

5 Materiais e métodos

5.1 Coleta de amostras de solo da área estudada

A coleta de amostras de solo foi feita em 2 campanhas de campo. Inicialmente foram coletadas 12 amostras indeformadas para a análise micromorfológica, sendo 3 amostras para cada sistema em diferentes profundidades. Nos mesmos pontos foram coletadas amostras deformadas para o estudo mineralógico do solo.

Na segunda campanha, foram coletadas amostras para o fracionamento físico e químico da matéria orgânica e para a análise cromatográfica. Foram coletadas 12 amostras deformadas de aproximadamente 1,5 kg de solo, sempre nos mesmos pontos da campanha anterior e com a mesma metodologia de coleta. No **Apêndice 1** estão descritos os locais de amostragem e a codificação das amostras.

5.2 Determinação mineralógica dos constituintes do solo

As fases mineralógicas das amostras de solo foram determinadas utilizando a técnica de difração de raios-X (DRX) e microscopia, através da descrição de lâminas delgadas. Foram analisadas amostras coletadas nos diferentes Sistemas e em 3 profundidades (**Apêndice 1**). A metodologia de preparação das amostras está descrita no **Apêndice 2**.

As análises foram realizadas no difratômetro de raios-X do Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia (DCMM) da PUC-Rio e do Centro de Tecnologia Mineral/MCT (CETEM).

Os difratogramas de raios-X (DRX) das amostras analisadas no DCMM, foram obtidos pelo método do pó, foram coletados em um equipamento difratômetro D5000 (Siemens), tubo de raios-X de alvo de cobre, filtro de níquel para absorver as radiações branca e $k\beta$, detector do tipo contador proporcional, velocidade do goniômetro e as condições de operação foram: radiação Cu $K\alpha$ monocromador:

grafite (40 kV/30 mA); velocidade do goniômetro de 2°/minuto e coletados de 5 a 80° 2 θ .

Os difratogramas de raios-X (DRX) das amostras analisadas no CETEM, também foram obtidos pelo método do pó, mas coletados em um equipamento Bruker-AXS D5005 equipado com espelho de Goebel para feixe paralelo de raios X, nas seguintes condições de operação: radiação Co K α (35 kV/40 mA); velocidade do goniômetro de 0,02° 2 θ por passo com tempo de contagem de 1,0 segundo por passo e coletados de 5 a 80° 2 θ . As interpretações qualitativas de espectro foram efetuadas por comparação com padrões contidos no banco de dados PDF02 (ICDD, 1996) em software Bruker Diffrac^{Plus}.

5.3 Análise micromorfológica do solo

Para a descrição micromorfológica foram coletadas 12 amostras indeformadas de solo em caixas de alumínio, no tamanho de 12x8 cm e 4 cm de profundidade, como os solos são friáveis, foram feitas trincheiras com aproximadamente 1 metro de profundidade, de maneira que as amostras não se deformassem.

Em seguida essas amostras passaram por um processo de preparação descrito por Filizola & Gomes (2004) para a confecção das lâminas delgadas, que consistiu na impregnação com um material com resina plástica colorida, que deu as amostras a coerência necessária para a preparação das lâminas. A impregnação não afetou o arranjo dos constituintes e nem as propriedades óticas do solo.

As lâminas foram observadas no microscópio petrográfico do Departamento de Ciência dos Materiais e Metalurgia da PUC-Rio, conforme as recomendações de Castro (2002) (**Apêndice 3**). As imagens foram capturadas com uma câmera acoplada ao microscópio óptico e processadas utilizando o software KS-400.

A análise micromorfológica foi feita em todos os quatros sistemas e em três profundidades diferentes (**Apêndice 1**), 3 lâminas por profundidade, totalizando 12 lâminas grandes (12x8 cm) e 36 lâminas pequenas (3x2).

Foram descritos os tipos e formas de poros, esqueleto e plasma, além dos aspectos ligados a ação biológica, tentando verificar e comparar as alterações sofridas nos diferentes sistemas, devido o preparo e manejo do solo.

5.4

Fracionamento físico da M.O.S. por densimetria e granulometria

A metodologia utilizada neste trabalho segue o procedimento laboratorial descrito por Sohi *et al.* (2001) e adaptada por (Roscoe & Machado, 2002) para estudar as propriedades físicas da matéria orgânica do solo, através dos métodos densimétrico e granulométrico.

Foram analisadas 12 amostras, uma de cada sistema estudado (S1, S2, S3 e S4) e em três profundidades diferentes (0-10, 10-20, e 25-40 cm) (**Apêndices 1**). Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização Física de Solos da Embrapa-Solos. Os detalhes deste procedimento estão descritos no **Apêndices 5**.

5.5

Fracionamento químico da M.O.S.

O fracionamento químico da MOS consiste na extração das frações húmicas a partir da sua solubilidade em meio aquoso em função do pH da solução extratora, resultando em três frações principais: ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) e humina (H).

Benites *et al.* (2003), relatam que a Sociedade Internacional de Substâncias Húmicas (IHSS) recomenda um método para a extração das substâncias húmicas de material de solo e posterior fracionamento em ácidos húmicos, fúlvicos e humina, baseado na solubilidade diferencial destas frações em meio alcalino e ácido. Mas, este método é laborioso e usado para se extrair substâncias húmicas com alto grau de pureza para fins de caracterização.

Os mesmos autores sugerem uma adaptação desta metodologia de extração e fracionamento, visando à quantificação das frações húmicas por meio de procedimento simplificado e de fácil execução. Esta metodologia pode ser usada para classificação de solos, como indicadores do efeito do manejo ou para estudos

da dinâmica de carbono no solo (Swift, 2001), fornecendo uma informação complementar ao teor de carbono orgânico total do solo.

Durante o desenvolvimento da pesquisa utilizou-se a metodologia descrita por Benites *et al.* (2003). Foram analisadas 60 amostras no total. Cinco amostras para cada profundidade dentro de cada sistema.

Os ensaios foram realizados no laboratório de caracterização física de solos da Embrapa-Solo. Os procedimentos metodológicos utilizados para extração da matéria orgânica do solo estão descritos passo a passo nos **Apêndices 7 e 8**.

5.6 Estudo das propriedades químicas do solo

No estudo das propriedades químicas do solo, foram analisadas os elementos Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} , H^+ , Na^+ , K^+ , além da capacidade de troca catiônica e saturação de bases, nas 3 profundidades estudadas e nos 4 sistemas.

As análises foram realizadas no laboratório de caracterização química de solos da Embrapa-Solo, seguindo os procedimentos metodológicos descritos no Manual de métodos de análise de solo.

5.7 Procedimento adotado para extração do 2,4-D do solo e análise por cromatografia líquida de alta performance (CLAE)

Vários procedimentos de extração do herbicida 2,4-D do solo para análise por cromatografia líquida ou gasosa foram pesquisados, entre eles podemos citar os seguintes autores: Sánchez-Brunete *et al.* (1994), Johnson, W. G. *et al.* (1995a), Johnson *et al.* (1995b), Thorstensen, C. W. & Christiansen, A. (2001), Spadotto, C. A *et al.* (2001), Amarante Jr. *et al.* (2003).

Os parâmetros de análise de 2,4-D por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) são descritos por: Di corcia & Marchetti (1991), Coquart, V. & Hennion, M. C.; (1993), Di corcia & Marchetti (1992), Chaudahary, A. J. *et al.* (2001), Thorstensen, C. W. & Christiansen, A. (2001), Spadotto, C. A *et al.* (2003), Kashyap, S. M. *et al.* (2005) e Amarante Jr. *et al.* (2003b,c). A **Tabela 5.1**, apresenta um

resumo dos parâmetros cromatográficos utilizados por estes autores em suas pesquisas.

Dos autores acima citados os procedimentos adotados neste trabalho foram os descritos Kashyap, S. M. *et al.* (2005) e Amarante Jr. *et al.* (2003b,c). (**Apêndice 10**), por melhor se adequar a nossa necessidade de tempo, facilidade de extração e de equipamento. Os procedimentos para preparação da solução padrão, branco, ensaio de recuperação, e avaliação da extração do 2,4-D do solo se basearam nos experimentos descritos por Amarante Jr. *et al.* (2003b,c), sendo apresentado no **Apêndice 10**.

Os procedimentos de preparação da solução padrão, teste de recuperação e extração do 2,4-D do solo foram realizados no Laboratório de Estudos Marinhos e Ambientais do Departamento de Química-PUC-Rio. Já a quantificação do herbicida foi feita no Labaguas do Departamento de Química-PUC-Rio. Os reagentes utilizados (metanol e diclorometano) foram de grau analítico (99%), padrão (HPLC) da marca Mallickrodt. O padrão de referência 2,4-D (99%) foi obtido da Aldrich.

As análises foram realizadas usando um sistema cromatográfico Varian ProStar modelo 325 UV-Vis, equipado com um detector UV. O composto 2,4-D foi analisado utilizando uma coluna Microsorb C18 (15 x 4,6mm, D.I., 5 μ m).

Foram analisadas amostras de solo coletadas em duas campanhas de campo com diferença de aproximadamente 12 meses, a primeira em fevereiro de 2007 e a segunda em janeiro de 2008. O total de amostras analisadas foram de 72, sendo 3 amostras para cada profundidade estudada dos 4 sistemas. Cada amostras teve duas leituras no cromatógrafo, com um total de 144 leituras.

Tabela 5.1. Resumo dos parâmetros cromatográficos utilizados por alguns pesquisados.

Metodologia						
Tipo de coluna	Fase móvel	Fluxo	Deteção	LD/LQ	Observações	Referência
C-18	TFA 0,05% em água e acetonitrila 0,025% de TFA (60:40) linearmente até 67% de acetonitrila em 20 min.	1,5mL/min	UV (230 nm)	0,03 µg L ⁻¹		Di corcia & Marchetti (1991)
C-18	(a) Metanol e (b) ácido perclórico (gradiente)	1mL/min.	UV	15 µg L ⁻¹		Coquart & Hennion (1993)
C-18	(a) Metanol:acetonitrila (82:18) e (b) água:TFA (0,17%)		UV	6,8 ng.L ⁻¹ / 5 x LD		Di Corcia & Marchetti (1992)
C-18	Metanol/solução tampão (pH 3)		UV (240nm)			Chaudahary <i>et al.</i> (2001)
C-8	20mM de fosfato tampão (pH 3) acetonitrila (65:35)	1mL/min.	UV (200nm)		Volume de injeção 50µL	Thorstensen & Christiansen (2001)
C-18	Metanol:água(70:30v/v) e cloreto de tetrabutilamônio a 0,01M		228nm			Spadotto, C. A <i>et al.</i> (2003)
C-18	Acetonitrila:água (75:25 v/v)	1mL/min.	228nm		Volume de injeção 3µL Eluição isocrática	Kashyap, S. M. <i>et al.</i> (2005)
C-18	Metanol:Solução tampão (50:50v/v)	0,7mL/min	230nm		Volume de injeção 20µL Eluição isocrática	Amarante Jr. <i>et al.</i> (2003 b,c)