

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

**ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DO ÁCIDO 2,4-
DICLOROFENOXIACÉTICO EM FORMULAÇÕES DE LIBERAÇÃO
CONTROLADA**

Autora: Josefina Aparecida de Souza

Orientador: Prof. Dr. Nelson Eduardo Durán Caballero

Co-orientador: Dr. André Luis Ferraz

Doutorado em Ciências

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida por Josefina Aparecida de Souza e aprovada pelos membros da Banca Examinadora em 8 de março de 1999.

UNIDADE	IQ
N.º CHAMADA:	UNICAMP
	So89e
V.	Ex.
TOMBO BC/	39209
PROC.	22/9/99
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	22/10/99
N.º CPD	

CM-00136446-2

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

So89e Souza, Josefina Aparecida de
Estudo da biodegradação do ácido 2,4-diclorofenoxiacético em
formulações de liberação controlada / Josefina Aparecida de
Souza. - - Campinas, SP: [s.n.], 1999.

Orientador: Nelson Eduardo Durán Caballero

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas. Instituto de
Química.

1. Lignina. 2. Perdas por degradação. 3. Herbicida. I. Caballero,
Nelson Eduardo Durán. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Química. III. Título.

Aos Mestres: Artur, Aparecida e Ximoda

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Nelson Durán, por sua orientação marcada pela grande liberdade no desenvolvimento do trabalho e incentivo a participação em eventos científicos .

Ao Dr. André Ferraz pela imprescindível co-orientação.

À Dra. Elisa Esposito pela Amizade e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Recursos Renováveis, Universidade de Concepción - Chile, nas pessoas de Juanita Freer e Jaime Baeza , pela disponibilidade de seus equipamentos e pessoal.

Ao Departamento de Biotecnologia da FAENQUIL, pela disponibilidade de seus laboratórios e equipamentos.

A todos os funcionários do Instituto de Química que contribuíram para o bom andamento deste trabalho.

À Milva e Inez Assis, pela participação ativa nos experimentos iniciais deste trabalho.

À todos os Amigos do Laboratório de Química Biológica (UNICAMP) e do Departamento de Biotecnologia da FAENQUIL pela harmonia e amizade que tomaram o andamento deste trabalho prazeroso.

À Elaine e Marcelo que tomaram minha estadia no Chile muito agradável.

À Família Predião, Mariela, Steffen e Fabrícia, e seus novos membros, Neta de Chico Pinto, Ka, Vidas-Boas e Ximoda, que fizeram os bons e “maus” momentos desta etapa mais divertidos e floridos.

À Maria Eunice e Lilia pela hospitalidade e a Amizade com “A” maiúsculo mesmo.

À Cécilia, Rúbens e a comunidade Bahá'í pela participação especial nas horas mais escuras.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Índice	
Lista de abreviaturas	i
Resumo	ii
Summary	iii
Curriculum	iv
I - Introdução	1
I.1 - Lignina	2
I.2 - Biodegradação de defensivos agrícolas	8
II Objetivo	26
III – Parte experimental	27
III.1 – Obtenção da formulação	27
III.2 – Ensaio de degradação do 2,4-D por microrganismos	27
III.2.1 – Ensaio de degradação do 2,4-D por <i>P. chrysosporium</i>	27
III.2.2 – Degradação do 2,4-D por <i>P. putida</i>	28
III. 2.3 – Determinação das enzimas extracelulares	28
III.2.3.1 - Manganês peroxidase	28
III.2.3.2 - Lignina peroxidase	29
III. 2.4 – Determinação das enzimas intracelulares	29
III.2.4.1 - Pirocatecase	30
III.2.4.2 - Metapirocatecase	30
III.2.5 - Determinação de inibição das enzimas MnP e LiP	30
III.3. - Degradação do 2,4 - D em solo	31
III 3.1 – Sistema sem estimulação inicial dos microrganismos	31
III3.2 – Sistema com estimulação inicial dos microrganismos	32
III.4. – Extração de 2,4-D das formulações e dos solos	32
III.5 – Determinação de metabólitos	33
III.5.1 – Derivatização das amostras	33
III.5.2 Análise por CG/EM	34
III.6 – Determinação das modificações na matriz polimérica causada pela biodegradação	34

III.6.1 Determinação da cinética de liberação do 2,4-D	34
III. 6.2. - Análise por microscopia eletrônica de varredura	34
III.6.3 - Análise por FTIR	35
III.7 - Determinação de 2,4-D por CLAE	35
IV - Resultados e discussão	36
IV.1 - Ensaio de biodegradação com microrganismos isolados	36
IV.1.1- Biodegradação de 2,4-D livre e em formulação de liberação controlada	36
IV.1.1.1 - Degradação por <i>P.chrysosporium</i>	36
IV.1.1.2 - Degradação por <i>P. putida</i>	39
IV.1.1.3 - Determinação de enzimas	40
IV.2 – Ensaio de degradação de 2,4-D em solo	43
IV.2.1 - Biodegradação de 2,4-D livre e em formulação de liberação controlada	43
IV.2.1.1 - Sistema sem estimulação dos microrganismos	43
IV.2.1.2 - Sistema com estimulação do crescimento dos microrganismos	46
IV.3 – Determinação de metabólitos	49
IV.4 - Alterações da matriz polimérica ocorrida durante a biodegradação	54
IV. 4.1 - Determinação da cinética de liberação do 2,4-D	54
IV.4.2 - Microscopia eletrônica de varredura	57
IV.4.3 - Análise por FTIR	62
V - Conclusões	67
VI.- Referências	69
Apêndices	76
Extração do 2,4-D do solo e das formulação	76
Cromatogramas de CG e espectros de massa do 2,4-D e seus isômeros derivatizados	77
Análise de TGA e DSC da lignina	88

Lista de abreviaturas

atm - Atmosfera

BTFA - Bis-(trimetilsilil)-trifluor-acetoamida

CG - Cromatografia gasosa

CG/EM - Cromatografia gasosa/espectrometria de massa

CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência

DA - Defensivo agrícola

DSC - Calorimetria diferencial de varredura

FLC - Formulação de liberação controlada

FTIR - Infra vermelho com transformada de Fôurier

LiP - Lignina peroxidase

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MnP - Manganês peroxidase

MO - Matéria orgânica

r^2 - coeficiente de correlação

SCEM - Sistema com estimulação dos microrganismos

SSEM - Sistema sem estimulação dos microrganismos

TGA - Análise termogravimétrica

TR - Tempo de retenção

UV - ultra violeta

RESUMO**ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DO ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO EM FORMULAÇÕES DE LIBERAÇÃO CONTROLADA**

Autora: Josefina Aparecida de Souza,
Orientador: Nelson Eduardo Durán Caballero
Co-orientador: André Luís Ferraz

Palavras chaves: lignina, perdas por degradação e herbicida

O herbicida 2,4-D de grau técnico (ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 2,4-D livre), e o herbicida retido em formulações de liberação controlada à base de lignina (2,4-D/FLC), foram submetidos à biodegradação. Para isto foram empregados a bactéria *Pseudomona putida*, o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, e microflora do solo. Diferentes taxas de degradação foram observadas de acordo com as diferentes concentrações iniciais do herbicida no meio. Nas concentrações iniciais de 5, 10 e 20 mg/L de 2,4-D livre, *P. chrysosporium*, degradou 12, 45 e 56% do herbicida, respectivamente. A 40, 60 e 80 mg/L de 2,4-D, observou-se 35% de degradação, e a 100 mg/L 25% de degradação. Para as FLC observou-se 20, 43, 46 e 42% de degradação para 10, 20, 40 e 60 mg/L de 2,4-D, respectivamente. Os experimentos com *P. putida* e 2,4-D livre apresentaram 19% de degradação a uma concentração de 10 mg/L. Acima desta concentração, nenhuma degradação foi observada. Já para a FLC a 10 e 100 mg/L de 2,4-D, foram observados 29 e 12% de degradação, respectivamente. Os experimentos em solo foram realizados à concentração constante de 9,4 Kg/ha de 2,4-D. Em solo sem estimulação do crescimento dos microrganismos, o 2,4-D livre apresentou entre 7-10% de degradação, e o solo com estimulação, $44,5 \pm 4,5\%$. Já o 2,4-D em FLC apresentou $17 \pm 3\%$ e nenhuma degradação para os solos com e sem estimulação do crescimento inicial dos microrganismos, respectivamente. A ausência de metabólitos da via degradativa do 2,4-D determinadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa, demonstrou que as condições empregadas nos ensaios de degradação, favoreceram a mineralização do herbicida. O aumento da porosidade da FLC após degradação pelo fungo e pela bactéria, observado através de análise de microscopia eletrônica de varredura, demonstrou que a formulação sofreu alterações físicas após o processo de degradação. A hidrólise da função éster entre o 2,4-D e lignina, foi observada através de análise por FTIR das FLC. Estas modificações físicas e químicas resultaram num aumento da velocidade de liberação do herbicida da FLC. As constantes de difusão aparente do 2,4-D da FLC passaram de 9 dias^{-1/2} para 17 e de 12 dias^{-1/2} para 16 dias^{-1/2}, após tratamento com o fungo e a bactéria, respectivamente. A FLC atuou como uma barreira à biodegradação do ingrediente ativo presente em seu interior. Porém, maiores ou menores taxas de degradação do ingrediente ativo dependeram da concentração inicial proporcionada pelo sistema de liberação controlada.

SUMMARY

STUDY OF BIODEGRADATION OF 2,4-D DICHLOROPHENOXYACETIC ACID IN CONTROLLED RELEASE FORMULATIONS

Author: Josefina Aparecida de Souza

Advisor: Nelson Eduardo Durán Caballero

Co-advisor: André Luís Ferraz

Key words: lignin, degradation loss and herbicide

Technical grade 2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid, i.e., free 2,4-D), and the herbicide retained in lignin-based controlled release formulations (2,4-D/CRF), were submitted to biodegradation. For this purpose, *Pseudomonas putida* bacteria, *Phanerochaete chrysosporium* fungus and soil microflora were utilized. Different degradation rates were observed in accordance with different initial herbicide concentrations in the medium. In the initial free 2,4-D concentrations of 5, 10 and 20 mg/L, *P. chrysosporium* degraded 12, 45 and 56% of the herbicide, respectively. For 40, 60 and 80 mg/L of 2,4-D, 35% degradation was observed, and for 100 mg/L, 25%. For the CRF, 20, 43, 46 and 42% degradation for 10, 20, 40 and 60 mg/L was observed, respectively. Experiments with *P.putida* and free 2,4-D presented 19% degradation in a concentration of 10 mg/L. In concentrations greater than 10 mg/L, no degradation was observed. Comparatively, for CRF of 10 and 100 mg/L of 2,4-D, 29 and 12% degradation was observed, respectively. Experiments in soil were carried out at a constant 2,4-D concentration of 9.4 Kg/ha. In soil not stimulated by growth of microorganisms, free 2,4-D presented between 7-10% degradation, and stimulated soil, $44.5 \pm 4.5\%$ degradation. In comparison, the CRF 2,4-D presented $17 \pm 3\%$ degradation and no degradation for soils with and without stimulation of the initial growth of the microorganisms, respectively. The absence of metabolites of the 2,4-D degradation was determined by gas chromatography coupled with mass spectrometry, and demonstrated that the conditions utilized in the degradation experiments favored the mineralization of the herbicide. A CRF porosity increase after degradation by fungus and bacteria was observed by means of scanning electronic microscopy, and demonstrated that the formulation had undergone physical and chemical modifications after the degradation process. The hydrolysis of the ester group between the 2,4-D and lignin was observed by FTIR analysis of the CRF. These physical and chemical modifications resulted in a herbicide release rate increase in the CRF. Apparent 2,4-D diffusion constants of the CRF went from 9 days^{-1/2} to 17, and from 12 days^{-1/2} to 16 days^{-1/2} after treatment with fungus and bacteria, respectively. The CRF acted as a barrier to biodegradation of the active ingredient present in the formulation. However, greater or smaller degradation rates of the active ingredient depended on the initial concentration provided by the controlled release system.

André R. Coutrim, Josefina Aparecida de Souza, André Luiz Ferraz, Flávio Teixeira da Silva e Richard Wilkins.

"The Influence of Different Lignins on the Controlled-Release of 2,4-D and Ametrin Herbicides." Proc Third Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components, volume IV, p. 278-281 - Belo Horizonte - Brasil (1993).

Josefina A. Souza

Utilização de Lignina para Obtenção de Formulação de Liberação Controlada do Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético, 1994. Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP - Campinas S.P. Brasil.

Souza, J.A., Ferraz, A., Mei L..I., da Silva, F.T., Cotrim, A. e Rocha. G.J.M.

"Influences of the Structural Lignin Characteristics on the Release Rate of the Herbicides 2,4-D in Controlled Release System." Proc The Fourth Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins And Other Wood Components, volume 5, p.237-238 - Recife - (1995).

Souza, J.A., Ferraz, A., Esposito, E. e Durán, N.

"O Papel da Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase de *Phanerochaete chrysosporium* na Degradação do Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético" Anais. I Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente, volume 1, p.232 - 237 - Campinas - Brasil (1996).

Nelson Durán, Josefina A. Souza and André Ferraz.

Sugar Bagasse Lignin: Characterization and Use as a Controlled Release Device for 2,4-D and Its Biodegradation. Proc. Third International Non-Wood Fiber Pulping and Papermaking Conference, p.10-14 - China (1996)

André Ferraz, Josefina A. Souza, Flávio T. Silva, Adilson R. Gonçalves, Roy E.

Bruns, André R. Cotrim and Richard M. Wilkins

Controlled-Release of 2,4-D from Granule Matrix Formulations Based on Six Lignins.

J. Agric. Food. Chem. 1997, 45:1001-1005.

Souza, J.A., Ferraz, A. and Durán, N.

Biodegradation of 2,4-D in a Lignin-Based Controlled-Release System by *Pseudomonas putida*. Proc. International Symposium on Emerging Technologies of Pulping & Papermaking of Fast-Growing Wood, p. 342-349P – Guangzhou - China (1998).

J.A. Souza, A. Ferraz, E. Esposito e N. Durán

Estimulação dos Microrganismos Indígenos na Degradação do Herbicida 2,4-D como Estratégia de Biorremediação. Anais. II Reunião Nacional de Microbiologia Aplicada ao Meio Ambiente, Campinas - Brasil (1998) no prelo.

Curriculum Vitae

1- Dados Pessoais

Nome: Josefina Aparecida de Souza - Estado Civil: Solteira

Data de Nascimento: 28/09/66

RG nº: 07699498-7 - CPF nº: 964492687-00

Endereço: Rua João Batista de Nascimento 130, Vila Nilton Teixeira.

Lavras M.G. - CEP 37200 - 000

Fone residencial: (035) 821 8521

2 - Formação Acadêmica

Doutorado: Ciências - Área de Química Orgânica

Instituto Química - UNICAMP - Campinas S.P.

Título da tese: Estudo da Biodegradação do Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético em formulação de Liberação Controlada

Período: Setembro 1994 - Março 1999.

Mestrado: Engenharia Química - UNICAMP -

Faculdade de Engenharia Química - Departamento de Tecnologia de Polímeros - UNICAMP - Campinas S.P.

Título da tese: Utilização de Lignina para Obtenção de Formulação de Liberação Controlada do Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético.

Período: Março 1992 - Agosto de 1994

3º Grau - Engenharia Industrial Química - FAENQUIL - Conclusão 1991 - Lorena SP

3 - Publicações:

Josefina Aparecida de Souza, George Jackson Moraes Rocha, André Luiz Ferraz e Flávio Teixeira da Silva

"Caracterização Física e Química de Lignina Kraft de Eucalipto e de Bagaço de Cana Pré-tratado com Explosão a Vapor. Proc CICTE 90 - Congresso de Iniciação Científica Tecnológica de Engenharia, Volume IX, p 394 - São Carlos - Brasil (1990).

André Luiz Ferraz, Josefina Aparecida de Souza e Flávio Teixeira da Silva

"Characterization of Lignins Used as Matrix in Controlled Release Formulation: Steam Exploded Sugar Cane Bagasse and Kraft Eucalyptus Lignins. Proc. Second Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Other Wood Components, volume III, p. 173-177 - Campinas - Brasil (1991).

I – INTRODUÇÃO

Desde seu surgimento, as atividades agrícolas vem passando por vários processos de desenvolvimento: as ferramentas manuais, a utilização de animais (arado), as máquinas e a utilização de produtos químicos, os chamados defensivos agrícolas (DA). Atualmente a utilização de DA alcançou níveis mundiais, sendo que os Estados Unidos representa o maior mercado, seguido do Japão e do Brasil (1,5 bilhões de dólares somente no Brasil em 1995) [De Baptista, 1996]. Dentro deste mercado, os herbicidas merecem destaque, representando 55% do total, seguido de 22% de inseticidas, 15% de fungicidas e 8% de outros similares [De Baptista, 1996]. O herbicida 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) é bastante usado no combate de plantas pertencentes a espécies de folhas largas. Das 30.000 toneladas de herbicidas empregadas em gramados residenciais nos Estados Unidos, o 2,4-D é um dos mais comumente usados [Michel e col., 1995].

A utilização de DA é acompanhada de inúmeras perdas ocasionadas por lixiviação, degradações química, fotoquímica e biológica, absorção no solo e arraste pelo vento durante aplicações por pulverização. Devido a estas perdas, super dosagens dos DA se fazem necessárias a fim de alcançar o efeito desejado. Estas dosagens são fonte de contaminação ambiental, além de aumentar significativamente o custo do DA por aplicação .

A liberação controlada é definida como um método em que os materiais bioativos se fazem disponíveis para um alvo específico, a uma taxa e duração pré-determinadas, para cumprir os efeitos necessários [Wilkins, 1983]. Através da diminuição do processo de lixiviação e da proteção do ingrediente ativo contra degradações, os dispositivos de liberação controlada visam amenizar os problemas apresentados pelas formulações convencionais, obtendo assim formulações menos tóxicas e mais eficazes.

Dentre os vários polímeros sintéticos e naturais estudados na obtenção de formulações de liberação controlada (FLC), a lignina merece destaque. Esta apresenta um lento processo de degradação, além de ser um material biodegradável, cujos produtos de degradação não são tóxicos.

A lignina utilizada neste trabalho é proveniente do bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor [Silva e Wikins,1992]. Essa lignina vem sendo estudada desde 1989 na obtenção de FLC [Souza e col., 1995, Ferraz 1992]. Várias etapas foram e estão sendo realizadas, envolvendo a caracterização física e química da lignina [Ferraz e col., 1992], a obtenção da FLC [Souza,1994] [Cotterill e col., 1996], a determinação da velocidade de liberação do herbicida [Ferraz e col., 1997], e a performance da FLC em campo [Cotrim e col., comunicação pessoal]. Porém, não é de nosso conhecimento uma avaliação da extensão da proteção que esse sistema de liberação controlada oferece contra processos de biodegradação.

Dentro deste contexto, o presente trabalho avaliou a degradação do herbicida 2,4-D livre e 2,4-D em FLC à base de lignina. A comparação do processo degradativo ocorrido nas duas formas do herbicida, permitiu avaliar o grau de proteção contra biodegradação oferecido pela lignina.

1.1 – Lignina

A lignina é um polímero natural formado basicamente por unidades fenilpropano, ligadas entre si em diversas posições. A biossíntese da lignina ocorre através da polimerização radicalar dos seus precursores: álcoois sinapílico, coniferílico e para-cumarílico. A polimerização é iniciada por peroxidases e H_2O_2 que, por desidrogenação dos álcoois precursores, produzem um radical fenoxi que sofre reações de acoplamento formando os dímeros que, por sua vez sofrem nova desidrogenação enzimática e o processo se repete

sucessivamente, levando à formação da macromolécula. Esse tipo de polimerização dá origem a um polímero tridimensional e amorfo. Os principais acoplamentos que ocorrem entre as unidades fenilpropano são do tipo: α -O-4 e β -O-4 (49-65%); β -5 (6-16%); 5-5(2-9%); e β - β (2-5%) (figura 1) [Fengel e Wegener, 1989]. Estas diferentes ligações entre carbono-carbono e ligações do grupo éteres, não prontamente hidrolisáveis, tornam a lignina uma macromolécula mais resistente a degradação microbiana do que a celulose e as hemiceluloses. Assim, ela provavelmente funciona como um agente protetor da degradação das paredes celulares das plantas [Chen e Chang 1985], além de apresentar uma função estrutural no complexo celular de plantas superiores, agindo como uma "cola" que confere coesão ao conjunto de células [Fengel e Wegener, 1989].

Devido à estrutura da lignina, macromolécula estereoirregular com acoplamentos inter-mônômeros do tipo carbono-carbono e éter, seu sistema decompositor deve ser extracelular, pouco específico e com mecanismo preferencialmente oxidativo a hidrolítico [Kent e Cullen 1998]. Estas características do sistema degradativo são encontradas em fungos de decomposição branca. Eles apresentam peroxidases e oxidases extracelulares que atuam sem especificidade via geração de radicais livres não estáveis, que sofrem uma variedade de reações de clivagens espontâneas, [Kent e Cullen, 1998].

As principais enzimas presentes em alguns fungos de decomposição branca, lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase (MnP) e lacase, agem diretamente ou indiretamente sobre a decomposição da lignina. Na figura 2 está ilustrada a ação destas enzimas sobre uma molécula de lignina.

A LiP é uma glicoproteína que contém ferro- protoporfirina IX (heme) como grupo prostético e requer peróxido de hidrogênio para sua atividade catalítica [Durán e Esposito, 1996]. Assim, a LiP é oxidada pelo H_2O_2 a um intermediário deficiente em dois elétrons, denominado composto I. Este retorna ao seu estado

original através de duas oxidações do substrato doador. A oxidação da lignina catalisada pela LiP inicia com a abstração de um elétron do anel aromático. O radical aril cátion resultante reage com ambos, cátion e radical, formando uma larga variedade de fragmentos de degradação [Kirk e Cullen, 1998].

A MnP como a LiP apresentam o ciclo catalítico convencional das peroxidases, sendo a primeira dependente do H_2O_2 e do íon Mn(II) como substrato. Durante o ciclo catalítico a MnP é oxidada através do H_2O_2 gerando um intermediário deficiente em dois elétrons, denominado o composto I. Este por sua vez, pode oxidar substratos fenólicos ou Mn(II). Já o intermediário deficiente em um elétron, composto II, aparentemente é reduzido somente pelo Mn(II). Nesta etapa o Mn(II) deve ser quelado através de ácidos orgânicos, tais como glicolatos e oxalatos, que estabilizam o Mn(III), e promovem sua liberação da enzima. Estes quelantes de Mn (III) são oxidantes difusíveis que podem agir a alguma distância da enzima. Porém, eles não são oxidantes fortes e não podem atacar as unidades não fenólicas da lignina. Eles atacam estruturas fenólicas, que alcançam aproximadamente 10% das unidades da lignina. O radical fenoxi da lignina, resultante da oxidação, sofre uma variedade de reações, algumas que resultam na clivagem do polímero dentro de certas unidades, entre os anéis aromáticos e o carbono α [Tuor e col., 1992, Wariishi e col., 1991, citados por Kirk e Cullen, 1998].

Lacases são oxidases que atacam fenóis, aminas aromáticas e outros substratos ricos em elétrons. Assim como os quelantes de Mn(III), elas oxidam as unidades fenólicas a radicais que podem levar a clivagem do carbono α aril. A catálise da lacase passa por 4 etapas de oxidação, transferindo os elétrons do oxigênio molecular reduzindo-os a água e retomando então a enzima ao seu estado original. A lacase pode oxidar unidades não fenólicas da lignina quando na presença de substratos auxiliares como ABTS (2,2, azino -bis- 3 etiltiazolina-6-sulfonato).

O estudo da biodegradação de lignina vem sendo realizado através de compostos modelos de lignina, utilizando enzimas ligninolíticas e fungos de decomposição branca, como o *Phanerochaete chrysosporium*. Compostos como vanilina, aldeído coniferílico, ácido vanílico, ácido benzoico entre outros, são formados nas principais reações que ocorrem na estrutura da macromolécula: clivagem oxidativa da cadeia lateral carbono α - carbono β e abertura oxidativa do anel aromático, figura 3.

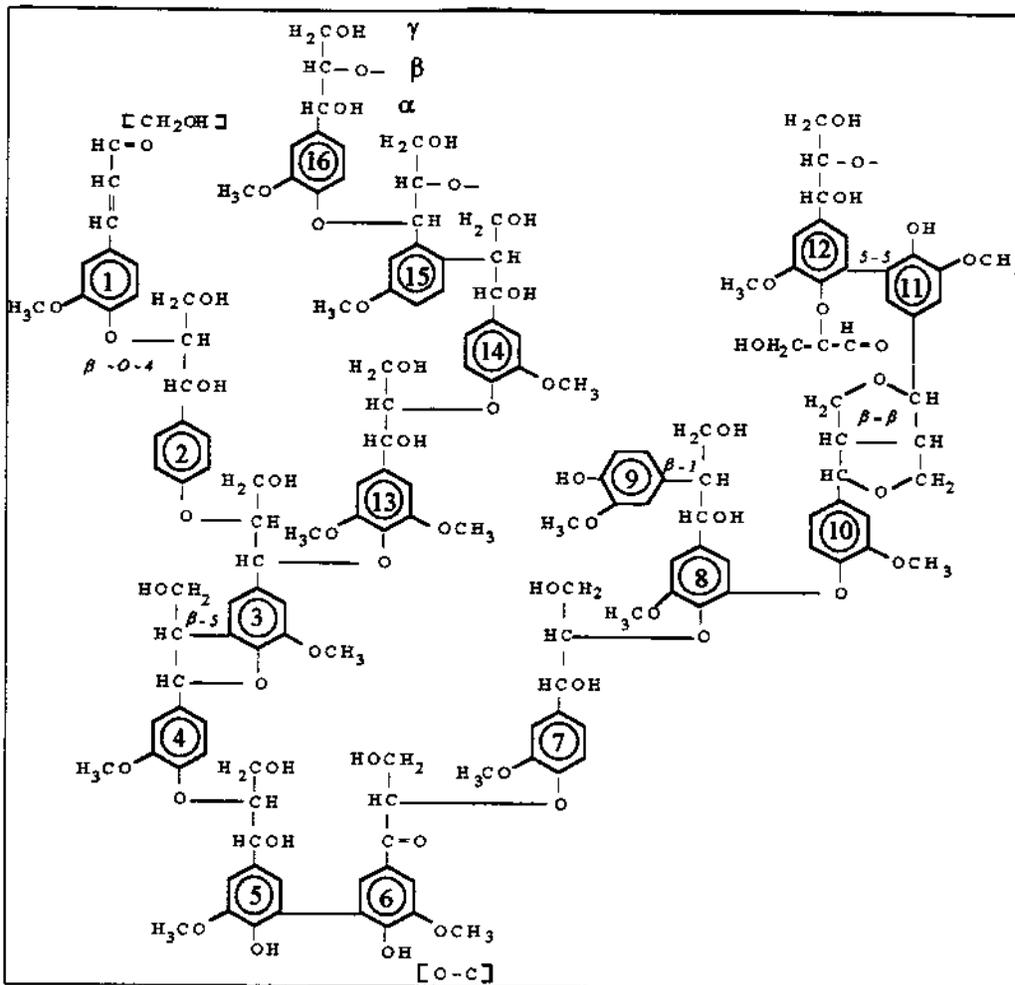


FIG. 1 - Estrutura possível para a lignina, proposta por Adler [Fengel e Wegener, 1989].
 Nota: Em destaque são indicados os termos utilizados para a nomenclatura de ligninas e os tipos de ligação mais freqüentes entre unidades fenilpropano.

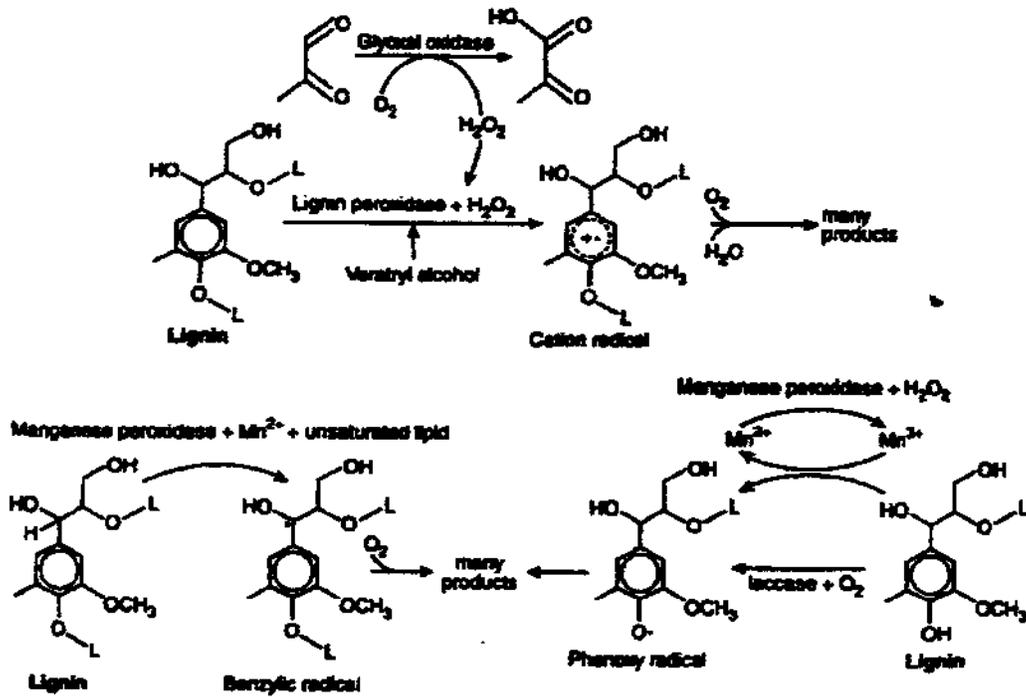


FIG. 2 – Esquema ilustrativo da atuação das enzimas ligninolíticas presentes em fungos de decomposição branca.

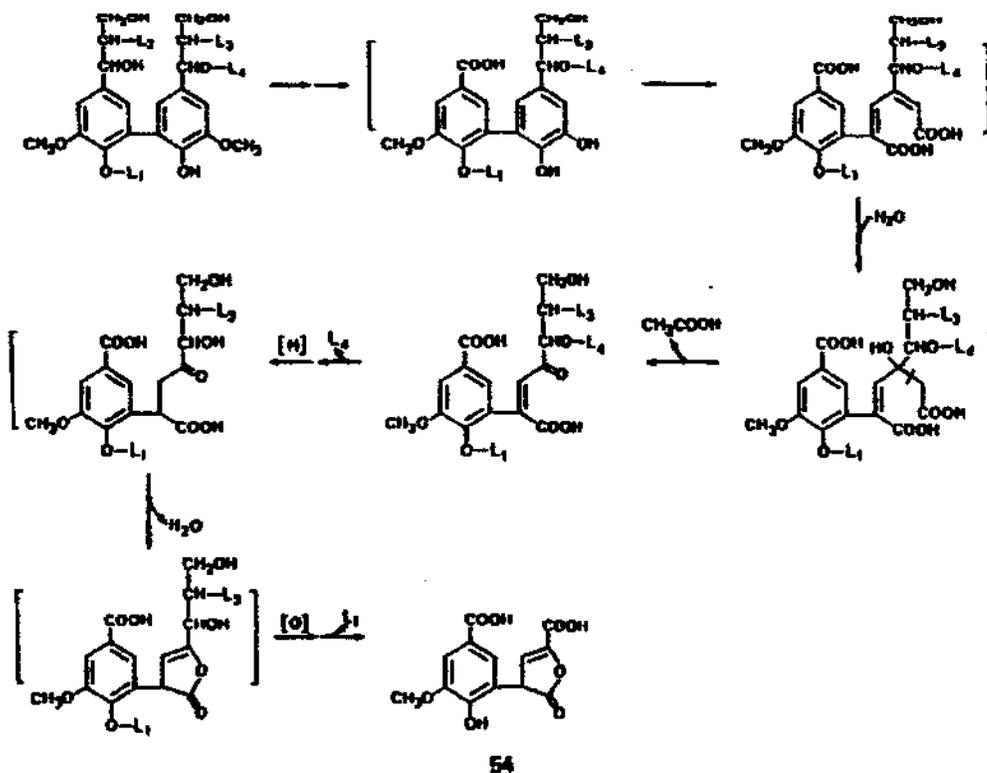


Fig. 3 - Esquema de um possível caminho de degradação por fungo de subestruturas fenólica 5-5' envolvendo clivagem da ligação da cadeia lateral C_α - C_β e clivagem do anel aromático.

I.2 - Biodegradação de Defensivos Agrícolas

Os herbicidas quando expostos ao meio ambiente sofrem degradação química, física e biológica. A biodegradação é a principal via de degradação de muitos herbicidas no ambiente [Mackay e Betts, 1989; Kearney e Kaufman, 1975].

Existe uma grande variedade de microrganismos capazes de degradar herbicidas [Kearney e Kaufman, 1975, Soccol e col., 1995]. Vários estudos sobre sua biodegradação estão sendo realizados, nos quais culturas puras, culturas mistas e a própria microflora do solo são os meios utilizados para a biodegradação de herbicidas e de suas combinações.

A biodegradação de ácidos fenoxiacéticos por bactérias ocorre por dois caminhos principais, de acordo com o composto intermediário:

1 - Via fenol correspondente, na qual o 2,4-D sofre inicialmente a perda da cadeia alquílica por meio da clivagem oxidativa ocasionada pela enzima 2,4-D mono oxigenase dando origem ao 2,4-diclorofenol [Helling e col., 1968, citado por Ditzelmuler e col., 1989]. Este é *orto* hidroxilado pela 2,4-diclorofenol hidrolase gerando o 3,5-diclorocatecol [Bollag e col., 1968, citado por Ditzelmuler e col., 1989]. O catecol sofre clivagem *orto* do anel aromático dando origem ao ácido 2,4-dicloromucônico por meio da catecol 1,2-dioxigenase (conhecida como pirocatecase) [Tiedje e col., 1969, citado por Ditzelmuler e col., 1989]. Outras reações, como lactonização e deslactonização, vão ocorrendo e gerando os demais metabólitos mostrados na figura 4.

2 - Via ácido hidroxifenoxiacético, na qual o 2,4-D é hidroxilado originando o ácido 2,4-dicloro-6-hidroxifenoxiacético. Este por clivagem da ligação éter perde a cadeia alcanóica gerando o 3,5-diclorocatecol. A partir da geração deste metabólito as duas vias degradativas passam a gerar os mesmos metabólitos, figura 4.

Baseados nas duas vias degradativas podemos observar a geração de

diferentes metabólitos no processo degradativo do 2,4-D.

Faukner e Woodcock [1965] utilizaram o fungo *Aspergillus niger* na degradação do 2,4-D e observaram a formação do ácido 2,4-dicloro-5-hidroxifenoxiacético e o ácido 2,5-dicloro-4-hidroxifenoxiacético, metabólitos semelhantes aos da via por bactérias, e o ácido 2,4-dicloro-6-hidroxi-fenoxiacético. Já Pieper e col. [1988] mostram o mesmo mecanismo da via fenol, citada anteriormente, para a degradação do 2,4-D pela bactéria *Alcaligenes eutrophus* JMP 134, cepa geneticamente modificada. Esta produziu as mesmas enzimas inicialmente presentes na degradação do 2,4-D pela bactéria *Arthrobacter* sp usada por Helling e col. [1968] e Tiedje e col. [1969]. A reação de degradação do DDT (1,1-bis (4-clorofenil) – 2,2,2-tricloroetano) por *P chrysosporium* [Bumpus e col., 1993, citado por Pasczynski e Crawford, 1995] ocorreu inicialmente através da hidroxilação e remoção de cloro, enquanto pela bactéria *Alcaligenes eutrophus* a etapa de hidroxilação e clivagem do anel aromático ocorreu antes da remoção do cloro [Nadeau e col., 1994, citado por Pasczynski e Crawford 1995].

A biodegradação dos pesticidas é bastante complexa e alguns fatores fundamentais devem ser considerados:

a - A diversificação e complexidade das vias metabólicas dos microrganismos.

b - A suscetibilidade de pesticidas à biodegradação, a qual parece ser uma propriedade intrínseca de cada composto, depende de características estruturais tais como grau de halogenação e outras [Mackay e Betts, 1989].

c - A conversão do composto inicial em produtos estáveis ou prontamente metabolizados, e a possibilidade destes produtos serem mais ou menos tóxicos em comparação ao seu precursor.

d - O tempo requerido para uma degradação substancial biológica do herbicida, que é extremamente variável, podendo ser de dias no caso de alguns

compostos tais como os carbamatos, a anos como no caso do DDT [Mackay e Betts, 1989].

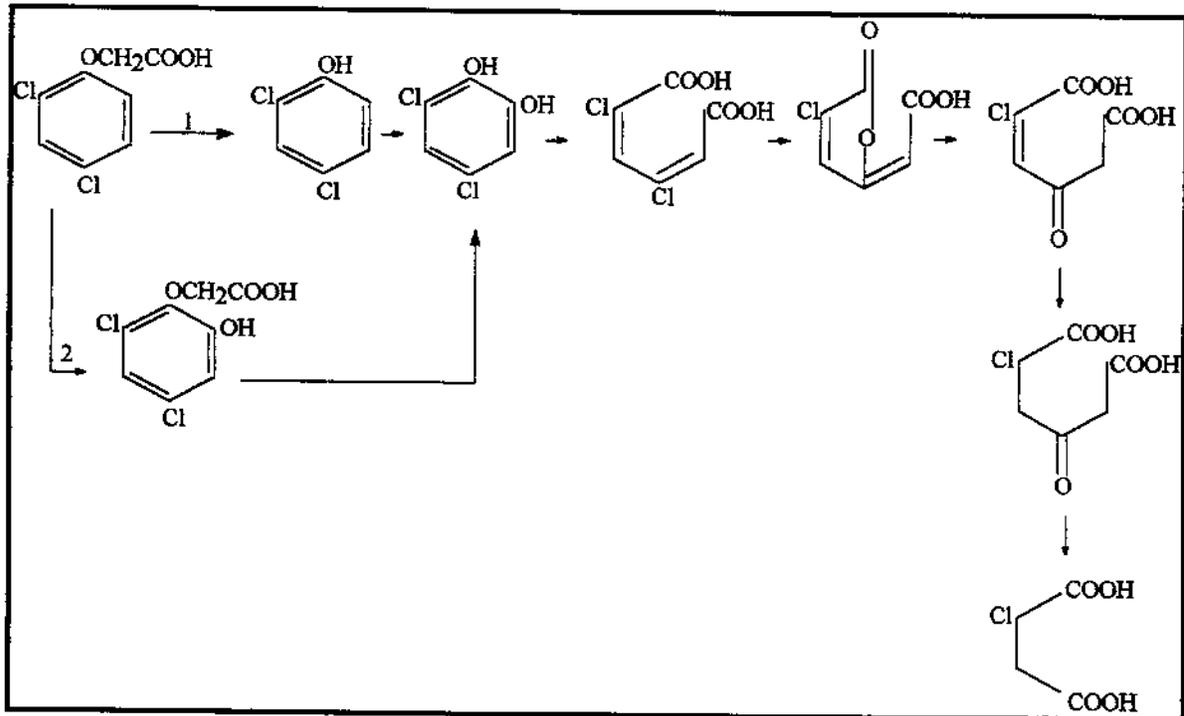


FIG.4 - Esquema dos dois caminhos para a biodegradação do 2,4-D por *Pseudomonas* sp e *Arthobacter* sp. A degradação por *Pseudomonas* sp ocorre via fenol correspondente (1). A degradação por *Arthobacter* sp ocorre pela via ácido 2,4-dicloro-6-hidroxi fenoxiacético (2) [Kearney e Kaufman, 1975].

O basidiomiceto *Phanerochaete chrysosporium* é um fungo de degradação branca que tem recebido bastante atenção na degradação da lignina, bem como de poluentes haloaromáticos [Paszczyński e Crawford, 1995]. Um exemplo de uso do *P.chrysosporium* na degradação e mineralização de compostos haloaromáticos foi o trabalho realizado por Yadav e Reddy [1993]. Eles estudaram a mineralização do 2,4-D e do ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) usando o *P.chrysosporium* ME-446 (ATCC) em meios oxigenados, agitados e estáticos,

com alta e baixa concentração de nitrogênio e a 37°C. A mineralização foi ensaiada em quatro combinações: [¹⁴C] 2,4-D; [¹⁴C] 2,4-D mais 2,4,5-T; [¹⁴C] 2,4,5-T e; [¹⁴C] 2,4,5-T mais 2,4-D. As concentrações foram de 5 mg/L para 2,4-D e 10 mg/L para 2,4,5-T. O 2,4-D e o 2,4,5-T foram simultaneamente mineralizados e nenhuma inibição na degradação foi observada. Pelo contrário, houve maior mineralização dos compostos quando ensaiados simultaneamente. Cerca de 36% de mineralização do 2,4-D puro contra 46% quando na presença de 2,4,5-T, e 24,9% de mineralização de 2,4,5-T puro contra 36,8% na presença do 2,4-D. A mineralização do [¹⁴C] 2,4-D a ¹⁴CO₂ foi observada em culturas com baixas concentrações de nitrogênio, tanto para a adição do 2,4-D no tempo zero, quanto para a adição a partir do sexto dia de cultivo. Estes resultados sugeriram que as possíveis enzimas utilizadas na mineralização do 2,4-D são produzidas continuamente e não é necessário uma adaptação do microrganismo para a degradação do herbicida. Após o 9º dia de cultivo em meio com baixa quantidade de nitrogênio houve uma substancial diminuição na mineralização do 2,4-D. Nestas condições foi adicionado glicose ao meio. O resultado foi um acentuado aumento na taxa de mineralização. Isso sustentou a extensiva degradação e mineralização do 2,4-D em meio com alta quantidade de nitrogênio e em meio contendo extrato de malte. Ensaio de determinação de lignina peroxidase (LiP) e manganês peroxidase (MnP) revelaram a produção dessas enzimas em meio com baixa concentração de nitrogênio porém, sua ausência em meio com alta concentração de nitrogênio e em meio com extrato de malte. Tanto a degradação como a mineralização ocorreram nos 3 meios, sendo mais acentuada no meio com alta concentração de nitrogênio e extrato de malte. Isso sugere que as enzimas LiP e MnP não são requeridas para degradar 2,4-D. Os experimentos realizados com um mutante de *P.chryso sporium*, incapaz de produzir LiP e MnP, confirmaram esta idéia. A degradação do 2,4-D em meio contendo extrato de malte foi maior em sistema sob agitação (48%) do que em sistema estático (36%).

O aumento da biodegradação de DA com o enriquecimento do meio, como ilustrado anteriormente [Yadav e Reddy, 1993], foi também observado em um solo pobre em matéria orgânica (latossolo vermelho-amarelo) [Musumeci, 1992, citado por Soccol e col., 1995]. A adição de sacarose ao solo acelerou a degradação de carbaril (1-naftil metil carbamato). Esse foi degradado em seis semanas contra 10 semanas no mesmo solo não enriquecido. Sua mineralização também foi favorecida, pois após 21 dias, a liberação de CO₂ foi cerca de 20 vezes maior do que no solo não enriquecido.

De acordo com a complexidade das vias metabólicas, existem evidências de que a biodegradação de um herbicida ocorre com a formação de metabólitos distintos, de acordo com o sistema microbiológico empregado.

Ryan e Bumpus [1989] estudaram a biodegradação do (2,4,5-T) por *P. chrysosporium* e compararam os resultados com sistemas bacteriológicos de degradação. A biodegradação foi realizada em meio limitado em nitrogênio (tartarato de amônio 1,2 mM) e em meio com nitrogênio em excesso (tartarato de amônio 12 mM). O 2,4,5-T foi mineralizado por *P. chrysosporium*, o que não ocorre durante a biodegradação por bactérias. A segunda diferença entre os dois sistemas refere-se à capacidade biodegradativa das bactérias. A biodegradação bacteriológica é freqüentemente induzida pelo substrato e ocorre após prolongado tempo de incubação. Em contraste, a biodegradação do 2,4,5-T a CO₂ por *P. chrysosporium* ocorreu tanto quando ele foi incubado no início da cultura, como quando foi adicionado ao meio após o crescimento do fungo.

Fatores considerados por vários autores bastante como relevantes na degradação de pesticidas são as características físicas e químicas dos solos como: temperatura, pH, umidade, quantidade de matéria orgânica, etc. Uma grande parte dos trabalhos encontrados na literatura defende esta idéia [Blumhorst e Weber, 1994, Racke, 1990, citados por Soccol e col., 1995]. Porém Chanay e Fournier [1994] defenderam uma idéia contrária a esta, em um estudo

realizado com o inseticida carbofuran (2,3-dihidroxi-2,2-dimetilbenzofurano), em diferentes solos franceses. Nesse estudo foi realizada uma análise estatística multivariada, envolvendo: tempo de meia-vida do inseticida, história de aplicação anterior do inseticida no solo, características físicas e químicas do solo (pH, quantidade de material orgânico, umidade equivalente, número de microrganismos capazes de degradar carbofuran, etc). Os resultados obtidos revelaram baixas correlações entre as características do solo e a degradação do inseticida, revelando assim que as características físicas e químicas do solo, exceto pH, não exerceram influência significativa na degradação do carbofuran. Em solos inicialmente desinfectados com clorofórmio, o pH apresentou um coeficiente de correlação de 0,80. Também foi observada uma pequena correlação entre o tamanho inicial da população de microrganismos capazes de degradar carbofuran, e a taxa máxima de degradação do carbofuran após o segundo tratamento do solo com o inseticida.

Outro trabalho evidenciando a influência do pH na degradação de pesticidas foi realizado medindo-se a degradação do herbicida 2,4-D em solos com diferentes pH. Na faixa de 8,5 a 5,0 a meia vida pouco mudou, variando de 5 a 8 dias. A pH 4,5 a meia vida aumentou para 21 dias e a pH 4,0 aumentou para 41 dias [Kearney e Kaufman, 1975].

Greer e Shelton [1992] defendem a idéia da influência da matéria orgânica (MO) na degradação dos defensivos agrícolas. Eles associaram a quantidade de MO com os fenômenos de adsorção e dessorção do DA. Um dos trabalhos que contribuiu com esta tese, foi a biodegradação do 2,4-D em solos com diferentes quantidades de MO. Os ensaios foram realizados a 25 - 27°C em solos com 14 e 1,6% de MO [Greer e col., 1992]. Foram utilizadas duas cepas de bactérias, MI e 155. As concentrações de 2,4-D foram 1, 10 e 100 µg/g de solo úmido para os ensaios em solo com 1,6% de MO, e 100 µg/g de solo úmido, para os ensaios com 14% de MO. Os solos foram trabalhados em suas capacidades de campo, 57

para solo com 14% de MO e 10 para solo com 1,6% de MO, e a pH entre 6,8-7. A concentração inicial de 2,4-D na fase solúvel (umidade do solo proveniente da capacidade de campo) foi de 60 e 600 $\mu\text{g/mL}$ para as concentrações de 10 e 100 μg de 2,4-D por g de solo, respectivamente. As taxas de degradação foram geralmente similares para as duas cepas em solo com 1,6% de MO, tendo ocorrido preferencialmente na fase solúvel e nas primeiras 20 horas. A partir dessa etapa, a degradação ocorreu simultaneamente nas duas fases do solo, solúvel e sorvida (2,4-D adsorvido no solo). Para as concentrações de 1 $\mu\text{g/mL}$, a degradação ocorreu em 30 horas. Maior degradação foi observada na fase solúvel e com a cepa MI. Para solos com 14% de MO, 100 μg de 2,4-D/g de solo úmido na presença de MI, a fração inicial de 2,4-D adsorvido no solo foi de 90%. O 2,4-D adsorvido e desorvido foi aparentemente metabolizado simultaneamente, após 70 horas de inoculação. Na fase solúvel a degradação alcançou valores inferiores ao limite de detecção porém, na fase adsorvida foram encontrados 5% de 2,4-D residual. Um monitoramento da degradação do 2,4-D também foi realizado utilizando a microflora natural do solo. Cerca de 10% de degradação foi observado após 10 dias em solo com 1,6% de MO porém, nenhuma degradação significativa foi observada no solo com 14% MO no intervalo de 45 dias. A menor habilidade de degradação do solo com 14% em MO foi atribuída a uma menor taxa de desorção do 2,4-D do solo e ao crescimento do microrganismo em condições de baixa disponibilidade de fonte energética.

Os xenobióticos uma vez no solo estão sujeitos a interações químicas e físicas com a superfície ou com o interior (complexos tridimensionais) de substâncias minerais ou orgânicas. Essas interações, podem reduzir a biodegradação dos xenobióticos no solo [Scow e Johnson, 1997]. Este fenômeno está correlacionado com a biodisponibilidade do xenobiótico à microflora presente no solo. A biodisponibilidade de um xenobiótico no solo é controlada pelos processos de adsorção, desorção, difusão e solubilidade. A taxa de degradação

de poluentes não biodisponíveis é usualmente mais lenta do que o mesmo sob a forma solúvel, ou seja disponível, [Rijnararts e col., 1991, Ogram e col., 1985, citados por Scow e Johnson, 1997].

Aparentemente a degradação dos DA é afetada pela história de suas sucessivas aplicações. Em um trabalho realizado para verificar esse fenômeno [Bromilow e col., 1996] utilizou-se solos tratados durante 20 anos com 5 diferentes DA, sendo eles herbicidas, inseticidas e nematicidas. Nesse estudo observou-se que somente o aldicarb [2-meti- 2-(metiltio)-propionaldeído] apresentou um aumento significativo de sua meia vida quando re-incubado no solo em questão. Também nesse estudo, o inseticida clorofenvinfo não apresentou nenhuma alteração no tempo de meia vida porém, em outro estudo similar, com diferente solo [Rouchaud e col., 1989, citado por Bromilow e col., 1996], o clorofenvinfo teve sua meia vida diminuída.

Musumeci [1992] citado por Soccol e col. [1995] relatou que a vida média do paration (O,O-dietil-O-4-nitrofenil fosforotiato) em solo gley-úmido, com 10 sucessivas aplicações, não alterou sua vida média. A única diferença encontrada entre os solos com e sem sucessivas aplicações foi a presença de um actinomiceto, *Nocardia* sp. Esse microrganismo foi isolado do solo e degradou o paration no seu metabólito, nitrofenol.

Diante da diversificação comportamental dos sistemas de degradação biológica, utilizando um ou mais pesticidas, o fator suscetibilidade do pesticida à biodegradação em função da estrutura química do composto é de importante relevância neste amplo e complexo estudo de biodegradação.

Alexander e Lustigman [1966] estudaram a degradação biológica de benzenos mono e dissubstituídos. Os compostos derivados do benzeno foram individualmente usados, como única fonte de carbono, em soluções aquosas de sais minerais, utilizando microrganismos extraídos do solo. O composto foi considerado degradado quando a sua absorbância no UV desapareceu por

completo. O fenol e o benzoato foram degradados rapidamente, após aproximadamente 1 dia de incubação. A anilina e o anisol foram menos atacados, 4 e 8 dias de incubação, respectivamente. O benzenossulfonato e o nitrobenzeno foram os mais resistentes à degradação, 16 e 64 dias de incubação respectivamente. Assim, parece que os grupos hidroxilas e carbonilas foram os mais favoráveis, e os grupos sulfonatos e nitratos menos favoráveis na biodegradação de anéis aromáticos monossustituídos.

Um efeito na biodegradação em função da estrutura química também foi evidente entre os benzenos dissustituídos, tabela 1 [Alexander e Lustigman 1966]. Nenhum dos 13 compostos sulfonatos e nove dentre dos 13 compostos clorosustituídos não foram degradados em menos de 2 semanas. Os 2 únicos compostos deste grupo (clorosustituído) metabolizados em 16 dias foram os *para* substituídos. Os compostos nitrados apresentaram-se bastante resistentes, exceto os contendo uma carbonila ou hidroxila fenólica. A maioria das anilinas substituídas não se comportou como substrato nestas condições. Sete dos anisóis foram também largamente inertes, mas seis deles continham grupos substituintes nitro ou amino. Similarmente 4 dos 13 toluenos não foram degradados dentro de um período de 64 dias. As 4 moléculas resistentes possuíam um grupo nitro ou um sulfato.

Tab. 1 - Degradação de benzenos dissustituídos por microflora do solo

Tipo	Segundo substituinte		Primeiro substituinte						
	posição	COOH	OH	NO ₂	NH ₂	OCH ₃	Cl	OCH ₃	SO ₃ H
COOH	<i>o</i>	2	2	8	2	16	>64	4	> 64
	<i>m</i>	8	2	>64	> 64	2	32	16	> 64
	<i>p</i>	2	1	4	8	8	64	2	> 64
OH	<i>o</i>		1	> 64	4	1	>64	4	...
	<i>m</i>		8	4	> 64	1	>64	16	...
	<i>p</i>		...	16	...	1	16	8	32
NO ₂	<i>o</i>			> 64	> 64	> 64	>64	> 64	> 64
	<i>m</i>			> 64	> 64	> 64	>64	> 64	> 64
	<i>p</i>			> 64	> 64	> 64	>64	> 64	> 64
NH ₂	<i>o</i>				> 64	64	>64	> 64	> 64
	<i>m</i>				> 64	8	>64	> 64	> 64
	<i>p</i>				...	4	>64	64	> 64
OCH ₃	<i>o</i>					8	...
	<i>m</i>					> 32	...
	<i>p</i>					8	...
SO ₃ H	<i>o</i>					> 64	...		> 64
	<i>m</i>						16		...
	<i>p</i>								...

Os valores numéricos são os dias necessários para a total perda da absorbância

A persistência do DDT, DA mais freqüentemente encontrado no meio ambiente, é também atribuída à estrutura química, pois as posições dos grupos clorados na molécula confere grande estabilidade ao composto [Musumeci, 1992, citado por Soccol e col., 1995].

O extensivo uso de DA em jardins e gramados, 30.000 toneladas nos Estados Unidos em 1995, torna a biodegradação dos resíduos provenientes desses uma questão importante. Desses DA o 2,4-D é o mais comumente empregado em gramados residenciais. Baseado nesta questão, Michel e col. [1995], estudaram a biodegradação do 2,4-D presente em resíduos residenciais

formados por folhas e gramas. Esse resíduo foi seco a 37°C até aproximadamente 7% de umidade, moído e o 2,4-D marcado e não marcado foi adicionado para obter uma concentração de 17 mg/kg de resíduo seco. Esta mistura em quantidade suficiente para obter 200 g em 2,4-D, foi adicionada a um biorreator de 2 L e aerado com ar úmido. A temperatura foi medida chegando a atingir uma faixa entre 50-80°C nos primeiros 8 a 10 dias e 60 - 70°C no fim de 80 dias. A degradação ocorreu sem a adição de microrganismos exógenos. A mineralização do 2,4-D foi de 27% no 10º dia, atingindo 47% ± 6% no 50º dia. A análise do ¹⁴C demonstrou que 23% estava sob a forma de ácido húmico e 19,5% não foi extraídos. Uma análise da massa molecular da fase extraída do resíduo após biodegradação, revelou que 70% do ¹⁴C presente tinha massa molecular maior que 1600 e os 30% restantes, massa de 700. Baseados na massa molecular do 2,4-D (221) os autores sugerem que parte do 2,4-D adicionado foi convertido a ácido húmico de alta massa molecular durante o processo. A análise do controle abiótico do processo revelou a ausência de mineralização, e uma pequena conversão do 2,4-D a ácido húmico. Baseados neste resultado os autores sugerem que a humificação do 2,4-D durante o processo de compostagem é principalmente um processo de biológico, e que o 2,4-D não extraído sob condições abióticas foi devido primariamente a um processo de adsorção. A degradação do 2,4-D em um processo de compostagem, sugere a presença de microrganismos diferentes dos encontrados no solo, haja visto que as taxas de degradação são alteradas em solos com alto teor de MO. Outra hipótese é que no processo de compostagem a matéria orgânica apresenta maior umidade quando comparado ao solo, o que levaria a um rápido equilíbrio de partição do 2,4-D adsorvido e dessorvido, resultando em uma degradação efetiva.

Outro trabalho utilizando resíduos vegetais foi realizado por Zablotowicz e col. [1998]. Eles empregaram o herbicida 2,4-D, resíduos de centeio (*Lolium*

multiflorum Lan) e de uma leguminosa usada como pasto (Hairy Vetch – *Vicia villosa* Roth), e para fins comparativos, solo. A microflora associada com os resíduos vegetais foi 100 vezes maiores do que a do solo, sendo que suas atividades microbiais foram 6 vezes maior do que a do solo. No entanto o 2,4-D incubado com esses resíduos vegetais sofreu menores valores de degradação. Após 14 dias de ensaio foi obtido 78-82% *versus* 28-40% de mineralização do 2,4-D [¹⁴C da carboxila] e 48-60% *versus* 5-7% de mineralização do 2,4-D [¹⁴C do anel] em solo e em resíduos vegetais, respectivamente. Os autores atribuíram os menores valores de degradação do 2,4-D nos resíduos vegetais a uma limitada disponibilidade do herbicida à microflora presente.

Vários trabalhos na literatura tem considerado a umidade como parâmetro fundamental na degradação de DA em solo. A disponibilidade de água no solo afeta a atividade das espécies, a sobrevivência, o movimento e a atividade dos microrganismos [Lynch 1986]. Segundo Felson e Shelton [1993] citado por Soccol e col. [1995] maior umidade de solo favorece a degradação biológica, sendo isto mais devido ao estado fisiológico do microrganismo do que à dessorção do produto adsorvido ao solo.

Cattaneo e col. [1997] estudaram a degradação de 2,4-D em colunas de solo, sendo as menores degradações obtidas a 6 % de umidade e nenhuma abaixo desta. Porém, a 40% de umidade foi observada uma densidade populacional microbiana (*Burkholderia cepacia* BRI6001L) 4 vezes maior e uma degradação 10 vezes maior do que a obtida a 6% de umidade.

Soccol [1995] observou a permanência do lindano (hexachlorociclohexano) em solo úmido-argiloso e em solo arenoso. Após 3 anos de aplicação, de 10 a 14% do lindano estava presente no solo argiloso enquanto que em solo arenoso havia cerca de 10% após 14 anos.

Petersen e col. [1995] citado por Scow e Johnson [1997] não observaram nenhuma degradação de tolueno e tricloroetileno em solos com umidade igual ou

abaixo de 5%.

Na busca de utilizar suspensões de solo para estimar a quantidade de biomassa necessária e o tempo requerido para remover atrazina (2-cloro-4 etilamino-6-isopropilamino-s triazina) de solo, Wenk e col. [1998] comprovaram mais uma vez que o conteúdo de água no solo e a quantidade de microrganismos são fatores relevantes no processo de biodegradação. Sistemas formados de suspensão de solo (100 g de solo, 200 mL de água e diferentes concentrações de atrazina) foram incubados por 7 dias. Após este período, as suspensões com diferentes concentrações de *Pseudomonas* sp (5; 0,3 e 0,03 g/kg de solo) foram adicionadas aos sistemas. O nível de atrazina diminuiu no primeiro dia para níveis não detectáveis em ambas as fases, aquosa e sólida, quando 5 e 0,3 g de bactéria/Kg de solo foram usados. Porém, com 0,03 g de bactéria/Kg de solo a degradação ocorreu num intervalo de tempo maior, 5 dias. Nenhum desaparecimento significativo foi observado em solo não inoculado. A fim de avaliar a biodisponibilidade do herbicida no solo em função do tempo, diferentes concentrações de atrazina (20; 5; 2,5 e 1 mg/L) foram mantidas por longos tempos em solução de solo estéril. Passados os intervalos de 103 e 260 dias, inóculos com diferentes concentrações de *Pseudomonas* sp (0,01 e 1 g/Kg de solo) foram adicionados às suspensões de solo. Sete dias após a inoculação as concentrações de atrazina na fase aquosa foram encontradas abaixo do limite de detecção. Porém, ainda foram detectadas quantidades de atrazina na fase sólida. Este último resultado pode ser fruto da ausência da disponibilidade do herbicida adsorvido na fase sólida. O fenômeno de adsorção da atrazina na fase sólida foi observado em experimentos realizados em suspensão de solo, onde a concentração de atrazina diminuiu em amostras não inoculadas sob longos tempos de incubação. O coeficiente de adsorção em solução de solo para 7, 24, 40, 104 e 260 dias foram 0,69; 1,43; 1,66; 1,61 e 1,27 mg/Kg, respectivamente. O aumento dos coeficientes demonstraram uma maior fixação do herbicida ao solo

com o passar do tempo. Este fenômeno pode explicar a total degradação da atrazina tanto na fase líquida como na fase sólida para os experimentos realizados com um menor tempo de inoculação do herbicida, 7 dias. Ensaio em solo com 60% de umidade, empregando diferentes concentrações de *Pseudomonas* sp, 1; 0,1 e 0,01 g/Kg de solo, foram realizados. As taxas de eliminação de atrazina foram maiores para as maiores quantidades de biomassa. A degradação mais lenta da atrazina em solo do que na suspensão de solo foi atribuída à menor mobilidade do microrganismo e à menor difusão do herbicida no solo.

Veeh e col. [1996] utilizaram dois modelos matemáticos a fim de descrever os efeitos das diferentes profundidades e temperaturas do solo (região de Montana, USA) sobre a biodegradação do 2,4-D. Os ensaios de degradação do herbicida (0,67 Kg/ha) foram realizados às temperaturas de 10, 17 e 24°C empregando diferentes profundidades de solo 0-30, 30-60 e 60-120 cm, e mantidos a 33% de umidade. Os dois modelos cinéticos são baseados em mecanismos de degradação distinto [Alexander e Scow, 1989]. As equações de Characklis [1990], forneceram um excelente ajuste aos dados experimentais, apresentando um valor de coeficiente de correlação (r^2) igual a 0,99. Já o ajuste dos dados a curva do modelo de primeira ordem foi mais pobre. O melhor ajuste dos dados ao modelo usando as equações de Characklis foi atribuído ao fato de que este descreve a cinética de degradação microbiana, tipicamente observada quando a população é exposta a um novo substrato, isto é, uma fase "lag" (fase de latência) dando uma curva de degradação na forma de S. A degradação do 2,4-D medida em termos de CO₂ acumulado apresentou uma fase "lag" inicial em todos os tratamentos. Esta fase "lag" tem sido caracterizada como período de adaptação em que as enzimas necessárias à degradação do substrato e de seus metabólitos são sintetizadas [Torstensson 1978, citado por Veeh e col., 1997]. Foi observado um aumento na fase lag e um decréscimo na taxa de degradação do

2,4-D com um aumento da profundidade em ambos os solos usados. As constantes de degradação diminuíram com o aumento da profundidade, $5,3 \times 10^{-3}$ para 0-30 cm de profundidade, $1,2 \times 10^{-4}$ para 30-60 cm de profundidade e $5,0 \times 10^{-5}$ para 60-120 cm de profundidade, para os ensaios realizados a 10°C, sendo que o mesmo efeito foi observado nas demais temperaturas empregadas. A meia vida, calculada pelo modelo de primeira ordem, aumentou significativamente com o aumento da profundidade do solo, 7, 273 e 593 (dias) para 0-30, 30-60 e 60-120 cm respectivamente. Também foi observado um decréscimo nos coeficientes de degradação com a profundidade, que foi consistente com ao decréscimo na população das bactérias. Com o decréscimo de temperatura foi verificado um aumento na fase "lag" e um decréscimo na taxa de degradação em ambos os solos. Estes resultados demonstraram a importância de considerar a flutuação da temperatura nos modelos matemáticos usados para prever o destino de compostos orgânicos em solo.

Os experimentos para determinar o número de bactérias capaz de degradar 2,4-D, realizados por contagem em placa, revelaram uma diminuição destas com as profundidades dos solo [Veeh e col., 1996]. Foi realizada uma regressão linear para correlacionar unidades de colônias formadas *versus* % carbono orgânico. Uma correlação positiva foi obtida em ambos os solos, com valores de r^2 0,61 para o meio de cultura com 2,4-D e 0,75 para o meio sem adição de 2,4-D. Outros resultados similares foram obtidos por Lavy e col. [1973] e por Foster e McKercher [1973]. De acordo com os autores, os resultados sugeriram que uma mudança no teor de carbono orgânico como uma função da profundidade pode ser um indicador da atividade biológica e, subseqüentemente, mudanças nas taxas de degradação em função da profundidade. Uma forte correlação negativa foi observada ao relacionar valores de tempo de meia vida do 2,4-D e teor carbono orgânico para todas as profundidades de solo testados nos tratamentos a 17 e 24°C. Os valores de r^2 foram de 0,88 e 0,94 para 17 e 24°C,

respectivamente. Estes resultados revelaram uma correlação positiva entre as taxas de degradação e o carbono orgânico. Estes resultados são contrários às teses que um aumento na matéria orgânica diminui a disponibilidade do substrato ao microrganismos, levando a uma diminuição na degradação, Smith e Muir, [1980] e Stott e col. [1983]. Veeh e col. [1996] sugerem que mudanças no teor de carbono orgânico como uma função da profundidade, que foi considerado como um indicador da atividade microbiana, resultaram na correlação positiva entre teor de carbono orgânico e taxa de degradação.

Além das diversas maneiras possíveis de utilizar as cepas dos diversos microrganismos disponíveis na natureza, conforme citado inicialmente neste texto, o emprego de cepas modificadas geneticamente vem sendo desenvolvido.

Haugland e col. [1990] estudaram a biodegradação de herbicidas fenoxiacético clorados através de cultura pura e mista de bactérias. A biodegradação do 2,4-D e do 2,4,5-T puros ou combinados foi estudada utilizando cepas puras de *Pseudomonas cepacia* (AC1100), *Alcaligenes eutrophus* (JMP 134), mistura de AC1100 e JMP143 e ainda uma cepa derivada da recombinação genética de AC1100 e JPM134 (RHJ). Os estudos foram realizados em meio basal suplementado com 2,4,5-T ou 2,4-D, ou ainda mistura de 2,4-D e 2,4,5-T como fonte de carbono para culturas puras ou combinadas. Os resultados obtidos revelaram que as suspensões de células AC1100 degradaram significativamente 2,4,5-T (96% de degradação), mas mostraram fraca capacidade para degradar 2,4-D (28% de degradação). Já as suspensões de células de JMP134 degradaram significativamente 2,4-D (100% de degradação) e mostraram nenhuma atividade para 2,4,5-T. Misturas de suspensões de células AC1100 e JMP134 degradaram significativamente 2,4,5-T e 2,4-D, 100% de degradação para ambos, quando tratados separadamente porém, o mesmo não ocorreu com a mistura 2,4-D e 2,4,5-T, 45 e 44% de degradação, respectivamente. A cepa derivada da recombinação genética RHJ, degradou 2,4-D e 2,4,5-T tratados

individualmente ou em combinação. A inibição da degradação do 2,4,5-T quando na presença de 2,4-D utilizando AC1100 é atribuída à acumulação de clorohidroquinona que, por sua vez, inibe a formação de clorohidroquinona que acredita-se ser um substrato para a dioxigenase do anel aromático. Quando as células de AC1100 e JMP134 são expostas a ambos os substratos 2,4,5-T e 2,4-D, a produtividade do catabolismo do 2,4-D via 2,4-diclorofenol e 3,5-diclorocatecol, que ocorre através do JMP134, não compete efetivamente com o catabolismo final do 2,4-D por meio da AC1100. A consequência é a acumulação de clorohidroquinona e clorofenóis. A simultânea degradação do 2,4-D e 2,4,5-T pela RHJ1, foi atribuída à independência dos caminhos metabólicos desses compostos na presença de RHJ1.

A vasta literatura sobre o processo biodegradativo de DA em solos e pela microflora que os compõem ainda carece de conclusões definitivas sobre o efeito de características físico-químicas dos solos sobre a taxa de degradação dos DA. De qualquer forma, é evidente que a biodegradabilidade de DA adsorvidos na fase sólida do solo ou disponíveis na fase líquida é bastante diferenciada. Em geral os DA são prontamente degradados quando na fase líquida e são recalcitrantes quando adsorvidos na fase sólida. Todas as variáveis que afetam esse equilíbrio parecem alterar simultaneamente a biodegradabilidade dos DA.

O uso de FLC é uma atividade agrícola recente e pouco se sabe sobre a degradabilidade dos DA ocluídos nas diversas matrizes de liberação controlada existentes. Certamente, as FLC tornam os DA menos disponíveis à microflora, pois os detêm adsorvidos ou fisicamente retidos e com isso, menor concentração dos DA vai para a fase líquida do solo. Por outro lado, a liberação do DA em pequenas concentrações pode levar a taxas que são mais facilmente biodegradáveis (concentração não tóxica a microflora local) ou ainda, levar ao estímulo de uma microflora com habilidade degradativa em detrimento de outra sem a mesma habilidade.

Dentro desse contexto, a proposta deste trabalho é avaliar se a biodegradabilidade do herbicida 2,4-D formulado com lignina em sistemas de liberação controlada é alterada em comparação com o mesmo herbicida disponível na forma pura, isento de aditivos ou matrizes de formulação.

II - Objetivo

O objetivo deste trabalho foi avaliar se formulações de liberação controlada à base de lignina podem minimizar ou inibir a biodegradação do herbicida 2,4-D.

Para atingir esse objetivo foram realizadas as seguintes etapas:

- Obtenção das formulações de liberação controlada.
- Degradação da formulação 2,4-D/lignina pelos microrganismos *Pseudomonas putida* (*P.putida*) e *Phanerochaete chrysosporium* (*P. chrysosporium*).
- Degradação da FLC 2,4-D/lignina pela microflora do solo.

III – Parte experimental

III.1 – Obtenção da formulação

A lignina de bagaço de cana utilizada como matriz para a FLC foi obtida em escala piloto nas instalações do Departamento de Biotecnologia da FAENQUIL, em trabalho prévio ao desenvolvimento desta tese [Silva e Wilkins, 1992].

A formulação foi obtida por fusão do 2,4-D grau técnico (97% de pureza), em uma cuba de aço inox imersa em um banho de silicone a 170-172°C [Souza,1994]. Após a fusão do 2,4-D (2,25 g), foram adicionadas 2,75 g de lignina de bagaço de cana. A mistura foi vigorosamente agitada com auxílio de uma espátula metálica. Após a homogeneização, a temperatura real da formulação, medida através de termopar, variou entre 135 e 136°C. Após 10 min de processamento, a formulação foi resfriada, triturada e peneirada. Grãos de dimensões entre 0,71 e 1,00 mm de diâmetro, foram empregados nos ensaios do presente trabalho.

III.2 – Ensaio de degradação do 2,4-D por microrganismos

III.2.1 – Ensaio de degradação do 2,4-D por *P. chrysosporium*

A cepa estoque de *P. chrysosporium* BKM-F1767 foi inoculada antes de cada experimento em meio ágar-extrato de malte (2%) a 37°C por 5 dias [Esposito e col.,1991].

Uma suspensão aquosa de *P.chrysosporium*, de volume e concentração suficientes para a obtenção de $1,65 \times 10^7$ esporos, foi adicionada aos frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 75 mL de meio de cultura composto de tampão tartarato de amônia (0,02 mol/L), glicose (10%) e solução de vitaminas, a pH 4,5. Estes frascos foram mantidos a 37°C, 200 rpm e aerados por 10 min em intervalos de tempos definidos (171 mL de O₂/h), até o total consumo da glicose [Linko e Haapala,1993]. Após o consumo da glicose e conseqüentemente o crescimento do fungo, o 2,4-D em diferentes concentrações (5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L)

foi adicionado ao meio e os frascos foram agitados a 60 rpm para o restante do experimento.

A determinação da glicose no meio de cultura de cada experimento foi realizada pelo método de Nelson [Nelson,1944].

III.2.2 – Degradação do 2,4-D por *P. putida* (CCT.0548T)

A re-hidratação da bactéria foi realizada em 1 mL de água estéril durante 30 min. O crescimento da bactéria foi realizado durante 48 horas a 30°C em meio nutriente de Broth 8 g/L (37,5% de extrato de carne e 62,5% de peptona).

O 2,4-D grau técnico em quantidade suficiente para obter concentrações de 10, 40 e 80 mg/L, foi acrescentado a soluções de nutriente de Broth, concentração final de 4,5 g/L. Este sistema, inoculado com *P.putida*, foi mantido a 37°C e 60 rpm durante 5 dias.

O monitoramento do desaparecimento do 2,4-D foi realizado por CLAE, de acordo com o procedimento descrito no item III.7.

A degradação da formulação 2,4-D/lignina foi realizada em condições similares ao 2,4-D grau técnico. Quantidades de formulação suficientes para obter concentrações de 10 e 100 mg/L de 2,4-D, se houvesse total liberação inicial, foram mantidas sob agitação de 60 rpm, durante 5 dias.

O monitoramento do desaparecimento do 2,4-D foi realizado por CLAE, de acordo com o procedimento descrito no item III.7.

III. 2.3 – Determinação das enzimas extracelulares

III.2.3.1 - Manganês peroxidase

A determinação da atividade de manganês peroxidase foi baseada na metodologia de Kuwahara e col. [1984]. A 500µL de amostra previamente filtrada foram adicionados 100 µL de vermelho de fenol 0,1%, 100 µL de lactato de sódio 25 mmol/L, 200 µL de albumina bovina 0,1%, 50 µL de sulfato de manganês 2 mmol e 50 µL de peróxido de hidrogênio 2 mmol/L. Esta mistura

reagiu durante 5 min a 30°C. A interrupção da reação foi realizada com a adição de 40µL de hidróxido de sódio. A atividade enzimática foi medida espectroscopicamente, e a absorção foi medida em 610 nm. Um branco para zerar o aparelho foi preparado com os mesmos constituintes do meio onde ocorreu a degradação, porém sem a presença do fungo e do 2,4-D.

III.2.3.2 - Lignina peroxidase

A atividade de lignina peroxidase foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico segundo a metodologia descrita por Tien e Kirk [1984]. Os reagentes foram adicionados na seguinte seqüência: 250 µL de amostra, 375 µL de tampão tartarato de sódio 0,33 mol/L (pH 3,0), 450 µL de água destilada, 125 µL de álcool veratrílico 0,4 mmol/L e 50 µL peróxido de hidrogênio 0,4 mmol/L. Imediatamente após a adição dos reagentes, a atividade foi determinada espectroscopicamente e a absorbância medida em 310 nm durante 5 min.

III. 2.4 – Determinação das enzimas intracelulares

Como se trata de enzimas intracelulares, o primeiro passo deste experimento foi liberá-las do interior da célula através da quebra da parede celular pelo método de sonicação.

A sonicação foi baseada no método publicado por McMullan e Quin [1992]. Após o intervalo de tempo de degradação, o meio de cultura foi centrifugado durante 20 min a 5°C e 200 rpm em uma centrífuga BECKMAN J2-21. A massa de bactérias obtida foi sonicada na presença de 10 mL de tampão tris, pH 9 em um sonicador ultra-som da COLE-PARMER modelo 4710. O processo de sonicação foi realizado empregando ciclos de 30 s com 15 pulsos, durante 4 minutos. Durante o processo de sonicação a suspensão contendo as bactérias foi mantida a baixa temperatura utilizando um banho de gelo. Após sonicação as amostras foram novamente centrifugadas e o sobrenadante foi analisado para as enzimas pirocatecase e metapirocatecase.

III.2.4.1 - Pirocatecase

A determinação da atividade enzimática foi baseada na metodologia descrita por Nakasawa e Nakasawa [1970]. Em uma cubeta de 3 mL foram adicionados 1940 μL de fosfato de sódio 0,1 mol/L pH 7,5 , 60 μL catecol 0,01 mol/L e 1000 μL de caldo enzimático obtido do processo de sonicação da bactéria. Em seguida esta mistura foi submetida à leitura em espectrofotômetro BECKMAN, modelo DU 640B, em 260 nm, durante 3 minutos com leitura a cada 30 segundos a 24°C. Uma mistura similar porém, sem a adição de catecol, foi usada como branco. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que produz 1 μmol de ácido mucônico por minuto a 24°C.

III.2.4.2 - Metapirocatecase

A determinação da atividade enzimática foi baseada na metodologia descrita por Nozaki [1970]. Em uma cubeta de 3 mL foram adicionados 1900 μL fosfato de sódio 0,05 mol/L pH 7,5 , 100 μL catecol 0,01 mol/L e 1000 μL de caldo enzimático obtido do processo de sonicação da bactéria. Em seguida a mistura foi submetida à leitura em espectrofotômetro BECKMAN, modelo DU 640B, em 375 nm, durante 3 minutos com leitura a cada 30 segundos a 24°C. Uma mistura similar porém, sem a adição de catecol, foi usada como branco. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que oxida 1 μmol de catecol por minuto a 24°C.

III.2.5 - Determinação de inibição das enzimas MnP e LiP

Os ensaios foram realizados com base na metodologia empregada para determinação das atividades MnP (item III.2.3.1) e LiP (item III.2.3.2), porém com a adição de 2,4-D em diferentes concentrações (5, 10, 20, 40, 60, 80 e 100 mg/L) ao meio reacional.

III.3. - Degradação do 2,4 - D em solo

A escolha do solo para o presente trabalho foi baseada em sua utilização em estudos anteriores:

a - Estudos de FLC em escala de bancada (vasos) e campo, realizados junto ao Departamento de Biotecnologia da Faculdade de Engenharia Química de Lorena (FAENQUIL).

b - Utilização de microrganismos provenientes do solo, capazes de degradar o 2,4-D.

Este solo é composto por 29,6% de areia, 47,4% de "silt", 22,9% argila, 4,8 meq/100 g de solo de capacidade de troca catiônica, 2,6% de matéria orgânica e pH de 5,5 [Pereira, 1996].

III 3.1 – Sistema sem estimulação inicial dos microrganismos

Para este experimento foram empregados 2,4-D grau técnico e formulação 2,4-D/lignina, que foram aplicados em solos estéril e não estéril, em quantidades suficientes para uma concentração de 9,4 kg/ha. Foi empregado um sistema fechado, utilizando placas de Petri de diâmetro 0,09 m a $28^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{C}$.

A esterilização do solo foi realizada através de vapor úmido em autoclave, empregando duas etapas de 40 min a 1 atm, com intervalo de 6 horas entre cada etapa.

O solo empregado é do tipo latossolo roxo e proveniente da região do Vale do Paraíba, São Paulo. Este foi empregado com 100% de sua capacidade de campo (habilidade que o solo tem em reter água) que é de 34% (g de água/100 g de solo seco). Esta umidade foi obtida adicionando inicialmente água ao sistema e mantendo as placas lacradas.

Foram utilizados 20 gramas de solo, aproximadamente 12,2 mg de 2,4 - D grau técnico e 26,6 mg de 2,4-D/lignina, que foram aplicados na superfície do solo.

As amostragens foram realizadas em 10, 20 e 30 dias. Para os solos contendo 2,4-D grau técnico, a homogeneização do 2,4-D residual no solo foi realizada triturando ambos em um gral. Para os experimentos com formulações 2,4-D/lignina, estas foram retiradas do solo e este foi homogeneizado também em gral, para análises posteriores.

III.3.2 – Sistema com estimulação inicial dos microrganismos

Este experimento foi realizado em condições similares ao sistema sem estimulação inicial dos microrganismos (item III.3.1). Porém houve uma estimulação inicial dos microrganismos presentes no solo. Esta estimulação foi realizada através da adição de uma solução aquosa contendo glicose (0,2%), peptona e extrato de carne (7,7 g/L) e vitaminas (130 µL para 130 mL de solução) aos solos vivo e estéril. Estes foram incubados durante 5 dias a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ e, em seguida, ensaiados com 2,4-D durante 60 dias.

III.4. – Extração do 2,4-D das formulações e dos solos

Para a extração do 2,4-D residual das formulações foram empregadas 3 metodologias :

- a - extração em fluido super-crítico
- b - extração em "soxhlet"
- c - extração com metanol em ultra-som

As extrações com fluido super-crítico foram realizadas em um extrator SUPELCO - SUPERCRITICAL FLUIDO EXTRACTOR SFE-400. Foram utilizados de 5 a 6 g de formulação, 70°C , 3500 Psi, durante 20 minutos. As extrações em soxhlet foram feitas com cerca de 89,1 mg de formulação extraídas por água durante 90 horas. A extração em ultrassom foi realizada com cerca de 5 mg de formulação extraída com metanol durante 30 min.

A extração de 2,4-D em solo foi testada por 4 métodos :

- e - extração com fluido super-crítico
- f - extração em " shaker "
- g - extração com metanol em ultra-som.
- h - extração em "soxhlet" com metanol

Para a extração com fluido super-crítico foram empregadas as mesmas condições usadas para as formulações porém, foram utilizados 3 g de solo e 1 mL de metanol como fase modificadora. A extração em "shaker" foi feita com 3 g de solo em 20 mL de metanol sob agitação de 150 rpm durante 1 hora. A extração em ultrasom foi realizada com cerca de 3 g de solo imersos em 10 mL de metanol mantidos por 30 min em ultrasom. A extração em "soxhlet" foi realizada pela adição da massa completa de cada amostra, cerca de 20 g de solo, extraída com metanol por 50 horas e, em seguida, a amostra foi evaporada em rota-evaporador.

A determinação do 2,4-D extraído foi realizado por CLAE de acordo com o procedimento descrito no item III.7.

III.5 – Determinação de metabólitos

III.5.1 – Derivatização das amostras

Dois mL dos extratos provenientes das amostras de 2,4-D residual na formulação e no solo obtidos através da extração com metanol (item III.4), foram evaporados por arraste por nitrogênio. Em seguida as amostras foram derivatizadas através do acréscimo de 100 μ L de piridina e 1000 μ L de BSTFA [bis-(trimetilsilil)-trifluor-acetoamida] e aquecidas durante 60 minutos a 60°C em banho-maria.

As amostras inicialmente dissolvidas em água (2,4-D residual nos meios de cultura) foram extraídas com acetato de etila. A 2 mL de amostra foram adicionados 2 mL de acetato de etila, e em seguida foram agitados por 1 min em vórtex. Após a separação, à fase orgânica foi acrescentado sulfato de sódio

anidro, para eliminação de resíduos de água. Em seguida as amostras foram evaporadas por arraste com nitrogênio e submetidas à derivatização.

III.5.2 Análise por CG/EM

Após derivatização, as amostras foram submetidas à cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM), utilizando um equipamento FINNIGAN MAT modelo GCQTM empregando uma coluna DB-5 de 30 m x 0,25 mm e gás hélio a fluxo linear de 33 cm/s (equivalente a 1 mL/min). Foi empregado o seguinte gradiente de temperatura: 60°C durante 1 min, seguido de um aumento de 30°C por min até atingir 140°C. Após 3 min a esta temperatura a mesma foi novamente elevada na proporção de 4°C por min até alcançar 240°C e nesta permanecer durante 13 min.

III.6 – Determinação das modificações na lignina causadas pela biodegradação

III.6.1 - Determinação da cinética de liberação do 2,4-D

Os ensaios de liberação em água foram realizados em triplicata em um sistema estático mantido a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Cerca de 50 mg de formulação granulada com diâmetro entre 0,7 e 1,0 mm foram imersos em 30 mL de água. A água foi trocada em intervalos de tempo definidos e a concentração do 2,4-D foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

III. 6.2. - Análise por microscopia eletrônica de varredura

As amostras de formulações 2,4-D/lignina, sem degradação e degradadas pelos microrganismos (*P.chrysosporium*, *P.putida* e microflora do solo), foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (JEOL - J5M T300).

III.6.3 - Análise por FTIR

As amostras de formulações 2,4-D/lignina sem ou com tratamento por microrganismos e após eliminação do 2,4-D residual, e uma amostra da lignina usada como matriz foram analisadas por FTIR (Nicolet 520). Foram obtidos espectros de transmissão a partir de pastilhas de KBr com 0,5% do analito.

III.7 - Determinação do 2,4-D por CLAE

As concentrações de 2,4-D foram determinadas através de análise por CLAE, empregando uma coluna Merck RP - 18 de 200x4,6 mm e grãos de 10 µm. Metanol/H₂SO₄ (0,005 mol/L) na proporção 70:30 foi usado como fase móvel na determinação do 2,4-D para os experimentos de liberação em água, e acetonitrila/ácido acético (1%) na proporção 3:8, para os experimentos de degradação por microrganismos puros e pela microflora do solo. O fluxo de eluente foi 1,0 mL/min em ambos os casos. O 2,4-D foi detectado a 280 nm em um cromatógrafo SHIMADZU -LC- 10AD.

IV - Resultados e discussão

IV.1 - Ensaio de biodegradação com microrganismos isolados

IV.1.1- Biodegradação do 2,4-D livre e em formulação de liberação controlada.

Para os ensaios de biodegradação foram escolhidos inicialmente dois microrganismos modelo, o fungo *P.chrysosporium* e a bactéria *P.putida*, ambos produtores de enzimas oxidativas capazes de degradar compostos aromáticos. Os meios degradativos utilizados foram adequados para o crescimento dos microrganismos, facilitando assim as atuações sobre o 2,4-D.

IV.1.1.1 - Degradação por *P.chrysosporium*

O 2,4-D sob a forma livre sofreu diferentes graus de degradação de acordo com a concentração inicial usada em cada cultura (figura 5).

Baseados nos resultados da figura 5, observamos que à medida que aumentávamos a concentração do 2,4-D no meio (5, 10 e 20 mg/L), sua degradação aumentava, 12, 45 e 56%, respectivamente. Porém, quando seguimos aumentando sua concentração (40, 60, 80 e 100 mg/L) observou-se uma queda na degradação, sendo cerca de 35% para 40, 60 e 80 mg/L e 25% para 100 mg/L. A baixas concentrações de 2,4-D (5, 10, 20 mg/L) o efeito predominante deve ter sido uma indução na produção das enzimas do metabolismo do fungo. Já a concentrações elevadas (acima de 40 mg/L), o efeito predominante deve ter sido o início da inibição do metabolismo fúngico devido à toxicidade do 2,4-D.

A tabela 2 mostra os resultados da biodegradação do 2,4-D contido em FLC. Esta tabela apresenta todos os dados utilizados no balanço de massa realizado para determinação do 2,4-D degradado.

Nestes ensaios, o efeito de diferentes concentrações iniciais do herbicida também afetou sua degradação. Numa concentração de 10 mg/L foi observado 20% de degradação. Aumentando a concentração inicial (20, 40 e 60 mg/L) foi

observado um aumento da quantidade degradada, 43, 46 e 42%, respectivamente.

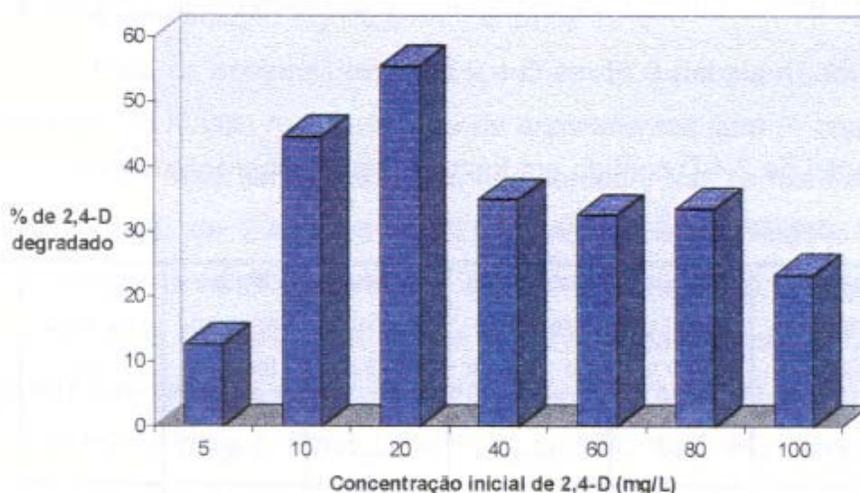


Fig. 5 - Degradação do 2,4-D técnico após 4 dias de incubação com *P. chrysosporium* sob a forma de pellet em meio sintético tamponado por tartarato de amônio 0,02 mol/L a 37°C e 60 rpm.

Ao compararmos o 2,4-D livre e 2,4-D sob a forma de FLC, observamos que em concentrações iniciais de 10 e 20 mg/L, o 2,4-D em FLC sofreu menor degradação, 20 e 43% contra 45 e 56% para o 2,4-D livre. Nas concentrações de 40 e 60 mg/L foi observado um efeito contrário, 46 e 42% para o 2,4-D em FLC contra 35 e 33% para o 2,4-D livre. Uma possível explicação para este fenômeno, reside no fato de que para alcançar as concentrações iniciais, onde a degradação é máxima (20 mg/L), o 2,4-D em FLC necessitava de concentrações iniciais maiores, devido ao efeito de liberação lenta presente neste sistema. Se observarmos os valores de degradação para as concentrações iniciais de 40 e 60 mg/L para o 2,4-D em FLC e de 10 e 20 mg/L para o 2,4-D livre, verificaremos que

seus valores são similares. Tratando-se do mesmo intervalo de tempo, 4 dias, parece-nos que os dois ensaios desenvolveram-se sob o mesmo efeito de concentração. Isto era esperado já que a liberação lenta do 2,4-D em FLC não permite que todo 2,4-D inicial seja solubilizado no período de tempo avaliado (4 dias de degradação). A presença da matriz de lignina também minimizou a toxicidade observada em concentrações iniciais acima de 20 mg/L de 2,4-D livre (figura 5).

Tabela 2 - Degradação de 2,4-D contido em formulações de liberação controlada por *P.chyso sporium*., realizada a 37°C, 60 rpm e pH 4,5.

Conc. Iniciais mg/L	Tempo (dias)	Massa das amostras de FLC com 45,9% de 2,4-D (mg)	Massa inicial de 2,4-D na FLC (mg)	Massa final de 2,4-D no meio de cultura (mg)	Massa residual de 2,4-D na FLC (mg)	Massa residual total de 2,4-D (mg)	2,4-D degradado (%)	Valore Médio de 2,4-D degradado (%)
10	4	2,00	0,92	0,23	0,48	0,71	22,8	20 ± 3
10	4	2,09	0,96	0,22	0,57	0,79	17,7	
20	4	3,70	1,70	0,25	0,72	0,97	43	43 ± 3
20	4	3,40	1,60	0,21	0,70	0,91	43	
20	4	3,20	1,47	0,14	0,65	0,79	46	
20	4	3,50	1,61	0,31	0,67	0,98	39	
40	4	6,40	2,90	0,42	1,18	1,60	45	45,5 ± 0,5
40	4	6,40	2,90	0,29	1,29	1,57	46	
60	4	9,80	4,50	0,86	1,73	2,59	42	42
20	7	3,60	1,70	0,33	0,61	0,94	45	44 ± 1
20	7	3,30	1,50	0,32	0,53	0,85	43	
40	7	6,80	3,10	0,50	1,05	1,55	50	49 ± 1
40	7	6,70	3,10	0,55	1,05	1,61	48	
60	7	9,90	4,50	0,89	1,34	2,23	50	48 ± 2
60	7	9,70	4,50	0,83	1,56	2,39	47	

IV.1.1.2 - Degradação por *P. putida*

Os resultados obtidos nos ensaios de biodegradação de 2,4-D livre por *P. putida* estão mostrados na tabela 3. A bactéria *P. putida* foi mais sensível a altas concentrações iniciais de 2,4-D do que o fungo *P. chrysosporium*. Entre as concentrações testadas, 10, 40 e 80 mg/L, somente em 10 mg/L foi observado um nível de degradação significativo, cerca de 19%.

Para os ensaios utilizando 2,4-D em FLC (tabela 4), foi utilizado o mesmo balanço de massa realizado para os experimentos com *P. chrysosporium* porém, uma tabela mais simplificada está apresentada. Nas concentrações iniciais de 10 e 100 mg/L de 2,4-D em FLC, os valores de degradação foram 29 e 12%, respectivamente. No experimento com 10 mg/L de 2,4-D, a degradação observada para a FLC foi maior que aquela observada na mesma concentração inicial de 2,4-D livre (tabelas 4 e 3). No caso da concentração de 100 mg/L, que seria uma dose tóxica para a *P. putida*, em se tratando do 2,4-D livre, ainda foi possível observar degradação, indicando que para este intervalo de tempo, 5 dias, a quantidade de 2,4-D presente no meio não alcançou concentrações tóxicas à bactéria. Nesse caso, o resultado obtido nos leva a crer, mais uma vez baseados no efeito da liberação controlada, que em concentrações iniciais inferiores a 10 mg/L, *P. putida* pode degradar maiores percentagens de 2,4-D.

Tabela 3 - Degradação do 2,4-D livre por *P. putida* durante 5 dias, realizada a 37°C, 60 rpm e pH 6,5.

Concentração inicial de 2,4-D (mg/L)	2,4-D degradado (%)
10	19 ± 1
40	Zero
80	Zero

Tabela 4 - Degradação de 2,4-D formulado por *P. putida* durante 5 dias, realizada a 37°C, 60 rpm e pH 6,5.

Concentração inicial de 2,4-D (mg/L)	2,4-D degradado (%)
10	29 ± 6
100	12 ± 3

IV.1.1.3 - Determinação de enzimas

Considerando a possibilidade de que as duas formas empregadas do herbicida, 2,4-D livre e em FLC, pudessem alterar o metabolismo degradativo dos microrganismos, monitoramos algumas enzimas oxidativas produzidas durante o processo de biodegradação. Nos ensaios com *P.chrysosporium* foram determinadas a presença das enzimas oxidativas MnP e LiP, capazes de degradar compostos aromáticos. Nestas condições, a atividade da lacase, enzima também produzida pelo *P.chrysosporium*, foram nulas. Para os ensaios com *P.putida* também foram determinadas as enzimas oxidativas, pirocatecase e metapirocatecase, que são capazes de degradar compostos fenólicos. Essas enzimas são citadas na literatura como participantes do processo degradativo de catecois clorados, um dos metabólitos da via degradativa do 2,4-D [Ditzelmuller e col., 1989]. Ainda nos ensaios com *P.putida* foi determinada a enzima MnP, encontrada recentemente nessa bactéria em trabalhos realizados em nosso laboratório.

Os resultados obtidos para LiP e MnP produzidas por *P.chrysosporium* na presença de 2,4-D livre e em FLC com diferentes concentrações estão mostrados nas tabelas 5 e 6. Ao compararmos os valores das atividades enzimáticas com os de degradação do 2,4-D em diferentes concentrações (item IV.2.1.1) observamos que não há uma correlação direta entre eles, exceto nas concentrações de 10 e 20 mg/L, onde foram obtidos os maiores valores de degradação do 2,4-D livre.

Diante da possibilidade de inibição das enzimas pelas diferentes concentrações do 2,4-D, realizamos ensaios de determinação enzimática de MnP e LiP na presença de diferentes concentrações do 2,4-D livre (tabela 7). Verificamos que nas condições ensaiadas nenhuma inibição da atividade enzimática foi observada.

De acordo com estes resultados uma possível explicação para a ausência de correlação entre as atividades enzimáticas e a degradação é que outras enzimas oxidativas estariam agindo no sistema. Evidências desta hipótese podem ser observadas em trabalho realizado por Yadav e Reddy [1993], no qual uma cepa mutante de *P.chrysosporium*, não produtora das enzimas MnP e LiP, foi capaz de mineralizar o 2,4-D.

As enzimas intracelulares pirocatecase e metapirocatecase dos ensaios com *P.putida* não foram encontradas neste experimento, tanto para o 2,4-D livre quanto para o 2,4-D em FLC. A enzima extracelular, MnP, apresentou baixos valores de atividade (3 U/L) tanto para os experimentos com 2,4-D livre quanto em FLC (tabela 8).

Analisando todos os resultados enzimáticos, constatamos que a presença ou a ausência das atividades enzimáticas foi observada, tanto nos experimentos com 2,4-D livre quanto com FLC. Este fato pode indicar que o processo degradativo é o mesmo para os dois sistemas de degradação, 2,4-D livre e em FLC.

Tabela 5 - Teores de enzimas produzidas por *P.chrysosporium* após 4 dias de degradação de 2,4-D livre

Concentração inicial de 2,4-D (mg/L)	Lignina peroxidase (U/L)	Manganês peroxidase (U/L)
5	0	1,0
10	40	1,7
20	25	0,5
60	0	0,2
80	0	0
100	0	0

Tabela 6 - Teores de enzimas produzidas por *P.chrysosporium* após 4* e 7** dias de degradação de 2,4-D em FLC.

Concentração inicial de 2,4-D (mg/L)	Lignina peroxidase (U/L)	Manganês peroxidase (U/L)
20*	17,5	0
40*	3,0	0
60*	0,8	4,3
20**	12,4	4,5
40**	0	2,3
60**	6,2	4,5

Tabela 7 - Inibição da atividade enzimática de LiP e MnP na presença de 2,4-D

Amostras	Atividade Enzimática de LiP (U/L)	Atividade Enzimática de MnP (U/L)
Caldo enzimático	231	127
Caldo + 2,4-D técnico [5 mg/L]	231 ± 25	114 ± 22
Caldo + 2,4-D técnico [10 mg/L]	240 ± 26	119 ± 31
Caldo + 2,4-D técnico [20 mg/L]	268 ± 29	123 ± 6
Caldo + 2,4-D técnico [40 mg/L]	241 ± 27	111 ± 32
Caldo + 2,4-D técnico [60 mg/L]	257 ± 28	119 ± 2
Caldo + 2,4-D técnico [80 mg/L]	247 ± 27	125 ± 1
Caldo + 2,4-D técnico [100 mg/L]	252 ± 28	111 ± 10

Tabela 8 - Teor de MnP nos experimentos de degradação de 2,4-D por *P. putida*

Amostras	Tempo (dias)	Concentração (U/L)
2,4-D livre	1	2,8 ± 0,6
FLC	1	3 ± 1
2,4-D livre	2	3 ± 0,5
FLC	2	6,3 ± 0,5
2,4-D livre	3	1,9 ± 0,3
FLC	3	1,0 ± 0,3
2,4-D livre	4	2,0 ± 0,6
FLC	4	2,8 ± 0,5
2,4-D livre	5	3,0 ± 0,3
FLC	5	4 ± 1

IV.2 – Ensaio de degradação de 2,4-D em solo

IV.2.1 - Biodegradação de 2,4-D livre e em formulação de liberação controlada

A fim de encontrar as condições adequadas para estudar a biodegradação do 2,4-D em solo, dois sistemas foram ensaiados. Sistema com e sem estimulação inicial do crescimento dos microrganismos presentes no solo.

IV.2.1.1 - Sistema sem estimulação dos microrganismos (SSEM)

Os resultados obtidos nos ensaios de biodegradação do 2,4-D livre presente no solo estão mostrados na figura 6. Apesar dos elevados desvios experimentais, podemos observar claramente a degradação do 2,4-D que variou entre 7 e 10% durante o período de 10 a 40 dias, demonstrando que basicamente o processo ocorreu nos primeiros 10 dias. Uma das possíveis explicações para este fenômeno seria a disponibilidade do herbicida à microflora presente no solo. Considerando o fenômeno de adsorção do herbicida ao solo, podemos supor que

no intervalo de 10 dias havia uma concentração de herbicida na fase solúvel do solo (fase contendo líquido no solo) a qual, segundo a literatura, é a fase preferencial para a biodegradação, suficiente para estimular a degradação do herbicida. Já o aumento deste intervalo de tempo pode ter causado os seguintes efeitos:

a - A concentração do herbicida na fase solúvel do solo, devido ao efeito de solubilização do 2,4-D, alcançou níveis tóxicos para a microflora presente.

b - O herbicida adsorvido na fase sólida do solo, fase na qual ele se torna menos ou mesmo não biodisponível, não sofreu o processo de desorção. Assim, o herbicida não se fez disponível à ação dos microrganismos à medida que este foi consumido da fase solúvel.

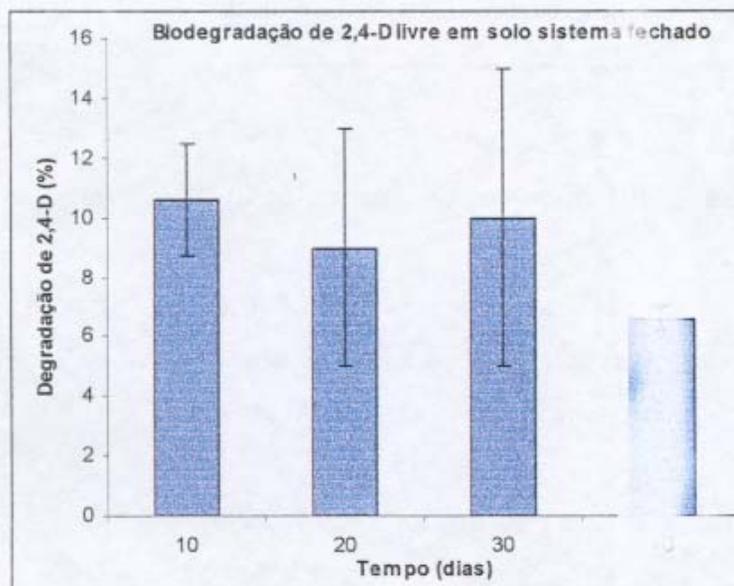


Fig.6 – Degradação de 2,4-D livre (9,4 Kg/ha) em sistema fechado.

Os resultados dos ensaios de biodegradação em solo de 2,4-D em FLC estão mostrados na tabela 9. Devido à pouca liberação do 2,4-D das FLC e à baixa eficiência da extração, metanol em ultrassom, as quantidades de 2,4-D recuperadas do solo não alcançaram teores mensuráveis pela técnica de CLAE.

Logo, a avaliação dos resultados obtidos neste experimento foi baseada no 2,4-D residual nas FLC. Os teores de 2,4-D residuais nas FLC foram bastante semelhantes para os diferentes tempos de incubação empregados, sendo que os valores para o mesmo intervalo de tempo tanto em solo estéril quanto em solo vivo, não apresentaram variações significativas. De acordo com este resultado, concluímos que o intervalo de tempo utilizado não foi suficiente para observar o processo de difusão do 2,4-D da FLC. E enquanto o 2,4-D for componente da FLC, ele não sofre a ação dos microrganismos. Neste caso, o 2,4-D se comporta de maneira semelhante ao herbicida adsorvido na fase sólida do solo.

A fim de observarmos a degradação do 2,4-D após liberação da FLC foram realizados experimentos empregando maior intervalo de tempo. E para alcançar maiores valores de biodegradação do 2,4-D, e conseqüentemente melhor avaliação das possíveis diferenças entre as duas formas do 2,4-D empregado, livre e sob a forma de FLC, os novos experimentos foram conduzidos em meio com estimulação inicial do crescimento da microflora presente no solo.

Tabela 9 - 2,4-D residual nas FLC ensaiadas em solo

Dias	% de 2,4-D residual na FLC	
	Solo estéril	Solo vivo
10	89 ± 6	88 ± 3
20	95 ± 1	95,0 ± 0,1
30	99,0 ± 0,5	97,0 ± 0,3
40	86,7 ± 0,1	90 ± 1

IV.2.1.2 - Sistema com estimulação do crescimento dos microrganismos (SCEM)

Os resultados obtidos estão mostrados na figura 7 e as tabelas 10 e 11.

A figura 7 mostra as placas com solos vivo e estéril, onde o 2,4-D livre foi ensaiado durante 60 dias. A ausência de grãos de 2,4-D na superfície do solo vivo foi o primeiro indício da atuação dos microrganismos. Estes resultados foram confirmados após análise do 2,4-D residual presente nos solos através de CLAE, tabela 10.

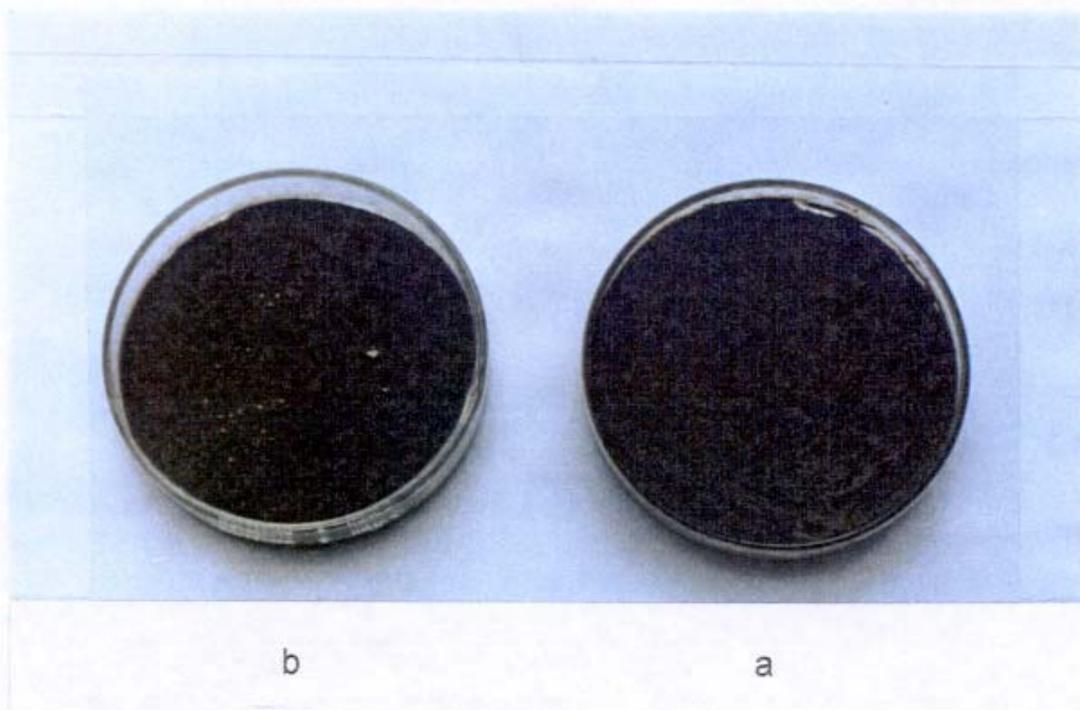


Fig. 7 – 2,4-D livre em solo vivo (a) e estéril (b) (100% da capacidade do solo) incubados durante 60 dias a $30 \pm 2^\circ \text{C}$ na ausência de luz.

A porcentagem de 2,4-D degradada foi obtida subtraindo o 2,4-D detectado em solo estéril do 2,4-D detectado em solo vivo. A degradação observada foi de $45 \pm 5\%$, tabela 10. Os resultados indicam que a estimulação inicial dos microrganismos favoreceu a biodegradação do 2,4-D em solo. Os valores de degradação obtidos foram maiores do que os observados no sistema fechado sem estimulação do crescimento inicial dos microrganismos, 7 a 10% de degradação.

As quantidades de 2,4-D recuperadas nas amostras provenientes dos solos estéreis apresentaram melhor reprodutibilidade do que as amostras provenientes de solos vivos. Isto pode ser fruto das variações nos valores de degradação alcançados nas diferentes replicatas.

A extração com metanol em soxhlet foi bastante eficiente, mas cerca de 27% de 2,4-D não foi recuperado. Este herbicida residual pode estar fortemente ligado ao solo, sendo que estas interações não foram rompidas pela ação do metanol. Esta hipótese está de acordo com o trabalho de Bollag [1980], segundo o qual, os xenobióticos que estão incorporados a compostos estáveis de matéria orgânica do solo, não são facilmente removidos. Esta incorporação pode ocorrer por adsorção do composto em questão pelos sítios ativos dos ácidos húmicos e fúlvicos [Stevenson 1972] citado por Bollag [1980]. A reação de humificação do 2,4-D durante seu processo de degradação em resíduos residenciais (grama), foi observada em trabalho realizado por Michel e col. [1995]. Eles encontraram cerca de 70% do ^{14}C do 2,4-D em resíduos com massa molecular de 1600 e os 30% restantes com massa molecular de 700. A humificação e polimerização que pode levar a um aumento da massa molecular do composto em processos de degradação, também foram observadas por Bollag [1980]. O 2,4-dicloro fenol na presença de constituintes húmicos, ácido síringico e ácido vanílico, e lacase, sofreu o processo de polimerização, que ocorreu entre as próprias moléculas do 2,4-dicloro fenol e entre as moléculas de 2,4-dicloro fenol e de constituintes do solo.

A tabela 11 mostra os resultados observados com a biodegradação de 2,4-D formulado. Ao observarmos os resultados de 2,4-D residual em solo e presente na FLC, poderemos concluir que 60 dias de incubação a 100% da capacidade de campo, são condições suficientes para observar a difusão do 2,4-D da FLC. Em média, 61 % de 2,4-D estava ausente da FLC no fim de 60 dias, tanto em solo vivo quanto em solo estéril. Porém, as liberações em triplicata diferem significativamente. A subtração do 2,4-D residual em solo estéril do vivo nos dá uma degradação de $17 \pm 3\%$.

Ao compararmos a degradação obtida com o 2,4-D livre ($45 \pm 5\%$) com a obtida com as FLC, verificamos que nestas condições, a FLC amenizou a degradação do 2,4-D. Uma comparação entre os resultados obtidos com as FLC em solo, com e sem estimulação da microflora, nos leva a concluir que não havendo liberação do herbicida, este não estará disponível a ação dos microrganismos. Assim sendo, a FLC funciona como uma barreira à degradação do ingrediente ativo nela incorporado.

Tabela 10 – Degradação de 2,4-D livre em solo SCEM

Amostras	2,4-D residual no solo (%)	2,4-D degradado (%)
Solo estéril	$72,5 \pm 14^*$	
Solo vivo	$28 \pm 8^*$	$45 \pm 5^{**}$

*desvio da média, ** desvio acumulado [Baccan e col. 1979].

Tabela 11 - Degradação de 2,4-D formulado em solo do SCEM

Amostras	2,4-D residual no solo (%)	2,4-D residual na FLC (%)	Somatório do 2,4-D residual (%)	Somatório médio do 2,4-D residual (%)	2,4-D degradado (%)
Estéril	13,5	48,5	62	63 ± 11	
Estéril	10,5	42,4	53		
Estéril	48	27	75		
Vivo	16	11	27	46 ± 17	17 ± 3
Vivo	0,5	53,3	54		
Vivo	4,4	53,4	58		

Nos produtos comerciais o 2,4-D encontra-se sobre a forma líquida, porém, em nossos ensaios em solo ele foi empregado sobre a forma sólida. A razão de utilizá-lo sobre esta forma era assemelhá-lo a sua forma na FLC. Uma utilização do 2,4-D em solução ou suspensão poderia ter acentuado o efeito de proteção contra a biodegradação do herbicida oferecido pela FLC em solo.

IV.3 – Determinação de metabólitos

A necessidade de determinar os metabólitos da via degradativa, surgiu juntamente com os questionamentos iniciais deste trabalho.

- O 2,4-D presente na FLC estaria sujeito a degradação? Para o caso de uma resposta afirmativa, a acumulação de metabólitos na FLC seria um instrumento de comprovação.

- As duas formas de 2,4-D, livre e em FLC, teriam mecanismos de degradação diferenciados? Para o caso de uma resposta afirmativa, poderíamos obter diferentes metabólitos para as duas vias de degradação como evidência desta hipótese.

A determinação dos metabólitos, como descrita na parte experimental, foi realizada por CG/EM. Os resultados obtidos estão ilustrados sobre a forma de cromatogramas e espectros apresentados no apêndice II.

A identificação de possíveis compostos frutos da degradação do herbicida ou da lignina, matriz da FLC, foi realizada através da busca do aparecimento de novos compostos inicialmente ausentes nos 3 sistemas modelo usados para a degradação.

Devido as diferentes origens do 2,4-D (livre e em FLC) e dos diferentes ambientes de degradação (meio de cultura e solo) foi necessária a realização de diferentes amostras controle para a identificação dos metabólitos, (figuras 8, 9, 13, 15, 18, 20, 22, 24 e 26 apêndice II). A amostra controle comum a todas as análises, encontrada no cromatograma da figura 8 apêndice II, foi obtida a partir da mistura dos seguintes reagentes:

BSTFA, reagente para derivatização das amostras.

Piridina, solvente para o herbicida e seus possíveis metabólitos e isômeros.

Acetato de etila, utilizado para extrair o 2,4-D e seus possíveis metabólitos e isômeros dos meios de cultura para o fungo e para a bactéria.

As figuras 9 a 10 mostram o cromatograma e o espectro do 2,4-D técnico derivatizado com BSTFA, respectivamente. O pico mais intenso no cromatograma mostrado na figura 9 com tempo de retenção (TR) de 22,24 min, refere-se ao 2,4-D derivatizado. Os picos com TR de 18,34 e 19,32 min foram identificados como isômeros do 2,4-D derivatizado e seus espectros estão mostrados nas figuras 11 e 12, respectivamente. O isômero com TR de 19,32 min gerou ions molares em quantidades significativamente menores do que o isômero com TR de 18,34 min. Os espectros do 2,4-D derivatizado e seus isômeros apresentam em comum o ion molecular 292, mas fragmentações diferenciadas. O ion molar 292 é fruto da massa molecular do 2,4-D (220) mais o grupo $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ proveniente do reagente derivatizador (BSTFA). Os isômeros encontrados na literatura para o 2,4-D são:

ácido 2,3 diclorofenoxiacético e ácido 3,4 diclorofenoxiacético [McLafferty e Stauffer, 1989].

As amostras controle para o 2,4-D residual, livre e em FLC, presentes no meio de cultura após degradação, foram obtidas empregando 2,4-D livre mais o meio de cultura usado durante os ensaios de degradação (figuras 13 e 18 apêndice II). Os picos apresentados no cromatograma da figura 13 são provenientes do reagente de derivatização, do meio de cultura, do 2,4-D e os seus isômeros. O pico do isômero com TR de 19,32 apresentou intensidade imensurável nesta amostra.

Uma comparação entre o cromatograma obtido da análise da amostra do 2,4-D degradado por *P.chrysosporium* (figura 14 apêndice II) e o cromatograma controle (figura 13 apêndice II) demonstrou que nenhum novo composto se formou devido a degradação do 2,4-D.

O 2,4-D e seus isômeros extraídos da FLC sem qualquer tratamento foram empregados como um controle para os ensaios de degradação do 2,4-D sob a forma de FLC (figura 15 apêndice II). O isômero com TR de 18,34 min, presente no 2,4-D livre, se encontra ausente no cromatograma do extrato da FLC. Com isto podemos sugerir que este isômero pode ser a fração do 2,4-D não extraída por metanol em ultra-som, conforme discutido no apêndice I. Já que nenhuma perda durante o processo de obtenção da FLC foi detectada. Isto pode ser constatado ao analisarmos os resultados obtidos da extração do 2,4-D em "soxhlet" por 90 horas utilizando água como solvente, na qual 100% de 2,4-D foi extraído da FLC.

O cromatograma do extrato da FLC degradada por *P.chrysosporium* (figura 17 apêndice II) mostrou-se similar ao da FLC sem tratamento, e demonstrou a ausência de possíveis acumulações de metabólitos do 2,4-D no interior da formulação.

O cromatograma obtido da análise do meio de cultura após degradação do 2,4-D sobre a forma de FLC por *P.chrysosporium*, encontra-se na figura 16, apêndice II. Este cromatograma também não apresentou a presença do isômero com TR igual a 18,32 min. Isto nos leva a duas hipóteses:

- O sistema enzimático envolvido no processo de degradação não é capaz de hidrolisar os grupos formados entre o isômero e a lignina, portanto este mantém-se ligado a matriz da formulação.

- O sistema enzimático pode proporcionar a hidrólise, porém uma vez que esta ocorre o isômero está disponível e é degradado.

A primeira hipótese torna-se inadequada ao compararmos os espectros de FTIR das FLC degradadas pelos microrganismos (item IV.4.3), nos quais a hidrólise dos grupos ésteres formados entre a lignina e 2,4-D e/ou seu isômero, foram observadas.

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que o *P.chryso sporium* foi capaz de degradar o herbicida (livre ou em FLC) e os metabólitos de sua via degradativa, simultaneamente. Resultados similares a estes são encontrados na literatura. Yadav e Reddy [1993] observaram a mineralização do 2,4-D por *P.chryso sporium*, a partir do 3º dia da adição do herbicida. Baseados nestes resultados podemos inferir que estes metabólitos apresentaram curta duração.

Um trabalho realizado por Valli e Gold [1991], utilizando *P.chryso sporium* em condições similares as usadas neste trabalho para degradar o 2,4-dicloro fenol, demonstrou que este fungo é capaz de mineralizar um dos metabólitos da via degradativa do 2,4-D, o 2,4-diclorofenol, e também seus derivados. A identificação dos metabólitos do 2,4-diclorofenol foi realizada em curtos intervalos de incubação, uma, seis e dezesseis horas. Isto enfatiza a curta vida de tais metabólitos. Em nossos experimentos, além da curta vida, estes metabólitos devem ter se formado em concentrações que não favoreceram o acúmulo, o que poderia provocar uma possível intoxicação dos microrganismos presentes nos sistemas degradativos.

Resultados similares aos obtidos com o *P.chryso sporium*, foram observados com a *P. putida* e com a microflora do solo, figuras 18 a 21 e 22 a 27, respectivamente.

A ausência do isômero (TR = 18,43), significativamente presente no 2,4-D livre, mesmo após degradação por *P.chrysosporium*, não foi observada na análise do 2,4-D livre degradado por *P.putida*. Este resultado demonstra que o sistema enzimático da bactéria tem maior afinidade pelo isômero do que o sistema enzimático do fungo.

Os cromatogramas das análises de 2,4-D, livre e em FLC, residual em solos estéreis, apresentaram picos intensos nos tempos de retenção de aproximadamente 30, 20; 34,48 min, ausentes nos solos vivos. Estes compostos foram identificados como açúcares. Eles são provenientes da técnica empregada para estimulação do crescimento dos microrganismos presentes no solo, item III.3.2. Todas as amostras provenientes dos ensaios de solo apresentaram um composto com TR 17,49 min com características de composto clorado. Porém este estava ausente nos controles do 2,4-D livre e sob a forma de FLC, bem como, nos sistemas degradativos empregando fungo e bactéria. Este composto foi identificado como o éster metílico do 2,4-D. Uma explicação para o aparecimento desse éster vem da possível reação do 2,4-D com metanol (usado no processo de extração) na presença de metais presentes em solo. O aparecimento do éster metílico de 2,4-D no interior das formulações nos leva a crer, que estas foram capazes de adsorver metais presentes no solo, proporcionando assim a mesma reação entre o 2,4-D e metanol observada nas amostras extraídas do solo.

Não foi identificado nenhum composto que pudesse ser fruto de reações de polimerização, entre as próprias moléculas do 2,4-D e entre 2,4-D e substâncias do solo. Se a última ocorreu, esta foi suficientemente intensa para manter o 2,4-D ligado ao solo, ao ponto de não ser extraído pela ação do metanol, ou levando a compostos de elevada massa molecular que não foram detectados por CG. Essa parece uma hipótese coerente, considerando os 27% de 2,4-D não recuperados após extração utilizando metanol.

Os resultados obtidos com *P.chrysosporium*, *P.putida* e microflora do solo, demonstram que o 2,4-D segue caminhos degradativos semelhantes, tanto sob a forma livre como em FLC.

IV.4 - Alterações da matriz polimérica ocorridas durante a biodegradação

As formulações de liberação controlada também foram analisadas quanto às modificações físicas e químicas ocorridas na matriz. Para isto foram empregadas as seguintes metodologias: determinação da cinética de liberação do 2,4-D em meio aquoso, microscopia eletrônica de varredura e FTIR.

IV. 4.1 - Determinação da cinética de liberação do 2,4-D

Os ensaios de liberação do herbicida a partir da matriz de lignina foram realizados em água. A liberação do 2,4-D em água foi testada para os seguintes modelos: cinética de ordem zero, cinética de primeira ordem e cinética de ordem meio (controlada por difusão).

A cinética mais adequada para descrever a liberação do herbicida foi de ordem $\frac{1}{2}$ que é característica de um mecanismo de difusão, conforme representado pela equação de Higuchi [Souza, 1994]. Os valores da constante aparente de difusão (equação 1), variável que é proporcional à velocidade de liberação do ingrediente ativo, foram empregados neste trabalho com o objetivo de verificar as possíveis modificações ocorridas na formulação após o processo degradativo.

$$Q' = K' t^{1/2}$$

Eq.1

onde: Q = razão entre quantidade de ingrediente ativo liberado e quantidade inicial.

t = tempo (dias)

K = constante de difusão aparente

A figura 28 mostra a liberação de 2,4-D em água, antes de qualquer processo de degradação. A constante de difusão foi calculada para o intervalo de 7 a 60% da liberação do 2,4-D, pois a partir deste intervalo o comportamento cinético não é mais regido por uma cinética de ordem meio, conforme prevê a equação 1, mas sim por uma cinética logarítmica. A constante calculada com base na inclinação da curva da figura 28 foi igual a $11 \text{ dias}^{-1/2}$.

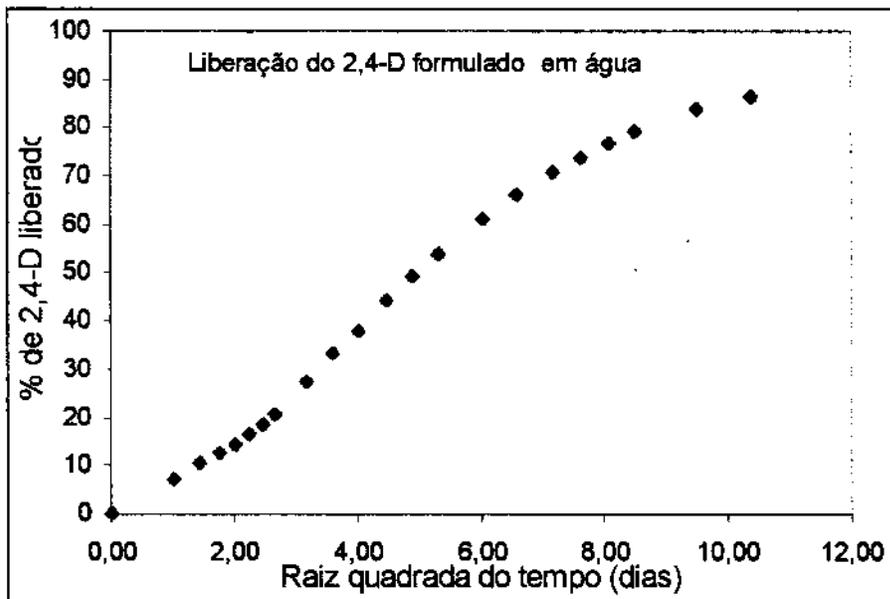


Fig. 28– Liberação do 2,4-D a partir da FLC em meio estático, água a $30 \pm 2^\circ \text{C}$

As cinéticas de liberação do 2,4-D formulado antes e após biodegradação, por *P.chrysosporium* e *P.putida*, estão mostradas nas figuras 29 e 30, respectivamente. As amostras de FLC usadas para determinar a constante de difusão aparente (K) antes do processo degradativo, foram inicialmente incubadas em água durante 4 e 5 dias, como controle para os ensaios feitos com FLC biodegradadas por *P.chrysosporium* e *P.putida*, respectivamente. Este procedimento foi realizado a fim de assemelhá-las às FLC submetidas à degradação as quais, além do processo de degradação, passaram pelos processos de inchamento dos grãos de FLC e de difusão do 2,4-D.

Ambos os processos degradativos alteraram a velocidade de liberação do 2,4-D. No caso da formulação tratada com *P.chrysosporium*, a constante de difusão (K) sem tratamento era de 9 dias^{-1/2} passando para 17 dias^{-1/2} após a biodegradação. Similar alteração também foi verificada para as formulações tratadas com *P.putida*, sendo que a constante de difusão variou de 12 dias^{-1/2} antes do tratamento para 16 dias^{-1/2} após o tratamento. O aumento das constantes indicam uma aceleração da velocidade de liberação do 2,4-D. Estas alterações na velocidade de difusão do herbicida foram proporcionadas pelas mudanças físicas e químicas observadas na FLC, itens IV.4.2 e IV.4.3.

As amostras de FLC que permaneceram em solo vivo por 60 dias, apresentaram baixas concentrações residuais de herbicida. Isso impossibilitou um acompanhamento da cinética de liberação do herbicida em água, e conseqüentemente a determinação das constantes de difusão do herbicida da FLC.

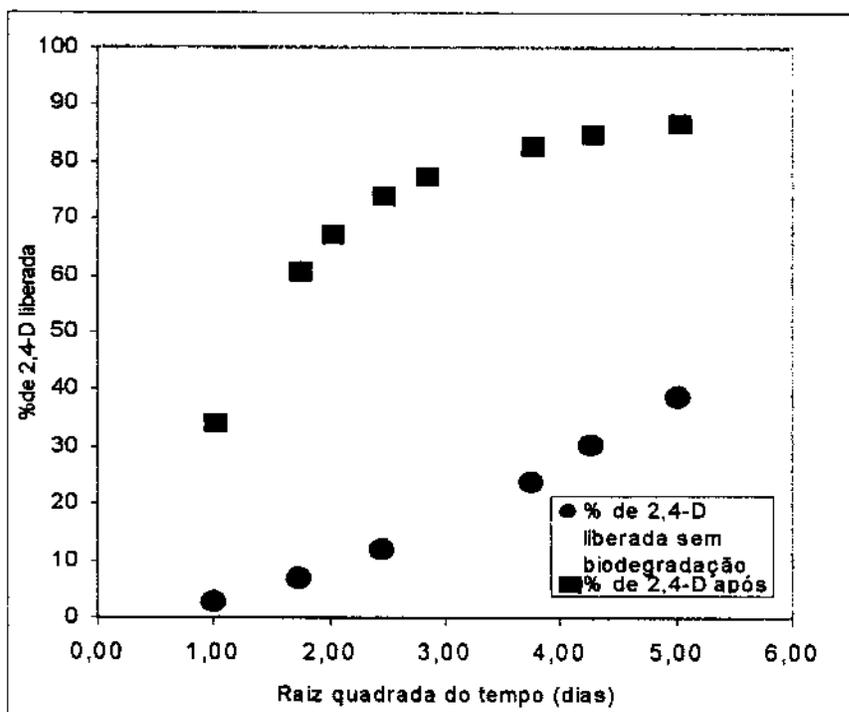


Fig. 29 – Liberação do 2,4-D das FLC antes e após tratamento por *P.chrysosporium*. (meio aquoso estático a $30 \pm 2^\circ\text{C}$).

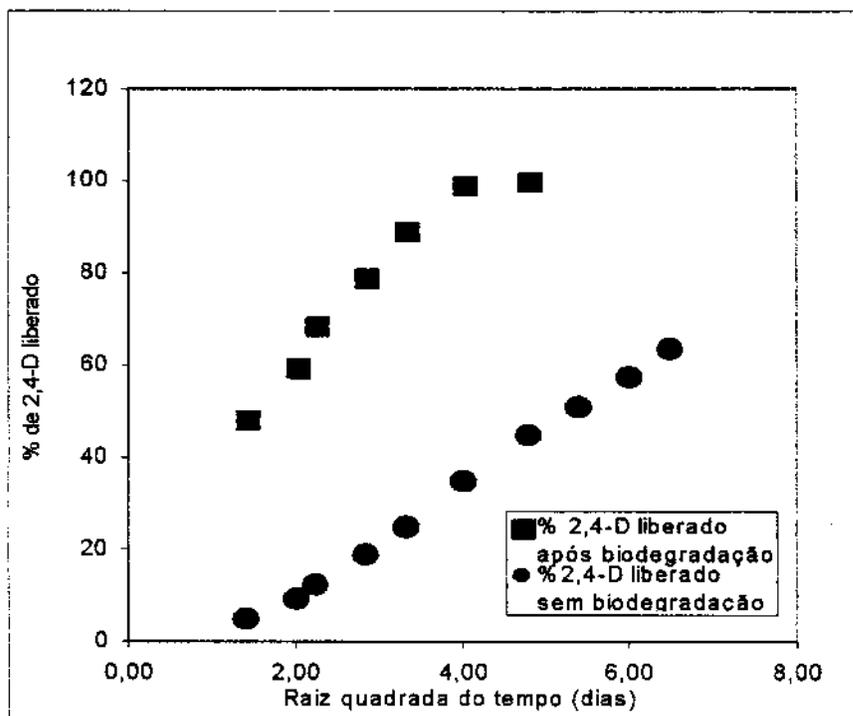


Fig. 30 – Liberação do 2,4-D das FLC antes e após tratamento por *P. putida* (meio aquoso a $30 \pm 2^\circ\text{C}$).

IV.4.2 - Microscopia eletrônica de varredura

Os resultados estão mostrados nas figuras 31 a 35. A figura 31 mostra grãos de 2,4-D grau técnico. Estes grãos são similares aos encontrados na superfície das FLC sem qualquer tratamento (figura 32).

Baseados nos grânulos brancos de 2,4-D na superfície da formulação sem qualquer tratamento inicial, podemos constatar a homogeneidade da formulação (figura 32). As formulações, sem qualquer tratamento, liberadas em água durante 5 dias sob agitação (figuras 33), apresentaram ausência dos grânulos brancos (2,4-D) na superfície, provavelmente devido ao processo de liberação. Esta superfície apresentou a formação de pequenas rachaduras provenientes do processo de inchamento dos grãos.

As formulações tratadas com *P. chrysosporium*, durante 4 dias (figura 34), além de apresentarem a ausência dos grânulos brancos, também apresentaram-

se com mais rachaduras do que as simplesmente liberadas em água. O mesmo efeito foi observado com as formulações tratadas com *P.putida*, figura 35.

As FLC ensaiadas em solo do SCEM estão mostradas nas figuras 36 e 37. Os grãos de FLC inoculados em solo estéril e vivo apresentaram rachaduras similares sem as variações acentuadas nas superfícies dos grãos como às observadas nas formulações tratadas pelo fungo e pela bactéria. Isto pode ser devido ao fato de que a degradação nos sistemas empregando fungo e bactéria foi realizada em meio aquoso, o que contribuiu para um maior efeito de inchamento dos grãos.

Em síntese, os resultados de microscopia eletrônica de varredura revelaram alterações ao nível físico na superfície das formulações, sendo estes mais acentuados nas FLC tratadas por *P.chrysosporium* e *P.putida*. Considerando que a porosidade da formulação é uma variável que está correlacionada com a constante de difusão, que por sua vez está relacionada com a velocidade de liberação do ingrediente ativo, equação 1, podemos inferir que as alterações de porosidade da FLC, após sua degradação, contribuíram para o aumento da velocidade de liberação do 2,4-D.

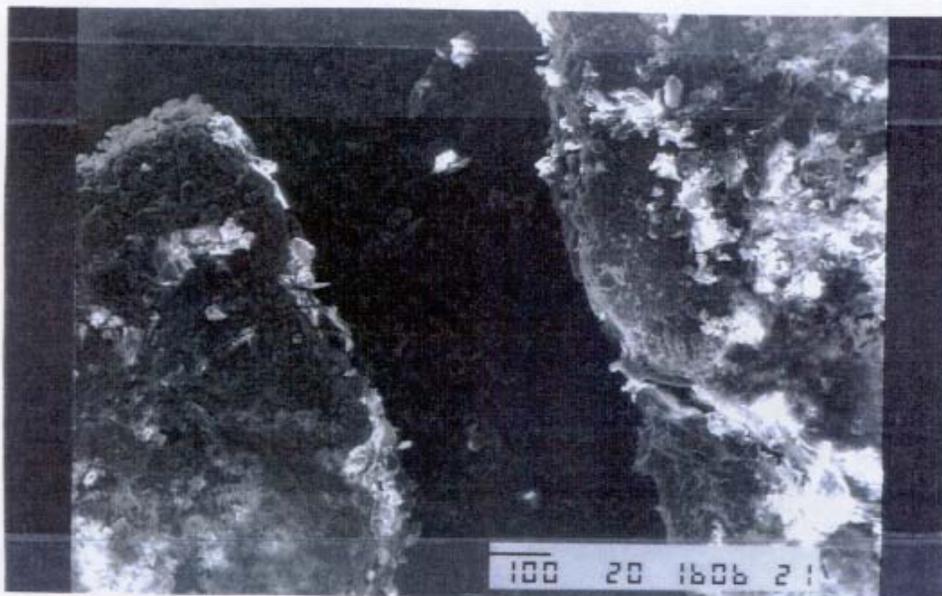


Fig. 31 - Grãos 2,4-D grau técnico com aumento de 100 vezes



Fig. 32 - Formulação 2,4-D/lignina (45,9% em 2,4-D), com aumento de 100 vezes.



Fig. 33 - Formulação 2,4-D/lignina (45,9% em 2,4-D) liberada em água, sob agitação durante 5 dias, com aumento de 75 vezes.

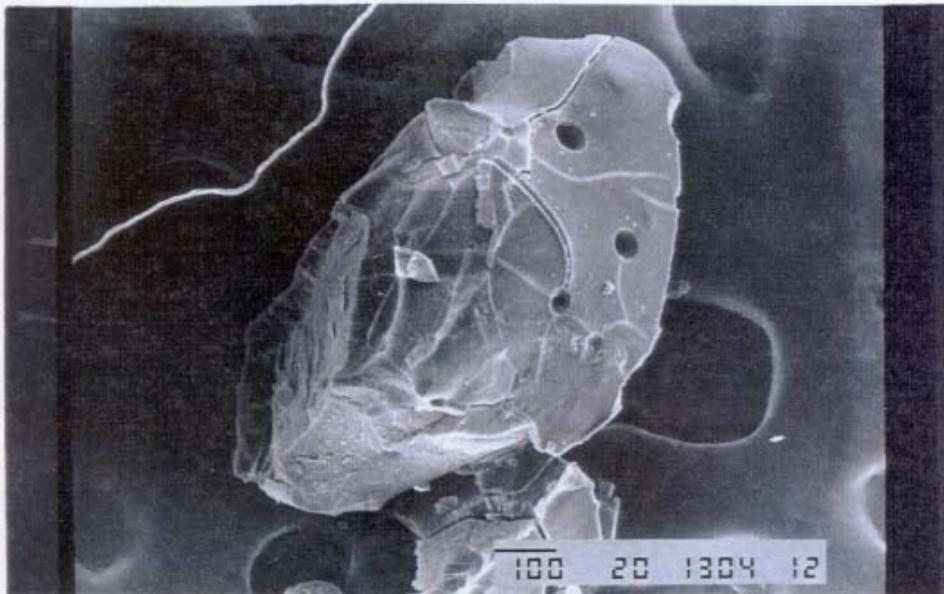


Fig. 34 - Formulação 2,4-D/lignina (45,9% em 2,4-D) tratada por 4 dias com *P.chrysosporium*, com aumento de 100 vezes.

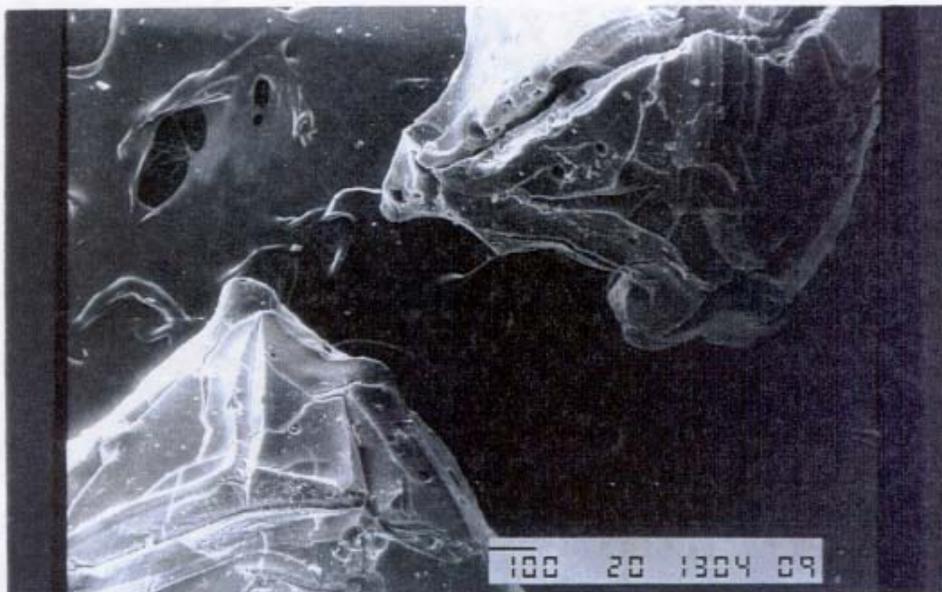


Fig. 35 - Formulação 2,4-D/lignina (45,9% em 2,4-D) tratada por 5 dias com *P.putida*, com aumento de 75 vezes.

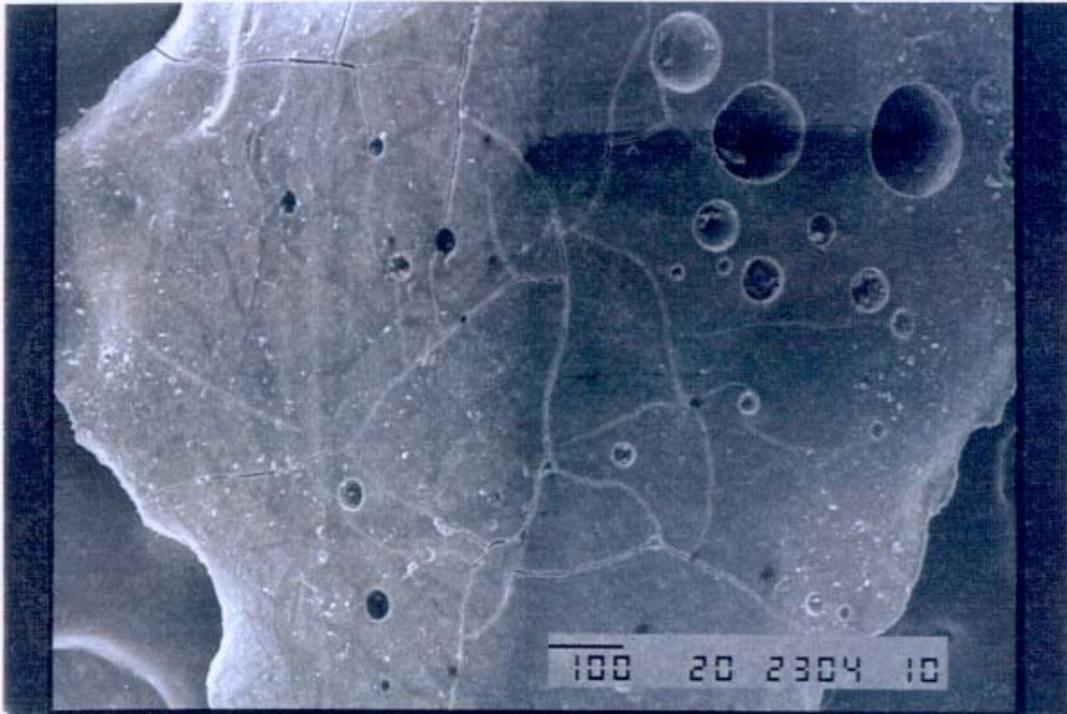


Fig. 36 – Formulação 2,4-D/lignina (45,9% em 2,4-D) incubada em solo estéril (SCEM) durante 60 dias, com aumento de 100 vezes.



Fig. 37 – Formulação 2,4-D/lignina (45,9% em 2,4-D) incubada em solo vivo (SEM) durante 60 dias (aumento de 100 vezes).

IV.4.3 - Análise por FTIR

A fim de observar mudanças químicas ocorridas na lignina (matriz da FLC) devidas à ação dos microrganismos, foram obtidos espectros de FTIR da lignina, da FLC após liberação do 2,4-D em água, da FLC após tratamento com *P.chrysosporium* e FLC após tratamento com *P.putida*, seguidas de liberação do 2,4-D residual em água. A normalização dos espectros foi realizada dividindo-se os valores de absorvância de todas as bandas pelo valor correspondente à banda em 1510 cm^{-1} de cada espectro.

Ao compararmos a FLC após liberação do 2,4-D em água (figura 39) com a lignina (figura 38), pode-se observar que a banda em 1753 cm^{-1} é mais acentuada no espectro da FLC. Esta banda foi atribuída ao grupo C=O tipicamente encontrado em ésteres. As bandas abaixo de 800 cm^{-1} presentes no espectro da FLC são devidas as ligações carbono-cloro. A variação da banda em 1753 cm^{-1} foi recentemente observada por Ferraz e col. [1997]. Neste trabalho foi realizada a subtração entre o espectro do 2,4-D e a FLC, que resultou num possível espectro da lignina (matriz da formulação), sendo este último comparado com o espectro da lignina original empregada na obtenção da formulação. O espectro obtido da subtração do 2,4-D e da lignina apresentou bandas em 1753 cm^{-1} e 1080 cm^{-1} diferentes do espectro da lignina original. Estas foram atribuídas ao estiramento de C=O e C-O dos grupos ésteres. O aparecimento destas bandas foi atribuído a ligações entre a lignina e o 2,4-D que se formaram no processamento da FLC a alta temperatura.

A possibilidade de modificações na lignina devida à temperatura de processamento da FLC foi verificada a partir das análises de DSC (calorimetria diferencial de varredura) apresentadas no Fourth Periodic Report [1992]. No gráfico de DSC (a curva que mostra o pico em $447,67^{\circ}\text{C}$, figura 42 apêndice III), observa-se que antes de 200°C não há nenhuma transição na lignina de bagaço. Considerando que a temperatura real de processamento da FLC variou de $135 - 136^{\circ}\text{C}$, podemos a grosso modo inferir que o espectro da formulação 2,4-D/lignina (figura 39) não apresenta modificações estruturais provenientes da temperatura de processamento da FLC na lignina de bagaço. Porém, devemos ressaltar que estas considerações são aproximações, pois as análises de DSC foram realizadas em atmosfera de nitrogênio e a FLC obtida na presença de oxigênio do ar.

Se compararmos a FLC sem tratamento (figura 39) com a formulação tratada com *P.chrysosporium* (figura 40), podemos observar que a banda em 1753 cm^{-1} apresenta maior intensidade na FLC não tratada pelo fungo. A intensidade da banda na formulação tratada se assemelha à da banda obtida no espectro da lignina (figura 38). Esta menor intensidade da banda pode ser devida à atuação

Se compararmos a FLC sem tratamento (figura 39) com a formulação tratada com *P.chrysosporium* (figura 40), podemos observar que a banda em 1753 cm^{-1} apresenta maior intensidade na FLC não tratada pelo fungo. A intensidade da banda na formulação tratada se assemelha à da banda obtida no espectro da lignina (figura 38). Esta menor intensidade da banda pode ser devida à atuação do fungo, que proporcionou a hidrólise dos grupos ésteres formados entre o herbicida e a lignina. As bandas de carbono-cloro (abaixo de 800 cm^{-1}) não foram alteradas pela ação fúngica. O mesmo efeito observado na formulação tratada pelo fungo foi observado na FLC tratada pela bactéria (figura 41). A alteração da banda em 1753 cm^{-1} foi atribuída neste caso a ação da bactéria *P.putida*.

A hidrólise dos grupos ésteres formados entre o 2,4-D e a lignina também pode ter contribuído com o aumento da velocidade de liberação do 2,4-D da FLC.

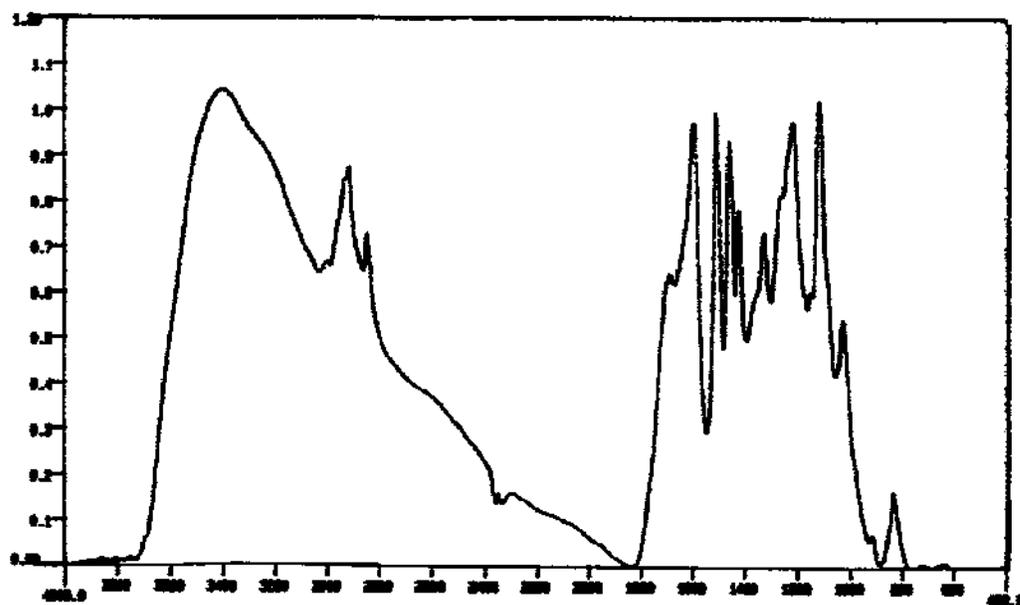


Fig. 38 - Espectro FTIR da lignina de bagaço de cana.

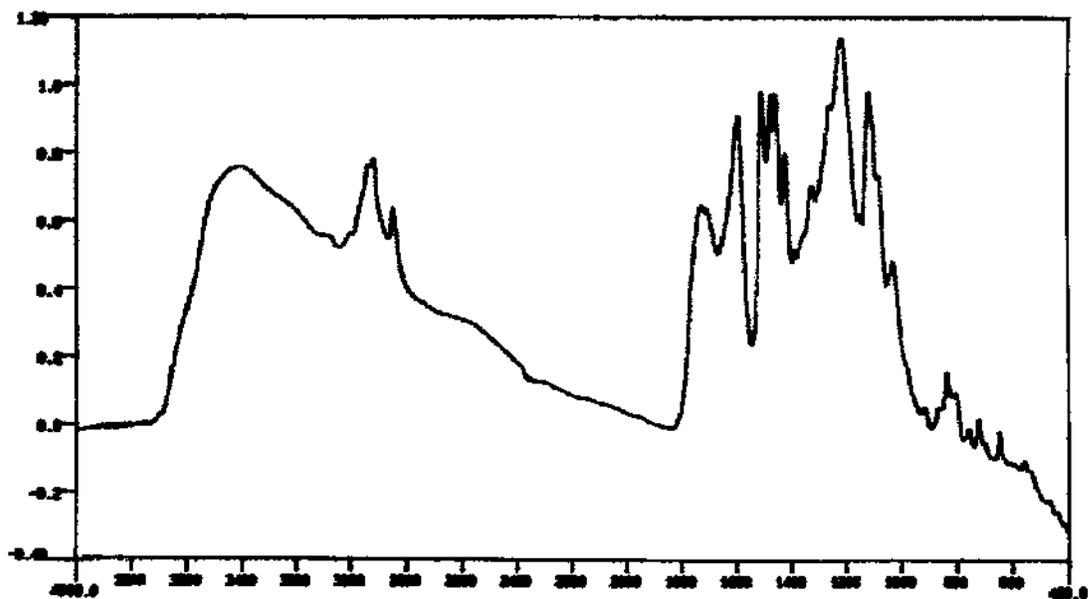


Fig. 39 - Espectro FTIR da formulação 2,4-D/lignina (45,9% em 2,4-D) após 50 dias de liberação em água.

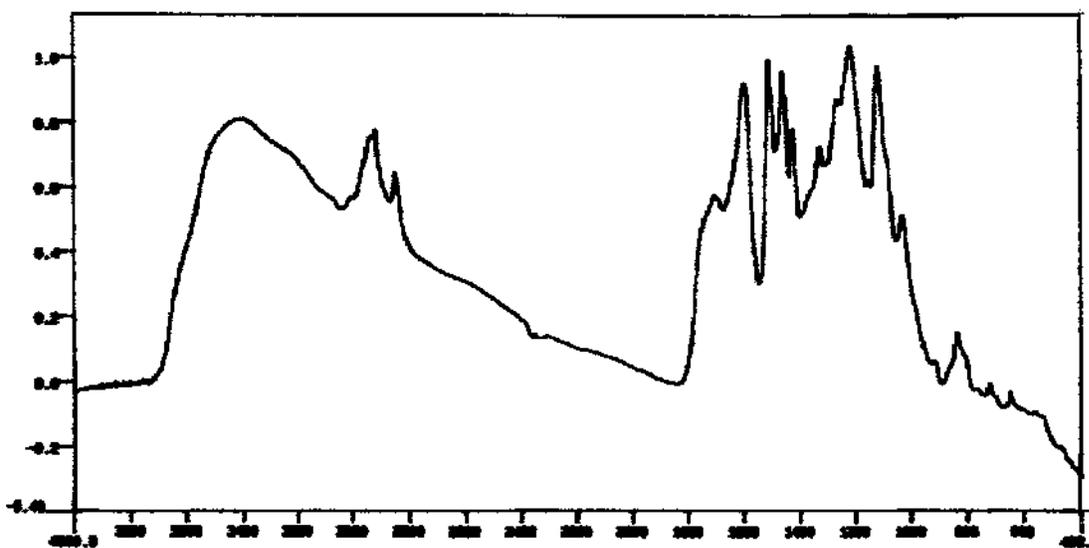


Fig. 40 - Espectro FTIR da formulação 2,4-D/lignina (45,9% em 2,4-D) degradada por *P.chrysosporium* durante 4 dias, seguida de liberação por aproximadamente 50 dias em água.

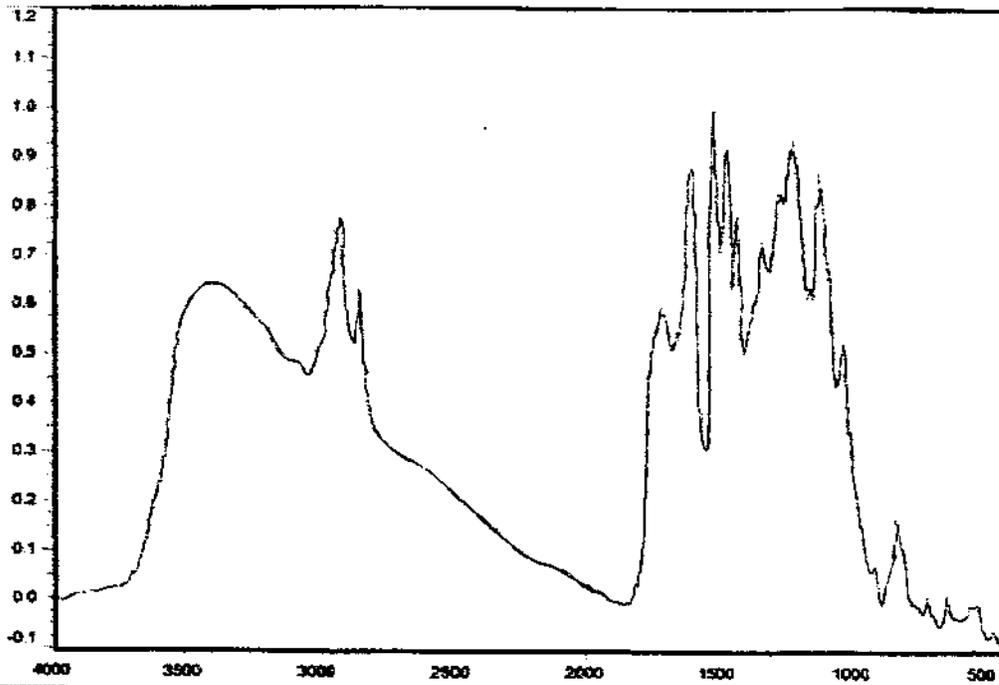


Fig. 41 - Espectro FTIR da FLC (45,9% em 2,4-D) degradada por *Pseudomonas* durante 5 dias, seguida por 50 dias de liberação.

V - Conclusões

- A concentração inicial do herbicida disponível aos microrganismos foi fator preponderante no seu processo degradativo. Diferentes concentrações proporcionaram diferentes taxas de degradação. Para o caso do 2,4-D em FLC as maiores concentrações iniciais propiciaram maiores valores de degradação. Este efeito é devido a ausência da solubilização total do herbicida no meio degradativo, o que proporcionou diferentes concentrações entre as duas formas de utilização do 2,4-D livre e em FLC. Dentre as concentrações de 2,4-D livre degradadas por *P.putida* somente 10 mg/L sofreu degradação, Entretanto, a FLC sofreu maior degradação. As maiores taxas de degradação do 2,4-D em FLC também foram atribuídas à lenta liberação do 2,4-D presente em FLC, o que proporcionou concentrações iniciais de 2,4-D não tóxicas à bactéria.

- A mudança física na FLC foi constatada por meio dos resultados obtidos por microscopia eletrônica de varredura. Com essa técnica foram observadas modificações significativas na superfície da FLC. Mudanças químicas nas FLC foram constatadas através das análises de FTIR. Essa técnica demonstrou uma possível hidrólise dos grupos ésteres formadas entre a lignina e o 2,4-D e/ou seu isômero, durante o processo de obtenção das FLC. Estas mudanças contribuíram para o aumento da velocidade de liberação do 2,4-D nas FLC após tratamento com *P.putida* e *P. chrysosporium*. As técnicas de FTIR e microscopia eletrônica de varredura foram satisfatórias para observar as modificações químicas e físicas na FLC.

- A ausência de degradação do 2,4-D presente nas FLC ensaiadas em solo sem estimulação dos microrganismos e a ausência de metabólitos no interior das FLC após o processo degradativo, demonstrou que somente o 2,4-D liberado da FLC está disponível para a ação degradativa dos microrganismos.

De posse destes resultados, podemos concluir que a FLC pode criar uma barreira à biodegradação do 2,4-D que permanece nela. Porém, maiores ou menores taxas de degradação do ingrediente ativo dependem da sua concentração inicial e esta concentração é grandemente afetada pelo sistema de

liberação controlada. Desta forma, embora a FLC atue como uma barreira ao processo biodegradativo, sua ação de liberação sendo lenta, proporciona baixas concentrações do ingrediente ativo no meio, o que contrariamente, poderia aumentar em vez de diminuir sua biodegradação.

VI - Referências

- Alexander, M. e Lustigman, B.K. 1966. Effect of Chemical Structure on Microbial Degradation of Substituted Benzenes. J. Agr. Food Chem. **14**: 410 - 413.
- Alexander, M. e Scow, K.M. 1989. Kinetics of Biodegradation in Soil. In B.L. Sawhney and K. Brown (ed.) Reactions and Movement of Organic Chemicals in Soils. SSSA Spec. Publ. ASA and SSSA, Madison, WI. **22**:243-269
- Baccan, N., Andrade, J.C., Godinho, O.E.S. e Barone J.S. 1979. Química Analítica Quantitativa Elementar. Erros e Tratamentos dos Dados Analíticos. Edgard Blücher Ltda. São. Paulo p. 3-26.
- Blumhorst, M.R. e Weber, J.B. 1994. Chemical Versus Microbial Degradation of Cyanazine and Atrazine in Soils. Pest. Sci. **42**: 79 - 84.
- Bollag, J.M., Helling, C.S. e Alexander, M. 1968. 2,4-D Metabolism: Enzymatic Hydroxylation of Chlorinated Phenols. J. Agric. Food Chem. **16**:826-828.
- Bollag, J.M., Liu. S.Y. e Minard, R.D. 1980. Cross-Coupling of Phenolic Humus Constituents and 2,4-Dichlorophenol. Soil Sci. Am. J. **44**:52-56.
- Bromilow, R.H., Evans, A.A., Nicholls, P.H. Todd, A.D. e Briggs, G.G. 1996. The Effect on Soil Fertility of Repeated Applications of Pesticides over 20 Years. Pestic. Sci. **48**:63-72.
- Bumpus, J. A., Powers, R.H. e Sun, T. 1993. Biodegradation of DDE (1,1-dichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl) Ethane by *Phanerochaete chrysosporium*. Mycologia **97** 95-98.
- Cattaneo, M.V., Masson, C. e Greer, C.W. 1997. The Influence of Moisture on Microbial Transport, Survival and 2,4-D Biodegradation with a Genetically Marked *Burkholderia cepacia* in Unsaturated Soil Columns. Biodegradation **8**: 87-96.
- Characklis, W.G.1990. Kinetics of Microbial Transformations. In W.G. Characklis e K.C. Marshall (ed.) Biofilms. John Wiley & Sons, New York. p. 233-264.
- Charnay, M.P. e Fournier, J.C. 1994. Study of the Relation Between Carbofuran Degradation and Microbial or Physicochemical Characteristics of Some French Soils. Pest. Sci. **40**: 207 - 216.

- Chen, L.C e Chang, H.M.1985. Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components. Chemistry of Lignin Biodegradation.Takayoshi Higuchi (ed.). 535-578.
- Cotterill, J.V., Wilkins, R.M. e Silva, F.T. 1996. Controlled Release of Diuron from Granules Based on a Matrix System. J. Contro. Release 40, 133-142.
- De Baptista, G.C. 1996. Agricultural uses of Pesticides in Latin America. Workshop on Pesticides - Uses and Enviromental Safety in Latin America. São Paulo - Brasil.
- Ditzelmuller, G., Loidl, M. e Streichsbier, F. 1989. Isolation and Characterization of a 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid-Degrading Soil Bacterium. Appl. Microbiol. Biotechnonol. 31: 93-96.
- Durán, N. e Esposito. 1996. Ecologia Microbiana. I.S De Melo e J.L. Azevedo – Embrapa. p. 269-292.
- Esposito, E., Canhos, V.P. e Durán, N. 1991. Screening of Lignin-Degrading Fungi for Removal of Color from Kraft Mill Wastewater with no Additional Extra Carbon-Source. Biotechnol.Lett. 13: 571 - 576.
- Faulkner, J.K. e Woodcock, D. 1965. Fungal Detoxication. Part VII. Metabolism of 2,4-Dichlorophenoxyacetic and 4-Chloro-2-methylphenoxyacetic Acids by *Aspergillus niger*. 1187-1191
- Felsot, A.S. e Shelton, D.R. 1993. Biodegradation of Soil Pesticides: Interaction between Physicochemical Processes and Microbial Ecology. SSSA Special Publication , USA. 32: 227 - 251.
- Fengel, D. e Wegener, G.1989. Wood-Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Walter de Gryter, New York, p.132-181.
- Ferraz, A., Souza, J.A. e Da Silva, F.T. 1992. Characterization of Lignins Used as Matrix in Controlled Release Formulations: Steam Explosion Sugar Cane Bagasse and Kraft Eucalyptus Lignins. Proc. 2nd. Braz. Symp. Chem. Lignin and Other Wood Comp. (N. Durán and E. Esposito, Eds.) Campinas, Brazil. 3, 173-177.

- Ferraz, A., Souza, J.A., Da Silva, F.T., Gonçalves, A.R., Bruns, R.E., Cotrim, A. e Wilkins, R.M. 1997. Controlled-Release of 2,4-D from Granule Matrix Formulations Based on Six Lignins. J. Agric. Food Chem. **45**:1001-1005.
- Fourth Periodic Progress Report. 1992. The Use of Agricultural Waste Products in Tropical Crop Production and Protection in Light Soils EC-TS2* 0283 – C (SMA), p.27.
- Foster, R.K. e R.B. McKercher. 1973. Laboratory Incubation Studies of Chlorophenoxyacetic Acids in Chernozemic Soils. Soil Biol. Biochem. **5**:333-337.
- Greer, L.E. e Shelton, D.R. 1992. Effect of Inoculant Strain and Organic Matter Content on Kinetics of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Degradation in Soil. Appl. Environ. Microbiol. **58**:1459-1465.
- Greer, L.E., Robinson, J.A. e Shelton, D.R. 1992. Kinetic Comparison of Seven Strains of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid-Degrading Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 1027-1030.
- Haugland, R.A., Schlemm, D.J., Lyons III, R.P., Sferra, P.D. e Chakrabarty, A.M. 1990. Degradation of the Chlorinated Phenoxyacetate Herbicides 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and 2,4,5 - Trichlorophenoxyacetic Acid by Pure and Mixed Bacterial Cultures. Appl. Environ. Microbiol. **56**: 1357-1362.
- Helling, C.S., Bollag, J.M. e Dawson, J.E. 1968. Cleavage of Ether-Oxygen Bond in Phenoxyacetic Acid by an Arthrobacter Species. J. Agric. Food Chem. **16**:538-539.
- Kearney, P.C. e Kaufman, D.D. 1975 (ed). Herbicides: Chemistry, Degradation and Mode of Action. Marcel Dekker. New York, p. 35-50.
- Kirk, K.T e Cullen. D. 1998. Environmentally Friendly Technologies for Pulp and Paper. Enzymology and Molecular Genetics of Wood Degradation by White-Rot Fungi. Raymond A. Young and Massod Akhtar p. 275-307.
- Kuwahara, M., Glenn, J.K., Morgan, M.A. e Gold, M.H. 1984. Separation and Characterization of Two Extracellular H₂O₂ - Dependent Oxidase from Ligninolytic Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. FEBS Lett. **169**: 247-250.

- Lavy, T.L., Roeth, F.W. e Fenster, C.R. 1973. Degradation of 2,4-D and Atrazine at Three Soil Depths in the Field. J. Environ. Qual. 2:132-137.
- Linko, S. e Haapala, R. 1993. Production of *Phanerochaete chrysosporium* Lignin Peroxidase Under Various Culture Condition. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 494-498.
- Lynch, J.M. 1986. Fatores Microbiológicos na Produtividade Agrícola. Biotecnologia de Solo p. 209.
- Mackay, N. e Betts, W.B.(ed) 1989. Biodegradation: Natural and Synthetic Materials. p. 92 - 137.
- McLafferty, F. W. e Stauffer, D.B. 1989. The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data. John Wiley & Sons. New York, p. 1415.
- McMullan e Quinn. 1992. Detection of Novel Carbon-Phosphorus Bound Cleavagem Activity in Cell-Free Extracts of on Environmental *Pseudomonas fluorescens* Isolate. Biochem. Biophys. Res. Commun. 184:1022-1027.
- Michel, F.C. Reddy, C. A. e Fomey, L.J. 1995. Microbial Degradation and Humification of the Lawn Care Pesticide 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid During the Composting of Yard Trimmings. Appl. Environ. Microbiol 61: 2566-2571.
- Musumeci, M.R. 1992. Defensivos Agrícolas e sua Interação com a Microbiota do Solo. In: Tsai, S.M., Neves, M.C.P. Microbiologia do Solo Campinas: Sociedade Brasileira do Solo, p.341-360.
- Nadeau, L.J., Menn, F.M., Breen, A e Sayler, G.S. 1994. Aerobic Degradation of 1,1,1-Trichloro-2,2,-Bis (4-Chlorophenyl) Ethane (DDT) by *Alcaligenes eutrophus* A5. Appl. Environ. Microbiol. 60: 51-55.
- Nakazawa, T. e Nakazawa, A. 1970. Pyrocatechase (*Pseudomonas*). Methods Enzymol: 17A: 518.
- Nelson, N. 1944. A Photometric Adaptation of the Somogyi Method for the Determination of the Glucose. J. Biol. Chem. 153: 375 - 380.
- Nozaki, M. 1970. Metapyrocatechase. Methods Enzymol: 17A: 522.

- Ogram, A.V., Jessup, R.E., Ou, L.T. e Rao, P.S.C. 1985. Effects of Sorption on Biological Degradation Rates of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in Soils. Appl. Environ. Microbiol. **49**:582-587.
- Paszczynski, A. e Crawford, R.L. 1995. Potential for Bioremediation of Xenobiotic Compounds by the White-Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Biotechnol. Prog. **11**: 368-379
- Pereira, C.A . 1996. Obtenção e Avaliação de Formulação de Liberação Controlada de Diuron/Lignina. Lorena. FAENQUIL, (Tese de Mestrado)
- Petersen, L.W., Moldrup, P., El-Farhan, Y.H., Jacobsen, O.H., Yamaguchi, T., e Rolston, D.E. 1995. The Effect of Moisture an Soil Texture on the Adsorption of Organic Vapors. J. Environ. Qual. **24**: 752-759.
- Pieper, D.H., Reineke, W., Engesser, K.H. e Knackmuss, H.J. 1988. Metabolism of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid, 4-Chloro-2-Methylphenoxyacetic Acid and 2-Methylphenoxyacetic Acid by *Alcaligenes eutrophus* JMP 134. Arch. Microbil. **150**:95-102.
- Racke, K. D. 1990. Pesticides in the Soil Microbial Ecosystem. In: Racke, K.D. e Coats. J. R. Enhanced Biodegradation of Pesticides in the Environment. Iowa: Dow Elanco, p. 1-12.
- Rijnaarts, H.H.M., Bachmann, A., Jumelet, J.C. e Zehnder, A.J. 1991. Effect of Desorption and Intraparticle Mass on the Aerobic Biomineralization of A-Hexachlorocyclohexane in a Contaminated Calcareous Soil. Environ. Sci. Technol. **24**: 1349-1354.
- Rouchaud, J., Metsue, M., Van de Steene, F., Pelerents, C., Gillet, J., Benoit, F., Ceustermans, N. e Vanparys, L. 1989. Influence of Continuous Monoculture and Insecticide Treatments on the Rate of Chlorofenvinphos Soil Biodegradation in Cabbage Crops. Bull Environ. Contam. Toxicol. **42**: 409 - 416
- Ryan, T.P. e Bumpus, J.A. 1989. Biodegradation of 2,4,5 - Trichlorophenoxyacetic Acid in Liquid Culture and in Soil by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Microbiol Biotechnol **31**: 302 - 307.
- Scow, K.M. e Johnson, C.R. 1997. Effect of Sorption on Biodegradation of Soil Pollutants. Advan Agronomy. **58** :1-48.

- Silva, F.T. e Wilkins, R.M. 1992. Use of Lignins as Support for Herbicides in Controlled Release Formulations. Proc. Second Brazilian Symposium on the Chemistry of Lignins and Others Wood Components 3: 165-172.
- Smith, A.E. e Muir, D.C.G. 1980. Determination of Extractable and Non-Extractable Radioactivity from Prairie Soils Treated with Carboxyl- and Ring-Labelled [^{14}C] 2,4-D. Weed Res. 20:123-129.
- Socol, C.R., Pinheiros, L.I. e Krefta, A.A.W. 1995. Degradação de Pesticidas no Solo: Revisão Bibliográfica. Pesticidas Revista Técnico Científica. 5: 1-134.
- Souza, J.A. 1994. Utilização de Lignina para Obtenção de Formulação de Liberação Controlada do Ácido 2,4 Diclorofenoxiacético. Campinas, UNICAMP (Tese de Mestrado).
- Souza, J.A., Ferraz, A., Mei, L.I., Da Silva, F.T., Cotrim, A. e Rocha, G.J.M. (1995). Influences of the Structural Lignin Characteristic on the Release Rate of the Herbicide 2,4-D in a Controlled Release System. Proc. 4th. Braz. Symp. Chem. Lignin and Other Wood Comp. (M. do C. B. Pimentel and E.M. Melo, Eds.) Recife, PE, Brazil. 237-238.
- Stott, D.E., Martin, J.P., Focht, D.D. e Haider, K. 1983. Biodegradation, Stabilization in Humus, and Incorporation into soil Biomass of 2,4-D and Chlorocatechol Carbons. Soil Sci. Soc. Am. J. 47:66-70.
- Tiedje, J.M., Duxbury, J.M., Alexander, M. e Dawson, J.E. 1969. 2,4-D Metabolism: Pathway of Degradation of Chlorocatechols by *Arthrobacter* sp. J. Agric. Food Chem. 17: 1021-1026.
- Tien, M. e Kirk, T.K. 1984. Lignin-Degradind Enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, Characterization, and Catalytic Properties of a Unique H_2O_2 -requering Oxigenase. Proc.Nat. Acad. Sci. USA 81: 2280-2284.
- Torstensson, N.T.L. 1978. Effects of Phenoxyacetic Acid Herbicides on Soil. In Chlorinated Phenoxy Acids and their Dioxins. Ecol. Bull. 27:263-284.
- Tuor, U., Warrishi, H., Schoemaker, H.E. e Gold, M.H. Oxidation of Phenolic Aryl glycerol β - Aryl Ether Lignin Model Compounds by Manganese Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*: Oxidative Cleavage of on α - Carbonyl Model Compound. A. 1992. Biochemistry. 31:4986-4995.

-
- Valli, K. e Gold, M.H. 1991. Degradation of 2,4-Dichlorophenol by the Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. J. Bacteriol **173**: 345-352.
- Veeh, R.H., Inskeep, W.P. e Camper, A. K. 1996. Soil Depth and Temperature Effects on Microbial Degradation of 2,4-D. J. Environ. Qual. **25**:5-12.
- Wariishi, H., Valli, K. e Gold, M.H. 1991. In Vitro Depolymerization of Lignin by Manganases Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. Biochem. Biophys. Res. Comm. **176**:269-275.
- Wenk, M., Baumgartner, T., Dobovsek, J., Fuchs, T., Kucsera, J., Zopfi, J. e Stucki, G. 1998. Rapid Atrazine Mineralisation in Soil Slurry and Moist Soil by Inoculation of an Atrazine-Degrading *Pseudomonas* sp. Strain. Appl. Microbiol. Biotechnol. **49**: 624-630.
- Wilkins, R.M. 1983. Controlled Release - Present and Future. Proc. International Congress of Plant Protection, Brighton, p. 554-559.
- Yadav, J.S. e Reddy, C.A. 1993. Minerazation of 2,4-Dichlorophenoxyacet Acid (2,4-D) and Mixtures de 2,4-D and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. Environ. Microbiol. **59**:2904-2908.
- Zablutowicz, R.M., Locke, M.A. e Smeda, R.J. 1998. Degradation of 2,4-D and Fluometuron in Cover Crop Residues. Chemosphere. **37**: 87-101.

Apêndice I

Extração de 2,4-D do solo e das formulações

A fim de identificar e padronizar um método adequado para extração de 2,4-D de solo e de FLC, vários métodos foram avaliados conforme citados no item III.6. Os resultados obtidos com diferentes métodos de extração estão mostrados na tabela 12. Os melhores resultados na extração da FLC foram obtidos em 'soxhlet', durante 90 horas, e em ultra-som, durante 30 min. Porém, considerando o fator tempo, a extração em ultra-som se faz mais vantajosa.

Os 2% de 2,4-D residual nas FLC extraídas com metanol em ultra-som pode ser herbicida ligado quimicamente à lignina. Porém, estas ligações foram hidrolisadas quando a FLC foi submetida a extração com água em 'soxhlet', o que levou a uma extração total do herbicida. Diante da recuperação total de 2,4-D da FLC, podemos inferir que o processo de obtenção da FLC (fusão do herbicida) não proporcionou a degradação de 2,4-D.

A extração da formulação com fluido supercrítico (FSC) poderia ser mais eficiente se uma fase modificadora fosse utilizada. Uma extração usando 1 μ L de metanol como fase modificadora foi realizada porém, a solubilidade da FLC neste solvente provocou um entupimento no sistema de extração, impossibilitando o emprego do metanol como fase modificadora.

Para os casos de extração do solo por fluido supercrítico, na ausência de fase modificadora, a eficiência da extração de 2,4-D foi bastante inferior quando comparada com a extração na presença da mesma. Se compararmos a extração do solo TE8, solo estéril contendo 2,4-D técnico do 30º dia de degradação, por fluido supercrítico e por ultra-som, verificaremos que os valores de extração são similares. Valores similares de extração também podem ser observados se compararmos a extração do solo TE 6 (solo estéril contendo 2,4-D técnico do 20º dia de degradação) em ultra-som e em "shaker".

Os melhores rendimentos de extração de 2,4-D de solo foram obtidos utilizando metanol em "soxhlet" durante 50 horas. Esta técnica foi empregada na extração de 2,4-D em solos com estimulação inicial dos microrganismos presentes

nos mesmos. Porém, como não havíamos realizado a extração com metanol em "soxhlet" quando os experimentos em sistema fechado foram realizados, a extração com metanol em ultra-som foi empregada na finalização desses experimentos.

Tabela 12 - Valores de 2,4-D extraído por diferentes técnicas

Amostras	% de 2,4-D extraído
Solo TE 8 extraído em FSC com modificador de fase	8,4
Solo TE 8 extraído em FSC sem modificador de fase	1,2
Solo TE 8 extraído com metanol em ultra-som por 30 min	9,6
Solo TE 6 extraído com metanol em ultra-som por 30 min	21,6
Solo TE 6 extraído com metanol em "shaker" por 60 min	22,9
Solo extraído com metanol em "soxhlet" por 50 min	50 a 70
FLC extraída em FSC sem modificador de fase	19,5
FLC extraída com água em "soxhlet" por 90 horas	100
FLC extraída com metanol durante 30 min em ultra-som	98

Apêndice II

Cromatogramas de CG e espectros de massa do 2,4-D e seus isômeros derivatizados

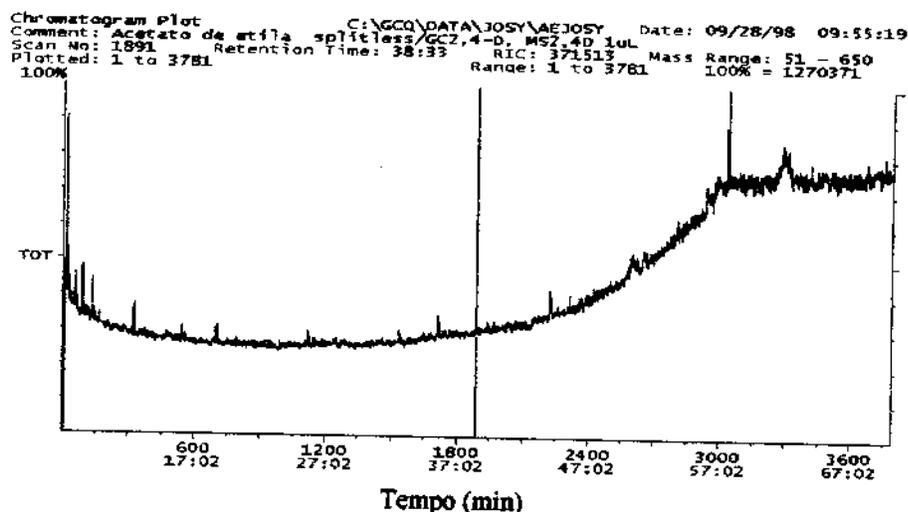


Fig 8 – Cromatograma dos produtos da reação de derivatização, BSTFA, piridina e acetato de etila, obtido durante o seguinte gradiente de temperatura: 60°C por 1 min, seguido de um aumento de 30°C por min até 140°C. Após 3 min esta foi novamente elevada na proporção de 4°C por min até alcançar 240°C, mantendo-se nesta durante 13 min.

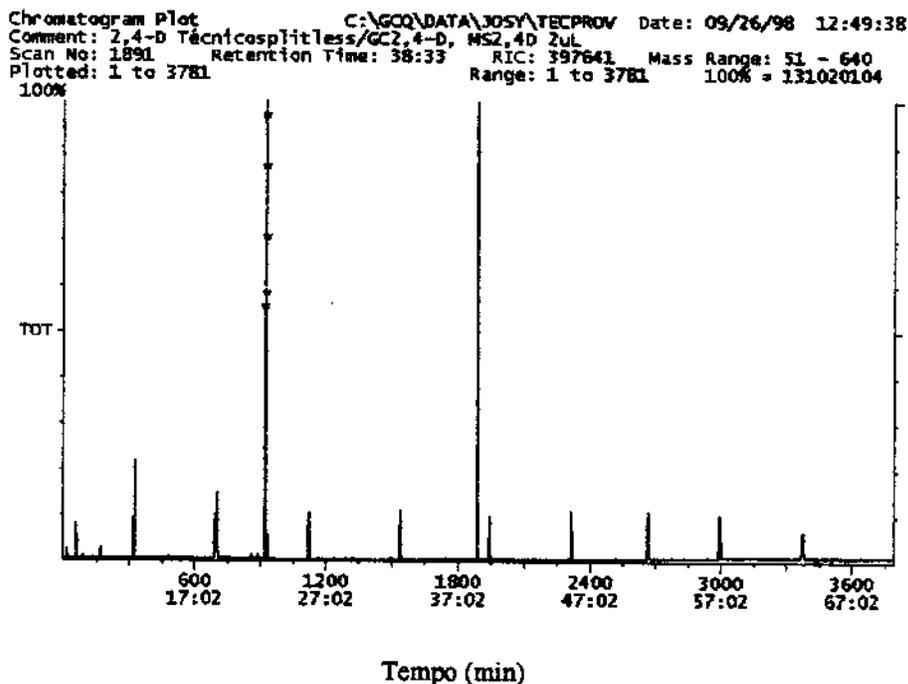


Fig 9 – Cromatograma de CG de 2,4-D derivatizado com BSTFA., obtido durante o seguinte gradiente de temperatura: 60°C por 1 min, seguido de um aumento de 30°C por min até 140°C. Após 3 min esta foi novamente elevada na proporção de 4°C por min até alcançar 240°C, mantendo-se nesta durante 13 min.

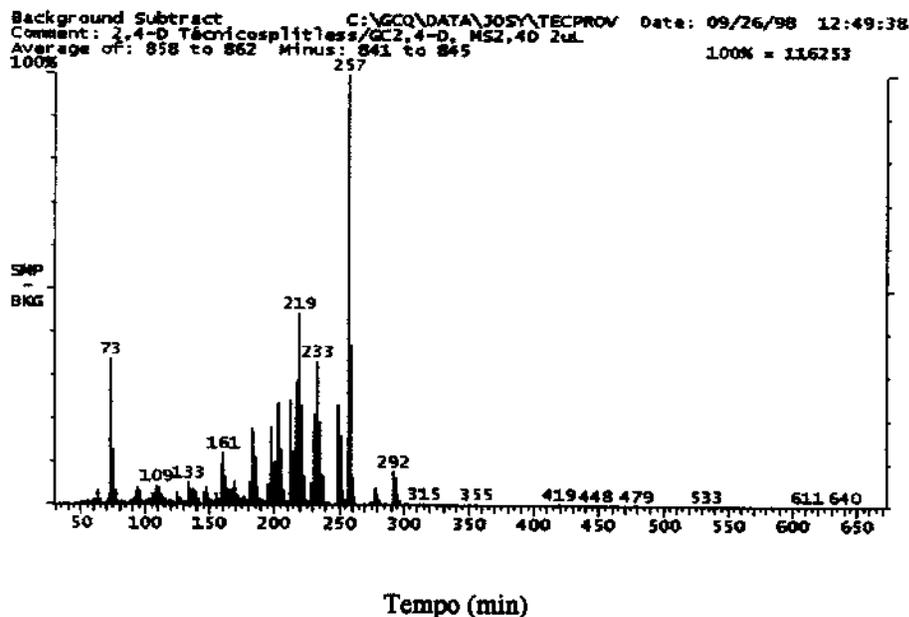


Fig 10 – Espectro de massa de 2,4-D derivatizado.

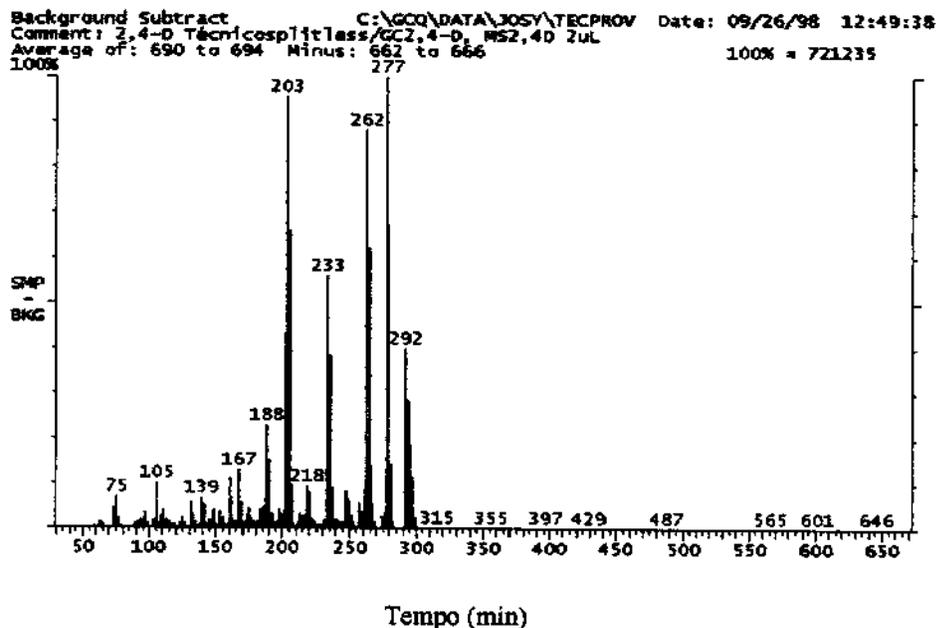


Fig. 11 – Espectro de massa do isômero de 2,4-D derivatizado, com tempo de retenção de 18,34 min na análise de CG.

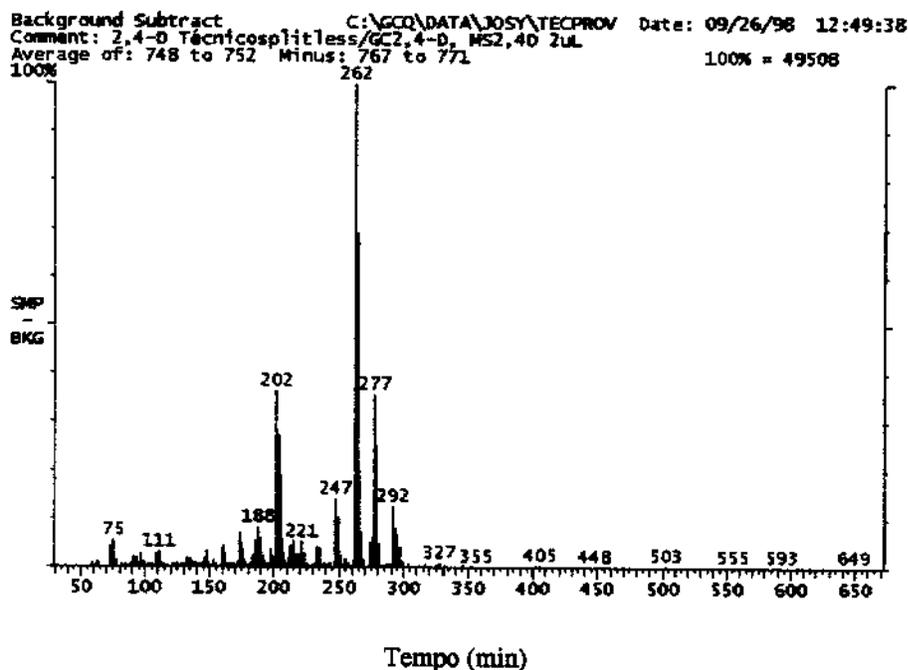


Fig. 12 – Espectro de massa do isômero de 2,4-D derivatizado, com tempo de retenção de 19,32 min na análise de CG.

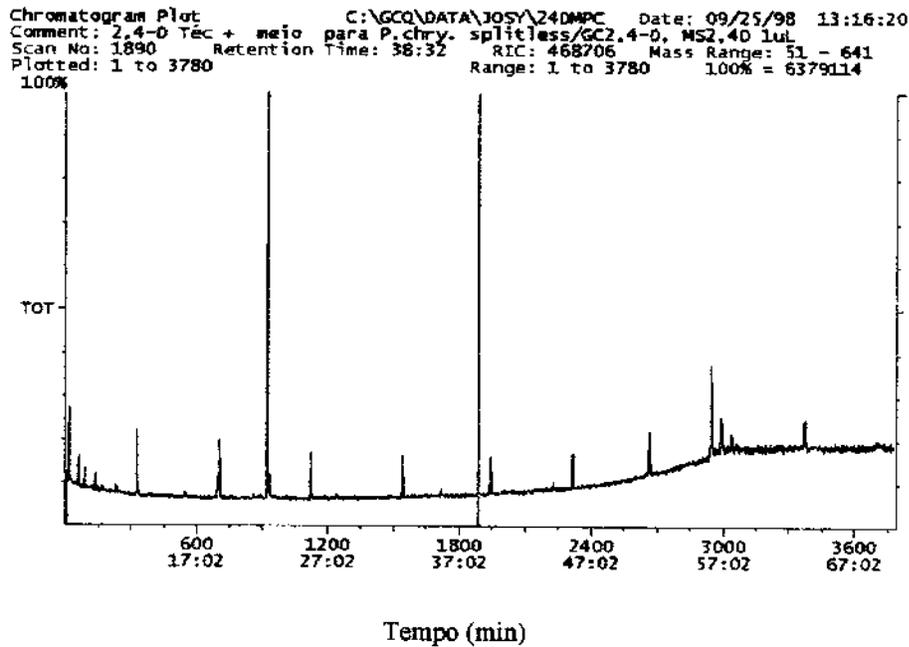


Fig 13 - Cromatograma de CG do extrato de 2,4-D livre presente em meio de cultura para *P.chryso sporium* obtido durante o seguinte gradiente de temperatura: 60°C por 1 min, seguido de um aumento de 30°C por min até 140°C. Após 3 min esta foi novamente elevada na proporção de 4°C por min até alcançar 240°C, mantendo-se nesta durante 13 min.

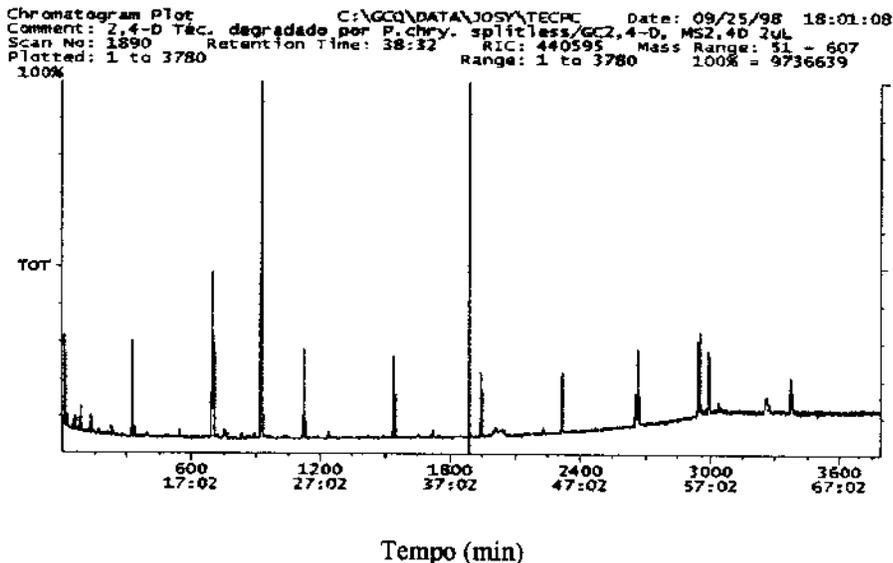


Fig 14 - Cromatograma de CG do extrato de 2,4-D livre degradado durante 4 dias por *P.chryso sporium* obtido durante o seguinte gradiente de temperatura: 60°C por 1 min, seguido de um aumento de 30°C por min até 140°C. Após 3 min esta foi novamente elevada na proporção de 4°C por min até alcançar 240°C, mantendo-se nesta durante 13 min.

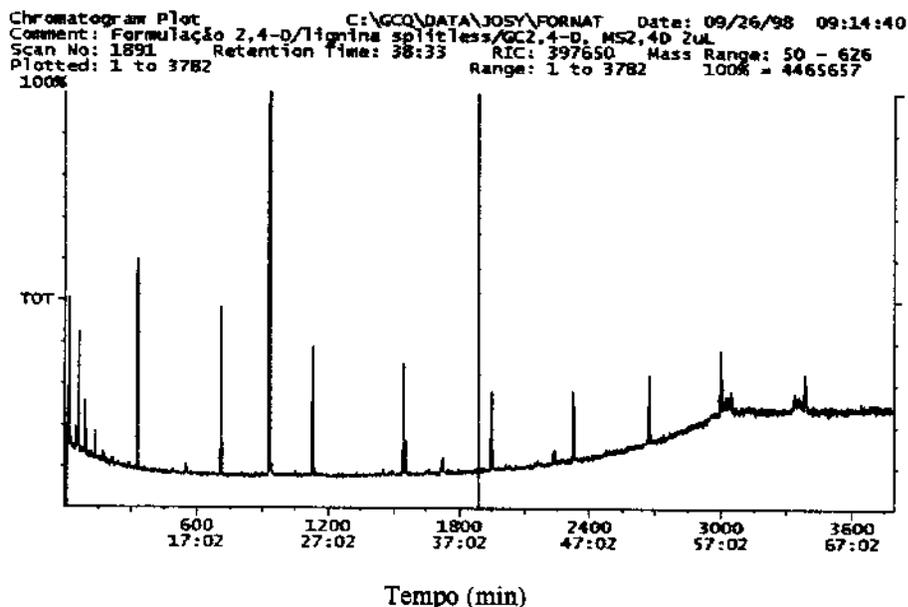


Fig 15 – Cromatograma de CG do extrato da FLC obtido durante o seguinte gradiente de temperatura: 60°C por 1 min, seguido de um aumento de 30°C por min até 140°C. Após 3 min esta foi novamente elevada na proporção de 4°C por min até alcançar 240°C, mantendo-se nesta durante 13 min.

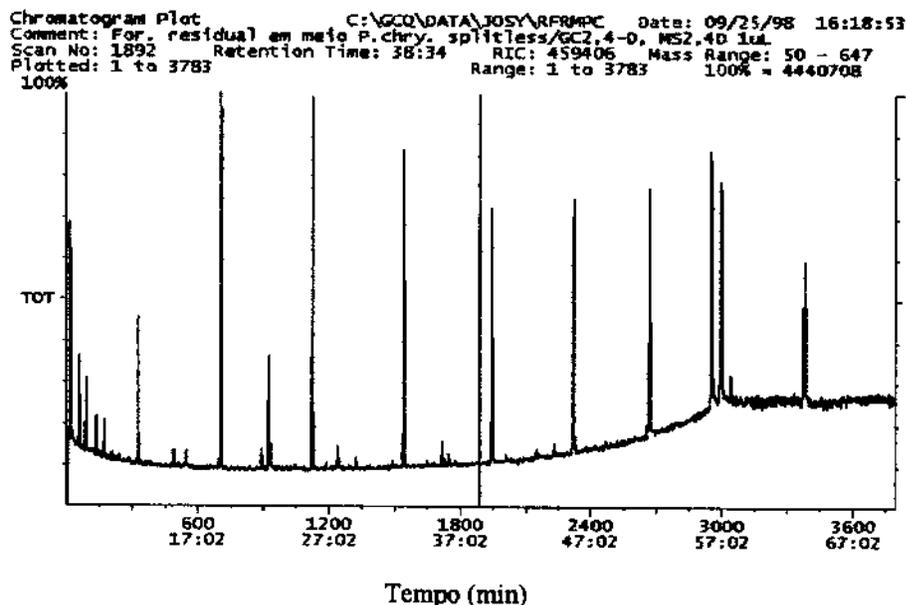


Fig 16 – Cromatograma de CG do extrato de 2,4-D residual em meio de cultura após 4 dias degradação da FLC por *P.chryso sporium* obtido durante o seguinte gradiente de temperatura: 60°C por 1 min, seguido de um aumento de 30°C por min até 140°C. Após 3 min esta foi novamente elevada na proporção de 4°C por min até alcançar 240°C, mantendo-se nesta durante 13 min.

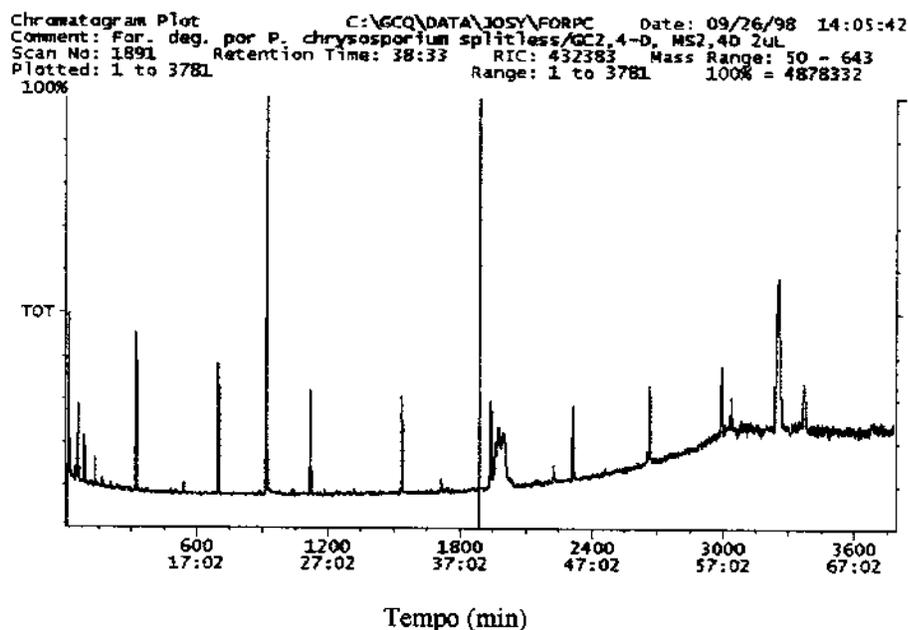


Fig 17 – Cromatograma de CG do extrato de 2,4-D residual no interior da FLC após 4 dias de degradação por *P.chrysosporium* obtido durante o seguinte gradiente de temperatura: 60°C por 1 min, seguido de um aumento de 30°C por min até 140°C. Após 3 min esta foi novamente elevada na proporção de 4°C por min até alcançar 240°C, mantendo-se nesta durante 13 min.

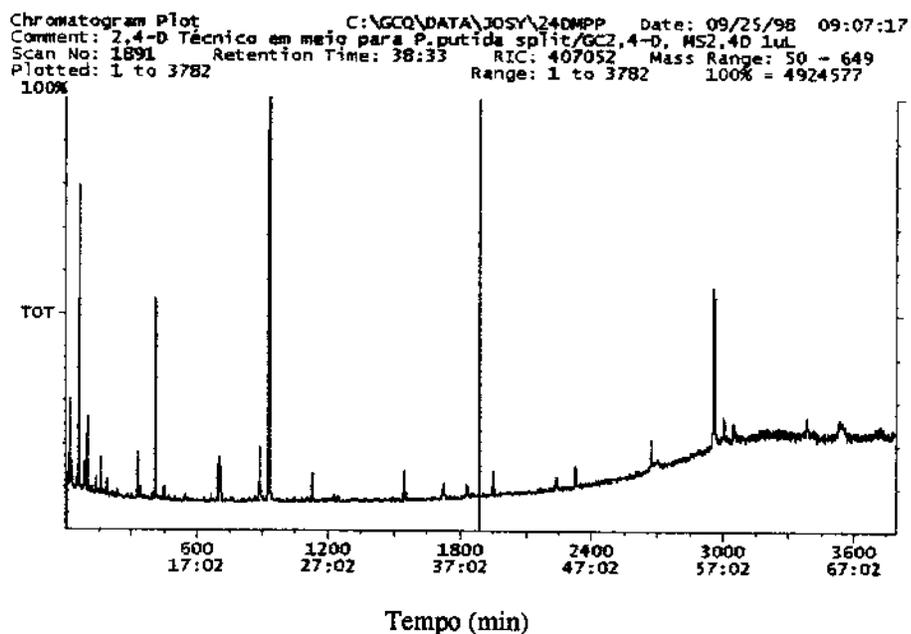


Fig 18 – Cromatograma do extrato de 2,4-D livre em meio de cultura para *P.putida* obtido durante o seguinte gradiente de temperatura: 60°C por 1 min, seguido de um aumento de 30°C por min até 140°C. Após 3 min esta foi novamente elevada na proporção de 4°C por min até alcançar 240°C, mantendo-se nesta durante 13 min.

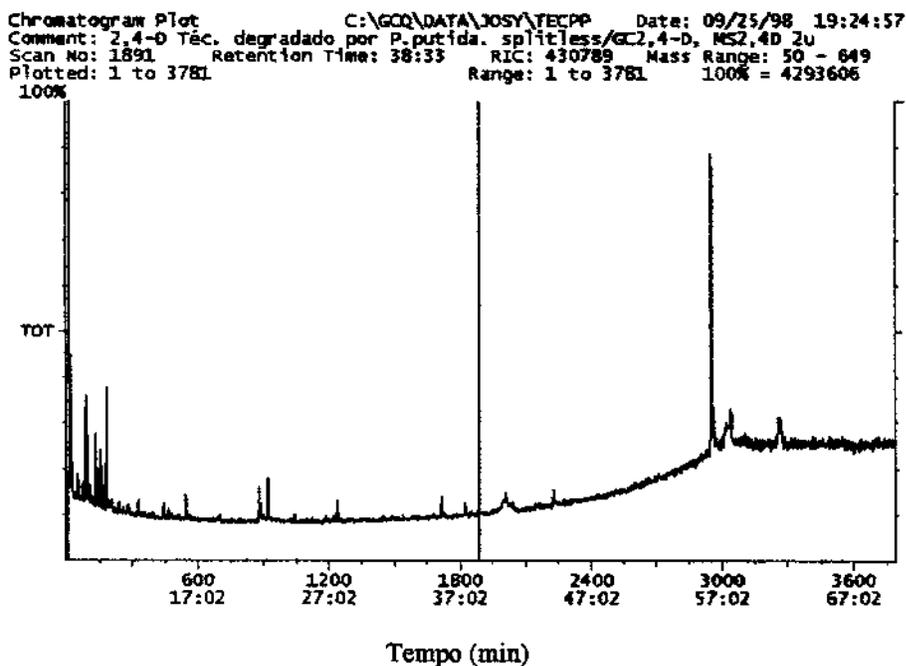


Fig 19 – Cromatograma de CG do extrato de 2,4-D livre degradado por *P.putida* durante 5 dias obtido durante o seguinte gradiente de temperatura: 60°C por 1 min, seguido de um aumento de 30°C por min até 140°C. Após 3 min esta foi novamente elevada na proporção de 4°C por min até alcançar 240°C, mantendo-se nesta durante 13 min.

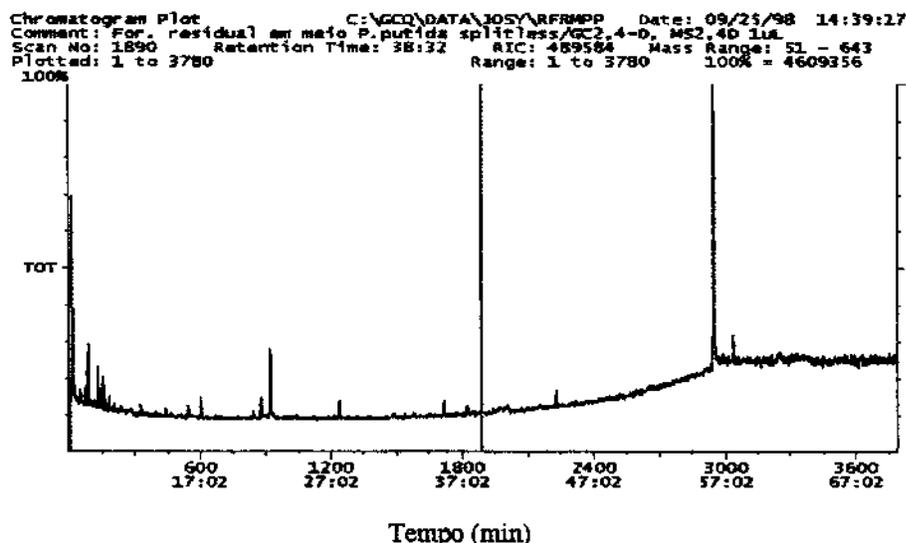


Fig 20 – Cromatograma de CG do extrato de 2,4-D residual em meio de cultura após 5 dias de degradação da FLC por *P.putida* obtido durante o seguinte gradiente de temperatura: 60°C por 1 min, seguido de um aumento de 30°C por min até 140°C. Após 3 min esta foi novamente elevada na proporção de 4°C por min até alcançar 240°C, mantendo-se nesta durante 13 min.

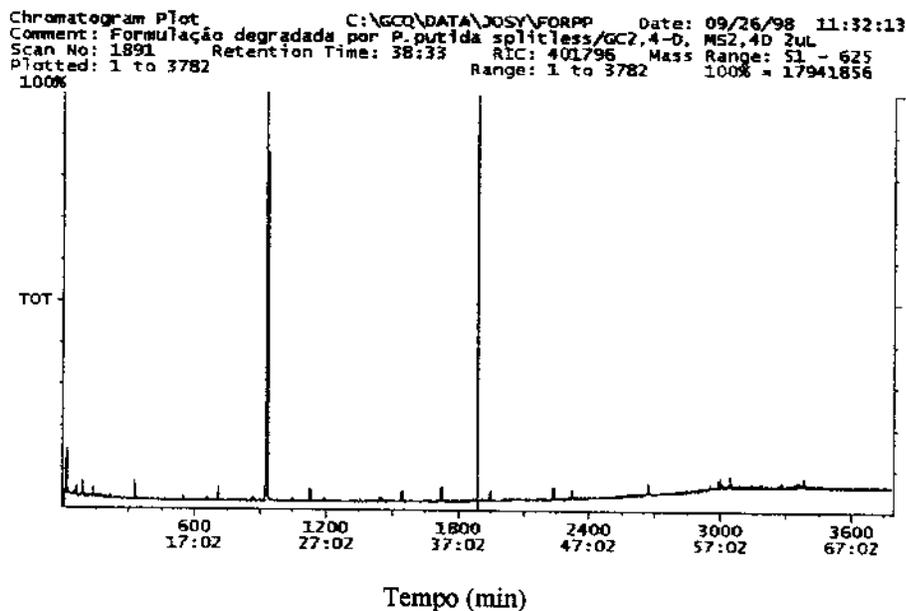


Fig 21– Cromatograma de CG do extrato de 2,4-D residual no interior da FLC após 5 dias de degradação por *P.putida* obtido durante o seguinte gradiente de temperatura: 60°C por 1 min, seguido de um aumento de 30°C por min até 140°C. Após 3 min esta foi novamente elevada na proporção de 4°C por min até alcançar 240°C, mantendo-se nesta durante 13 min.

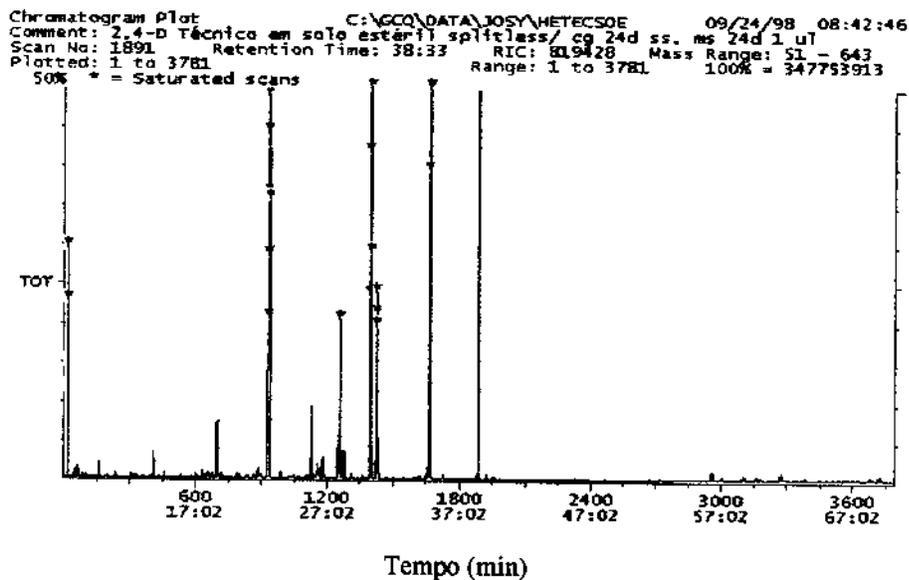


Fig 22 – Cromatograma de CG do extrato de 2,4-D livre em solo estéril após 60 dias obtido durante o seguinte gradiente de temperatura: 60°C por 1 min, seguido de um aumento de 30°C por min até 140°C. Após 3 min esta foi novamente elevada na proporção de 4°C por min até alcançar 240°C, mantendo-se nesta durante 13 min.

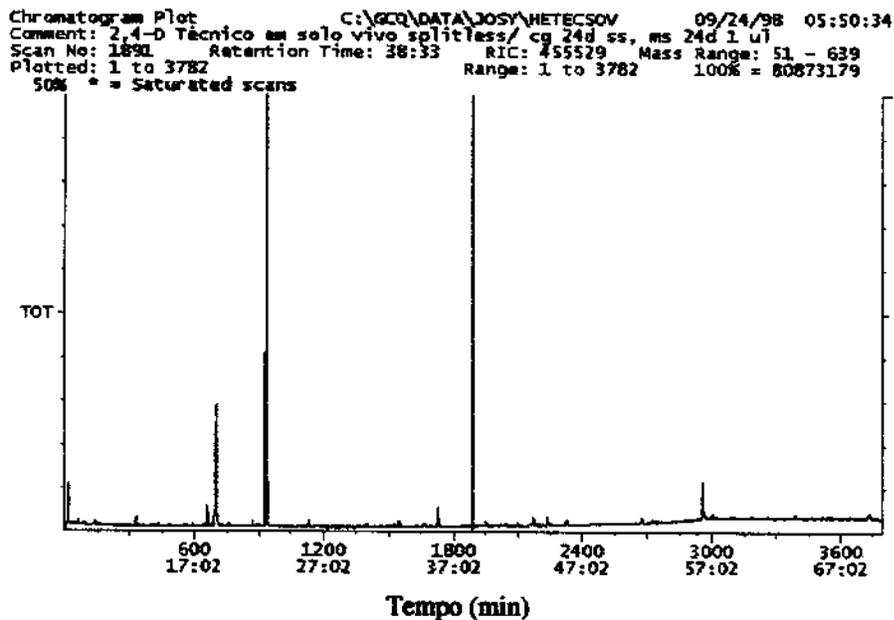


Fig 23 – Cromatograma de CG do extrato de 2,4-D livre em solo vivo após 60 dias obtido durante o seguinte gradiente de temperatura: 60°C por 1 min, seguido de um aumento de 30°C por min até 140°C. Após 3 min esta foi novamente elevada na proporção de 4°C por min até alcançar 240°C, mantendo-se nesta durante 13 min.

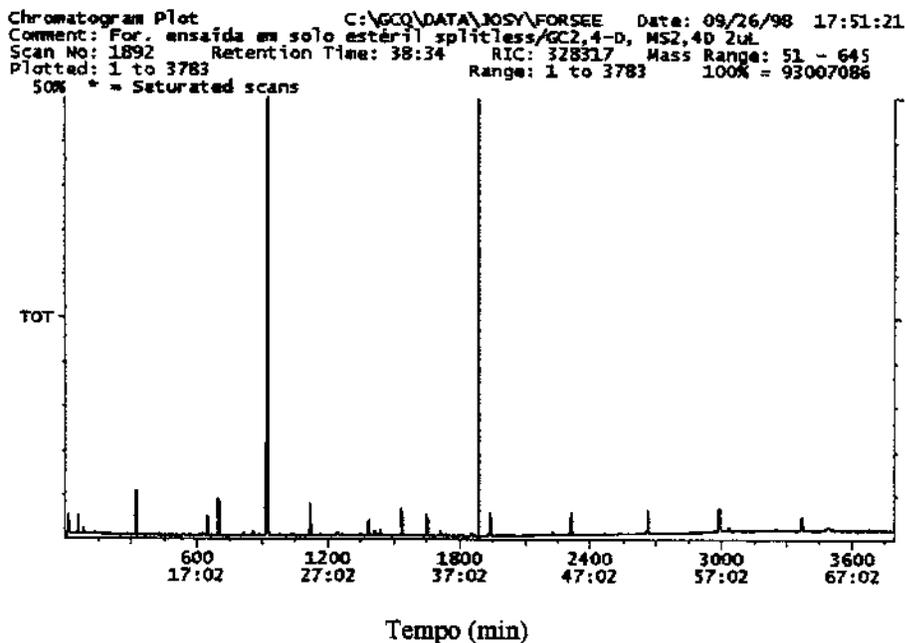


Fig 24 – Cromatograma de CG do extrato de 2,4-D residual no interior da FLC após 60 dias em solo estéril, obtido durante o seguinte gradiente de temperatura: 60°C por 1 min, seguido de um aumento de 30°C por min até 140°C. Após 3 min esta foi novamente elevada na proporção de 4°C por min até alcançar 240°C, mantendo-se nesta durante 13 min.

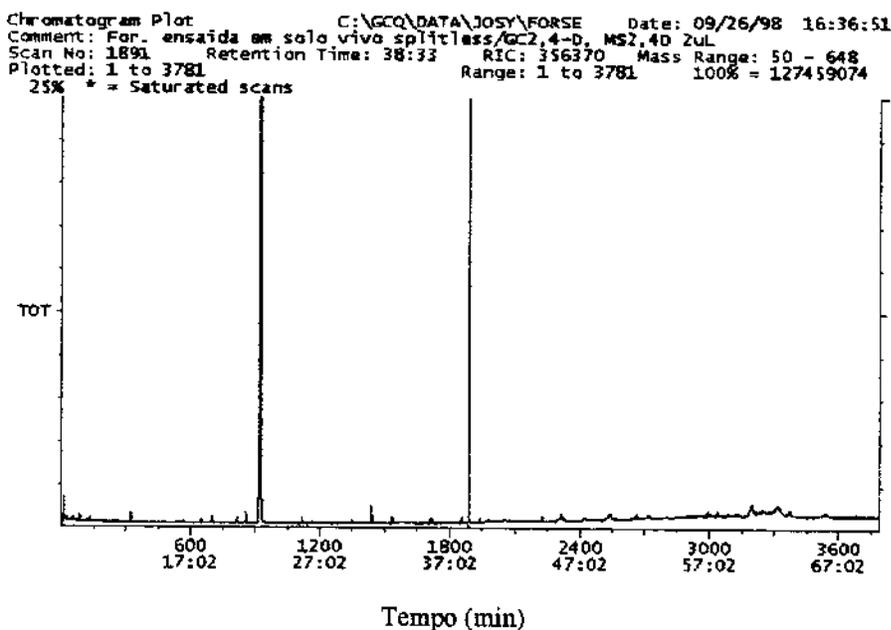


Fig 25— Cromatograma de CG do extrato 2,4-D residual no interior da FLC após 60 dias em solo vivo, obtido durante o seguinte gradiente de temperatura: 60°C por 1 min, seguido de um aumento de 30°C por min até 140°C. Após 3 min esta foi novamente elevada na proporção de 4°C por min até alcançar 240°C, mantendo-se nesta durante 13 min.

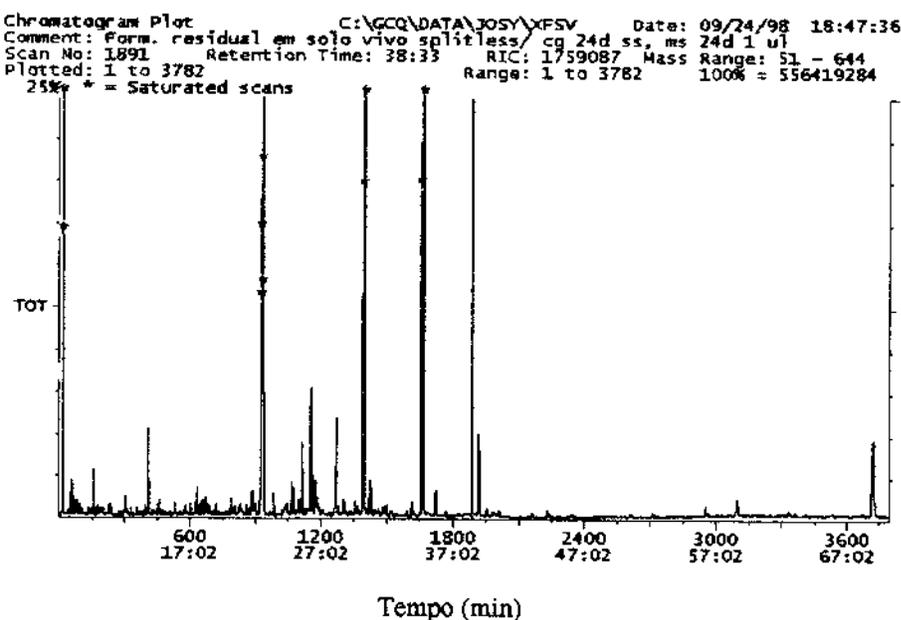


Fig 26 – Cromatograma de CG do extrato 2,4-D residual em experimentos com FLC em solo estéril após 60 dias, obtido durante o seguinte gradiente de temperatura: 60°C por 1 min, seguido de um aumento de 30°C por min até 140°C. Após 3 min esta foi novamente elevada na proporção de 4°C por min até alcançar 240°C, mantendo-se nesta durante 13 min.

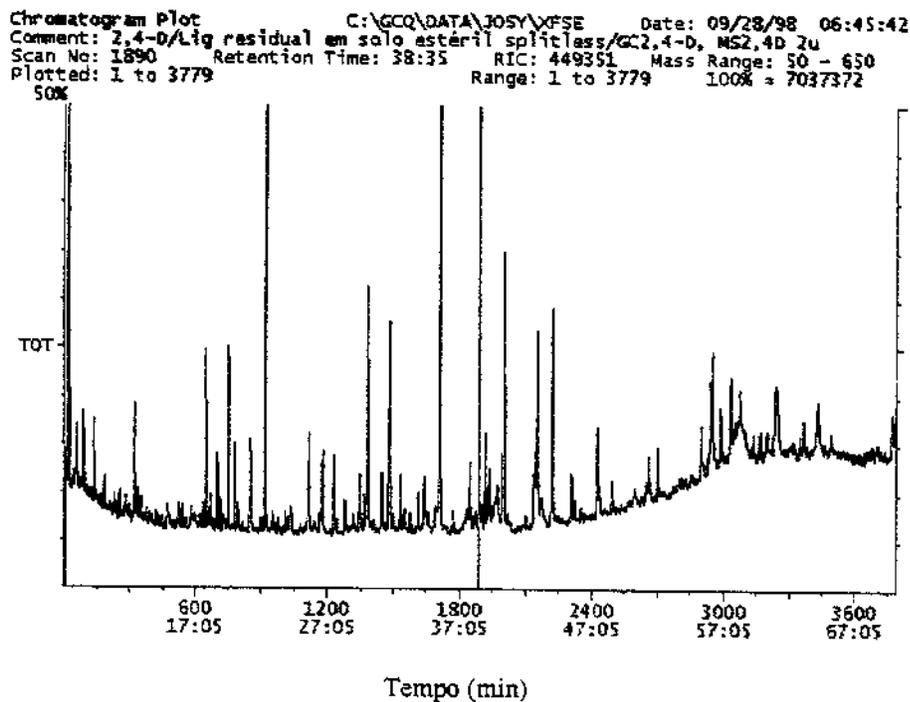


Fig 27 – Cromatograma de CG do extrato de 2,4-D residual em experimentos com FLC em solo vivo após 60 dias, obtido durante o seguinte gradiente de temperatura: 60°C por 1 min, seguido de um aumento de 30°C por min até 140°C. Após 3 min esta foi novamente elevada na proporção de 4°C por min até alcançar 240°C, mantendo-se nesta durante 13 min.

Apêndice III

Análise de TGA e DSC da lignina

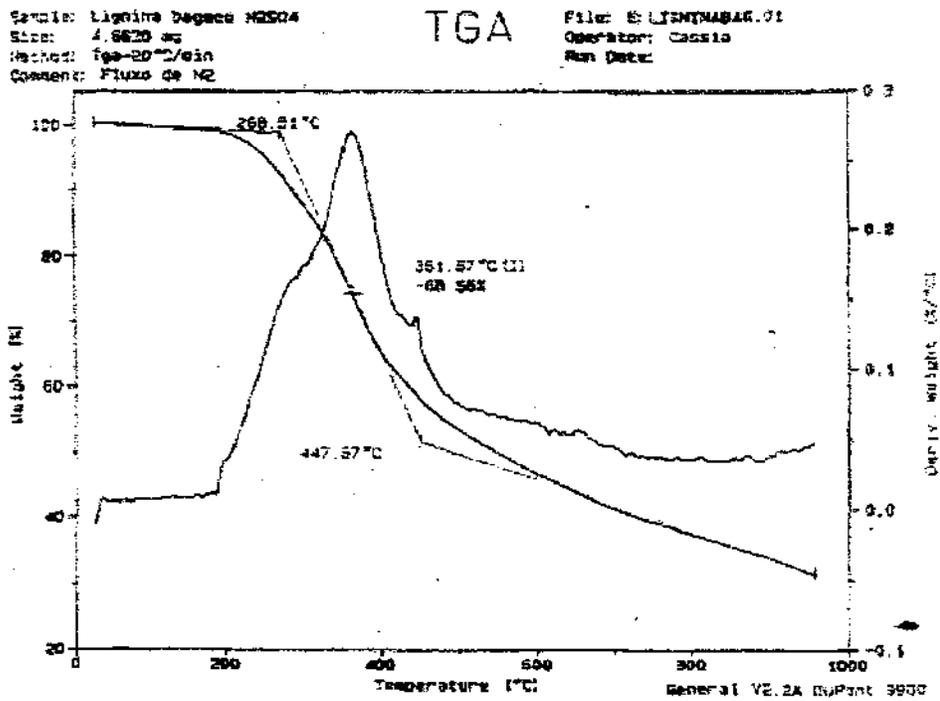


FIG 42– Gráfico contendo as curvas das análises de TGA e DSC (que apresenta um pico em 447,67°C) da lignina de bagaço de cana.