piên-PR. Tratamentos aplicados a 2.5% v v⁻¹ a 200 L ha⁻¹

Herbicidas	Ingrediente ativo
Arsenal NA®	Imazapyr
Dominum NA®	Aminopyralid e fluroxypir
Garlon NA®	Triclopyr
Glifosato NA®	Glyphosate
Pluris NA®	Triclopyr, picloram e aminopyralid
Controle	-

Figura 7 - Frasco reagente de 500 ml e coletor com solução de NaOH a 0.5M incubados a 25°C em BOD



Figura 8 - Aplicação no frasco reagente e unidades experimentais incubadas a 25°C em BOD



3.2.2 Análise dos dados

Os resultados de respiração heterotrófica global para cada local de coleta foram submetidos à ANOVA pelo teste F a 5% de probabilidade e as médias comparadas pelo teste de LSD, também a 5% de probabilidade. Todas as análises e gráficos foram realizados por meio do software R utilizando os pacotes *agricolae*, *ggplot2*, *emmeans* e *dplyr*.

3.3 EXPERIMENTO 3. Determinação e extração de herbicidas presentes no solo

O objetivo desta etapa do estudo foi de analisar o desenvolvimento do método analítico para detectar os ingredientes ativos e avaliar o método de extração mais eficaz para cada ingrediente ativo. Desse modo, o desenvolvimento do método foi realizado para os ingredientes ativos que estão demonstrados na Tabela 07, com os respectivos herbicidas. Os testes de extração com glyphosate apresentaram baixa extração e alta retenção do herbicida no solo, portanto, não foram apresentados no estudo.

A quantificação de cada ingrediente ativo foi realizada pelo sistema LC-MS/MS (Figura 09) localizado no NUPAM, FCA/UNESP, Botucatu-SP. Esse sistema é composto por um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), Shimadzu, modelo Prominence UFLC, que combina análise ultra-rápida e excelente performance de separação, com alta confiabilidade de resultados. Além disso, o sistema é equipado com duas bombas LC-20AD, auto-injetor SIL-20AC, degaseificador DGU-20A5, sistema controlador CBM-20A (permite a operação automatizada) e forno CTO-20AC (para controle da temperatura da coluna). Está acoplado ao HPLC um espectrômetro de massas 4500 triplo quadrupolo (Applied Biosystems / Sciex) (Figura 10). Para o desenvolvimento de cada método analítico foi utilizado o padrão analítico de cada ingrediente ativo com alto grau de pureza. Além disso, a composição da fase móvel para a separação cromatográfica foi testada em diferentes composições e vazões.

Figura 9 - Cromatógrafo líquido (Prominence UFLC) - HPLC



Figura 10 - Espectrômetro de massas triplo quadrupolo (LC-MS/MS) acoplado ao cromatógrafo líquido



Ademais, para a determinação da metodologia, foram realizadas infusões do padrão analítico de cada ativo direto no espectrômetro de massas, em soluções de

1 mg L⁻¹. Assim, foi possível selecionar o modo de ionização da fonte (ESI – ionização por eletrospray), que produz íons do analito no processo de evaporação da fase líquida. As moléculas do analito já isoladas e ionizadas entram no espectrômetro de massas sendo succionadas pelo circuito de alto vácuo do sistema. Dessa forma, as análises possibilitaram determinar as condições analíticas utilizadas para a quantificação de cada ingrediente ativo, permitindo seguir para o próximo estudo, analisando a melhor forma de extração dos herbicidas do solo.

Assim, o estudo para determinação da melhor forma de extração dos herbicidas do solo foi realizada com o solo proveniente de Botucatu-SP, mesmo solo utilizado no item 3.1. Para esse estudo, foram analisados os mesmos ingredientes ativos que foram utilizados no desenvolvimento do método (Tabela 07).

Foi realizado a aplicação de cada herbicida em 300g de solo e armazenados em sacos plásticos separadamente. Com isso, resultou-se em quatro sacos com 300g, um para cada herbicida. Os herbicidas foram aplicados à 2.5% v v⁻¹ e com taxa de aplicação de 200 L ha⁻¹. Após a aplicação, os solos foram homogeneizados e misturados, finalizando em uma amostra final de 1,2 kg de solo. Essa amostra final foi a utilizada em todas as extrações. A detecção e quantificação por cromatografia líquida de alta eficiência e espectrometria de massas (sistema LC-MS/MS) foi realizada utilizando as condições analíticas determinadas na primeira etapa do estudo.

Para poder determinar a melhor metodologia de extração dos herbicidas foram testados três diferentes fases: i) 80% Metanol: 20% H₂O (80M:20A); ii) 20% Metanol: 80% H₂O (20M:80A); e iii) 50% Metanol: 50% H₂O (50M:50A). A H₂O consiste em uma solução de Cloreto de Cálcio a 0.05N. Para cada tratamento (fase) foi utilizado quatro repetições, resultado em 12 unidades experimentais.

Para as extrações, foram pesados 10g de solo em tubos Falcon de 50 mL e adicionados 30 mL da fase para cada tratamento especificamente (Figura 11A). Após a adição das fases, foi utilizado um agitador homogeneizador 'Bead Ruptor Mill' (OMNI, GA, EUA) por 1 minuto, garantindo maior contato possível entre a fase e o solo tratado, aumentando a eficiência de extração dos herbicidas do solo (Figura 11B).

Após a agitação, as amostras foram retiradas e centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos (Figura 12A). Após a centrifugação, as amostras foram retiradas e o sobrenadante foi separado em outro tubo Falcon de 50 mL (Figura 12B). Por último, o sobrenadante foi filtrado por filtro Millipore de 0.2 µm e transferido para um 'vial' de 2

mL (Figura 12C). Foram realizados seis lavagens (ou extrações) por tratamento. Por fim, as amostras nos vials foram congeladas a -20°C até a análise por cromatografia líquida para detecção e quantificação dos herbicidas.

Tabela 7 - Herbicidas comerciais e respectivos ingredientes ativos que serão utilizados na detecção cromatográfica

Herbicidas	Ingrediente ativo
Arsenal NA®	Imazapyr
Dominum NA®	Aminopyralid e fluroxypir
Garlon NA®	Triclopyr
Pluris NA®	Triclopyr, picloram e aminopyralid

Figura 11 - Primeira etapa para extração dos herbicidas do solo. A- Tubo Falcon com solo aplicado e a fase para extração. B-Agitador para homogeneização das amostras

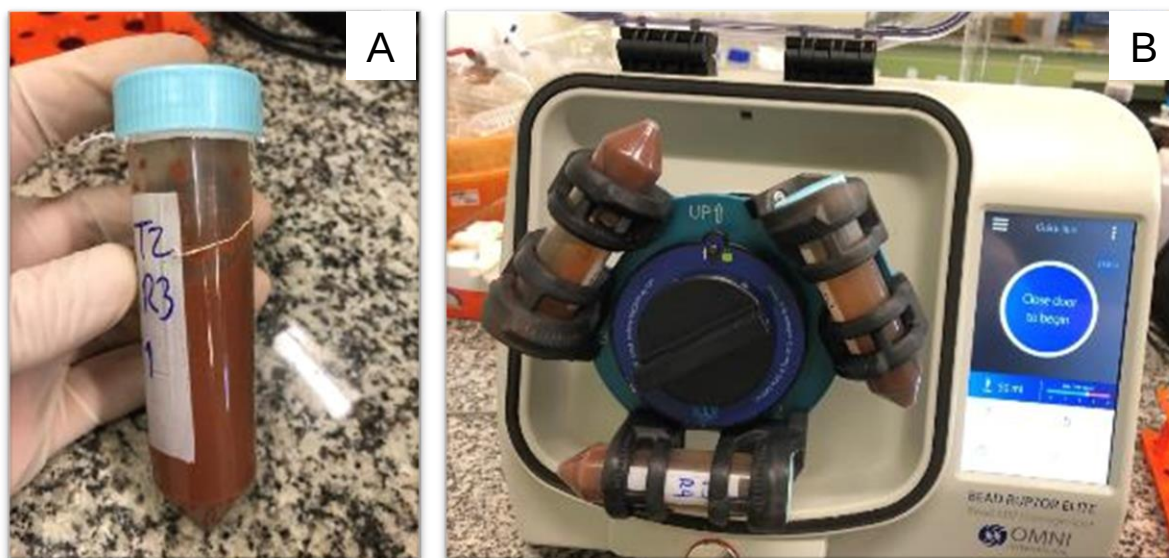
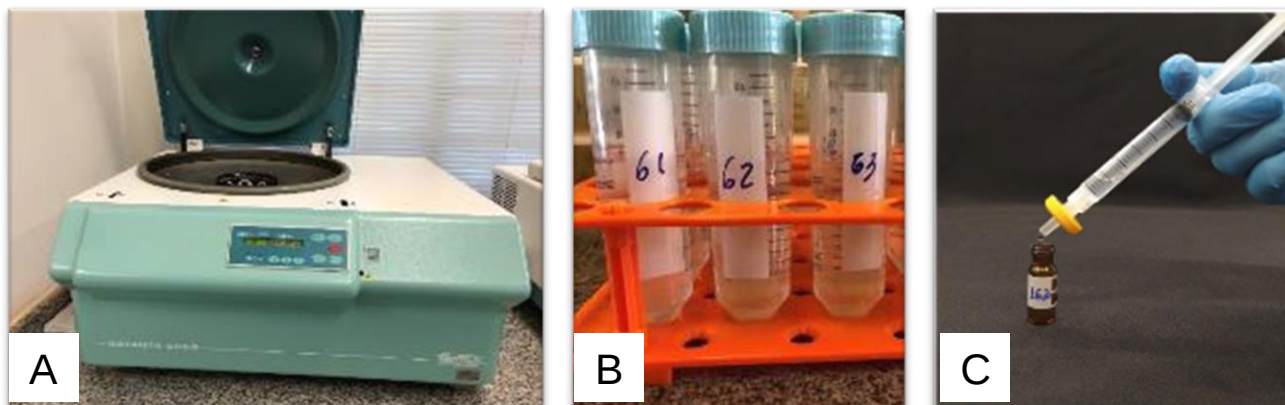


Figura 12 - Etapa final da extração dos herbicidas do solo. A-Centrifugação das amostras; B-Separação do sobrenadante após centrifugação; C-Filtragem e armazenamento da amostra final em vials



3.3.1 Análise estatística dos dados

Os resultados de extração foram ajustados ao modelos de regressão não-linear de Mitscherlich (MITSCHERLICH, 1909), seguindo a equação: $f(x) = c + (d-c)(\exp(-x/e))$, onde: $f(x)$ = quantidade extraída; d = Assíntota horizontal máxima alcançada no modelo; e = inflexão da curva; c = Assíntota horizontal mínima alcançada no modelo; x = Extração da solução. Após o ajuste do modelo, os resultados foram convertidos em porcentagem de extração total com base na assíntota máxima ajustada ao modelo para determinação da recuperação de cada ingrediente ativo.

As extrações acumuladas, ou seja, a soma das seis lavagens, foram submetidas à ANOVA pelo teste F a 5% de probabilidade e as médias comparadas pelo teste de LSD, também a 5% de probabilidade. As análises foram realizadas com o auxílio do *software* estatístico R utilizando os pacotes *drc*, *agricolae*, *ggplot2*, *emmeans* e *dplyr*.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Efeito de herbicidas reguladores de crescimento e adjuvantes na respiração heterotrófica global do solo

4.1.1 Efeito dos herbicidas na respiração heterotrófica global do solo em diferentes taxas de aplicação utilizando os solos de Botucatu-SP

Na Tabela 08 estão apresentados os resultados das análises de respiração heterotrófica global do solo acumulada ($\text{mg CO}_2 \text{ kg solo}^{-1}$) em diferentes herbicidas e taxas de aplicação. Como não houve efeito significativo entre as duas repetições experimentais, os dados foram analisados de forma conjunta. Além disso, não houve efeito significativo na respiração heterotrófica global do solo aos 14 e 28 DAA, portanto, apresentando a respiração acumulada durante os 28 dias de incubação.

Não foram encontrados efeitos significativos no fatorial herbicida e taxa de aplicação, ou seja, independente da taxa de aplicação, os herbicidas não afetaram a respiração heterotrófica do solo, isto é, não apresentaram efeitos negativos na atividade microbiana do solo em comparação com o controle sem aplicação. Além disso, não houve efeito significativo tanto dos herbicidas isolados como das taxas de aplicação. Resultados similares também foram apresentados com Cherni et al. (2015) e Nguyen et al. (2018) quando analisado o efeito do glyphosate na atividade microbiana: em ambos os trabalhos, o herbicida não apresentou efeito negativo na respiração global do solo.

Zabalay et al. (2018) e Latha e Gopal (2010) testaram o efeito do 2,4-D na atividade microbiana do solo em diferentes doses de aplicação. Zabalay et al. (2018), testando 10x a dose de bula, observaram um efeito negativo na atividade nos primeiros 5 dias após aplicação, com recuperação total da atividade após esse período. Similarmente, Latha e Gopal observaram efeito transiente em populações de bactérias 30 DAA, com regularização da população após esse período. Contudo, nos estudos dessa tese com herbicidas reguladores de crescimento, como o 2,4-D, os resultados encontrados são contrastantes e não apresentaram efeito na atividade microbiana testada.

Os resultados da análise de contraste entre cada tratamento e o controle sem aplicação estão dispostos na Tabela 09. Novamente, não houve efeito significativo da

aplicação dos herbicidas ou da taxa de aplicação na atividade microbiana do solo de forma específica. A análise por meio de contrastes nesse estudo permite determinar o efeito individual de cada tratamento/taxa de aplicação em contraste com o controle sem aplicação. Assim, pode-se considerar que os herbicidas não afetaram a microbiota do solo utilizado e que alterações na taxa de aplicação tampouco afetarão a atividade microbiana.

De modo geral, observando o efeito dos herbicidas de forma isolada, isto é, sem o efeito da taxa de aplicação (Figura 13), nota-se que os tratamentos em que houve aplicação dos herbicidas resultaram em aumento da respiração, podendo indicar leve estímulo da atividade microbiana do solo. Em comparação com o controle, os herbicidas Dominum e Pluris apresentaram 23 e 19% a mais de respiração, respectivamente, seguido por Garlon (16%), Glyphosate (10%) e Arsenal (3%). Dessa forma, observa-se que a aplicação dos herbicidas no solo utilizado não apresentaram riscos quanto à atividade microbiana, mantendo, assim, o nível de atividade microbiana, independente da taxa de aplicação utilizada.

Portanto, considerando os resultados das análises com os solos de Botucatu-SP, serão avaliados nos estudos subsequentes apenas o efeito dos herbicidas utilizando a taxa de aplicação de 200 L ha⁻¹, mantendo taxa de aplicação próxima entre o uso agrícola tratorizado (100-200 L ha⁻¹) e uso de aplicação manual-catação (200-350 L ha⁻¹).

Tabela 8 - Efeito dos tratamentos na respiração heterotrófica do solo

	Herbicidas	Ingrediente ativo	Taxa de aplicação	Respiração heterotrófica do solo
			(L ha ⁻¹)	(mg CO ₂ kg solo ⁻¹)
1	Arsenal NA®	Imazapyr	50	81,6 ± 8,97 ¹
2	Arsenal NA®		150	81,0 ± 5,83
3	Arsenal NA®		200	82,3 ± 6,00
4	Dominum NA®	Aminopyralid e fluroxpyr	50	96,9 ± 9,74
5	Dominum NA®		150	94,2 ± 8,87
6	Dominum NA®		200	90,9 ± 5,90
7	Garlon NA®	Triclopyr	50	94,5 ± 5,90
8	Garlon NA®		150	91,6 ± 7,03
9	Garlon NA®		200	95,9 ± 9,07
10	Glyphosate NA®	Glyphosate	50	74,5 ± 5,14
11	Glyphosate NA®		150	89,0 ± 7,31
12	Glyphosate NA®		200	100,0 ± 8,04
13	Pluris NA®	Triclopir, Picloram e aminopyralid	50	100,0 ± 11,3
14	Pluris NA®		150	94,0 ± 9,58
15	Pluris NA®		200	98,6 ± 10,0
16	Controle	-	0	81,4 ± 6,86
Causa de Variação				Teste F
Herbicidas (H)				2,814 ^{NS}
Taxa de aplicação (T)				0,572 ^{NS}
H x T				0,977 ^{NS}
C.V. (%)				33,8

¹ – Médias seguidas do ± Erro padrão; ^{NS}- Não significativo ao teste F.

Figura 13 - Efeito dos herbicidas na respiração heterotrófica do solo em relação ao controle. Valores das médias seguido de $\pm$ erro padrão

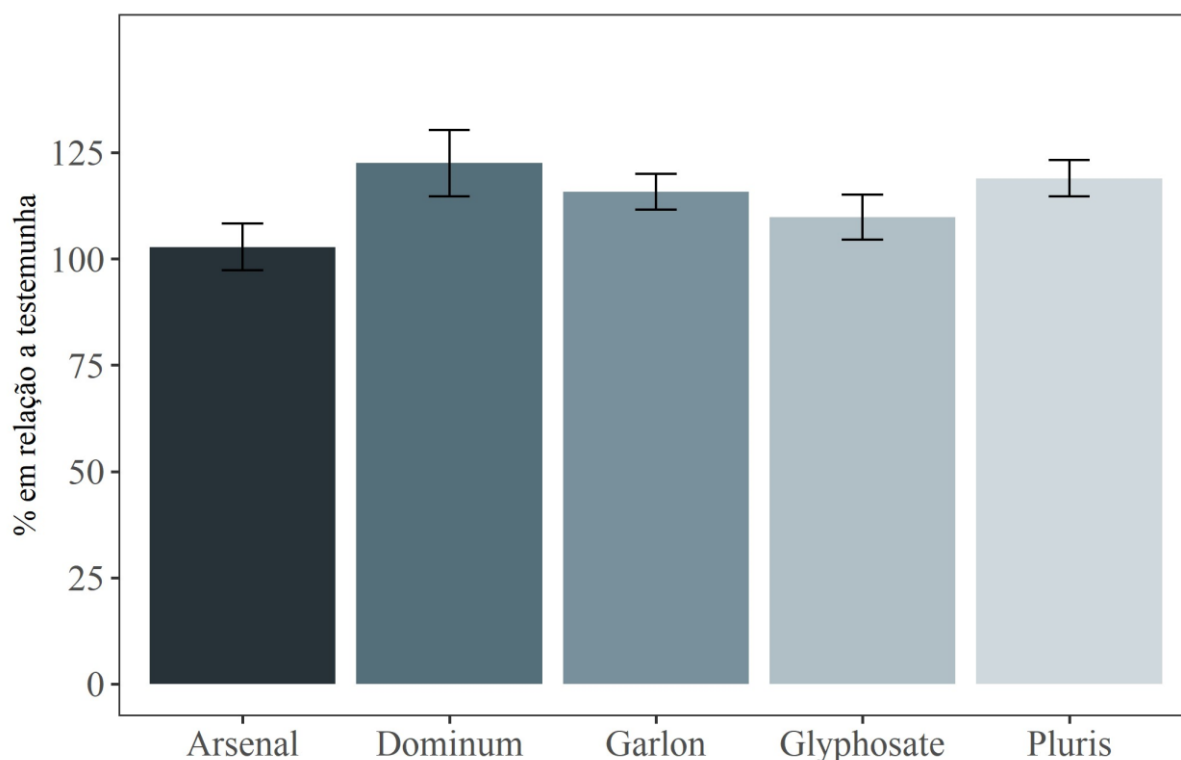


Tabela 9 - Contrastes entre os tratamentos e o controle

Tratamento	Taxa app. ¹ (L ha ⁻¹)	Estimativa	Teste-t	p-value
Arsenal NA® vs Controle	50	0,0591	0,013	1,0000
Arsenal NA® vs Controle	150	-0,1786	-0,038	1,0000
Arsenal NA® vs Controle	200	0,3451	0,074	1,0000
Dominum NA® vs Controle	50	6,2983	1,352	0,7680
Dominum NA® vs Controle	150	3,4026	0,711	0,9817
Dominum NA® vs Controle	200	3,8454	0,826	0,9648
Garlon NA® vs Controle	50	5,3168	1,141	0,8715
Garlon NA® vs Controle	150	4,1307	0,887	0,9525
Garlon NA® vs Controle	200	5,8716	1,261	0,8168
Glyphosate NA® vs Controle	50	-2,8123	-0,604	0,9912
Glyphosate NA® vs Controle	150	3,0995	0,665	0,9864
Glyphosate NA® vs Controle	200	7,6281	1,638	0,5905
Pluris NA® vs Controle	50	7,6441	1,641	0,5883
Pluris NA® vs Controle	150	5,1282	1,101	0,8877
Pluris NA® vs Controle	200	6,9814	1,499	0,6804

¹-Taxa de aplicação

4.1.2 Efeito dos adjuvantes na respiração heterotrófica global do solo utilizando os solos de Botucatu-SP

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados das análises de respiração heterotrófica global do solo acumulada ($\text{mg CO}_2 \text{ kg solo}^{-1}$) tratadas com diferentes adjuvantes. Considerando que não houve efeito significativo entre as duas repetições experimentais, os dados foram analisados de forma conjunta. Além disso, não houve efeito significativo na respiração heterotrófica global do solo aos 14 e 28 DAA, portanto, apresentando a respiração acumulada durante os 28 dias de incubação. Similar aos efeitos dos herbicidas no solo de Botucatu-SP, os adjuvantes também não apresentaram efeito significativo na atividade microbiana do solo. No entanto, em relação a testemunha, observa-se que, com exceção do adjuvante Silwet, os tratamentos apresentaram aumento na respiração do solo (Figura 14). Destaca-se os adjuvantes Assist e VegetOil com aumento de 15% na respiração heterotrófica global do solo em relação ao controle sem aplicação.

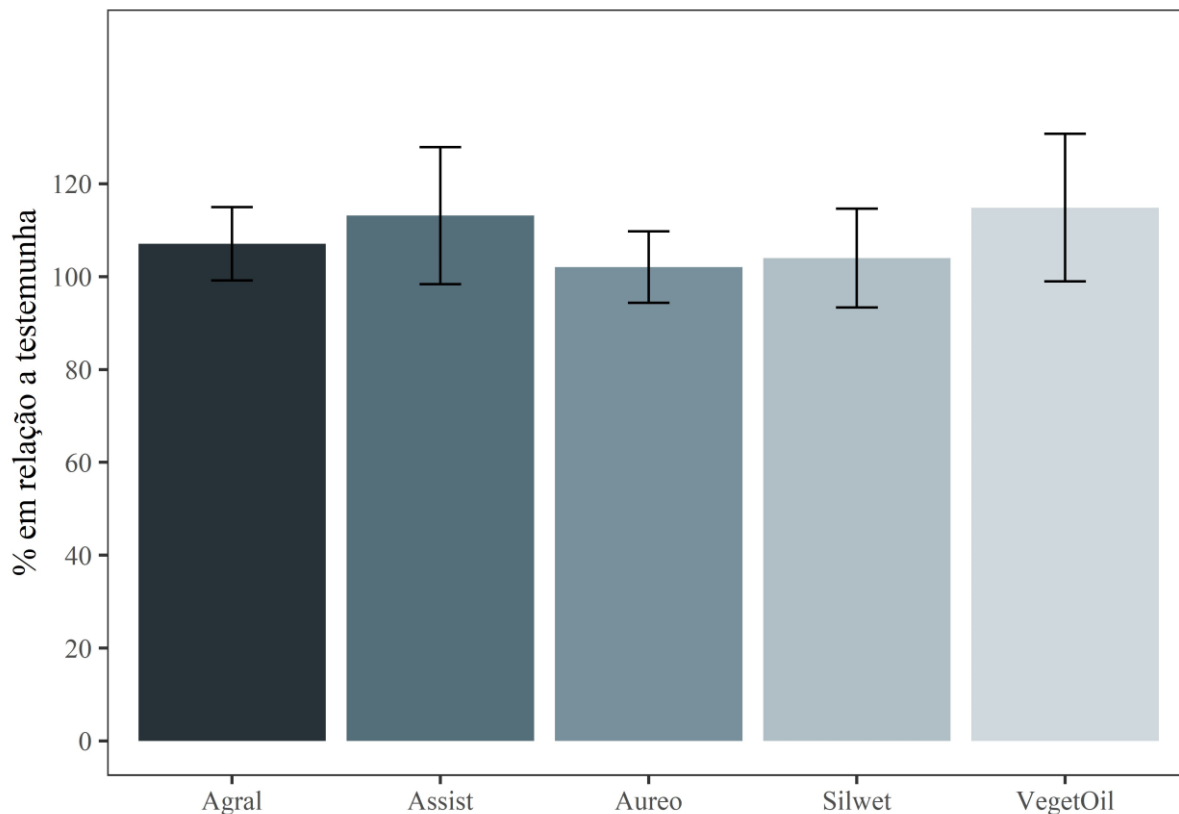
Os defensivos agrícolas utilizados nas aplicações são geralmente aplicados com a adição de adjuvantes. Assim, considerando que produto como um todo poderá afetar a microbiota do solo (ROSE et al., 2016), deve-se atentar também ao efeito dos adjuvantes e outras formulações na respiração heterotrófica global do solo (TOMINACK, 2000). Contudo, com base na atividade heterotrófica do solo utilizado, não foram observados efeitos significativos dos adjuvantes. Assim, destaca-se que para esse solo a mistura dos herbicidas com adjuvantes não deverão apresentar efeitos negativos na atividade microbiana.

Tabela 10 - Efeitos dos adjuvantes na respiração heterotrófica do solo

Tratamento	Ingrediente ativo	Dose	Respiração heterotrófica do solo
		v v^{-1}	($\text{kg CO}_2 \text{ ha}^{-1}$)
Agral	Etilenoxi-etanol	0,5	$81,0 \pm 5,99^1$
Assist	Óleo mineral	0,5	$85,5 \pm 10,90$
Aureo	Éster metílico - óleo de soja	0,5	$77,3 \pm 6,10$
Silwet	Surfatante siliconado	0,1	$78,3 \pm 7,68$
VegetOil	Óleo vegetal	0,1	$86,6 \pm 7,68$
Controle	-	-	$75,7 \pm 6,03$
Teste F			$0,868^{\text{NS}}$
C.V. (%)			29,0

¹ – Médias seguidas do $\pm$ Erro padrão. ^{NS}- Não significativo ao teste F.

Figura 14 - Efeito dos adjuvantes na respiração heterotrófica do solo em relação ao controle. Valores das médias seguido de $\pm$ erro padrão



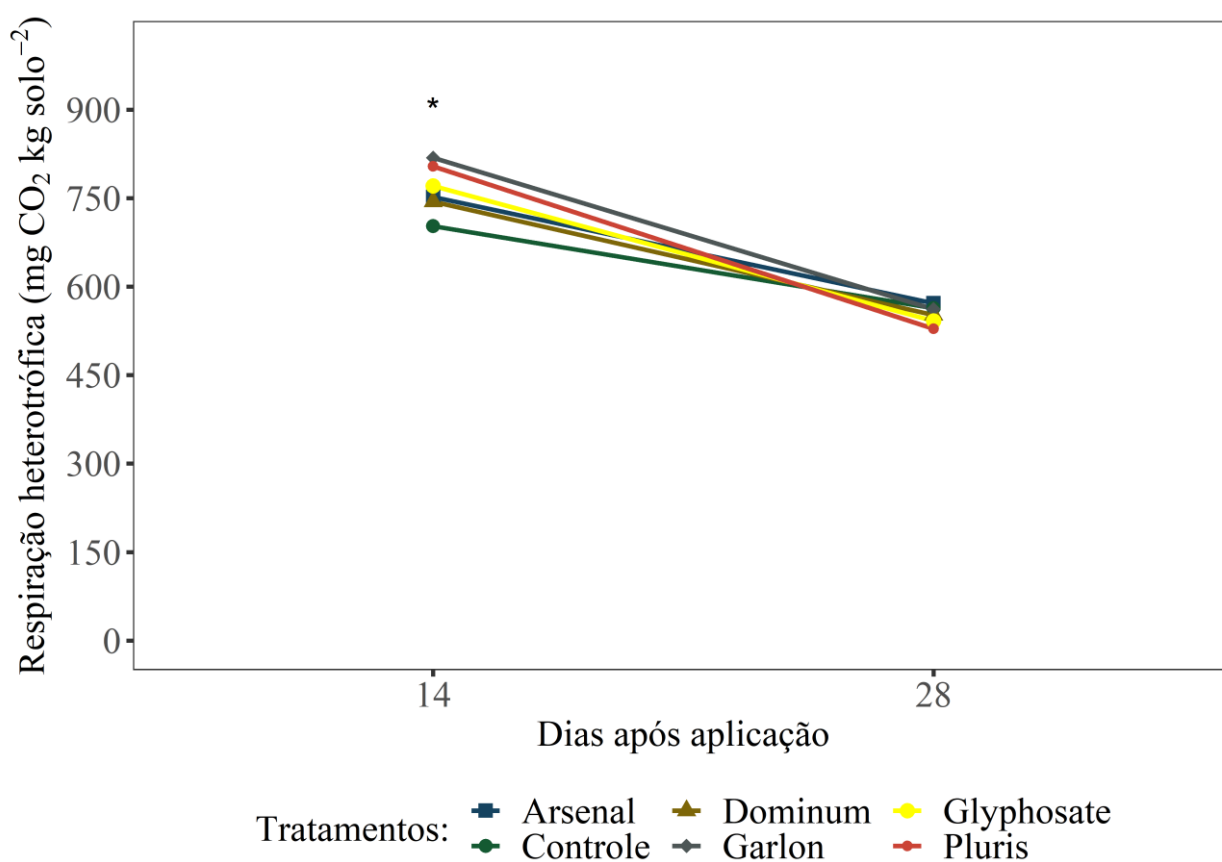
4.1.3 Efeito dos herbicidas na respiração heterotrófica global do solo utilizando os solos de Tunas do Paraná-PR.

Na Figura 15 e Tabela 11 estão apresentados os efeitos dos herbicidas na respiração heterotrófica global do solo ($\text{mg CO}_2 \text{ kg solo}^{-1}$) aos 14 e 28 DAA utilizando o solo de Tunas do Paraná-PR. Não houve diferença significativa entre as duas repetições experimentais, portanto, os dados estão apresentados de forma conjunta. Os herbicidas aplicados resultaram em efeito significativo apenas aos 14 DAA, apresentando resultados estatisticamente iguais aos 28 DAA. Verifica-se que, aos 14 DAA, todos os herbicidas afetaram positivamente a atividade microbiana do solo, com aumento expressivo na respiração do solo. Desse modo, destaca-se os tratamentos Garlon e Pluris com os maiores estímulos na respiração do solo em relação ao controle, resultando em 16% e 15% de estímulo, respectivamente. Em seguida, observa-se aumento na respiração nos tratamentos com Glyphosate, Arsenal e Dominum, aumentando a respiração em 10%, 7% e 6%. No entanto, aos 28 DAA,

observa-se que houve uma diminuição na respiração em todos os tratamentos e todos os tratamentos apresentaram atividade microbiana similar ao controle sem aplicação.

Não foram encontrados diferenças estatísticas quando analisado a respiração heterotrófica global do solo acumulada nos 28 DAA (Figura 16). Mesmo com o estímulo na respiração de 15% aos 14 DAA nos tratamentos com Garlon e Pluris, os efeitos foram transientes e apresentaram 9% de estímulo em relação ao controle considerando o período de 28 dias. Desse modo, não diferiram estatisticamente do controle. No entanto, observa-se que todos os herbicidas não afetaram negativamente a respiração do solo de Tunas do Paraná-PR, não afetando, portanto, a microbiota local do solo.

Figura 15 - Efeito dos herbicidas na respiração heterotrófica do solo ($\text{mg CO}_2 \text{ kg solo}^{-1}$) aos 14 e 28 DAA



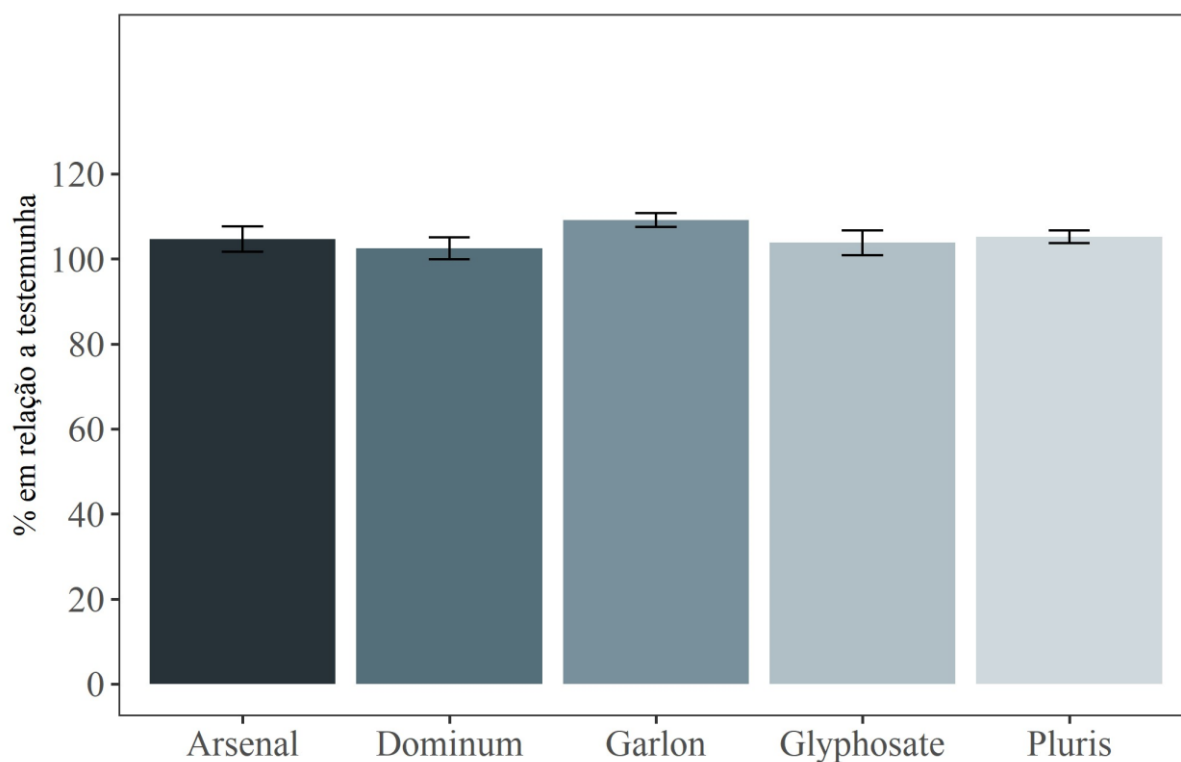
* - diferença significativa (F-test) a 5% de probabilidade

Tabela 11 - Efeitos dos herbicidas na respiração heterotrófica global do solo (mg CO₂ kg solo⁻¹) aos 14 e 28 DAA

Tratamento	Respiração heterotrófica do solo (mg CO ₂ kg solo ⁻¹)	
	14 DAA	28 DAA
Arsenal NA®	752,0 ± 44,1 ab ¹	571,9 ± 31,3
	744,3 ± 41,0 ab	551,8 ± 19,8
Dominum NA®	818,5 ± 24,7 a	561,9 ± 17,4
Garlon NA®	770,5 ± 51,4 ab	541,7 ± 35,5
Glyphosate NA®	803,7 ± 18,8 a	528,5 ± 30,8
Pluris NA®	702,7 ± 26,9 b	563,3 ± 25,2
Controle		
Teste F	2,562*	1,676^{NS}
C.V. (%)	10,88	7,58

¹ – Médias seguidas do ± Erro padrão; médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de LSD a 5 % de probabilidade; ^{NS}- não significativo ao teste F.

Figura 16 - Efeito dos herbicidas na respiração heterotrófica global do solo acumulada em relação ao controle (%). Valores das médias seguidos de ± erro padrão



4.1.4 Efeito dos herbicidas na respiração heterotrófica global do solo utilizando os solos de Piên-PR.

Na Figura 17 e Tabela 12 estão apresentados os efeitos dos herbicidas na respiração heterotrófica global do solo ($\text{mg CO}_2 \text{ kg solo}^{-1}$) aos 14 e 28 DAA utilizando o solo de Piên-PR. Não houve diferença significativa entre as duas repetições experimentais, portanto, os dados estão apresentados de forma conjunta. Para esse solo, os herbicidas aplicados resultaram em efeito significativo em ambas as avaliações, ou seja, aos 14 DAA e aos 28 DAA.

Aos 14 DAA, todos os herbicidas afetaram positivamente a atividade microbiana do solo, com aumento expressivo na respiração do solo. Desse modo, destaca-se o herbicida Garlon com maior estímulo da microbiota do solo, aumentando a respiração em 42% em relação ao controle, seguido pelo tratamento Pluris, com estímulo de 23% na respiração heterotrófica. Os tratamentos com Dominum, Glyphosate e Arsenal, aumentaram a respiração em 15%, 6% e 3% em relação ao controle, respectivamente.

No entanto, aos 28 DAA, houve diminuição na atividade microbiana do solo nos tratamentos e foi encontrado diferença significativa apenas para o tratamento Garlon (Figura 18). Desse modo, a aplicação do Garlon resultou em respiração heterotrófica 9% superior que o controle sem aplicação.

Foram observados diferenças significativas quando analisados a respiração heterotrófica global do solo acumulado durante os 28 dias de estudo (Figura 18). Desse modo, destaca-se o herbicida Garlon com a maior atividade microbiana, apresentando aumento de 30% em comparação com o controle, seguido do herbicida Pluris com 15% de estímulo. Os tratamentos Dominum, Glyphosate e Arsenal resultaram, durante toda a incubação, em aumento na respiração de 9%, 5% e 4%, respectivamente. O estímulo na atividade microbiana do solo pode estar relacionado ao fato dos herbicidas se tornarem substratos para a microbiota do solo, estimulando, portanto, sua atividade e consequente respiração (BERRY et al., 1979).

De forma geral, houve grande diferença na respiração heterotrófica global do solo entre o solo de Botucatu-SP e os solos de Piên e Tunas do Paraná-PR. Observa-se a respiração do solo de Botucatu-SP em torno de $80\text{-}100 \text{ mg CO}_2 \text{ kg solo}^{-1}$, enquanto os solos de Piên e Tunas do Paraná apresentaram respiração em torno de $400\text{-}500$ e $600\text{-}700 \text{ mg CO}_2 \text{ kg solo}^{-1}$, respectivamente. Essa diferença provavelmente

se deve pelas características de cada solo, sobretudo pela diferença no teor de matéria orgânica e nutrientes. Desse modo, por haver maior respiração nos solos provenientes do Paraná, pode ter aumentado a expressividade do efeito de cada herbicida na respiração do solo, facilitando o método estatístico de analisar diferenças estatísticas.

Similar aos efeitos dos herbicidas no solo de Tunas do Paraná-PR, nota-se os tratamentos Garlon e Pluris com os maiores estímulos na atividade seguido dos tratamentos Dominum, Glyphosate e Arsenal com estímulos similares e mais próximos a respiração do controle sem aplicação. Além disso, pode-se considerar que um dos ingredientes ativo responsável pelo aumento expressivo na atividade microbiana é o triclopyr, presente no Garlon (480 g e.a. L⁻¹) e no Pluris (150 g e.a. L⁻¹). Todavia, observa-se que todos os herbicidas não afetaram negativamente a respiração do solo de Tunas do Paraná-PR, não afetando, portanto, a microbiota local do solo.

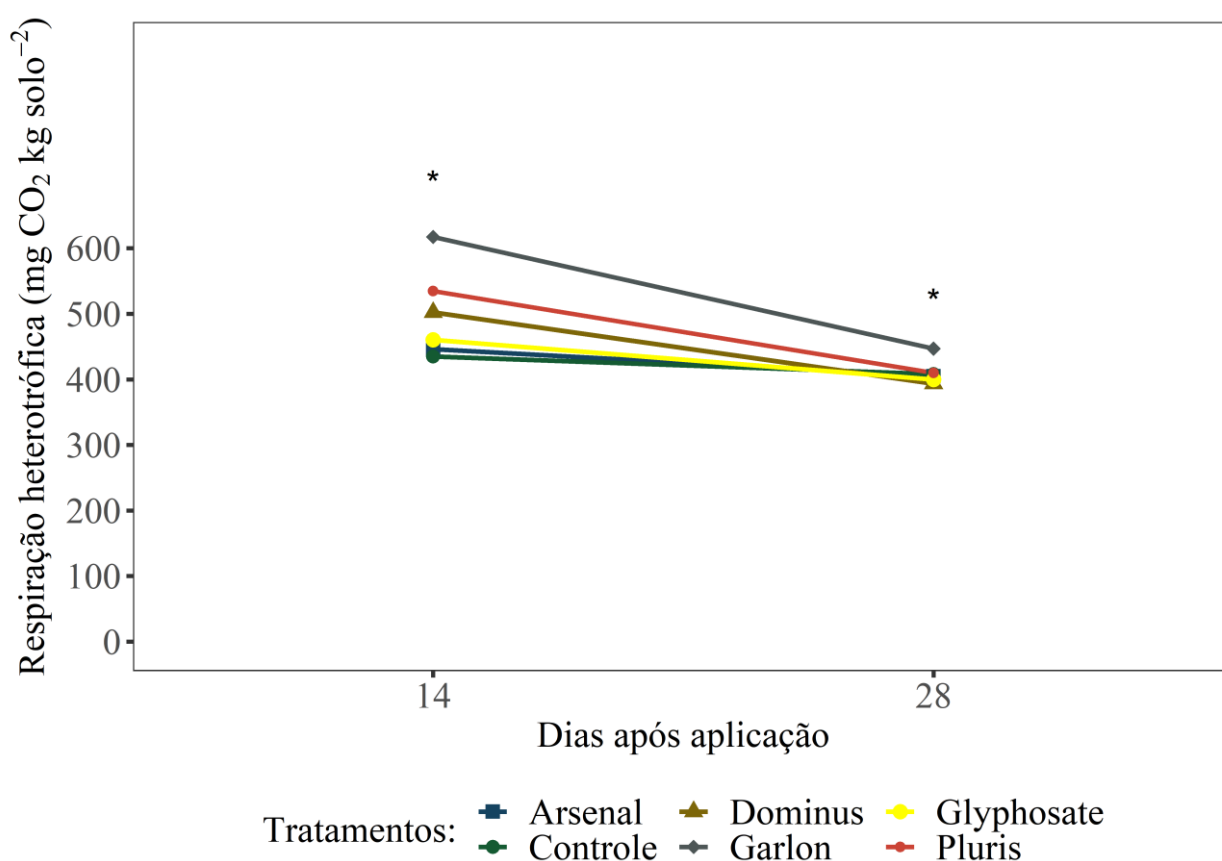
Estudando o uso de Garlon em aplicações basais em áreas de MIV, James et al. (2022) determinaram o impacto desse herbicida na comunidade e atividade microbiana do solo. Nesse estudo, foram realizadas aplicações basais no toco utilizando a dose de 12% do herbicida na solução, cerca de 40% superior a utilizada nessa tese. Os autores concluíram que não houve nenhum efeito do herbicida na comunidade microbiana do solo, tanto na diversidade da comunidade quanto em sua estrutura. Além disso, similar com os resultados encontrado nessa tese, os autores observaram que não houve efeito na atividade microbiana do solo, concluindo que o herbicida não causa nenhum impacto nas comunidades microbianas locais.

Os resultados encontrados nesses estudos corroboram com diversos trabalhos da literatura (CROUZET et al., 2010; PANETTIERI et al., 2013; CHERNI et al., 2015; ROSE et al., 2016; NGUYEN et al., 2018; SERAFINI et al., 2022; JAMES et al., 2022), apresentando efeito inerte ou efeito positivo (estímulo) na atividade microbiana. Deve-se ressaltar, no entanto, que alguns trabalhos da literatura que apresentaram efeitos negativos dos herbicidas na atividade microbiana, como em Zabaloy et al. (2008) e Latha e Gopal (2010), que utilizaram doses muito superiores a recomendada pela bula para observarem os efeitos negativos, chegando a utilizar 10 vezes a dose recomendada.

No entanto, mesmo com o aumento da atividade microbiana do solo, pelo aumento na respiração heterotrófica global do solo, é interessante determinar nos próximos estudos a interferência de cada ingrediente ativo na dinâmica de população

microbiana, estudando o efeito do herbicida tanto na diversidade, estrutura e quantidade populacional. Estima-se que os herbicidas podem selecionar certas populações microbianas e afetar outras, sobretudo nas populações que são capazes de degradar um ingrediente ativo e, conseqüentemente, aumentar sua atividade (SERAFINI et al., 2022). Desse modo, é possível atrelar diversas metodologias e análises para possibilitar maior entendimento sobre o efeito dos herbicidas nas populações microbianas.

Figura 17 - Efeito dos herbicidas na respiração heterotrófica do solo ($\text{mg CO}_2 \text{ kg solo}^{-1}$) aos 14 e 28 DAA



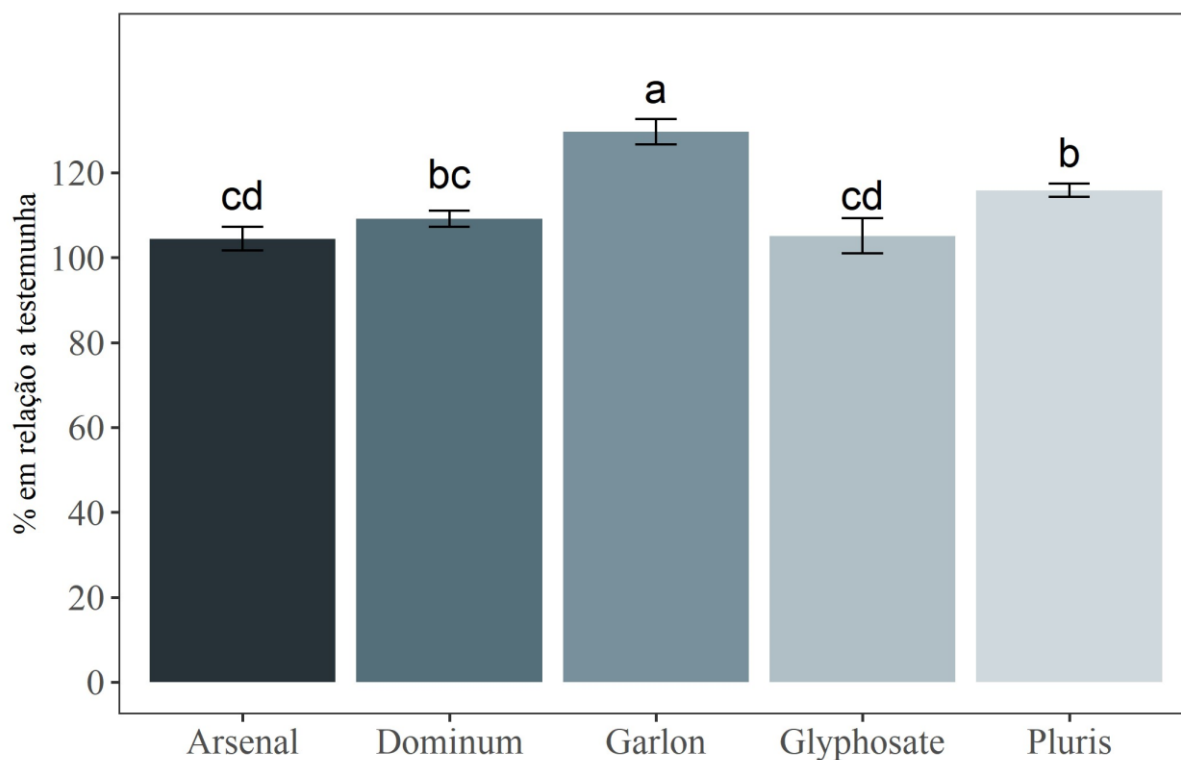
* - diferença significativa (F-test) a 5% de probabilidade

Tabela 12 - Efeitos dos herbicidas na respiração heterotrófica global do solo (mg CO₂ kg solo⁻¹) aos 14 e 28 DAA

Tratamento	Respiração heterotrófica do solo (mg CO ₂ kg solo ⁻¹)	
	14 DAA	28 DAA
1 Arsenal NA®	446,3 ± 54,6 cd ¹	404,8 ± 20,9 b
4 Dominum NA®	502,3 ± 58,1 bc	393,5 ± 24,7 b
7 Garlon NA®	617,4 ± 72,1 a	446,9 ± 30,1 a
10 Glyphosate NA®	460,4 ± 60,4 cd	399,9 ± 24,15 b
13 Pluris NA®	534,9 ± 51,1 b	409,8 ± 24,1 b
16 Controle	434,9 ± 46,3 d	408,8 ± 21,5 b
Teste F	8,736**	3,094*
C.V. (%)	14,74	7,98

¹ – Médias seguidas do ± Erro padrão; Médias seguidas da mesma letra, nas colunas, não diferem entre si pelo teste de LSD a 5 % de probabilidade; ^{NS}- não significativo ao teste F.

Figura 18 - Efeito dos herbicidas na respiração heterotrófica global do solo acumulada em relação ao controle (%). Valores das médias seguidos de ± erro padrão



4.2 Determinação e extração de herbicidas presente no solo

4.2.1. Detecção e quantificação dos ingredientes ativos

4.2.1.1 Triclopyr

As condições analíticas utilizadas para a quantificação do triclopyr estão apresentados na Tabela 13. A detecção e separação dos compostos foram realizados em 10 minutos. O tempo de retenção na coluna cromatográfica foi de 4,81 minutos. Ademais, a massa molecular e os fragmentos gerados a partir da molécula de triclopyr estão presentes na Tabela 14. A Figura 19 contém o cromatograma do padrão analítico de triclopyr ($1,56 \mu\text{L}^{-1}$) sob as condições descritas na Tabela 13. O método desenvolvido permitiu estabelecer quatro critérios de identificação do triclopyr: tempo de retenção cromatográfica; massa do íon precursor (255,774); massa do primeiro fragmento utilizado para quantificação do composto (197,700); massa de dois fragmentos para confirmar a identificação do composto (219,900; 217,600). Além disso, o método desenvolvido permitiu quantificar o triclopyr na concentração de $1,56 \text{ ng mL}^{-1}$ com uma relação Sinal / Ruído de 310,9. Assim, o limite de quantificação encontrado foi de $0,05 \text{ ng triclopyr mL}^{-1}$. Na literatura encontra-se limite de quantificação bem inferior ao encontrado no trabalho, com 1 ng mL^{-1} (TAYBEB et al., 2017).

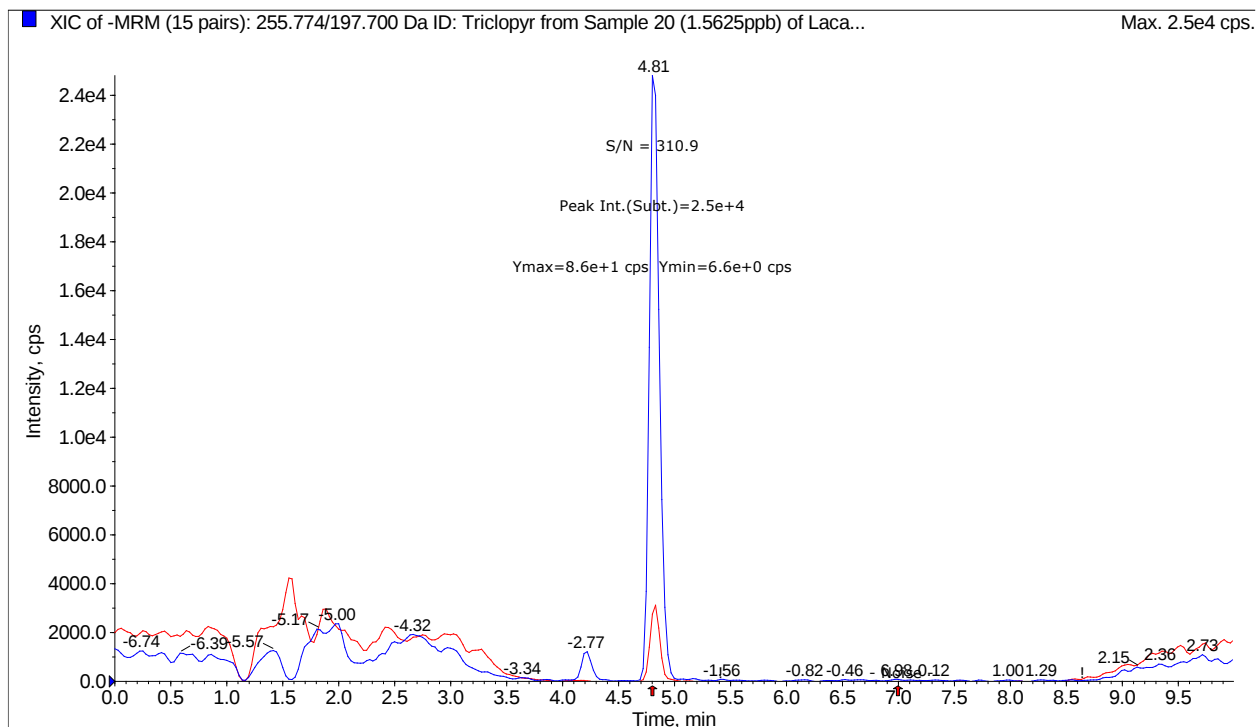
Tabela 13 - Condições cromatográficas utilizadas para quantificação do triclopyr

Coluna analítica	Gemini 5 μ C18 100Å, dimensões 150 x 4,6 mm (Phenomenex)	
Fase móvel	Fase (A) Água com 0,1% ácido Fórmico Fase (B) Acetonitrila com 0,1% ácido Fórmico	
	Inicial 70% Fase (A) e 30% Fase (B)	
	Tempo	% Solvente
Gradiente	1,00min	30 Fase (B)
	3,00	95 Fase (B)
	6,00	95 Fase (B)
Fluxo	1 ml min ⁻¹	
Forno	40°C	
Injeção	20 μ l	
Tempo de corrida	10 min	
Tempo de detecção	4,81 min	

Tabela 14 - Massa molecular e íons secundários dos compostos analisados

Composto	Massa Molecular	Íons Secundários (Fragmentos)	Tempo (mseg)
Triclopyr	255,774	197,700	150
	255,774	219,900	150
	255,774	217,600	150

Figura 19 - Cromatograma obtido para uma injeção de 1.56 $\mu\text{g L}^{-1}$ do padrão analítico de triclopyr



4.2.1.2 Aminopyralid

As condições analíticas utilizadas para a quantificação do aminopyralid estão apresentados na Tabela 15. A detecção e separação dos compostos foram realizados em 10 minutos. O tempo de retenção na coluna cromatográfica do aminopyralid foi de 4,16 minutos. Ademais, a massa molecular e os fragmentos gerados a partir das moléculas de aminopyralid estão presentes na Tabela 16. Encontra-se na Figura 20 o cromatograma do padrão analítico de aminopyralid ($1,56 \mu\text{g L}^{-1}$) sob as condições descritas na Tabela 15.

O método desenvolvido permitiu estabelecer quatro critérios de identificação do aminopyralid: tempo de retenção cromatográfica; massa do íon precursor (204,874); massa do primeiro fragmento utilizado para quantificação do composto (160,800); massa de dois fragmentos para confirmar a identificação do composto (124,900; 89,000). Além disso, o método permitiu quantificar o aminopyralid na concentração de $1,56 \text{ ng mL}^{-1}$ com uma relação Sinal / Ruído de 41,7. Assim, o limite de quantificação

encontrado foi de 0,05 ng aminopyralid mL⁻¹, superior ao encontrado na literatura, com limite de 0,2 ng mL⁻¹ (FAST et al., 2010)

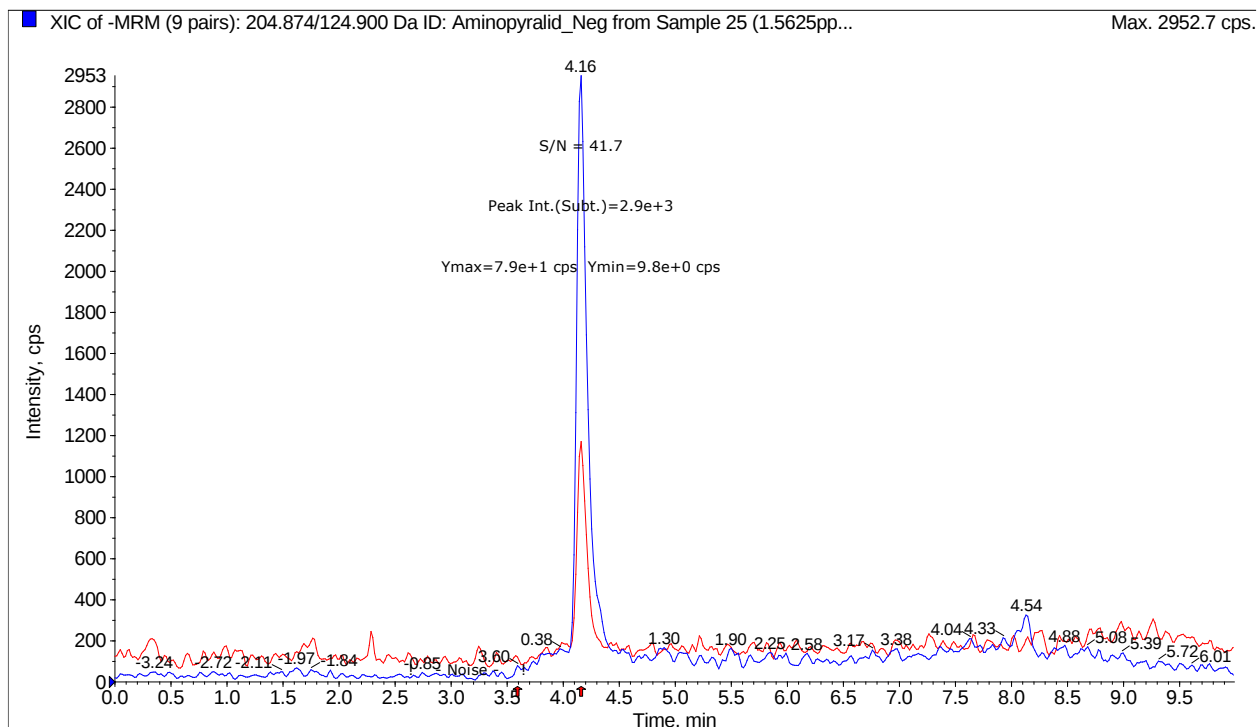
Tabela 15 - Condições cromatográficas utilizadas para quantificação do aminopyralid

Coluna analítica	Gemini 5μ C18 100Å, dimensões 150 x 4,6 mm (Phenomenex)	
Fase móvel	Fase (A) Água com 0,1% ácido Fórmico	
	Fase (B) Acetonitrila com 0,1% ácido Fórmico	
Gradiente	Inicial 70% Fase (A) e 30% Fase (B)	
	Tempo	% Solvente
	1,00min	30 Fase (B)
	3,00	95 Fase (B)
	6,00	95 Fase (B)
	8,00	30 Fase (B)
	10,00	Stop
Fluxo	1 ml min ⁻¹	
Forno	40°C	
Injeção	20 μl	
Tempo de corrida	10 min	
Tempo de detecção	4,16 min	

Tabela 16 - Massa molecular e íons secundários do composto aminopyralid

Composto	Massa Molecular	Íons Secundários (Fragmentos)	Tempo (mseg)
Aminopyralid	204,874	160,800	150
	204,874	124,900	150
	204,874	89,000	150

Figura 20 - Cromatograma obtido para uma injeção de 1.56 $\mu\text{g L}^{-1}$ do padrão analítico de aminopyralid



4.2.1.3 Fluroxypyr

As condições analíticas utilizadas para a quantificação do fluroxypyr estão apresentados na Tabela 17. A detecção e separação do composto foi realizado em 10 minutos. O tempo de retenção na coluna cromatográfica do fluroxypyr foi de 4,20 minutos. Ademais, a massa molecular e os fragmentos gerados a partir das moléculas de fluroxypyr estão presentes na Tabela 18. A Figura 21 contém o cromatograma do padrão analítico de fluroxypyr (ambos 1,56 $\mu\text{g L}^{-1}$) sob as condições descritas na Tabela 17.

O método desenvolvido permitiu estabelecer quatro critérios de identificação do fluroxypyr: tempo de retenção cromatográfica; massa do íon precursor (252,872); massa do primeiro fragmento utilizado para quantificação do composto (194,900); massa de dois fragmentos para confirmar a identificação do composto (232,700; 188,700). O método desenvolvido permitiu quantificar o fluroxypyr na concentração de

1,56 ng mL⁻¹ com uma relação Sinal / Ruído de 108,4. Portanto, o limite de quantificação é próximo a 0,05 ng fluroxypyr mL⁻¹. O limite encontrado na literatura é de 4 ng mL⁻¹ (HALIMAH; ISMAIL, 2004).

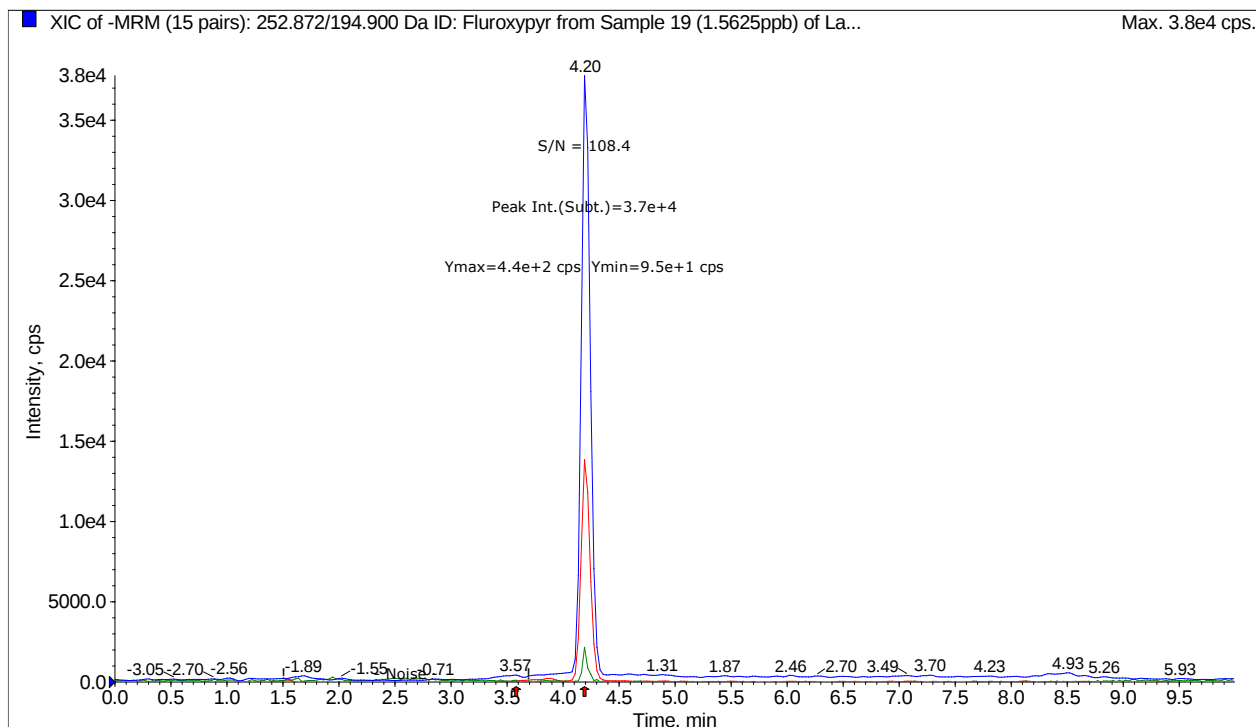
Tabela 17 - Condições cromatográficas utilizadas para quantificação do fluroxypyr

Coluna analítica	Gemini 5μ C18 100Å, dimensões 150 x 4,6 mm (Phenomenex)	
Fase móvel	Fase (A) Água com 0,1% ácido Fórmico	
	Fase (B) Acetonitrila com 0,1% ácido Fórmico	
Gradiente	Inicial 70% Fase (A) e 30% Fase (B)	
	Tempo	% Solvente
	1,00min	30 Fase (B)
	3,00	95 Fase (B)
	6,00	95 Fase (B)
	8,00	30 Fase (B)
	10,00	Stop
Fluxo	1 ml min ⁻¹	
Forno	40°C	
Injeção	20 μl	
Tempo de corrida	10 min	
Tempo de retenção	4,20 min	

Tabela 18 - Massa molecular e íons secundários do composto fluroxypyr

Composto	Massa Molecular	Íons Secundários (Fragmentos)	Tempo (mseg)
Fluroxypyr	252,872	194,900	150
	252,872	232,700	150
	252,872	188,700	150

Figura 21 - Cromatograma obtido para uma injeção de 1.56 $\mu\text{g L}^{-1}$ do padrão analítico de fluroxypyr



4.2.1.4 Picloram

As condições analíticas utilizadas para a quantificação do picloram são apresentados na Tabela 19. A detecção e separação dos compostos foram realizados em 10 minutos. O tempo de retenção na coluna cromatográfica do picloram foi de 5,40 minutos. Ademais, a massa molecular e os fragmentos gerados a partir das moléculas de picloram estão presentes na Tabela 20. A Figura 22 contém o cromatograma do padrão analítico do picloram ($1,56 \mu\text{g L}^{-1}$) sob as condições descritas na Tabela 19.

O método desenvolvido permitiu estabelecer quatro critérios de identificação do picloram: tempo de retenção cromatográfica; massa do íon precursor (238.777); massa do primeiro fragmento utilizado para quantificação do composto (195,000); massa de dois fragmentos para confirmar a identificação do composto (122,900; 158,700). Além disso, o método permitiu quantificar o picloram na concentração de $1,56 \text{ ng mL}^{-1}$ com uma relação Sinal / Ruído de 32. A relação sinal S / R tem resposta

aproximadamente linear à concentração do analito sendo possível estimar que os limites de quantificação seria próximo a 0,5 ng picloram mL⁻¹. O limite de quantificação encontrado na literatura é de 77,9 ng mL⁻¹ (PASSOS et al., 2018).

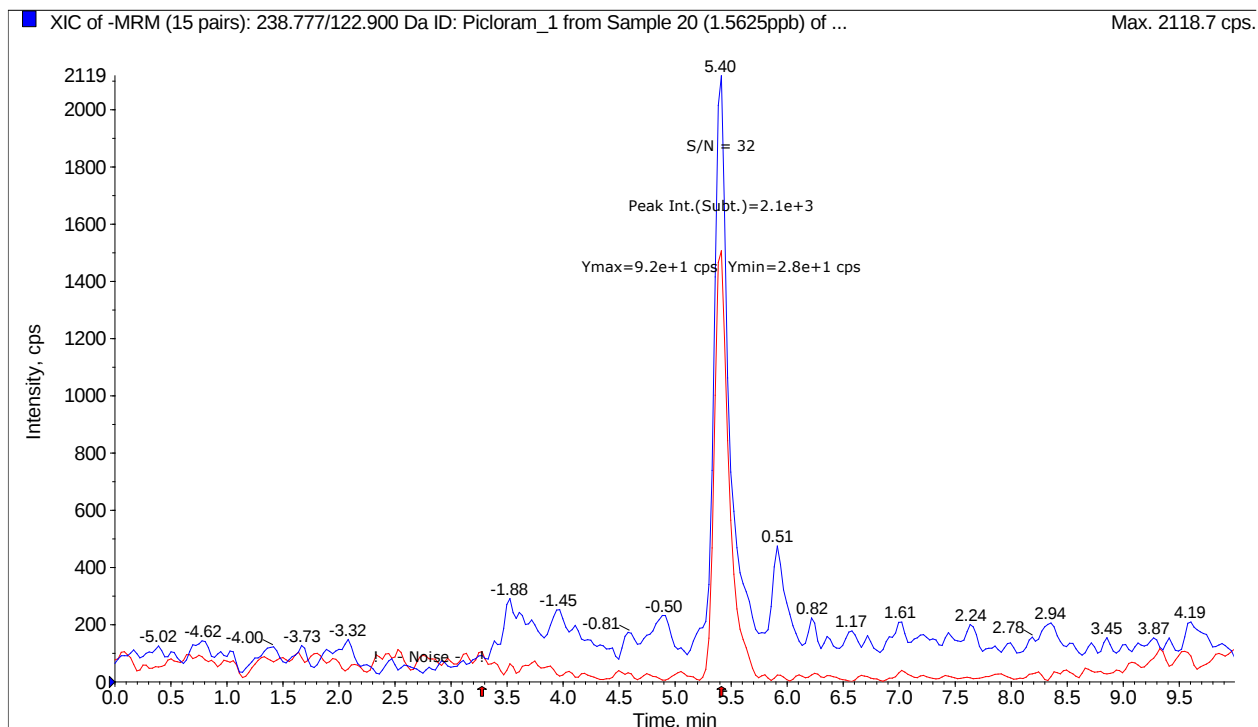
Tabela 19 - Condições cromatográficas utilizadas para quantificação do picloram

Coluna analítica	Gemini 5μ C18 100Å, dimensões 150 x 4,6 mm (Phenomenex)	
Fase móvel	Fase (A) Água com 0.1% ácido Fórmico	
	Fase (B) Acetonitrila com 0.1% ácido Fórmico	
Gradiente	Inicial 70% Fase (A) e 30% Fase (B)	
	Tempo	% Solvente
	1,00min	30 Fase (B)
	3,00	95 Fase (B)
	6,00	95 Fase (B)
	8,00	30 Fase (B)
	10,00	Stop
Fluxo	1 ml min ⁻¹	
Forno	40°C	
Injeção	20 μl	
Tempo de corrida	10 min	
Tempo de retenção	5,40 min	

Tabela 20 - Massa molecular e íons secundários do composto analisado

Composto	Massa Molecular	Íons Secundários (Fragmentos)	Tempo (mseg)
Picloram	238,777	195,000	100
	238,777	122,900	100
	238,777	158,700	100

Figura 22 - Cromatograma obtido para uma injeção de 1,56 $\mu\text{g L}^{-1}$ do padrão analítico de picloram



4.2.1.5 Imazapyr

As condições analíticas utilizadas para a quantificação do imazapyr estão apresentados na Tabela 21. A detecção e separação dos compostos foram realizados em 10 minutos. O tempo de retenção na coluna cromatográfica do imazapyr foi de 3,68 minutos. Ademais, a massa molecular e os fragmentos gerados a partir das moléculas de imazapyr estão presentes na Tabela 22. A Figura 23 contém o cromatograma do padrão analítico do imazapyr ($1,56 \mu\text{g L}^{-1}$) sob as condições descritas na Tabela 21.

O método desenvolvido permitiu estabelecer quatro critérios de identificação do imazapyr: tempo de retenção cromatográfica; massa do íon precursor (262.069); massa do primeiro fragmento utilizado para quantificação do composto (217.100); massa de dois fragmentos para confirmar a identificação do composto (148.800; 202.100). Ademais, método permitiu quantificar o imazapyr na concentração de 1,56

ng mL⁻¹ com uma relação Sinal / Ruído de 425.8. Com isso, estima-se os limites de quantificação próximo a 0,04 ng imazapyr mL⁻¹. Ademais, o limite encontrado é superior ao encontrado por Helling e Doherty (1995), com limite de quantificação de 5 ng mL⁻¹.

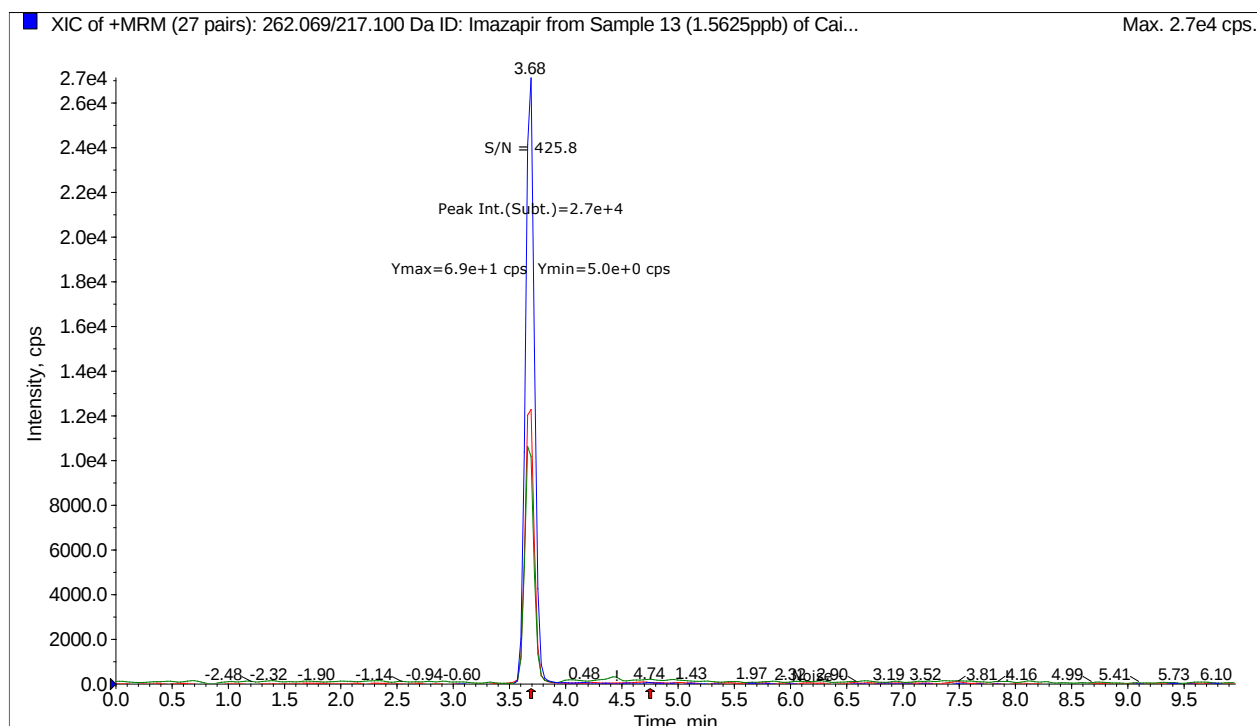
Tabela 21 - Condições cromatográficas utilizadas para quantificação do imazapyr

Coluna analítica	Synergi 2.5µm Hydro-RP 100Å, dimensões 50x4,6 mm (Phenomenex)	
Fase móvel	Fase (A) Água com 0.1% ácido acético	
	Fase (B) Metanol com 0.1% ácido acético	
Gradiente	Inicial 70% Fase (A) e 30% Fase (B)	
	Tempo	% Solvente
	1,00min	30 Fase (B)
	3,00	95 Fase (B)
	6,00	95 Fase (B)
	8,00	30 Fase (B)
	10,00	Stop
Fluxo	0,6 ml min ⁻¹	
Forno	40°C	
Injeção	20 µl	
Tempo de corrida	10 min	
Tempo de retenção	3,68 min	

Tabela 22 - Massa molecular e íons secundários do composto analisado

Composto	Massa Molecular	Íons Secundários (Fragmentos)	Tempo (msec)
Imazapyr	262,069	217,100	150
	262,069	148,800	150
	262,069	202,100	150

Figura 23 - Cromatograma obtido para uma injeção de 1.56 $\mu\text{g L}^{-1}$ do padrão analítico de imazapyr



4.2.2 Determinação do melhor método de extração dos ingredientes ativos

Os parâmetros das análises de quantificação dos ingredientes ativos picloram, triclopyr, aminopyralid, fluroxypyr e imazapyr, distribuídos em seis extrações e três tratamentos (80M:20A, 20M:80A e 50M:50A) estão apresentados na Tabela 23.

Na Tabela 24 estão apresentados os resultados do triclopyr para extração média (ng ml^{-1}), extração acumulada (ng ml^{-1}) e extração total acumulada (%) nos três tratamentos diferentes. Com base na última extração (sexta lavagem), nota-se que os tratamentos apresentaram extração similar de triclopyr, com diferença de apenas 5% entre eles: o tratamento 80M:20A resultou na extração de 231.3 ng ml^{-1} , enquanto os tratamentos 20M:80A e 50M:50A extraíram 220.6 e $231,2 \text{ ng ml}^{-1}$ (F-test: 2,535ns). No entanto, observando a curva de extração na Figura 24, nota-se que o tratamento 50M:50A apresentou maior extração do ativo com menor quantidade de lavagens, seguido do tratamento 20M:80A. Com três extrações com 50M:50A e 20M:80A possibilitaram a extração de 89,89% e 84,26% do triclopyr, respectivamente,

enquanto, com quatro extrações, resultaram 95% e 90% de extração do triclopyr, respectivamente.

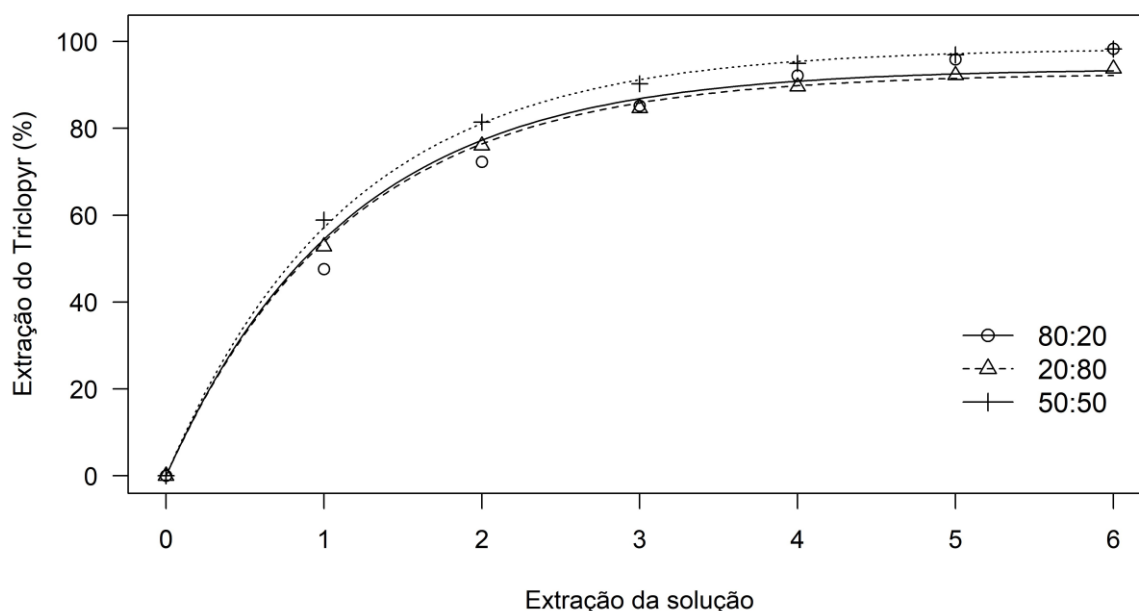
Tabela 23 - Estimativa dos parâmetros para os ingredientes ativos em cada fase (%Metanol: %Água)

Estimativa dos parâmetros	Picloram		
	80M:20A	20M:80A	50M:50A
c	0	0	0
d	26,42	28,02	28,86
e	0,23	0,37	0,37
R ²	0,99	0,99	0,99
	Triclopyr		
	80M:20A	20M:80A	50M:50A
c	0	0	0
d	236,3	221,3	231,9
e	0,27	0,34	0,35
R ²	0,99	0,99	0,99
	Aminopyralid		
	80M:20A	20M:80A	50M:50A
c	0	0	0
d	32,55	37,74	38,24
e	0,18	0,38	0,28
R ²	0,99	0,99	0,96
	Fluroxypyr		
	80M:20A	20M:80A	50M:50A
c	0	0	0
d	31,73	33,31	34,17
e	0,20	0,24	0,29
R ²	0,99	0,99	0,99
	Imazapyr		
	80M:20A	20M:80A	50M:50A
c	0	0	0
d	91,8	104,8	100,7
e	0,11	0,28	0,21
R ²	0,99	0,99	0,97

Tabela 24 - Extração média ($\pm$ Erro padrão), extração acumulada e respectiva porcentagem acumulada de triclopyr em cada tratamento (Metanol:Água)

Tratamento	Extração	Média	Acumulada	Total extraído
		(ng ml ⁻¹)		(%)
80M:20A	1	112,0 $\pm$ 2,12	112,0	47,40
	2	58,2 $\pm$ 4,85	170,2	72,03
	3	30,2 $\pm$ 3,40	200,4	84,81
	4	16,5 $\pm$ 0,54	216,9	91,79
	5	8,7 $\pm$ 0,66	225,6	95,47
	6	5,7 $\pm$ 0,57	231,3	97,81
20M:80A	1	124,2 $\pm$ 6,37	124,2	52,56
	2	54,6 $\pm$ 4,00	178,9	75,71
	3	20,2 $\pm$ 1,39	199,1	84,26
	4	11,8 $\pm$ 1,33	210,9	89,25
	5	6,2 $\pm$ 0,66	217,1	91,87
	6	3,5 $\pm$ 0,22	220,6	93,36
50M:50A	1	138,5 $\pm$ 3,20	138,5	58,61
	2	53,1 $\pm$ 1,81	191,6	81,08
	3	20,8 $\pm$ 1,07	212,4	89,89
	4	11,0 $\pm$ 0,60	223,4	94,54
	5	4,6 $\pm$ 0,46	228,1	96,53
	6	3,1 $\pm$ 0,21	231,2	97,84

Figura 24 - Curva de extração do triclopyr durante seis lavagens com a utilização de três fases (80M:20A, 20M:80A e 50M:50A)

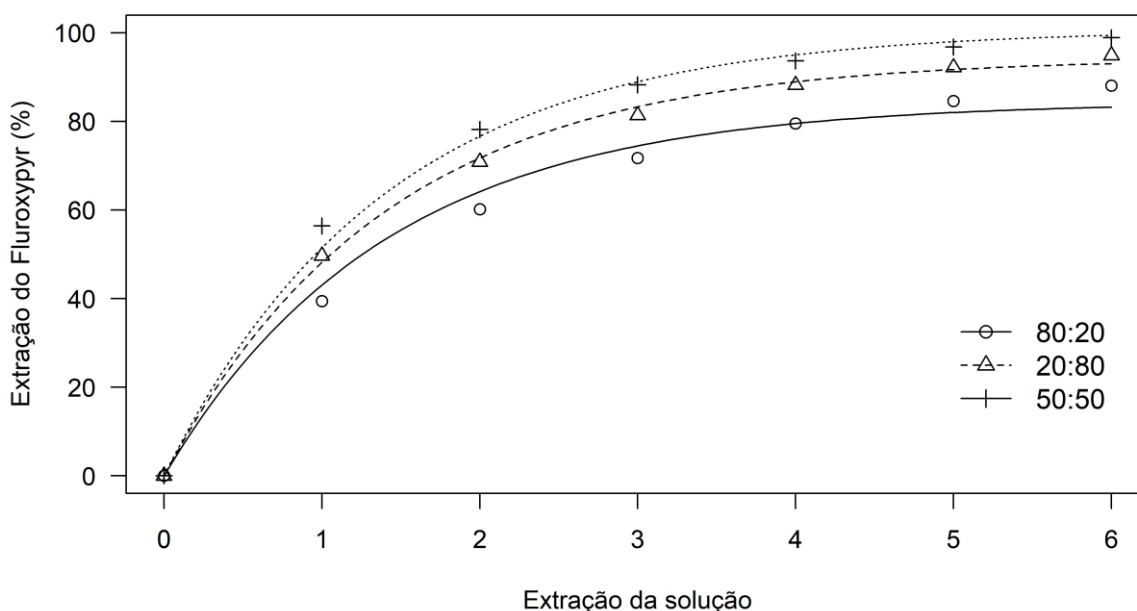


Na Tabela 25 estão apresentados os resultados do fluroxypyr para extração média (ng ml^{-1}), extração acumulada (ng ml^{-1}) e extração total acumulada (%) nos três tratamentos diferentes. Para esse herbicida, os tratamentos utilizando 50M:50A e 20M:80A apresentaram a maior extração do ingrediente ativo, extraíndo 33,8 e 32,4 ng ml^{-1} respectivamente (F-test: 14,16**). O tratamento com 80M:20A resultou na extração final de 30.1 ng ml^{-1} , 11% inferior ao tratamento 50M:50A. Com base na curva de extração (Figura 25), observa-se que o tratamento 50M:50A e 20M:80A resultaram na maior extração do ingrediente ativo com menor quantidade de lavagens, apresentando extração de 88,1% (50M:50A) e 81,4% (20M:80A) do fluroxypyr com três lavagens, seguido de 93,6 (50M:50A) e 90% (20M:80A) de extração com quatro lavagens.

Tabela 25 - Média da extração ($\pm$ Erro padrão), Extração acumulada e respectiva porcentagem acumulada de fluroxipir em cada tratamento (Metanol:Água)

Tratamento	Extração	Média	Acumulada	Total Acumulado
		(ng ml ⁻¹)		(%)
80M:20A	1	13,5 $\pm$ 0,6	13,5	39,51
	2	7,1 $\pm$ 0,3	20,5	59,99
	3	4,0 $\pm$ 0,2	24,5	71,70
	4	2,7 $\pm$ 0,2	27,2	79,60
	5	1,7 $\pm$ 0,1	28,9	84,58
	6	1,2 $\pm$ 0,04	30,1	88,09
20M:80A	1	17,0 $\pm$ 0,5	17,0	49,75
	2	7,2 $\pm$ 0,3	24,2	70,82
	3	3,6 $\pm$ 0,2	27,8	81,36
	4	2,3 $\pm$ 0,2	30,1	88,99
	5	1,4 $\pm$ 0,1	31,5	92,19
	6	0,9 $\pm$ 0,09	32,4	94,82
50M:50A	1	19,3 $\pm$ 0,9	19,3	56,48
	2	7,4 $\pm$ 0,4	26,7	78,14
	3	3,4 $\pm$ 0,2	30,1	88,09
	4	1,8 $\pm$ 0,09	32,0	93,65
	5	1,1 $\pm$ 0,03	33,0	96,58
	6	0,7 $\pm$ 0,02	33,8	98,92

Figura 25 - Curva de extração do fluroxypyr durante seis lavagens com a utilização de três fases (80M:20A, 20M:80A e 50M:50A)

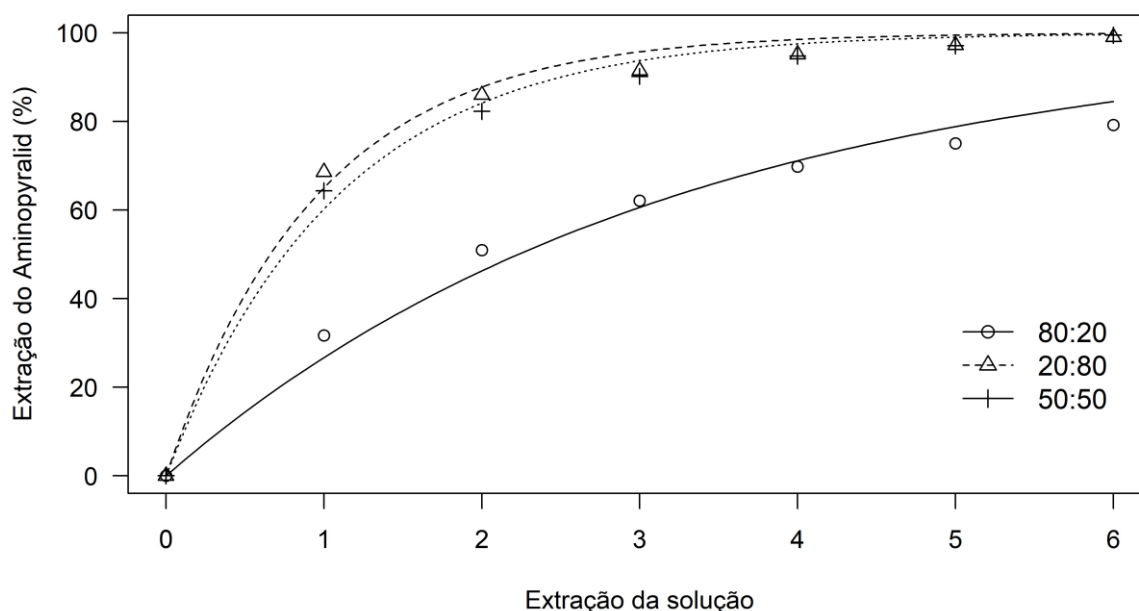


Na Tabela 26 estão apresentados os resultados do aminopyralid para extração média (ng ml^{-1}), extração acumulada (ng ml^{-1}) e extração total acumulada (%) nos três tratamentos diferentes. Similar a extração de fluroxypyr, os tratamentos utilizando 50M:50A e 20M:80A apresentaram a maior extração de aminopyralid em comparação com o tratamento com maior metanol, extraindo 38 e 37,8 ng ml^{-1} , respectivamente (F-test: 21,125***). O tratamento com 80M:20A resultou na extração final de 30.3 ng ml^{-1} , com extração 25% menor em comparação aos demais tratamentos. Com base na curva de extração (Figura 26), observa-se a superioridade dos tratamentos 20M:80A e 50M:50A com maior quantidade de extração por lavagem, resultando em extrações de 91,3% (20M:80A) e 90,0% (50M:50A) de aminopyralid com três lavagens, seguido de 95% (20M:80A) e 95% (50M:50A) de extração com quatro lavagens.

Tabela 26 - Média da extração ($\pm$ Erro padrão), Extração acumulada e respectiva porcentagem acumulada de aminopyralid em cada tratamento (Metanol:Água)

Tratamento	Extração	Média	Acumulada	Total acumulado
		(ng ml ⁻¹)		(%)
80M:20A	1	12,1 $\pm$ 0,25	12,1	31,64
	2	7,3 $\pm$ 0,46	19,4	50,73
	3	4,3 $\pm$ 0,31	23,7	61,98
	4	2,9 $\pm$ 0,34	26,7	69,82
	5	2,0 $\pm$ 0,17	28,6	74,79
	6	1,6 $\pm$ 0,10	30,3	79,24
20M:80A	1	26,2 $\pm$ 0,35	26,2	68,51
	2	6,6 $\pm$ 0,30	32,8	85,77
	3	2,1 $\pm$ 0,15	34,9	91,27
	4	1,4 $\pm$ 0,11	36,3	94,93
	5	0,8 $\pm$ 0,08	37,1	97,02
	6	0,7 $\pm$ 0,10	37,8	98,85
50M:50A	1	24,6 $\pm$ 0,75	24,6	64,33
	2	6,8 $\pm$ 0,28	31,4	82,11
	3	3,0 $\pm$ 0,40	34,4	89,96
	4	1,7 $\pm$ 0,17	36,2	94,67
	5	0,9 $\pm$ 0,1	37,1	97,02
	6	0,9 $\pm$ 0,03	38,0	99,37

Figura 26 - Curva de extração do aminopyralid durante seis lavagens com a utilização de três fases (80M:20A, 20M:80A e 50M:50A)

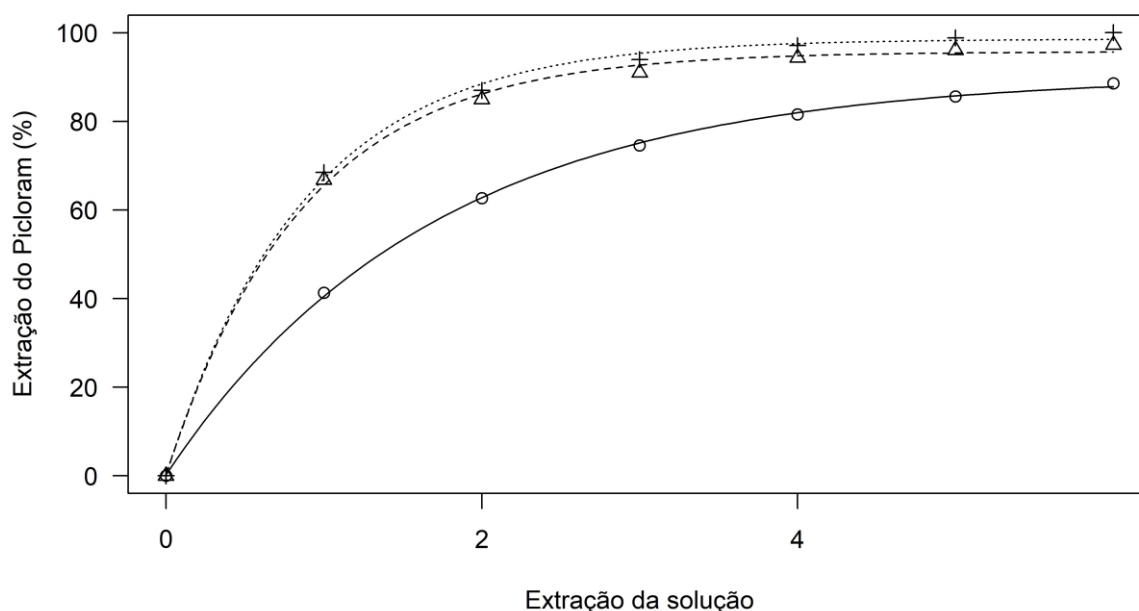


Na Tabela 27 estão apresentados os resultados do picloram para extração média (ng ml^{-1}), extração acumulada (ng ml^{-1}) e extração total acumulada (%) nos três tratamentos diferentes. Assim, com base nos resultados, os tratamentos utilizando 50M:50A e 20M:80A apresentaram a maior extração de picloram em comparação com o tratamento com maior concentração de metanol, extraíndo 28,9 e 28,1 ng ml^{-1} , respectivamente (F-test: 4,973*). O tratamento com 80M:20A resultou na extração final de 25,5 ng ml^{-1} , com extração 13% menor em comparação com o tratamento 50M:50A. Com base na curva de extração (Figura 27), observa-se que a superioridade do tratamento 20M:80A e 50M:50A com maior quantidade de extração por lavagem, resultando em extrações de 91,1% (20M:80A) e 93,9% (50M:50A) de picloram com três lavagens, seguido de 94,5 (20M:80A) e 97,1% (50M:50A) de extração com quatro lavagens.

Tabela 27 - Média da extração ($\pm$ Erro padrão), Extração acumulada e respectiva porcentagem acumulada de picloram em cada tratamento (Metanol:Água)

Tratamento	Extração	Média	Acumulada	Total acumulado
		(ng ml ⁻¹)		(%)
80M:20A	1	11,9 $\pm$ 0,93	11,9	41,23
	2	6,2 $\pm$ 0,46	18,1	62,72
	3	3,4 $\pm$ 0,28	21,5	74,50
	4	2,0 $\pm$ 0,08	23,5	81,43
	5	1,2 $\pm$ 0,05	24,7	85,59
	6	0,9 $\pm$ 0,09	25,5	88,36
20M:80A	1	19,3 $\pm$ 0,66	19,3	66,87
	2	5,2 $\pm$ 0,50	24,5	84,89
	3	1,7 $\pm$ 0,13	26,3	91,13
	4	0,1 $\pm$ 0,06	27,2	94,25
	5	0,5 $\pm$ 0,07	27,7	95,98
	6	0,3 $\pm$ 0,03	28,1	97,37
50M:50A	1	19,8 $\pm$ 1,04	19,7	68,26
	2	5,3 $\pm$ 0,30	25,1	86,97
	3	2,0 $\pm$ 0,11	27,1	93,90
	4	0,9 $\pm$ 0,04	28,0	97,02
	5	0,5 $\pm$ 0,02	28,5	98,75
	6	0,3 $\pm$ 0,02	28,9	100

Figura 27 - Curva de extração do picloram durante seis lavagens com a utilização de três fases (80M:20A, 20M:80A e 50M:50A)

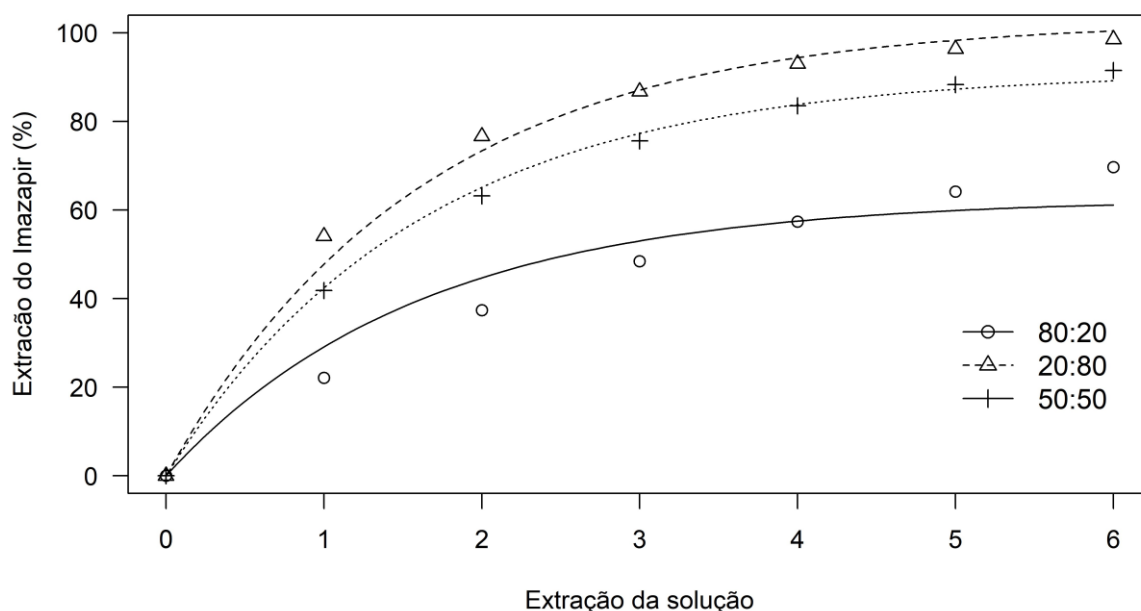


Na Tabela 28 estão apresentados os resultados do imazapyr para extração média (ng ml^{-1}), extração acumulada (ng ml^{-1}) e extração total acumulada (%) nos três tratamentos diferentes. Para esse ingrediente ativo, foi observado que o tratamento 20M:80A apresentou maior extração de imazapyr em relação aos demais, seguido do tratamento com 50M:50A e o tratamento 80M:20A com a menor extração total (F-test: 76,946***). Desse modo, o tratamento 20M:80A apresentou extração de 103.4 ng ml^{-1} enquanto os tratamentos 50M:50A e 80M:20A resultaram em extração de 96,0 e $73,1 \text{ ng ml}^{-1}$, respectivamente, sendo 7,7% superior que o tratamento 50M:50A e 41% superior ao 80M:20A. Além disso, com base na curva de extração (Figura 28), observa-se a superioridade do tratamento 20M:80A com maior quantidade de extração por lavagem, resultando em extrações de 87,0% de imazapyr com três lavagens, seguido de 94 % de extração com quatro lavagens.

Tabela 28 - Média da extração ($\pm$ Erro padrão), Extração acumulada e respectiva porcentagem acumulada de imazapyr em cada tratamento (Metanol:Água)

Tratamento	Extração	Média	Acumulada	Total acumulado
		(ng ml ⁻¹)		(%)
80M:20A	1	23,2 $\pm$ 0,62	23,2	22,14
	2	16,0 $\pm$ 0,62	39,2	37,40
	3	11,6 $\pm$ 0,37	50,8	48,47
	4	9,4 $\pm$ 0,52	60,2	57,44
	5	7,1 $\pm$ 0,25	67,3	64,22
	6	5,8 $\pm$ 0,16	73,1	69,75
20M:80A	1	56,7 $\pm$ 0,25	56,7	54,10
	2	23,7 $\pm$ 0,45	80,4	76,72
	3	10,6 $\pm$ 0,38	91,0	86,83
	4	6,6 $\pm$ 0,54	97,6	93,13
	5	3,5 $\pm$ 0,20	101,1	96,47
	6	2,3 $\pm$ 0,20	103,4	98,66
50M:50A	1	43,9 $\pm$ 1,67	43,9	41,89
	2	22,4 $\pm$ 0,84	66,3	63,26
	3	13,0 $\pm$ 0,45	79,3	75,67
	4	8,3 $\pm$ 0,38	87,6	83,59
	5	5,0 $\pm$ 0,26	92,6	88,36
	6	3,3 $\pm$ 0,16	96,0	91,60

Figura 28 - Curva de extração do imazapyr durante seis lavagens com a utilização de três fases (80M:20A, 20M:80A e 50M:50A)



De modo geral, com exceção da extração do imazapyr, a extração utilizando as fases 20M:80A e 50M:50A foram os tratamentos que resultaram na maior quantidade de extração, enquanto para imazapyr, o tratamento 20M:80A foi que permitiu maior extração desse ativo. Dessa forma, a extração com a fase 20M:80A seria recomendada para todos os ingredientes ativos analisados. Assim sendo, considerando que as análises dos solos para detecção e quantificação desses herbicidas em aplicação de MIV poderão conter mais de um ingrediente ativo, e, portanto, necessitar de análise de diversos ativos de uma só vez, o tratamento que apresentaria maior segurança e precisão na detecção dos cinco ingredientes ativos avaliados é a extração utilizando a fase '20% Metanol: 80% Água'.

Ademais, a utilização da fase 20M:80A é o que apresenta menor quantidade de metanol dentre os tratamentos, permitindo a diminuição do custo de extração do processo. Com base na extração de todos os ingredientes ativos, tanto com a extração utilizando a fase 20M:80A, quanto com a fase 50M:50A, observa-se que ao menos quatro extrações (lavagens) é o desejável para se realizar extração eficiente das amostras com quantidade segura para posterior detecção e quantificação.

6 CONCLUSÕES

Nas condições em que foram conduzidos os estudos de respiração heterotrófica global do solo, pode-se concluir que os herbicidas Garlon NA®, Arsenal NA®, Pluris NA®, Dominum NA® e Glyphosate NA® não afetaram negativamente a atividade microbiana dos solos testados de Botucatu-SP e de duas áreas que serão utilizadas no manejo integrado de vegetações, em Tunas do Paraná-PR e Piên-PR. Além disso, diferentes taxas de aplicação e utilização de adjuvantes não influenciaram a atividade microbiana do solo.

Nos solos provenientes do Paraná, observou-se estímulo na atividade microbiana pela aplicação dos herbicidas, sobretudo do herbicida Garlon NA® e Pluris NA®, com aumento na respiração heterotrófica global do solo. Com isso, seguindo as recomendações dos fabricantes e das boas práticas de manejo, pode-se concluir que a aplicação desses herbicidas em áreas de MIV não irá prejudicar a microbiota dos solos testados.

Nas condições em que foram conduzidos os estudos para detecção e extração dos herbicidas reguladores de crescimento, a saber picloram, aminopyralid, triclopyr, fluroxypyr e imazapyr, observa-se que o método proposto para detecção e quantificação se mostrou eficiente e com baixo limite de quantificação. A extração dos ingredientes ativos utilizando a fase '20% Metanol: 80% Água' resultou na extração mais eficiente. Além disso, recomenda-se quatro lavagens (extrações) para se obter quantidades suficientes para análise e detecção dos ingredientes ativos.

REFERÊNCIAS

- BOND-LAMBERTY, B.; BRONSON, D.; BLADYKA, E.; GOWER, S.T. A comparison of trenched plot techniques for partitioning soil respiration. **Soil Biology and Biochemistry**, 43(10), pp.2108-2114, 2011.
- BRAMBLE, W.C.; W.R. BYRNES. Integrated vegetation management of an electric utility right-of-way ecosystem. **Down to Earth**, 51(1):29–34, 1996.
- BRAMBLE, W.C.; BYRNES, W.R.; HUTNIK, R.J.; LISCINSKY, S.A. Interference factors responsible for resistance of forb-grass cover types to tree invasion on na electric utility right-of-way. **Journal of Arboriculture**, 22 (2), Marc, 1996.
- CHANDRA, P. Herbicides effects on certain soil microbial activities in some brown soils of Saskatchewan. **Weed Res.** 4, 5463, 1964.
- CHERNI, A.; TRABELSI, D.; CHEBIL, S.; BARHOUMI, F.; RODRÍGUEZ-LLORENTE, I.; ZRIBI, K. Effect of glyphosate on enzymatic activities, rhizobiaceae and total bacterial communities in an agricultural tunisian soil, **Water Air Soil Pollution**, 226: 1–11, 2015.
- CORRÊA, M. R. et al. AVALIAÇÃO DA DECOMPOSIÇÃO DE PLANTAS AQUÁTICAS NO SOLO. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v. 23, n. 2, p. 243-248, 2005.
- COVEY, T.R.; LEE, E.D.; BRUINS, A.P.; HENION, J.D. Liquid chromatography/mass spectrometry. **Analytical chemistry**, 58(14), pp.1451A-1461^a, 1986.
- CROUZET, O.; BATISSON, I.; BESSE-HOGGAN, P.; BONNEMOY, F.; BARDOT, C.; POLY, F.; BOHATIER, J.; MALLET, C. Response of soil microbial communities to the herbicide mesotrione: a dose-effect microcosm approach. **Soil Biology and Biochemistry**, 42(2), pp.193-202, 2010.
- FAST, B.J.; FERRELL, J.A.; MACDONALD, G.E.; SELLERS, B.A.; MACRAE, A.W.; KRUTZ, L.J.; KLINE, W.N. Aminopyralid soil residues affect rotational vegetable crops in Florida. **Pest management science**, 67(7), pp.825-830, 2011.
- HALIMAH, M.; Y. A. TAN; B. S. ISMAIL. "Method development for determination of fluroxypyr in soil." **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, 39, no. 5-6: 765-777, 2004.
- HELLING, C.S.; DOHERTY, M.A. Improved method for the analysis of imazapyr in soil. **Pesticide science**, 45(1), pp.21-26, 1995.
- HOROWITZ M.; BLUMENFELD T.; HERZLINGER G.; HULIN N. Effects of repeated applications of ten soil-active herbicides on weed population, residue accumulation and nitrification. **Weed Res.** 14, 97-109, 1974.
- JACKSON, L.W. A history of utility transmission right-ofway management in New York State, pp 103–110. In: William, J.R., J.W. Goodrich-Mahoney, J.R. Wisniewski, and J.

Wisniewski (Eds.). Proceedings of the 6th International Symposium on Environmental Concerns in Rights-of-Way Management, February 24–26, 1997, New Orleans, LA. Elsevier Science, New York, NY, 1997.

JAMES, J. J.; BACH, E. M.; BAKER, K.; BARBER, N. A.; BUCK, R.; SHAHRTASH, M.; BROWN, S. P. Herbicide control of the invasive Amur honeysuckle (*Lonicera maackii*) does not alter soil microbial communities or activity. **Ecological Solutions and Evidence**, 3(3), e12157, 2022.

KAISER P.; POCHON J. J.; CASSINI R. Influence of triazine herbicides on soil microorganisms. **Residue Rec.** 32, 211–233, 1970.

LATHA, P.C.; GOPAL, H. Effect of herbicides on soil microorganisms. **Indian J. Weed Sci.** 42 (3): 217-222, 2010.

LEWIS, J.A.; PAPAIVIZAS, G.C.; HORA, T.S. Effect of some herbicides on microbial activity in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, 10(2), pp.137-141, 1978.

LIU, W.; PUSINO, A.; GESSA, C. High-performance liquid chromatographic determination of the herbicide imazapyr residues in water and soil. **Science of the total environment**, 123, pp.39-43, 1992.

LUPWAYI, N. Z., et al. "Soil microbial biomass and diversity after herbicide application." **Canadian journal of plant Science**, 84(2):677-685, 2004.

MAHAN, C.G.; ROSS, B.D.; YAHNER, R.T. The effects of integrated vegetation management on richness of native compatible flowering plants and abundance of non-compatible tree species on a right-of-way in central Pennsylvania, USA. **Arb & Urban For**, 46, pp.395-401, 2020.

MEYER, V. R. *Practical high-performance liquid chromatography*. **John Wiley & Sons**, 2013.

MITSCHERLICH, E.A. Das gesetz des minimums und das gesetz des abnehmenden bodenertrages. **Landwirtsch Jahrb**, v.38, p.537-552, 1909.

MONEY, P.R. "PG&E's Integrated Vegetation Management Program.". **Proceeding of the California Weed Science Society**, v. 52., p.74-82, 2000.

MONQUERO, P.A.; SILVA, P.V., 2021. Comportamento de herbicidas no ambiente. In: *Matologia: Estudos sobre Plantas Daninhas*, pp.253-294, 2021.

NAVIE, S.C.; HAMPTON, S.J.; BLOOR, N. Integrated management of mown vegetation in eastern Australia. In *17th Australasian weeds conference proceedings: new frontiers in New Zealand, together we can beat the weeds* (pp. 26-30), 2010.

NGUYEN, D.B.; ROSE, M.T.; ROSE, T.J.; VAN ZWIETEN, L. Effect of glyphosate and a commercial formulation on soil functionality assessed by substrate induced respiration and enzyme activity. **European Journal of Soil Biology**, 85, pp.64-72, 2018.

NIESSEN, W.M.A. *Liquid chromatography-mass spectrometry*. **CRC press**, 3 ed., v.97, 2006.

NOWAK, C.A.; BALLARD, B.D. A framework for applying integrated vegetation management on rights-of-way. **Arboriculture & Urban Forestry**, 31(1), p.28, 2005.

OECD. OCDE Guidelines for Testing of Chemicals, No 217 - Soil microorganisms: carbon transformation test., jan, 2000. Disponível em: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-217-soil-microorganisms-carbon-transformation-test_9789264070240-en.

PANETTIERI, M.; LAZARO, L.; LOPEZ-GARRIDO, R.; MURILLO, J.M.; MADEJOÑ, E. Glyphosate effect on soil biochemical properties under conservation tillage. **Soil Tillage Res.** 133, 16–24, 2013.

PASSOS, A.B.R.; SOUZA, M.F.; SILVA, D.V.; SARAIVA, D.T.; DA SILVA, A.A.; ZANUNCIO, J.C.; GONÇALVES, B.F.S. Persistence of picloram in soil with different vegetation managements. **Environmental Science and Pollution Research**, 25, pp.23986-23991, 2018.

PINNA, M.V.; CASTALDI, P.; GARAU, M.; BIANCO, A.; MULTINEDDU, C.; CESARANI, A.; SITZIA, M.; DIQUATTRO, S.; MANGIA, N.P.; GARAU, G. Sorption–Desorption of Imazamox and 2,4-DB in Acidic Mediterranean Agricultural Soils and Herbicide Impact on Culturable Bacterial Populations and Functional Diversity. **Agriculture**, 12(11), p.1862, 2022.

PITELLI, R.A. Competição e controle das plantas daninhas em áreas agrícolas. **Série técnica IPEF**, 4(12), pp.1-24, 1987.

PPDB. Pesticide Properties Database. **Footprint: creating tools for pesticide risk assessment and management in Europe**. Developed by the Agriculture & Environment Research Unit (AERU), University of Hertfordshire, funded by UK national sources and the EU-funded FOOTPRINT project (FP6-SSP-022704). Disponível em: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/ppdb/en/index.htm>>.

QUEIROGA, C. L. Analisadores de massa: QTRAP. In: Espectrometria de massas: princípios e aplicações, 2009. Disponível em: <http://www.espectrometriademassas.com.br/capitulos/>

RAJ, S.K.; SYRIAC, E.K. Herbicidal effects on the bio-indicators of soil health - a review. **J Appl Nat Sci**, 9:2438–2448, 2017.

ROSE, M.T.; CAVAGNARO, T.R.; SCANLAN, C.A.; ROSE, T.J.; VANCOR, T.; KIMBER, S.; KENNEDY, I.R.; KOOKANA, R.S.; VAN ZWIETEN, L. Impact of herbicides on soil biology and function. **Advances in agronomy**, 136, pp.133-220, 2016.

RUSSELL, K.N.; RUSSELL, G.J.; KAPLAN, K.L.; MIAN, S.; KORNBLUTH, S. Increasing the conservation value of powerline corridors for wild bees through

vegetation management: an experimental approach. **Biodiversity and conservation**, 27, pp.2541-2565, 2018.

SERAFINI, C.G.; CLERICI, N.J.; DELLA-FLORA, I.K.; DUPONT, G.K.; DA COSTA CABRERA, L.; DAROIT, D.J. Effects of atrazine on soil microbial indicators and the evaluation of herbicide attenuation in microcosms. **Journal of Soils and Sediments**, pp.1-11, 2022.

SINGH, M.K.; SINGH, N.K.; SINGH, S.P. Impact of herbicide use on soil microorganisms. **Plant responses to soil pollution**, pp.179-194, 2020.

TANG, XIAOLU, et al. "Global patterns of soil heterotrophic respiration—A meta-analysis of available dataset." **Catena**, 191: 104574, 2020.

TAYEB, M.A.; ISMAIL, B.S.; JANSAR, K.; GOH CHOO, T.A.; AFROZA, Y.M. Triclopyr 3, 5, 6-Trichloro-2-Pyridinyl Clean-Up Procedure from Soil, Sediment and Water Samples Using SPE-HPLC-VWD. **Sains Malaysiana**, 46(9), pp.1401-1405, 2017.

TOMINACK, R.L. Herbicide formulations. **J. Toxicol. Clin. Toxicol.** 38, 129–135, 2000.

WEBSTER, K.L.; WILSON, S.A.; HAZLETT, P.W.; FLEMING, R.L.; MORRIS, D.M. Soil CO₂ efflux and net ecosystem exchange following biomass harvesting: Impacts of harvest intensity, residue retention and vegetation control. **Forest Ecology and Management**, 360, pp.181-194, 2016.

YAHNER, R.H.; HUTNIK, R.J. Integrated vegetation management on an electric transmission right-of-way in southeastern Pennsylvania, US. **Arboriculture & Urban Forestry**. Sep 1;31(5):263, 2005.

YAHNER, R.H. WILDLIFE HABITAT, HERBICIDES, AND RIGHTS-OF-WAY MAINTENANCE—INTEGRATED VEGETATION MANAGEMENT AND THE WIRE-BORDER ZONE METHOD. **Natural Areas Journal**, 26(2), pp.114-115, 2006.

ZABALOY, M.C.; GARLAND, J.L.; GOMEZ, M.A. An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2, 4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the pampas region, Argentina. **Applied soil ecology**, 40(1), pp.1-12, 2008.

ZAIN, N.M.M.; MOHAMAD, R.B.; SIJAM, K.; MORSHED, M.M.; AWANG, Y. Effects of selected herbicides on soil microbial populations in oil palm plantation of Malaysia: a microcosmo experiment. **Afr J Microbiol Res.** 7:367–374, 2013.