

Universidade Estadual de Campinas

Instituto de Química

Este exemplar corresponde a avaliação
final da Tese defendida por Silvana
Auxiliadora Missola Britter e aprovada
pela Comissão julgadora.

Campinas, 30 de Setembro de 1991

Cláudio Hiroldi

Estudo Microcalorimétrico De Polo

Em Presença De Atividade.

Tese de Mestrado

Silvana Auxiliadora Missola Britter

Orientador: Prof Dr Cláudio Hiroldi

Campinas - SP

-1991-

86 9112039

ao meu marido, "Marinho", pelo amor, carinho
e compreensão ao longo destes anos;
ao meu filho, "Matheus", pela felicidade
e renovação de esperança com sua chegada;
aos meus pais.

As ciências aplicadas não existem,
somente as aplicações da ciência.

(*Louis Pasteur*)

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Claudio Airoidi pelo apoio e incentivo, os quais tornaram possível a execução deste trabalho;

Ao Prof. Dr. José de Alencar Simoni pelo auxílio no uso do instrumento e pelas sugestões fornecidas;

Ao Prof. Dr. Aécio Pereira Chagas pelas importantes contribuições;

Ao Prof. Dr. Rogério Custódio pela ajuda fornecida;

A Prof.^ª Dr.^ª Sâmia Maria Tauk no fornecimento das amostras;

As técnicas de laboratório, Neusa e Claudete, pela amizade;

A todos os amigos: Eva, Geraldo, Carlos, Rita, Júnior, Sirlei,

Silvia, Margarida, Elza, Reinaldo, Carlos, Edésio, Lauro, Lauro

Camargo.

A Diretoria do Instituto de Química da Unicamp;

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

A todos de que me esqueci.

I. Introdução	14
1. Solos	14
Propriedades.	14
Componentes inorgânicos.	14
Matéria orgânica.	16
Complexos organominerais.	16
2. Microrganismos do solo	19
Tipos.	19
Classificação e crescimento.	20
Funções dos microrganismos no solo.	20
Transformações executadas por microrganismos.	21
Microrganismos e aditivos agrícolas.	21
Mineralização.	23
Cometabolismo.	24
Reações químicas com compostos orgânicos.	24
3. Herbicidas "Paraquat" e "Diquat"	30
Características.	30
Estrutura.	30
Decomposição.	30
4. Calorimetria	32
4.1. Alguns aspectos gerais de aplicações.	32
4.2. Instrumentação.	33
4.3. Calorimetria aplicada a sistemas biológicos.	34

II. Objetivo	36
III. Parte Experimental	37
1. Obtenção das amostras	37
2. Tratamento do solo	38
2.1. Esterilização com ácido clorídrico.	38
3. Reagentes	38
4. Preparação das soluções de "Paraquat" e "Diquat"	39
5. Determinação do conteúdo de matéria orgânica	40
6. Determinação da umidade	41
7. Medidas de pH	41
8. Parte calorimétrica	41
8.1. Instrumentação.	41
8.2. Calibração do aparelho.	46
8.3. Medidas calorimétricas.	46
IV. Resultados e Discussão	50
V. Conclusões Finais	75
VI. Bibliografia	77

Tab.1.	Quantidade dos elementos químicos encontrados na litosfera.	15
Tab.2.	Constituintes das moléculas orgânicas presentes no húmus.	17
Fig.1.	Representação esquemática da união entre uma partícula mineral do solo e parte da matéria orgânica.	18
Tab.3.	Quantidade de organismos mais comum encontrados no solo.	19
Tab.4.	Algumas reações químicas realizadas por microrganismos.	22
Tab.5.	Tipos de reações químicas que ocorrem no ambiente, no solo (S), culturas microbiológicas (M), águas naturais (N) e águas poluídas (P).	25
Tab.6.	Defensivos agrícolas com respectiva nomenclatura e estrutura química.	27
Fig.2.	Estrutura química dos herbicidas bupiridínicos (A) "Paraquat" (dicloreto de 1,1' dimetil-4,4' - bupiridínio) e (B) "Diquat" (dibrometo de 1,1' - etileno-2,2'-bupiridínio).	31

Fig.3.	Cilindro de medidas (unidade calorimétrica).	43
Fig.4.	Princípio de transferência de calor do calorímetro isotérmico LKB - 2277.	44
Fig.5.	Diagrama de blocos do sistema de medidas do calorímetro isotérmico LKB 2277.	45
Fig.6.	Ampola utilizada nas medidas calorimétricas.	47
Tab.7.	Influência do tempo de estocagem a $(293 \pm 5)K$ sob a curva exponencial, obtida pela adição de glicose no solo a 298K.	51
Fig.7.	Esquema do cálculo executado neste estudo, envolvendo a curva exponencial de desenvolvimento de microrganismos.	52
Tab.8.	Comparações entre tipos de solos e métodos de esterilização	53
Fig.8.	Efeito da estocagem sobre os microrganismos do solo desenvolvidos com glicose, a $(293 \pm 5)K$, em relação ao (A) Tempo de resposta (h) e (B) Efeito Térmico (kJ/mol de glicose).	54
Tab.9.	Efeito da concentração da massa de glicose (m) sob o máximo do pico de tempo (T_p) donde foi obtida a área (A) e calculado o Efeito Térmico (Q) por mol de glicose a 298 e 306K.	55

Fig.9.	Degradação microbiológica da glicose a 298K (--) e 306K (-) no solo e Teste da glicose em água sem solo a 298K.	57
Fig.10.	Resultados obtidos da degradação da glicose a 298K e 306K (A) Efeito Térmico (kJ/mol de glicose) e (B) Tempo de resposta (h) obtido do máximo do pico da curva exponencial.	58
Fig.11.	Degradação microbiológica da glicose a 306K com 0,2 (-.-), 0,4 (---) e 0,8 (-) % de glicose.	59
Tab.10.	Influência da concentração (i) de CuSO_4 (mg) sobre as curvas de crescimento obtidas pela adição de glicose no solo a 298K.	61
Fig.12.	Degradação microbiológica da glicose em presença de CuSO_4 a 298K com: 0,0; 0,05; 0,10; 0,20 e 0,40 % do sal.	63
Fig.13.	Resultados da degradação microbiológica da glicose em presença de CuSO_4 a 298K: (A) Tempo de resposta (h) e (B) Efeito Térmico (kJ/mol de glicose).	64
Tab.11.	Efeito provocado pela massa de "Paraquat" (m) sobre a microbiota do solo desenvolvida com glicose a 298K.	65

Tab.12.	Influência da concentração de "Diquat" (m) no desenvolvimento de microrganismos no solo com glicose a 298K.	66
Fig.14.	Curva exponencial de crescimento de microrganismos no solo em presença do herbicida "Paraquat" a 298K com massa: 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0 e 5,0 mg.	67
Fig.15.	Efeito provocado pela presença do herbicida bipyridínio "Paraquat" na degradação microbiológica da glicose no solo a 298K: (A) Efeito Térmico (kJ/mol de glicose) e (B) Tempo de resposta (h).	68
Tab.13.	Valores obtidos dos dados experimentais da massa i (mg) e do Tempo de resposta, $Tp(i)(h)$, para o cobre e os herbicidas bipyridínicos.	69
Fig.16.	Resultados da degradação microbiológica da glicose no solo em presença do herbicida bipyridínio "Diquat" a 298K : (A) Tempo de resposta (h) e (B) Efeito Térmico (kJ/mol de glicose).	70
Fig.17.	Curva exponencial de crescimento de microrganismos em presença do herbicida bipyridínio "Diquat" a 298K com massa: 0,0; 1,0; 2,0; 4,0 e 5,0 mg.	71
Fig.18.	Efeito provocado no solo com glicose pelo bactericida tetraciclina (-) e cloranfenicol (--) a 298K, com respectiva estrutura.	73

Símbolos e Abreviações

P - potência térmica.

Cc - constante de calibração.

K - constante de tempo do instrumento.

V - diferença de potencial.

t - tempo.

$\frac{\partial V}{\partial t}$ - derivada do sinal da diferença de potencial em relação ao tempo.

Vs - diferença de potencial no estado estacionário.

Q - efeito térmico.

A - área.

m - massa.

i - concentração de aditivo.

Tp - máximo do pico de tempo obtido a partir da adição de glicose.

Tp(i) - máximo do pico de tempo ou tempo de resposta na concentração (i) de aditivo.

Tp(0) - máximo do pico de tempo obtido sem aditivo.

$\frac{\partial i}{\partial T_p(i)}$

— - derivada da concentração do aditivo em relação ao máximo do pico de tempo.

C - constante do sistema estudado.

n - constante adimensional do sistema relacionada com o grau da equação.

i_d - concentração de aditivo depois de atingido o dobro do máximo do pico de tempo.

i_1 - concentração do aditivo depois de 1h.

RESUMO

Neste trabalho foram estudados solos classificados como Latossolo Roxo, sob vegetação de "cerrado" com e sem tratamento de vinhaça e de plantação de cana-de-açúcar, cuja amostragem foi obtida em profundidade de 5-10 cm. As amostras foram secadas, peneiradas e estocadas a $(293 \pm 5)^\circ\text{K}$.

Os parâmetros do Latossolo Roxo foram caracterizados por métodos físicos com a determinação do pH, umidade e matéria orgânica, dando: 5,10; 1,3 a 3,0 % e 3,5 %, respectivamente.

A atividade biológica nos solos foi seguida através do calorímetro isotérmico LKB 2277, sendo considerado os seguintes sistemas: glicose e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com variação na concentração de nutrientes de (3,0 a 12,0)mg, com respectivo efeito térmico de $((105 \pm 3)$ a (423 ± 17) kJ/mol de glicose) a 298K e $((129 \pm 3)$ a (579 ± 23) kJ/mol de glicose) a 306K. O CuSO_4 adicionado ao solo com glicose e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 298K na quantidade de (0,0 a 5,28)mg produziu um efeito térmico de $((216 \pm 4)$ a (48 ± 1) kJ/mol de glicose), respectivamente. Os herbicidas "Paraquat" e "Diquat", nas mesmas condições acima com massa de (0,0 a 6,0)mg, aproximadamente, produziram um efeito térmico de $((291 \pm 4)$ a (159 ± 2) kJ/mol de glicose para o "Paraquat" e de $((297 \pm 3)$ a (90 ± 1) kJ/mol de glicose para o "Diquat". Tanto o CuSO_4 como os herbicidas causaram forte efeito inibidor ao desenvolvimento de microrganismos.

Com o polissacarídeo celulose em presença de sais inorgânicos, nenhum efeito térmico foi observado. Os experimentos com os antibióticos "tetraciclina" e "cloranfenicol" a 298K, somente o primeiro apresentou efeito térmico correspondendo a (220 ± 3) kJ/mol de glicose.

Abstract

In this work was studied soils classified as Latosol Roxo, under "cerrado" vegetation, under "cerrado" vegetation with vinasse addition and the sugar cane area, with samples obtained at 0-15cm depth. The sample was dried, sieved and stored at $(293 \pm 5)K$.

The Latosol Roxo was characterized through physical methods given: pH (5,10); soil moisture (1,3-3,0%) and organic matter (3,5%).

The biological activity in soils were followed by means of a LKB 2277 in the following systems: glucose plus $(NH_4)_2SO_4$ with variable concentration of nutrients (3,0 to 12,0)mg with the respective thermic effect $((105 \pm 3)$ to $(423 \pm 17)kJ/mol$ of glucose) at 298,15K and $((129 \pm 3)$ to $(579 \pm 23)kJ/mol$ of glucose) at 306K. The amount of $CuSO_4$ in (0,0 to 5,28)mg added to soil contained glucose plus $(NH_4)_2SO_4$ give thermic effect $((216 \pm 4)$ to $(48 \pm 1)kJ/mol$ of glucose). The herbicides "Paraquat" and "Diquat" in above conditions with mass varying (0,0 to 6,0)mg produced thermic effect of $((291 \pm 4)$ to $(159 \pm 2)kJ/mol$ of glucose) for "Paraquat" and $((297 \pm 3)$ to $(90 \pm 1)kJ/mol$ of glucose) for "Diquat". This results indicated that the development of microorganisms is inhibited by the presence of both herbicides and $CuSO_4$.

The addition polysaccharide cellulose in presence inorganic salts no thermic effect was detected.

The experiments with antibiotics "tetracycline" and "chloramphenicol" showed that only the first exhibited thermic effect, which corresponds to $(220 \pm 3)kJ/mol$ of glucose.

I. INTRODUÇÃO

Para introduzir vimos expor algumas das propriedades do solo brasileiro, em particular o do Estado de São Paulo, onde o Latossolo Roxo ocupa uma área de 14,7%, tendo como características principais: coloração vermelho-arroxeadado, argiloso, bastante poroso, onde a fertilidade natural varia, sendo alta para terra roxa legítima. O material de origem destes solos são rochas eruptivas [1].

Assim, segue, nesta parte introdutória, a descrição do solo, dos microrganismos, dos herbicidas "Paraquat" e "Diquat" e da calorimetria.

1. SOLOS

As reações químicas e biológicas se desenvolvem num contínuo no meio ambiente, sendo que a maioria delas ocorrem no solo. Assim, as principais transformações que acontecem neste meio dependem das condições ambientais e das características inerentes de cada solo em si. Desta maneira, este capítulo inicia-se abordando as propriedades do solo, os componentes inorgânicos e orgânicos que o constituem e suas interações.

Verificam-se em sistemas como o solo que suas propriedades físicas e químicas variam com a profundidade, tipo de vegetação, umidade, tipo de rochas, organismos, tempo e outros fatores adicionais. Estas características podem diferir em pequenas distâncias [2]. Neste contexto, os componentes inorgânicos constituem uma parte importante da fração sólida da maioria dos solos [3]. Assim, os elementos químicos pertencentes a esta fração tem composição variável de um sítio para outro, podendo a extensão desta relação ser evidenciada na tabela 1.

Tabela 1: Quantidade dos elementos químicos encontrados na litosfera e solos [2,4].

Elemento químico	Massa atômica	Conteúdo na litosfera (ppm)	Faixa Comum nos solos (ppm)	Média em solos Log M
Ag	107,87	0,07	0,01 - 5	- 5,33
Al	26,98	81000	10000 - 300000	1,42
As	74,92	5	1 - 50	- 3,18
B	10,81	10	2 - 100	- 2,03
Br	79,91	2,5	1 - 10	- 3,20
Ca	40,08	36000	7000 - 500000	0,53
Cd	112,40	0,2	0,01 - 0,70	- 5,27
Co	58,93	40	1 - 40	- 2,87
Cr	52,00	200	1 - 100	- 1,72
Cu	63,54	70	2 - 100	- 2,33
Fe	55,85	51000	7000 - 550000	0,83
Hg	200,59	0,1	0,01 - 0,3	- 5,83
K	39,10	26000	400 - 30000	0,33
Mn	54,94	900	20 - 300	- 0,96
Na	22,99	28000	750 - 7500	0,44
O	16,00	465000	-	2,49
Pb	207,19	16	2 - 200	- 3,32
S	32,06	600	30 - 10000	- 0,66
Si	28,09	276000	230000 - 350000	- 2,06
Sn	118,69	40	2 - 200	- 3,07

A tabela 1 apresenta uma faixa de concentração de vários elementos químicos que aparecem na litosfera e solos, sendo que nem todos estes elementos estão na forma solúvel, em solução aquosa de solo. Nesta tabela 1 verificamos grande variação na concentração (ppm) dos elementos: Al, Ca, Fe, K, Mg, Na, O e Si nos solos e na litosfera, que é considerada como uma camada da Terra com profundidade de até 16 km. Os dados da última coluna fornecem meios de estimar concentrações máximas (M) de cada elemento químico que pode aparecer no estado solúvel, em solução natural de solos com 10% de peso seco [2], sendo que, quanto maior for o valor de $\log M$, maior será a concentração molar. É conveniente lembrar que esta tabela aborda quantitativamente os componentes inorgânicos dos solos americanos, o que difere do encontrado em solo brasileiro.

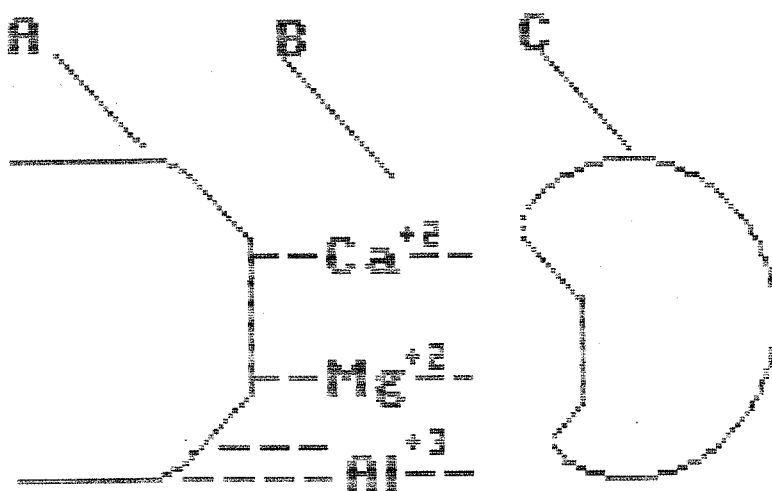
Outro componente importante é a matéria orgânica, a qual é constituída de resíduos vegetais e animais em diferentes estados de degradação, tecidos e células produzidas pelos habitantes do solo, sendo a parte mais escura denominada húmus [3]. Em termos de tipos de compostos, o húmus contém uma variedade de substâncias polimerizadas, moléculas aromáticas, polissacarídeos, aminoácidos, polímeros de ácidos urônicos e compostos contendo fósforo que estão representados na tabela 2. Exceto os aminoácidos e ácidos alifáticos, os quais são encontrados em baixas concentrações, os vários constituintes das moléculas orgânicas raramente existem na forma livre, sendo encontrados associados a polímeros ou formando complexos [3].

A matéria orgânica e a fração inorgânica do solo não atuam independentes uma da outra. Como é de se esperar, aí existem uniões resultantes da combinação direta das partículas minerais com a matéria orgânica através de ligações fracas, como aquelas denominadas do tipo ponte de hidrogénio ou ligações com cátions.

Tabela 2: Constituintes das moléculas orgânicas
presentes no húmus [3].

I. Aminoácidos	VII. Pentoses
Ácido Glutâmico	Xilose
Alanina	Arabinose
Valina	Ribose
Prolina	
Cistina	VIII. Hexoses
Fenilalanina	Glicose
	Galactose
	Manose
II. Purinas	
Guanina	IX. Alcoois
Adenina	Inositol
	Manitol
III. Pirimidinas	
Citosina	X. Açúcares
Timina	Ramnose
Uracil	Frutose
	2-O-metil-D-xilose
IV. Moléculas Aromáticas	2-O-metil-D-arabinose
V. Ácidos Urônicos	
Glucurônicos	XI. Ácidos Alifáticos
Galacturônicos	Acético
	Fórmico
VI. Aminoaçúcares	Lático
Glicosamina	Succínico
N-acetilglicosamina	

Assim, pode-se supor uniões, cujo esquema geral encontra-se na figura 1.



- A - Partícula Mineral do Solo
- B - Cátions presentes no húmus
- C - Resíduos orgânicos

Figura 1 : Representação esquemática da união entre uma partícula mineral do solo e parte da matéria orgânica [2].

Estes complexos organominerais são de diferentes tamanhos e mobilidades. Os complexos pequenos são geralmente mais solúveis e contribuem para a mobilidade dos componentes do solo, influenciando sobre os mecanismos de retenção de nutrientes no solo. Certas substâncias, como ácidos húmicos e fúlvicos, formam complexos organominerais cuja estabilidade é de grande importância para regular estes processos químicos. As constantes de estabilidade destes complexos variam segundo a natureza dos materiais, a acidez do meio e das espécies catiónicas presentes [3].

2. MICRORGANISMOS DO SOLO.

Antes de iniciar a descrição dos microrganismos do solo é conveniente ressaltar sua importância relacionada à capacidade de executar transformações químicas, permitindo o equilíbrio no ecossistema.

Sabe-se que os microrganismos estão presentes em praticamente todos os solos [2] e que existe relevante importância nas interrelações entre os mesmos e as enzimas. Contudo, investigações sobre a microbiota e enzimologia de solos tropicais são bastante escassas, sendo encontrados maiores investimentos envolvendo solo sob vegetação de "cerrado" [5-9].

Os organismos mais comuns do solo ocorrem como bactérias, actinomicetos, fungos filamentosos, leveduras, algas, protozoas e nematóides cujo número de organismos por grama de solo seco, baseado na técnica por contagem em placas, podem ser verificados na tabela 3 [10].

Tabela 3: Quantidade de organismos mais comum encontrados no solo [10].

Organismos	Número estimado por grama de solo seco
Bactérias	3.000.000 - 500.000.000
Actinomicetos	1.000.000 - 20.000.000
Fungos filamentosos	5.000 - 900.000
Leveduras	1.000 - 500.000
Algas	1.000 - 500.000
Protozoas	1.000 - 500.000
Nematóides	50 - 200

As necessidades básicas dos microrganismos para renovar a matéria viva e exercerem suas atividades são fonte de energia e fonte de material plástico [11]. A fonte de energia pode ser obtida da luz pelos microrganismos fotossintéticos, como por exemplo algas e certas bactérias ou de reações químicas pelos quimiotróficos. A fonte de material plástico aqui considerada é o carbono, nitrogênio, íons inorgânicos, onde se inclui os macro e micro nutrientes. Entre os macronutrientes encontramos o P, S, Ca e Fe e quanto ao segundo o Cu, Co, Zn e B.

Os microrganismos podem nutrir-se somente de substâncias inorgânicas ou podem exigir fontes orgânicas de carbono. Assim, são classificados em autótrofos e heterotróficos, respectivamente [12]. Conhece-se que a capacidade de crescimento dos organismos é determinada pela habilidade de utilização dos nutrientes [13]. Este é considerado como o aumento de massa resultante do acréscimo ordenado de todos os constituintes da matéria viva. O crescimento torna-se limitado pela exaustão de nutrientes ou acúmulo de substâncias tóxicas [14] sofrendo influência da temperatura, pH, oxigênio, condições nutricionais, entre outros [11].

As funções desempenhadas pelos microrganismos é de fundamental importância dentro dos processos biogeoquímicos. Estes processos envolvem transformações químicas realizadas por organismos vivos em ambientes naturais. Dentro deste contexto as enzimas microbianas desempenham um papel crucial em reações químicas de fixação, oxidação-redução e clivagem do material orgânico necessário para a manutenção do equilíbrio no ecossistema [15]. O aumento da população microbiana, resultante da adição de um substrato no solo, pode levar a um acréscimo da atividade enzimática ligada a este substrato. Assim, a adição de sacarose pode estimular a microbiota degradante deste açúcar enriquecendo o solo em invertases [15]. Contudo, a adição de um substrato pode induzir

o enriquecimento de uma enzima que não degrada este substrato. Isto pode ser explicado pela estimulação das interrelações de microrganismos, da produção de outras enzimas envolvidas nas reações químicas e pela degradação do substrato, causando formação de produtos intermediários sobre os quais proliferarão outros microrganismos [15].

Grande quantidade de matéria orgânica é decomposta a cada período de tempo por microrganismos do solo, sendo que podemos verificar na tabela 4 algumas transformações de grande importância que ocorrem em solos. Sabe-se que nutrientes inorgânicos precisam ser solubilizados e que compostos de nitrogênio e enxofre precisam ser oxidados ou reduzidos dependendo do nível de oxigênio no solo. Assim, passam a ocorrer reações de oxidação-redução no solo, com maior ou menor intensidade [2]. Alguns metais envolvidos nestas reações químicas estão na coluna dos elementos químicos da tabela 4 [2], as espécies microbiológicas responsáveis pelas transformações na coluna seguinte e na última coluna as reações químicas realizadas por estes organismos.

Algumas contribuições significativas demonstram o papel fundamental que os microorganismos desempenham nas modificações e destruições de poluentes no meio ambiente [16,17]. Quando uma substância tóxica é introduzida em solos e águas, a consequência imediata que se constata de ação microbiológica é a desintoxicação [18]. A principal causa da persistência de pesticidas no solo é a perda das condições que favorecem a biodegradação [17]. No caso do "Paraquat" (dicloreto de 1,1'-dimetil -4,4'-bipiridínio) existem aplicações *in vitro* onde é possível seguir o curso de sua degradação e metabolismo por microrganismos [19]. Estudo sobre sua degradação no solo concluiu que o "Paraquat", adsorvido nos espaços internos do reticulado das argilas, é difícil ao ataque microbiano, porém, aquele adsorvido na superfície de composto

Tabela 4: Algumas reações químicas realizadas por microrganismos [2].

Elemento Químico	Tipo de Microrganismos	Atividade Fisiológica
As	Ferroxidantes	As_2S_3 oxidado a AsO_3^{-3} ; AsO_4^{-3} ; SO_4^{-2} .
Cd	Desulfovíbrio	$\text{CdCO}_3 + \text{SO}_4^{-2} + 8\text{H}^+ + 8\text{e}^- = \text{CdS} + 4\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_3^{-2}$
Cu	Ferroxidantes	$\text{Cu}_2\text{S} + 4\text{H}_2\text{O} = 2\text{Cu}^{+2} + 8\text{H}^+ + \text{H}_2\text{SO}_4 + 10\text{e}^-$
Fe	Ferroxidantes	$\text{Fe}^{+2} = \text{Fe}^{+3} + \text{e}^-$
	Nitrificantes	$\text{Fe}^{+3} + \text{SO}_4^{-2} + 8\text{H}^+ + 9\text{e}^- = \text{FeS} + 4\text{H}_2\text{O}$.
Ni	Ferroxidantes	$\text{NiS} + 4\text{H}_2\text{O} = \text{Ni}^{+2} + 8\text{H}^+ + \text{SO}_4^{-2} + 8\text{e}^-$
S	Tiobactérias	$\text{H}_2\text{S} = \text{S} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$.
	Todos os microrganismos	$\text{S} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ = \text{H}_2\text{S}$.
Se	Selênicus	$\text{H}_2\text{Se} + 4\text{H}_2\text{O} = \text{SeO} + 10\text{H}^+ + 8\text{e}^-$ $\text{Se} + 2\text{e}^- + \text{H}^+ = \text{SeH}^-$.
Zn	Ferroxidantes	$\text{ZnS} + 4\text{H}_2\text{O} = \text{Zn}^{+2} + \text{SO}_4^{-2} + 8\text{H}^+ + 8\text{e}^-$

orgânico pode ser degradado. Quando um produto é aplicado no solo a adsorção na matéria orgânica é mais rápida do que argilas. Assim, o produto fica disponível ao ataque microbiano [19].

Existe hoje em dia grande preocupação quanto aos métodos de análises de resíduos de pesticidas, onde foi encontrado um resumo [20] incluindo: cromatografia de coluna, cromatografia à gás, cromatografia líquida de alta resolução, entre outros. Este também abordou a eficiência de métodos de extração com solventes orgânicos e posterior análise de resíduos de pesticidas em solos, águas, plantas e animais [20].

Microrganismos de solos e águas convertem muitos compostos orgânicos em produtos inorgânicos, dióxido de carbono e água. Sendo assim, a mineralização é, muitas vezes, uma consequência da atividade microbiológica [18]. Cabe ressaltar que a mineralização é considerada como a completa biodegradação de uma molécula orgânica. Deste modo, os microrganismos convertem o substrato orgânico em produtos inorgânicos onde populações responsáveis fazem uso do carbono no substrato e o convertem em constituintes celulares. Ao mesmo tempo a energia é trocada e as populações aumentam em biomassa e número [18]. Deste modo, a degradação de poluentes em solos e águas naturais é muitas vezes, resultado da atividade biológica. Todavia, a adsorção de compostos orgânicos por constituintes do solo e sedimentos podem reduzir a disponibilidade destes compostos, tornando vagarosa a degradação. Estudo sobre a cinética da degradação da benzilamina em suspensão de montmorillonita por bactérias foi publicado recentemente onde conclui que a mineralização é mais vagarosa na presença do sólido [21].

Observa-se em vários compostos orgânicos, tais como: "DDT" (2,2-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano), "aldrin" (1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahidro-1,4-endo,5,8-exo-dimeta-

no)naftaleno), "2,4,5,T" (ácido acético -(2,4,5-triclorofenóxi)) e "heptacloro" ((1,4,5,6,7,8,8a- heptacloro-3a,4,7a- tetrahidro-4,7-metano)indeno) [22-25], compostos clorados e não clorados, que ocorre conversão microbiológica diferente da mineralização, denominada cometabolismo [26,27]. Uma evidência ambiental deste fenômeno é a população não aumentar em número e biomassa, como resultado da introdução destes compostos dentro de águas e solos [18]. Este fenômeno ocorre pelo fato de que os microrganismos não são capazes de utilizar os compostos orgânicos introduzidos nos solos como fonte de energia. O cometabolismo é também denominado de cooxidação. Os patamares do metabolismo são delineados em cultura microbiológica devido à facilidade de conduzir as investigações. Mas as transformações devem ser estabelecidas em modelos de ecossistemas ou ecossistemas naturais. Estes modelos incluem: águas poluídas, solos, águas limpas, estuários e oceanos. Alguns tipos de reações envolvendo compostos orgânicos de particular importância ambiental é dado na tabela 5 [28-73]. Essa tabela 5 tenta reproduzir reações químicas que têm sido estabelecidas em modelos de ecossistemas por medidas diretas em solos(S), culturas microbiológicas(M), águas naturais (N) e águas poluídas(P). Estes dados não são rigorosos para mostrar que a reação é microbiológica pois alguns processos podem ser parcialmente ou completamente não enzimáticos. Os tipos de produtos listados são encontrados somente fora da célula e em concentrações detectáveis [18]. Na tabela 6 é encontrado o nome comum, nome químico e estrutura da maioria dos aditivos agrícolas citados na tabela anterior [74-85].

Estudos em culturas puras são inadequados para prever o destino de determinadas substâncias pois podem não serem degradadas por culturas simples e serem transformadas por mistura de culturas devido interações entre diferentes organismos [86], onde as fases finais de testes devem ser em ecossistemas [18].

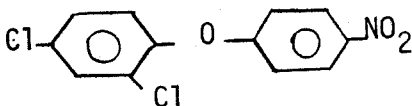
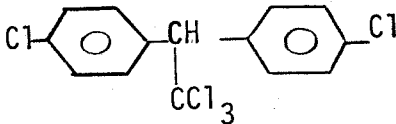
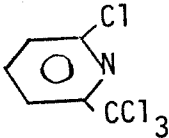
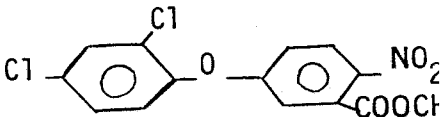
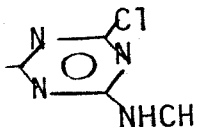
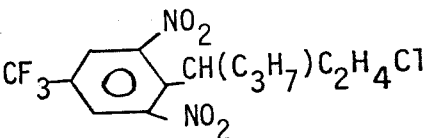
Tabela 5: Tipos de reações químicas que ocorrem no ambiente, no solo (S), culturas microbiológicas (M), águas naturais (N) e águas poluídas (P) [18,28-73].

Categoria	Reação Química	Exemplo	Ref.
Deshalo- genação	$RCH_2Cl \rightarrow RCH_2OH$	Propacloro (S,M)	[28]
	$ArCl \rightarrow ArOH$	Nitrofen (S)	[29]
	$ArF \rightarrow ArOH$	Flamprop-metil (S)	[30]
	$ArCl \rightarrow ArH$	Pentaclorofenol (S,M)	[31,32]
	$Ar_2CHCCl_3 \rightarrow Ar_2CHCHCl_2$	DDT (P,S,M)	[33,25,34]
	$Ar_2CHCCl_3 \rightarrow Ar_2C=CCl_2$	DDT (N,S,M)	[33,35,36]
	$RCCl_3 \rightarrow RCOOH$	N-Serve (S)	[33,34,37]
	$HetCl \rightarrow HetOH$	Cianazina (S)	[38]
Desami- nação	$ArNH_2 \rightarrow ArOH$	Flucloralin (S)	[39]
Descarboxi- lação	$ArCOOH \rightarrow ArH$	Bifenox (S)	[40]
	$Ar_2CHCOOH \rightarrow Ar_2CH_2$	DDT (M)	[41]
	$RCH(CH_3)COOH \rightarrow RCH_2CH_3$	Diclorofop-metil (S)	[42]
	$ARN(R)COOH \rightarrow ArN(R)H$	DDOD (S)	[43]
Oxidação de grupos metilas	$RCH_3 \rightarrow RCH_2OH$	Bromacil (S),	[44,45,46]
Hidroxi- lação	$ArH \rightarrow ArOH$	Bentiocarb (S),	[47,48]
	$RCH_2R' \rightarrow RCH(OH)R'$	Carbofuran (S)	[25,49]
	$R(R')CHR'' \rightarrow R(R')CHOH(R'')$	Bux inseticida (S)	[50]
	$R(R')(R'')CCH_3 \rightarrow$		
	$R(R')(R'')CCH_2OH$	Denmert (S)	[51]

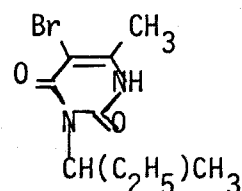
B-oxidação	$\text{ArOCCH}_2)_n\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$	ácidos alcanóides	
	$\rightarrow \text{ArOCCH}_2)_n\text{COOH}$	w-(2,4-diclorofenoxi)(S,M)	[52,53]
Formação de			
epóxi	$\text{RCH=CHR}' \rightarrow \text{RCH} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \text{---} \end{array} \text{CHR}'$	Heptacloro (S,M)	[54,55]
Oxidação			
de			
nitrogênio	$\text{RCR}'\text{NR}'' \rightarrow \text{RCR}'\text{NC(=O)R}''$	Tridemorf (S)	[56]
Oxidação de			
enxofre			
=S $\rightarrow$ =O	$\text{RSR}' \rightarrow \text{RSC(=O)R}'$	Aldicarb (S,M)	[57,58]
	$(\text{AlKO})_2\text{PC(=O)R} \rightarrow$		
	$(\text{AlKO})_2\text{PC(=O)R}$	Paration (S,M)	[59,60]
	$\text{RCC(=S)R}' \rightarrow \text{RCC(=O)R}'$	Etilenotiuréia (S)	[61]
Redução de			
Sulfóxido	$\text{RSC(=O)R}' \rightarrow \text{RSR}'$	Forato (S)	[62]
Redução da			
ligação			
tripla	$\text{RC}\equiv\text{CH} \rightarrow \text{RCH=CH}_2$	Buturon (S,M)	[63,64]
Redução da			
ligação			
dupla	$\text{Ar}_2\text{C=CH} \rightarrow \text{Ar}_2\text{CHCH}_3$	DDT (N,M)	[65]
Metabolismo			
nitro	$\text{RNO}_2 \rightarrow \text{ROH}$	Nitrofen (S)	[66]
	$\text{RNO}_2 \rightarrow \text{RNH}_2$	Pentacloronitrobenzeno(S,M)	[67-71]
Metabolismo			
de oximas	$\text{RCH=NOH} \rightarrow \text{RC}\equiv\text{N}$	Aldicarb (S,M)	[57,58]
Metabolismo			
de nitrila/			
amida	$\text{RC}\equiv\text{N} \rightarrow \text{RCC(=O)NH}_2$	Bromoxinil (S,M)	[72,73]

Obs: Abreviações: R-radical orgânico, Ar-anel aromático, Alk-grupo alquila, Het-heterocíclico.

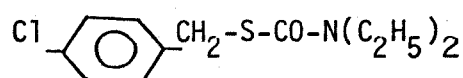
Tabela 6: Defensivos agrícolas com nomenclatura e estrutura química [74-85].

Nome Comum	Nome Químico	Estrutura
"Propacloro"	(2-cloro-N-isopropil) acetanilida	$\text{ClCH}_2\text{CON}(\text{CH}_3)_2$
"Nitrofen"	2,4-diclorofenil-p-nitrofenil éter	
"DDT"	2,2-(p-clorofenil)-1,1,1-tricloroetano	
N-Serve"	2-cloro-6-(triclorometil) piridina	
"Bifenox"	metil-5-(2,4-diclorofenóxi) 2-nitrobenzoato	
"Cianazina"	2-cloro-4-(etilamino)-6-(1-ciano-1-metiletilamino-5-triazine)	$\text{NC}(\text{CH}_3)_2\text{CHN}$ 
"Flucloralin"	N-(2-cloroetil)-2,6-dinitro-N-propil-4-trifluormetil anilina	

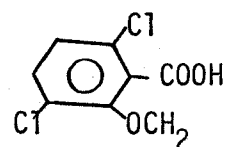
"Bromacil" (5-bromo-3-sec-butyl-6-metil)uracil



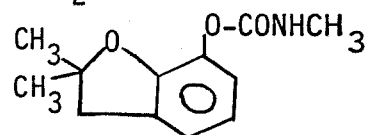
"Benthiocarb" S(4-clorobenzil)-N-N-di-etiltio) carbamato



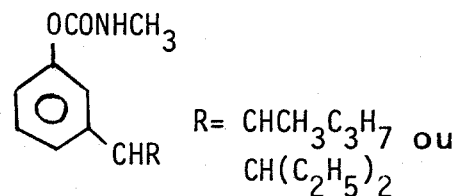
"Dicamba" ácido (3,6-dicloro-o-anísico)



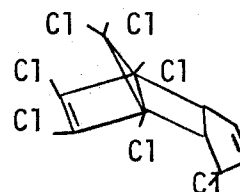
"Carbofuran" (2,3-dihidro-2,2-dimetil-benzofuranil metilcarbarato)



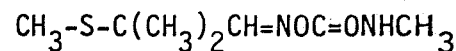
"Bux inseticida" mistura 3:1 de 3-(1-metil-butyl) fenil-N-metilcarbarato e 3-(1-etilpropil) fenil N-metilcarbarato



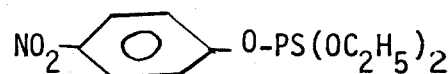
"Heptacloro" 1,4,5,6,7,8,8a-heptacloro-3a,4,7a-tetrahidro-4,7-metano indeno



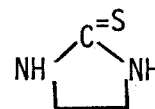
"Aldicarb" (2-metil-2-(metiltio) propinaldeído o-(metil carbamoil) oxima

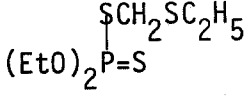
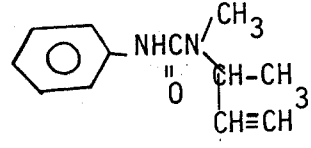
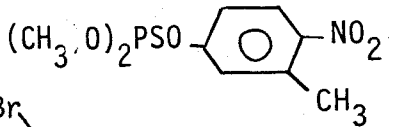
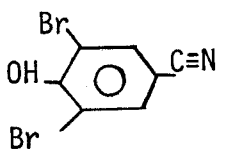
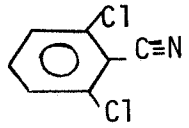
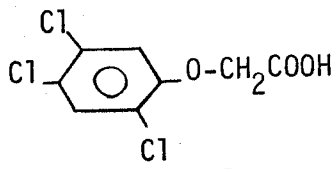
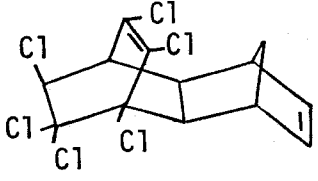
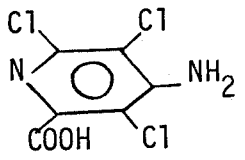
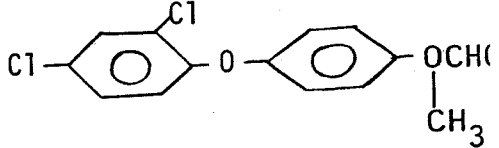


"Parathion" (o-o-di-etil-o-p-nitrofenil tiofosfato)



Etileno-tiuréia etilenotiuréia



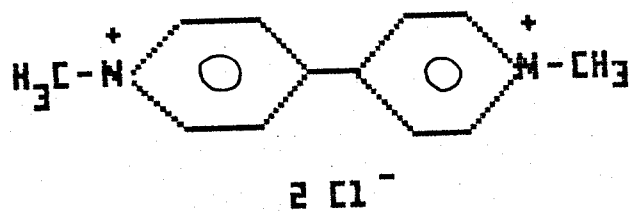
"Forato"	Co-o-dietyl-s-(cetiltio) metil) fósforo ditioato	
"Buturon"	3-(p-clorofenil 1)-1-(1-metil-2-propenil)-1-metiluréia	
"Sumition"	dimetil-3-metil-4-nitro-fenilfósforotionato	
"Bromoxinil"	3,5-dibromo-4-hidróxi-benzonitrila	
"Dicloro-benil"	2,6-diclorobenzonitrila	
"2,4,5,T"	ácido acético (2,4,5-triclorofenóxi)	
"Aldrin"	(1,2,3,4,10,10-hexacloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahidro-1,4-endo, 5,8-exo-dimetano) naftaleno	
"Picloram"	ácido picolínico (4-amino-3,5,6-tricloro)	
"Dicloro-fop-metil"	ácido propanóico (2-(4-(2,4-diclorofenóxi) fenóxi))	

3. HERBICIDAS

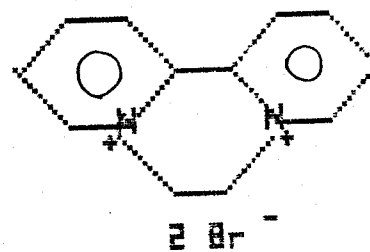
O uso extensivo de aditivos na agricultura trouxe preocupações quanto ao nível de poluição que os mesmos podem provocar no solo e na água [19]. "Diquat" e "Paraquat" são os herbicidas mais importantes do grupo dos derivados dos sais bipyridínicos descritos pela primeira vez por Brian e seus colaboradores em 1958 [80]. Eles são não seletivos, atuam como herbicidas e dessecantes, não tendo resíduos devido sua rápida inativação pela adsorção irreversível em contato com o solo. Sua natureza não residual permite imediato replantio na área aplicada e muitas etapas tradicionais em cultivos podem ser eliminadas [80].

O nome "Diquat" (dibrometo de 1,1'-etileno-2,2'-bipyridínio) e "Paraquat" (dicloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bipyridínio) referem-se aos respectivos cátions, derivados das piridinas, aos quais são atribuídos ação herbicida do sal [81]. A estrutura química dos dois herbicidas pode ser visualizada na figura 2. Ambos herbicidas são sais de amônio quartenários não voláteis e extremamente solúveis em água, sendo insolúvel em solvente orgânico apolar [80]. Apresentam elevado ponto de fusão e decompõem-se a elevadas temperaturas, no caso do "Paraquat", cuja decomposição ocorre a 573 K. São estáveis em solução ácida e neutra e menos estáveis em solução alcalina [19].

Muitos herbicidas podem ser dissipados no solo por decomposição química devido a processos de oxidação e hidrólise [19]. O "Paraquat" e "Diquat" podem ser oxidados pelo ar sob condições alcalinas e sofrem decomposição fotoquímica como resultado de sua exposição à luz [81]. Ambos são degradados nas plantas [81] e no solo podem estar sujeitos ao ataque microbiológico [80].



"Paraquat"
(A)



"Diquat"
(B)

Figura 2: Estrutura química dos herbicidas bupiridínios

(A) "Paraquat" (dicloreto de 1,1'-dimetil-4,4'-bupiridínio)

(B) "Diquat" (dibrometo de 1,1'-etileno-2,2'bupiridínio).

4. CALORIMETRIA

Nesta parte descreve-se algumas aplicações envolvendo a calorimetria, instrumentação e utilização em sistemas biológicos. Para melhor clareza, segue-se as descrições destes aspectos enfocados.

4.1- ALGUNS ASPECTOS GERAIS DE APLICAÇÕES

A simples ocorrência de um fenômeno físico, químico ou biológico está associado à liberação ou absorção de calor [87]. No sentido de se aproveitar esta propriedade, a calorimetria tem demonstrado ser uma técnica capaz de utilizar estes fenômenos em grande variedade de sistemas como em cultura pura [88-96], monitoração da qualidade de alimentos [97,98], análises de células e organismos [99-101], estudos de ligações em proteínas [102-104], troca iônica [105], estudos de hidrólise de glicosídeos [106], microbiologia de solos envolvendo estudos quantitativos e ecológicos [87, 107-111], interações entre compostos orgânicos e constituintes do solo [112], entre outros.

Existem várias descrições sobre calorímetros [113-115], cujos resultados obtidos são aplicados em análises computacionais para se interpretar a curva exponencial, inclusive em sistemas como o solo [116,117].

A aplicação da microcalorimetria em problemas microbiológicos é um exemplo da extensão de técnicas físicas em sistemas biológicos [118]. Investigações calorimétricas sobre sistemas vivos são conduzidas em alguns casos como experimentos estritamente termodinâmicos, obtendo informações dos mecanismos químicos e biológicos [119]. Em outros casos, são utilizados na monitoração de processos celulares, como instrumento analítico e cinético [119]

4.2- INSTRUMENTAÇÃO

O termo microcalorímetro indica que o instrumento tem potência térmica da ordem de microwatts, sendo usada como amostragem uma pequena quantidade de substância [119]. Grande parte dos microcalorímetros usados em trabalhos com células biológicas são isotérmicos (condução de calor), do tipo gêmeos ou diferencial. Estes contêm um vaso reacional e outro com material inativo, considerado como branco da reação, podendo ser tipo batelada ou de fluxo [119]. Uma vez que o sinal anotado é diferencial, as contribuições de interferências são canceladas. Esta é uma propriedade importante no caso de experimento conduzido por longo período de tempo. Considera-se aqui como tempo longo, aquele que envolve dias ou até meses. Este parâmetro difere frontalmente da calorimetria clássica, que busca a medida em fenômenos que ocorrem em poucos minutos.

Do ponto de vista de funcionamento, os calorímetros formam três grupos principais: adiabático, isoperibólico e isotérmico [120]. Vamos fazer considerações sobre calorímetro isotérmico que foi objeto de uso neste trabalho. Considerando calorímetros isotérmicos com comportamento ideal, o sinal da diferença de potencial (V) e da potência térmica (P) produzido no vaso através da termopilha, é dado abaixo pela equação de Tian-Calvet (1):

$$P = C_c \left(V + K \frac{\partial V}{\partial t} \right), \quad (1)$$

onde: C_c é a constante de calibração,

V é a diferença de potencial,

K é a constante de tempo do instrumento,

$\frac{\partial V}{\partial t}$ é a derivada do sinal da diferença de potencial em relação ao tempo.

Se uma potência constante é produzida, V poderá alcançar um estado estacionário, V_s . A potência no vaso é neste caso proporcional ao escoamento de calor para as vizinhanças e a equação (1) torna-se:

$$P = V_s \quad , \quad (2).$$

Para uma boa aproximação, a equação (2) pode ser aplicada a processo onde ocorre pequena mudança na potência térmica comparada com a constante de tempo. Este é um caso típico de processo envolvendo células vivas. Porém, se a mudança na potência térmica for rápida com o tempo, a curva obtida da diferença de potencial em relação ao tempo ficará distorcida da verdadeira curva cinética.

Integrando a equação (1) e (2), temos:

$$Q = \int_{t_1}^{t_2} V \, dt \quad , \quad (3)$$

$$Q = c A \quad , \quad (4).$$

A equação (4) mostra que o efeito térmico envolvido é proporcional à superfície da área da diferença de potencial em relação ao tempo [119].

4.3- CALORIMETRIA APLICADA A SISTEMAS BIOLÓGICOS.

A aplicação da calorimetria no trabalho com microrganismos tem tido um recente desenvolvimento, devido ao próprio aprimoramento da técnica, sendo notado que contribuições referentes ao crescimento microbiológico, obtido nas curvas calorimétricas, incluem fenômenos físicos, como viscosidade e sedimen-

ção e fenômenos químicos, como reações químicas. [119].

De maneira geral, todos os microrganismos podem ser estudados por microcalorimetria [118]. A atividade total pode ser detectada por esta técnica com vantagens, sendo uma delas o acompanhamento global do processo [119]. O estudo da análise cinética da curva de crescimento obtida da evolução de calor, durante o crescimento de microrganismos, é perfeitamente concordante com o ajuste matemático de uma função exponencial. No caso da degradação da glicose, a cinética reflete no aumento do número de células microbiológicas [16].

Um estudo utilizando RMN¹³C, onde foram investigadas as transformações químicas ocorridas durante a decomposição microbiológica no solo, tendo como substrato orgânico a glicose, concluiu que o material polimetileno que surgiu depois da adição do substrato era de origem microbiológica [121].

Foi relatado num resumo de alguns estudos microcalorimétricos sobre metabolismo, crescimento e toxidez dos microrganismos em culturas de batelada e fluxo [122]. Nestes estudos encontramos vários organismos estudados em substratos simples e complexos. A caracterização da atividade biológica foi feita analisando a influência de fatores como, pH, substratos, temperatura, entre outros [122]. Vários estudos calorimétricos em culturas puras provaram que a curva de crescimento de microrganismos é do tipo exponencial [88-96]. Supõem-se que, em misturas de culturas e sistemas como o solo envolvendo microrganismos, a curva obtida seja do mesmo tipo exponencial [16,109,110,116,117,122].

A identificação microbiológica de processos de crescimento por calorimetria está sujeita a restrições pois as curvas podem variar com meio de crescimento e tipos de bactérias [118]. Entretanto, foram identificadas aproximadamente 200 bactérias clinicamente significantes [118]. Cabe ressaltar aqui, que tentamos demonstrar a grande variedade de sistemas estudados por esta técnica.

II. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi explorar, do ponto de vista calorimétrico, o efeito que certos aditivos podem causar no solo, cuja resposta pode ser seguida através de reações dos microrganismos frente a certos estímulos nutrientes. Para melhorar conhecimento desta resposta, foi importante a coleta de amostras em diferentes localidades. A escolha dos aditivos teve função de acelerar ou inibir e, mesmo verificar, o efeito residual após a tentativa de completa eliminação dos microrganismos no solo. No estímulo ao crescimento de microrganismos, usou-se substâncias como fonte de carbono e nitrogênio, e então foi verificada a mudança deste comportamento com adição do cobre e herbicidas.

III. PARTE EXPERIMENTAL

Este capítulo se inicia com a obtenção da amostra de solo e posterior tratamento. É conveniente lembrar que os resultados obtidos dependem do tipo, do tratamento e preparação das amostras. O solo escolhido foi a terra roxa devido ser o mais abundante e representativo solo do Estado de São Paulo. Além disto, nesta parte descreveremos os reagentes utilizados, a preparação das soluções dos herbicidas, os métodos da caracterização do solo bem como a instrumentação, calibração e medidas calorimétricas.

1. Obtenção das Amostras.

As amostras foram obtidas do solo da Unicamp, classificado como Latossolo Roxo [123], em região parcialmente encoberta por arbustos, tomando-se o cuidado de evitar o solo que já teria sofrido terraplanagem. Foram coletadas amostras simples de 5-10cm de profundidade, desprezando-se a camada superficial, de acordo com as normas estabelecidas pelo Instituto Agrônomo de Campinas [124].

Com a finalidade de fazer comparações, foram obtidas amostras do solo no espaço livre existente entre pés de cana-de-açúcar da região de Limeira, com procedimento análogo ao descrito acima e solo sob plantação de "cerrado", do tipo Latossolo Vermelho-Amarelo [8], com e sem tratamento prévio de vinhaça, obtido no Campus de Rio Claro, Instituto de Biociências, Departamento de Ecologia.

2. Tratamento do Solo.

O solo roxo foi secado ao ar por uma semana e peneirado (0,59 mm). Este diâmetro de peneira foi escolhido a fim de se obter partículas pequenas para executar as medidas no calorímetro. É conveniente lembrar que neste procedimento deve-se levar em conta a facilidade de homogeneização do sólido com os nutrientes na água. Depois de peneirado, o solo foi guardado em sacos de polietileno a fim de permitir troca de gás carbônico (CO_2) e oxigênio (O_2), durante 3 meses. Este tempo foi necessário para se atingir o equilíbrio térmico com a temperatura ambiente e assim estocado a $(293 \pm 5)\text{K}$ [124].

O solo da região de Limeira recebeu tratamento análogo ao descrito acima e o solo sob plantação de "cerrado" depois de obtido da Unesp foi secado, peneirado, guardado em sacos de polietileno e então estocado a $(293 \pm 5)\text{K}$.

2.1 Esterilização com Ácido Clorídrico.

Parte do Latossolo Roxo foi esterilizado com ácido clorídrico (HCl) (Merck) de concentrações 12, 5 e 1 N em meio aquoso. O sólido permaneceu em contato com cada solução ácida durante 4 horas e decantado. Em seguida, foi lavado repetidas vezes até pH 7,0 e seco ao ar [87]. O produto final apresentou coloração cinza.

3. Reagentes

A glicose anidra ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$) (Hoescht do Brasil), o sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) (J. T. Baker), o nitrato de sódio (NaNO_3) (E-

cibra), o sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) (Eci-bra) e o hidrogenofosfato de potássio triidratado ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (Merck) e os antibióticos "tetraciclina" ($\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{O}_8\text{N}_2$) (Klinger) e "cloranfenicol" ($\text{C}_9\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_4$) (Carlo Erba), não receberam tratamento prévio ao serem utilizados e permaneceram guardados em dessecador. A celulose (Rhódia) foi peneirada (0,59 mm) e o sulfato de cobre (CuSO_4) utilizado foi aproveitado de estudos anteriores. Este havia sofrido um tratamento prévio onde foi triturado, secado em mufla de 673 a 683K por 8 horas, a fim de ser retirada toda a água, obtendo-se como produto final um pó de coloração branco levemente azulado.

O dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) foi triturado e secado em estufa de 413 a 423 K de 30 a 60 minutos [125].

Os herbicidas bipyridínicos "Paraquat" ($\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Cl}_2$) e "Diquat" ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{Br}_2$) foram obtidos da fábrica da ICI de Paulínia, em solução aquosa de concentração 380 g/l e 200 g/l, respectivamente.

4. Preparação das Soluções de "Paraquat" e "Diquat".

A solução de "Paraquat" (A) de concentração 38 g/l foi preparada a partir da solução estoque de 380 g/l, donde foi retirada uma alíquota de 10 ml e transferida para balão volumétrico de 100 ml e completada com água destilada até o menisco.

A partir da solução A foram retiradas as seguintes alíquotas: 3,3; 6,6; 9,9; 13,2; 16,5 e 19,0 ml, transferidas para balões volumétricos de 100 ml e completadas com água destilada (solução B). Desta maneira obtivemos as seguintes concentrações das soluções B: 1,25; 2,50; 3,74; 4,99; 6,24 e 7,18 g/l, respectivamente.

As soluções de "Diquat" foram preparadas de maneira análoga as de "Paraquat". Sendo assim, a solução C de 16 g/l foi preparada a partir da solução estoque de 200 g/l retirando-se uma alíquota de 20 ml e transferindo-a para balão de 250 ml. As alíquotas da solução C retiradas foram as seguintes: 7,9; 15,6; 23,4; 31,4; 39,2 e 46,9 ml, as quais foram transferidas para balão de 100 ml obtendo-se como solução D as seguintes concentrações: 1,26; 2,50; 3,74; 5,02; 6,27 e 7,50 g/l, respectivamente. Todas as diluições foram completadas com água destilada.

No estudo envolvendo o herbicida "Paraquat" foi transferida uma alíquota de 0,80 ml da solução B para ampola com nutrientes e 1,50g de solo. Desta maneira, foram transferidos para cada experimento calorimétrico as seguintes massas: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 5,7 mg do herbicida. Para o "Diquat" o procedimento foi análogo, onde na transferência da solução D obtivemos as seguintes massas: 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 mg.

5. Determinação do Conteúdo de Matéria Orgânica.

A determinação do conteúdo de matéria orgânica foi feita por titulação de dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) com sulfato ferroso amoniacal ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Vetec) em meio de ácido sulfúrico (H_2SO_4) e bórico (H_3BO_3) (Merck), usando difenilamina ($\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{N}$) (Merck) como indicador redox [124,125]. O ácido sulfúrico agiu neste caso como catalisador da reação de digestão do solo e o ácido bórico foi adicionado ao meio a fim de baixar o potencial formal do sistema $\text{Fe}^{+3} - \text{Fe}^{+2}$ trazendo o potencial do ponto de equivalência para coincidir com o do indicador [124,125]. Várias substâncias interferem na determinação do carbono oxidável, entre elas, cloretos, nitratos e óxidos de manganês [126].

6. Determinação da Umidade.

Esta etapa foi realizada com a perda de massa em estufa de 378 a 383 K , durante 8 horas, até massa constante [126].

7. Medidas de pH.

Foram realizadas com pHmetro E500 (Metrohm Herisau), onde foi feita a calibração com tampão de pH 4,0 e 7,0 a 298 K, em solução aquosa de KCl (Synth) 1N na proporção de 1:2,5 com eletrodo de vidro [124]. A medida de pH foi feita em solução de eletrólito forte, KCl 1N, a fim de aumentar a força iônica do meio com conseqüente diminuição da espessura da camada dielétrica, liberando assim, íons H^+ para a solução. O pH é uma medida simples feita no solo que reflete um conjunto de reações no sistema solo-solução. O método original para a relação 1:2,5 foi adotado em 1930 pela Comissão de Reação do Solo da Sociedade Internacional de Ciência do Solo sendo usada até os dias atuais [124].

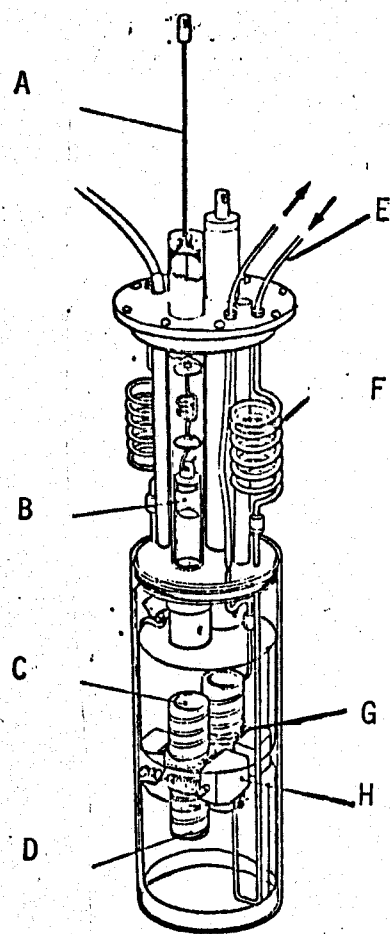
8. Parte Calorimétrica.

8.1 Instrumentação

O calorímetro isotérmico utilizado foi do tipo LKB 2277 - Thermal Activity Monitor - que contém quatro canais independentes contidos em banho termostatizado de 25 l, mantido em 1 ± 10^{-4} K em longo período de tempo, dias, se a temperatura ambiente não flutuar além de ± 1 K [119]. A faixa de trabalho do aparelho é de 278 a 353 K. Cada canal pode conter um cilindro de medidas que

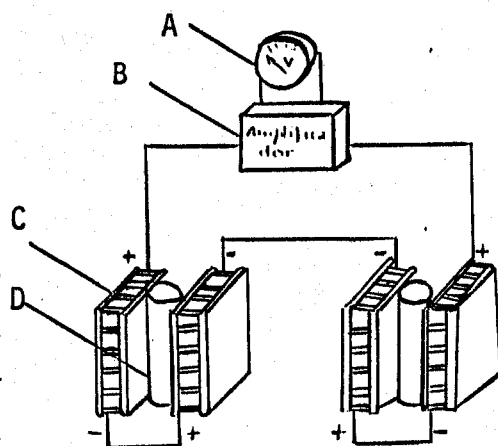
está representado na figura 3. Nesta figura 3 está indicado os elementos que constituem o cilindro de medidas, sendo que a ampola fica suspensa na haste (A), durante 3 horas para termostatização, na posição de equilíbrio (B). Após este período é abaixada até o bloco (C), onde são realizadas as medidas. Na parte inferior do bloco é encontrado um resistor (D) para calibração elétrica. Este cilindro possui tubos (E) para entrada e saída de gases, passando na entrada do sistema por uma bobina de condução de calor (F). No bloco de medidas (C) encontramos na parte lateral os elementos Peltier (G) que são sensores de fluxo de calor (semicondutores) e os blocos metálicos de transferência de calor (H). O princípio de funcionamento do aparelho (figura. 4) é a transferência de calor que se dá no vaso de reação para o ambiente termostatizado, que consiste de um bloco metálico. O fluxo de calor é percebido pelas "paredes" das termopilhas, que são semicondutores conectados em série, denominados de elementos "Peltier", que está entre o vaso calorimétrico e o bloco metálico. As termopilhas convertem o sinal elétrico, a diferença de potencial, proporcional ao escoamento de calor. A sensibilidade térmica do aparelho é da ordem de microwatts [119].

A visualização do sistema completo é dado na figura 5. Nesta figura temos o diagrama de blocos do sistema de medidas do calorímetro. Na célula calorimétrica (A) é colocado o vaso de reação, no caso a ampola de vidro, a qual está entre um par de termopilhas (B), sendo calibrada com resistência de calibração (C). Todo o sistema está envolto pelo cilindro de medidas (D). O sinal diferencial entre a amostra e o branco vai para o amplificador (E), aparecendo no visor (F), sofrendo posterior correção de ruídos (G) e anotado no registrador (H). O comando para calibração das resistências é realizado em (I) sendo possível acoplar um microcomputador externo (J) devido a existência da



- A - haste para ampola,
- B - ampola selada em posição de equilíbrio,
- C - recipiente de encaixe de ampola para medidas,
- D - resistor de calibração elétrica,
- E - tubos para escoamento de gases,
- F - bobina de condução de calor,
- G - elementos "Peltier" (termopilhas),
- H - blocos metálicos de transferência de calor.

Figura 3: Cilindro de medidas (unidade calorimétrica)



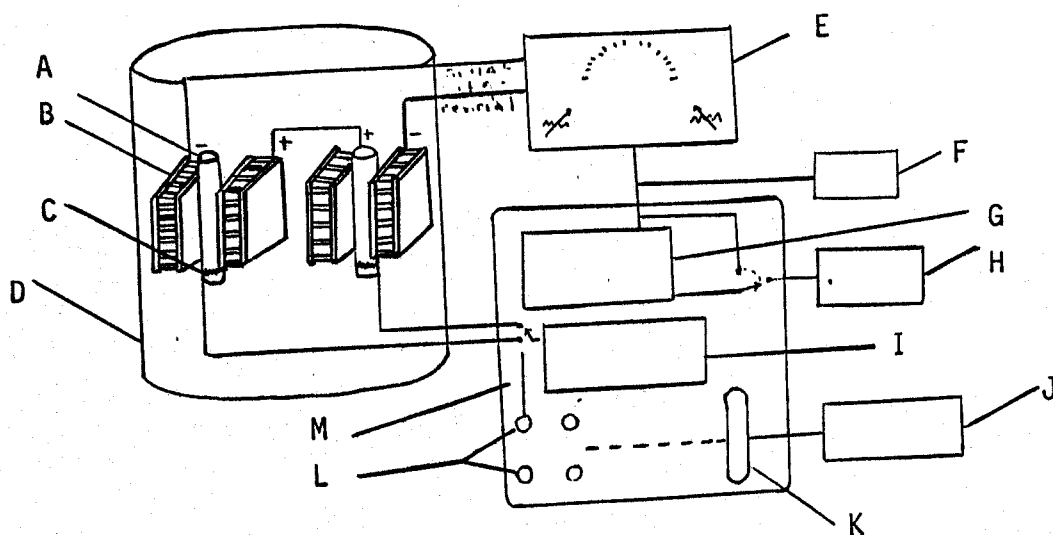
A - voltímetro,

B - amplificador,

C - termopilhas (elementos "Peltier"),

D - célula calorimétrica.

Figura 4: Princípio de transferência de calor
do calorímetro isotérmico LKB - 2277.



- A - célula calorimétrica,
- B - elementos "Peltier" (termopilhas),
- C - resistência de calibração,
- D - cilindro de medidas,
- E - amplificador,
- F - visor,
- G - correção de sinal e filtração de ruídos,
- H - registrador,
- I - comando de calibração,
- J - computador externo,
- K - interface para computador externo,
- L - entrada e saída para computador externo,
- M - unidade digital para calibração.

Figura 5: Diagrama de blocos do sistema do calorímetro isotérmico LKB - 2277.

interface (K) e entradas e saídas (L) do sistema para o computador externo. O calorímetro possui duas células calorimétricas idênticas: a célula da amostra e a célula do branco.

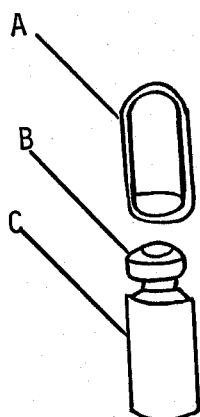
8.2 Calibração do aparelho.

A calibração realizada em todos os experimentos foi tipo estática, cuja faixa selecionada para sensibilidade térmica foi 0,3 e 1,0 W/V do registrador. A calibração ocorreu antes da amostra ser abaixada na célula calorimétrica.

8.3 Medidas Calorimétricas.

Do ponto de vista operacional, em cada ampola de vidro (figura 6) foi colocado nutrientes, 1,50 g de solo e 0,80 ml de água destilada ou solução de herbicida. Após ser fechada com tampa revestida de polietileno, para troca de CO_2 e O_2 . A mesma recebeu uma agitação para homogeneização do sólido. A referência foi preparada com 1,50 g de solo e 0,80 ml de água destilada. Antes de serem abaixadas até a célula calorimétrica, as ampolas permaneceram 3 horas no termostato em posição de equilíbrio e as medidas foram realizadas a 298K. É conveniente lembrar que a ampola, solo, nutrientes e água é considerada como o nosso sistema.

O estudo da glicose no solo precedeu todos os experimentos, sendo que cada ampola de vidro recebeu os nutrientes: X mg de glicose e X mg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, donde X = 3; 6 e 12 mg. Nesta, etapa foi realizado o teste da glicose em água para sabermos se o resultado obtido era devido a reação química entre glicose e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em meio aquoso. Assim procedendo fez-se o ensaio com os nutrientes glicose e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em 0,80ml de água destilada sem solo, tendo como referência 0,80 ml de água destilada.



A - alça para suspender ampola,

B - tampa revestida de polietileno na parte superior,

C - ampola de vidro.

Figura 6: Ampola utilizada nas medidas calorimétricas.

Constatado o efeito térmico nulo nesta operação, os experimentos seguintes consistiram em verificar a variação da temperatura quando adicionado ao solo as mesmas quantidades de glicose e sulfato de amônio acima descritas, porém com o calorímetro trabalhando a 306K.

Após esta etapa foi feito o estudo na presença do CuSO_4 no desenvolvimento de microrganismos. Nesta sequência de experimentos foi colocado na ampola como nutrientes 6 mg de glicose, 6 mg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com quantidade variável Y de CuSO_4 . As quantidades de Y foram as seguintes: 0,0; 0,77; 1,51; 2,01; 2,48; 3,04; 4,25; 5,28 e 6,19 mg, incluindo para cada experimento solo e água.

O estudo dos herbicidas bipyridínicos também envolveu procedimento análogo ao descrito acima, com quantidade variável Y = 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 5,7 mg de "Paraquat" e Y = 0,0; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 e 6,0 mg de "Diquat". Estas quantidades foram transferidas a partir das soluções previamente preparadas (4).

Para se investigar a ação de um polissacarídeo como fonte de carbono, escolheu-se para o experimento a celulose, a qual foi colocada no solo em presença de sais inorgânicos. Assim, 30 mg de celulose sofreu a adição de 1,5mg de nitrato de sódio (NaNO_3), 1,5mg de sulfato de magnésio heptaidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) e 3,0mg de hidrogenofosfato de potássio triidratado ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$). A escolha dos sais se deu a fim de desenvolver no solo microrganismos do tipo celulolíticos.

A esterilização do solo com ácido clorídrico (4.1) foi feita para se verificar como reagiria os microrganismos frente este tratamento. Desta maneira, foi colocado na ampola 6mg de glicose, 6 mg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, solo esterilizado e água. A referência neste caso foi solo esterilizado e água.

A comparação entre os vários tipos de solos foi feita com solo de cerrado como o encontrado na natureza e com o mesmo solo que recebeu a adição prévia de vinhaça e o solo de plantação de cana-de-açúcar. Os nutrientes utilizados foram sempre 6mg de glicose e 6mg de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Os estudos envolvendo a estocagem levou em consideração os dados obtidos do estudo da glicose no solo durante um ano e meio a 298K, aproximadamente.

A última etapa deste trabalho envolveu o teste dos antibióticos bactericidas do tipo "tetraciclina" e "cloranfenicol". Neste caso foi adicionado em 1,50g de solo com 6 mg de glicose e 6mg de sulfato de amônio, 6,10mg de "cloranfenicol" ou 6,25mg de "tetraciclina" em 0,80 ml de água. Esta etapa teve por finalidade saber se um reagente com função biológica causaria interferência na curva calorimétrica. É bom lembrar que em todos os casos foi utilizado água destilada, para evitar qualquer interferência nos resultados.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este estudo procurou dar uma contribuição ao conhecimento do solo brasileiro principalmente no que tange ao acompanhamento da ação de microrganismos através de reações calorimétricas, uma vez que são poucos os laboratórios no mundo que se dedicam a esta pesquisa. Por outro lado, este estudo tem gerado algumas publicações envolvendo solos de clima temperado. Desta maneira consideramos este trabalho como de relevante importância para que se possa ter conhecimento da dinâmica de solos tropicais.

Neste capítulo serão apresentados os métodos dos cálculos empregados na determinação do efeito térmico, os resultados obtidos, bem como alguma discussão sobre os mesmos.

É conveniente iniciar este capítulo com os cálculos do efeito térmico, a fim de saber como foram obtidos os resultados. Assim, temos abaixo, a determinação do efeito térmico, obtido da curva exponencial de crescimento de microrganismos. Nestes cálculos desejamos saber qual o efeito térmico em um cm^2 do processo. Estes foram feitos a partir de dados obtidos da calibração do aparelho e da área resultante na curva exponencial.

Os cálculos neste trabalho foram feitos baseando-se na equação (4) e que a quantidade de 6mg de glicose tenha sido completamente degradada no solo. Para tornar mais claro, segue-se uma ilustração neste caso hipotético, de um processo térmico utilizando 6mg de glicose, que resultou na obtenção de uma área (A) $22,5\text{cm}^2$, onde foi empregado uma potência de calibração (Pc) 1000 μW . Como normalmente a largura do papel no registrador é 20cm e admitindo a velocidade ajustada no papel do registrador (v) a 0,1mm/min, queremos saber qual o efeito térmico por mol de glicose. Inicia-se assim, calculando a potência de calibração correspondente a 1cm linear, obtendo em 1 cm o corresponde a 50 μW .

Foi medida a velocidade (v) de 0,1mm/min, o que equivale a dizer 0,01cm/60s. Então, no percurso de 1,0cm, têm-se o tempo correspondente a 6000s. Na relação com a área de 1 cm² obtém-se 0,3J. Como a área admitida foi 22,5cm², logo o efeito térmico por mol de glicose, ou seja, 180 g corresponde a 204 kJ/mol. Estes cálculos podem ser melhor visualizados na figura 7.

O solo em estudo, denominado Latossolo Roxo foi caracterizado por métodos físicos, cujos resultados são apresentados a seguir: pH (5,10); matéria orgânica (3,5%) e a umidade variou de (1,3 a 3,0)%. Estes resultados refletem um solo ácido e rico em matéria orgânica.

Com a finalidade de verificar o comportamento do solo com o tempo que o mesmo esteve estocado, foram realizados experimentos, cujos resultados estão na tabela abaixo:

TABELA 7: Influência do tempo de estocagem a (293±5)K sob a curva exponencial, obtida pela adição de glicose no solo a 298K.

Mês/Ano	Jul/89	Jan/90	Fev-Abr/90	Jun/90	Nov/90
Tp (h)	35,2	38,3	40,7±0,6	39,7	41,1
A (cm ²)	22,5	52,7	38,3±3,0	32,5	32,9
Q(kJ/mol)	204±8	225±9	249±21	291±3	297±3

Os resultados da tabela 7 mostram um aumento no tempo de resposta e no efeito térmico ao longo de aproximadamente um

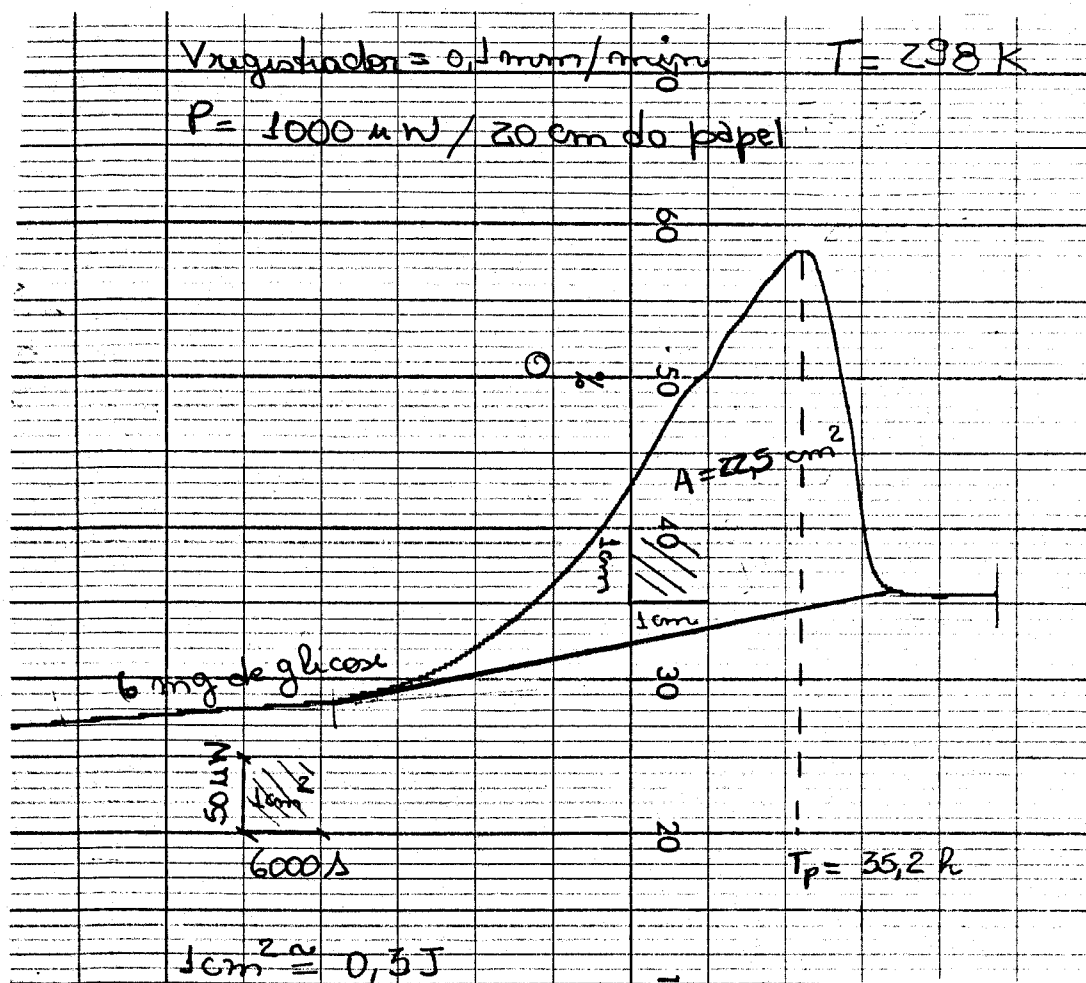


Figura 7: Esquema do cálculo executado neste estudo, envolvendo a curva exponencial de desenvolvimento de microrganismos.

ano e meio. Nota-se que a estocagem provocou um tempo de resposta cada vez mais lento dos microrganismos no solo (figura 8). O valor obtido de Fev-Abr/90, refere-se a uma média entre três medidas. Foi feito este cálculo a fim de facilitar a visualização dos resultados. O aumento aproximado de 31% de Jul/89 a Nov/90 no efeito térmico pode ter sido consequência do processo de estocagem com baixa umidade. Este procedimento favorece a permanência de microrganismos que possuem mecanismos de resistência a baixa umidade no solo (1,3-3,0)%. No caso pode ser microrganismos que são capazes de formar esporos. Assim, devido esta variação nos resultados obtidos podemos dizer que a estocagem teve influência sobre o sistema analisado. É conveniente lembrar que os desvios aqui apresentados são referentes a área obtida da curva calorimétrica através de integrador manual.

A etapa para testar a presença de microrganismos no solo foi feita através do tratamento com ácido clorídrico. Este procedimento levou a um efeito térmico muito pequeno, mostrando ser praticamente constante com o tempo, não se observando então, a curva exponencial de crescimento. Na tabela 8 podemos visualizar o resultado obtido com dados de estudo anterior.

TABELA 8: Comparações entre tipos de solos e métodos de esterilização.

Tipo de solo	Tipo de Esterilização	Efeito Térmico	Referência
		(μ W/g de solo seco)	
Composto	2 autoclavagens	2	[87]
Mor	4 autoclavagens	5	[87]
Roxo	ácido clorídrico	27	Este trabalho

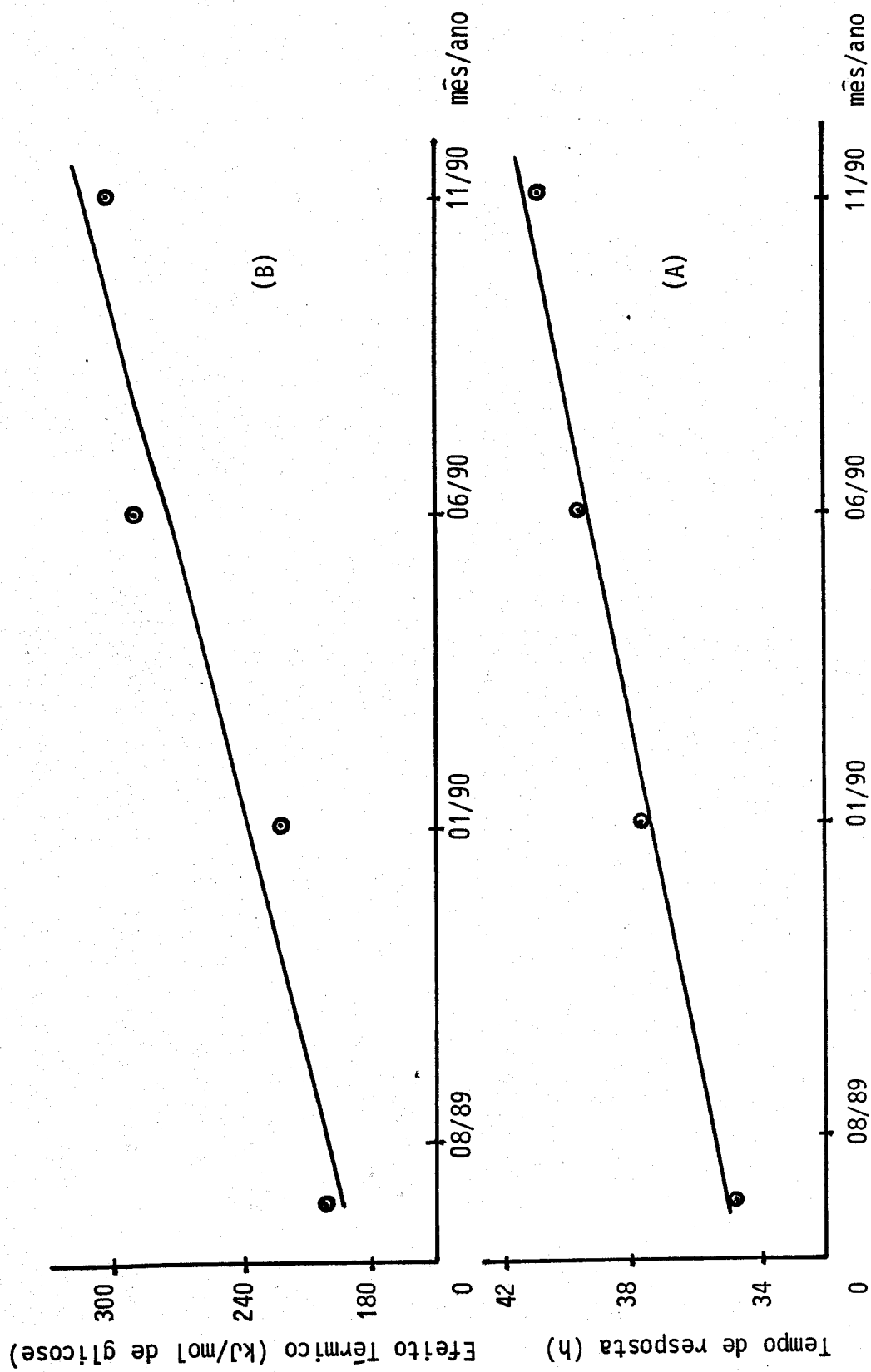


Figura 8: Efeito do tempo de estocagem sobre os microrganismos do solo desenvolvidos com glicose, a $(293 \pm 5)K$, em relação ao (A) Tempo de resposta (h) e (B) Efeito Térmico (kJ/mol de glicose).

Esta tabela 8 demonstra o baixo efeito térmico obtido em diferentes tipos de solos, quanto estes sofrem esterilização em autoclaves e no tratamento com ácido clorídrico. Observamos também que no processo de autoclavagem os valores do efeito térmico são menores, demonstrando ser um método de esterilização bastante eficiente. Cabe ressaltar aqui, que a autoclavagem é um método de esterilização pelo calor através de vapor superaquecido e pressão superior a atmosférica [14]. É bom lembrar que a esterilização em nosso sistema, refere-se a perda do efeito químico na constituição do solo.

Após esta etapa foi feito o estudo da degradação da glicose no solo. Assim, estudou-se a variação da quantidade de glicose com a temperatura. Os resultados obtidos estão listados na tabela 9.

TABELA 9: Efeito da concentração da massa de glicose (m) sob o máximo do pico de tempo (Tp) donde foi obtida a área (A) e calculado o Efeito Térmico (Q) por mol de glicose a 298 e 306K.

m (mg)	Tp (h)	298 K		Tp (h)	306K	
		A (cm ²)	Q (kJ/mol)		A (cm ²)	Q (kJ/mol)
3	29,2±1,3	11,5±0,3	105±3	17,3±0,7	14,2±0,3	129±3
6	35,2±1,4	22,5±0,9	204±8	19,4±0,8	29,9±1,2	270±11
12	43,8±1,8	47,1±1,9	423±17	23,8±1,0	64,5±2,6	579±23

Os resultados da tabela 9 mostram claramente que o aumento da concentração de glicose acarretou maior troca de calor e deslocamento no tempo de resposta. Este resultado foi verificado em ambas temperaturas. A variação da temperatura levou a um deslocamento do máximo do pico de tempo e alteração na área sob a curva (figura 9). Em 306K tivemos maiores valores para o efeito térmico (figura 10(a)) e tempo de resposta mais rápido (figura 10(b)). Assim podemos dizer que a temperatura de 306K foi mais favorável para o desenvolvimento de microrganismos. Talvez, para conhecimento da temperatura ótima do sistema, fosse necessário realizar uma varredura na faixa de 293 a 313K, aproximadamente.

O aumento na quantidade de glicose acarretou elevação proporcional no efeito térmico, o qual está intimamente relacionado com a degradação da glicose (figura 11). Os desvios aqui apresentados de aproximadamente 4 % representam uma média entre três medidas realizadas, demonstrando a reprodutibilidade do experimento. Nos experimentos envolvendo a glicose, a fonte de nitrogênio fornecida ao meio provém do sulfato de amônio.

É possível que trabalhando com valores acima de 12mg de glicose, encontremos um valor limite de concentração no sistema, já que o mesmo não apresentou saturação em 12 mg. É bom ressaltar que o máximo do pico da curva exponencial é considerado como o tempo de resposta obtido dos microrganismos no solo em presença de nutrientes.

No teste da glicose em água, sem a participação do solo não foi observada a curva exponencial de crescimento (figura 9).

Com o conhecimento da degradação da glicose, a etapa seguinte consistiu no estudo da influência do sulfato de cobre na curva exponencial de desenvolvimento de microrganismos. Esta etapa foi acompanhada através da cinética de degradação da glicose

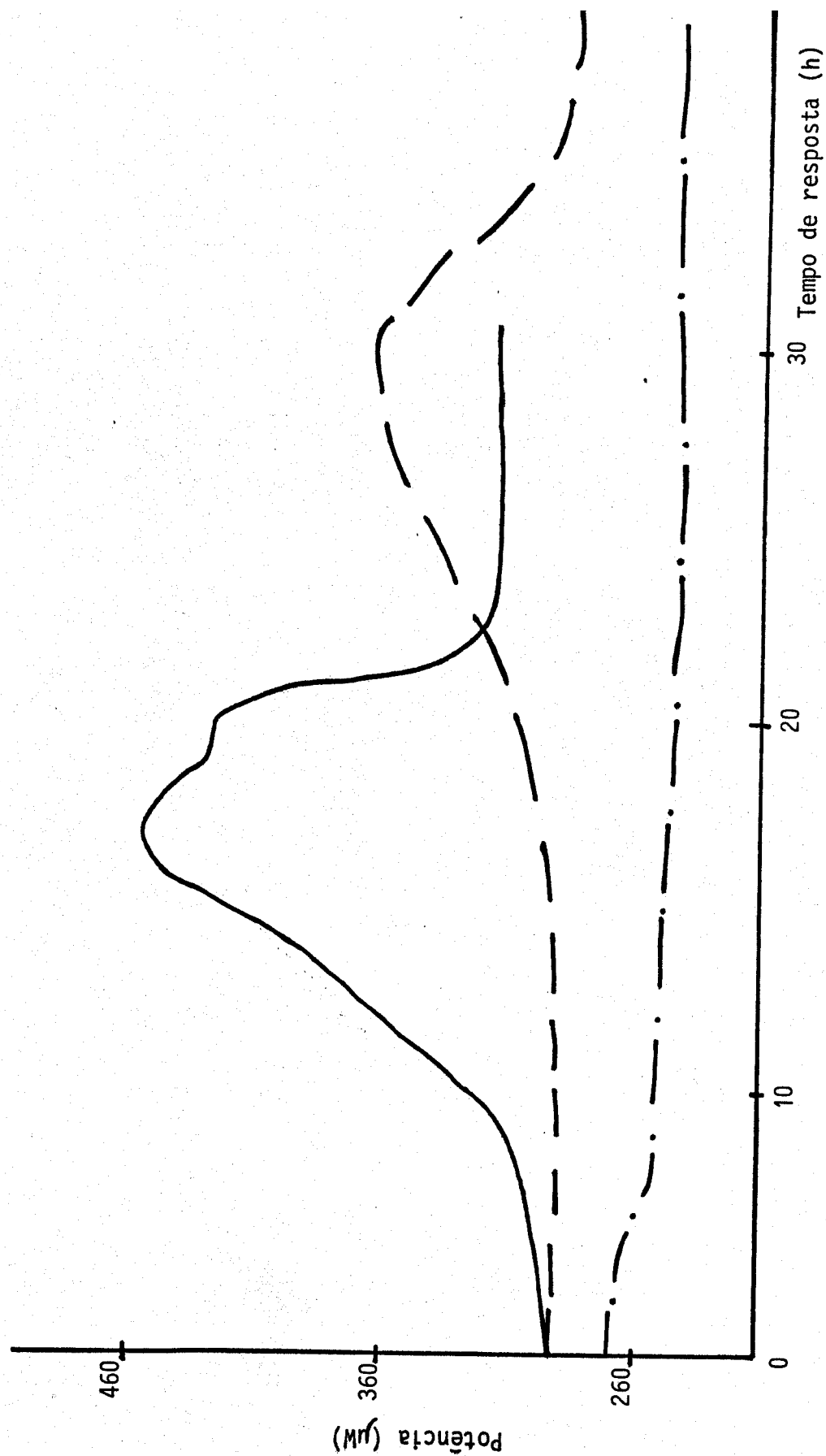


Figura 9: Degradação microbiológica da glicose a 298K (---) e 306K (-) no solo e Teste da glicose em água sem solo a 298K (-.-).

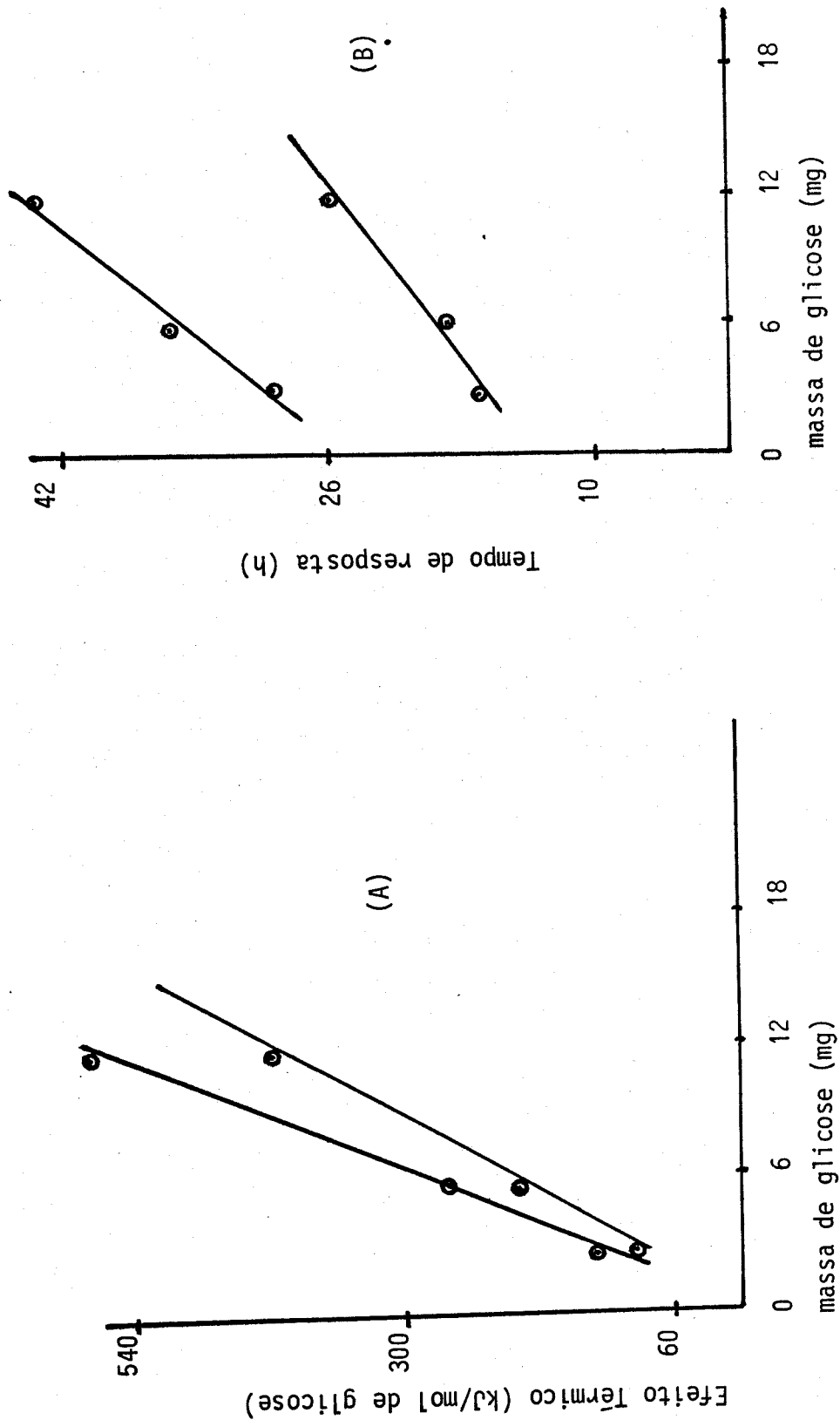


Figura 10: Resultados obtidos da degradação da glicose a 298K e 306K:

(A) Efeito Térmico (kJ/mol de glicose) e (B) Tempo de resposta (h) obtidos do máximo do pico da curva exponencial.

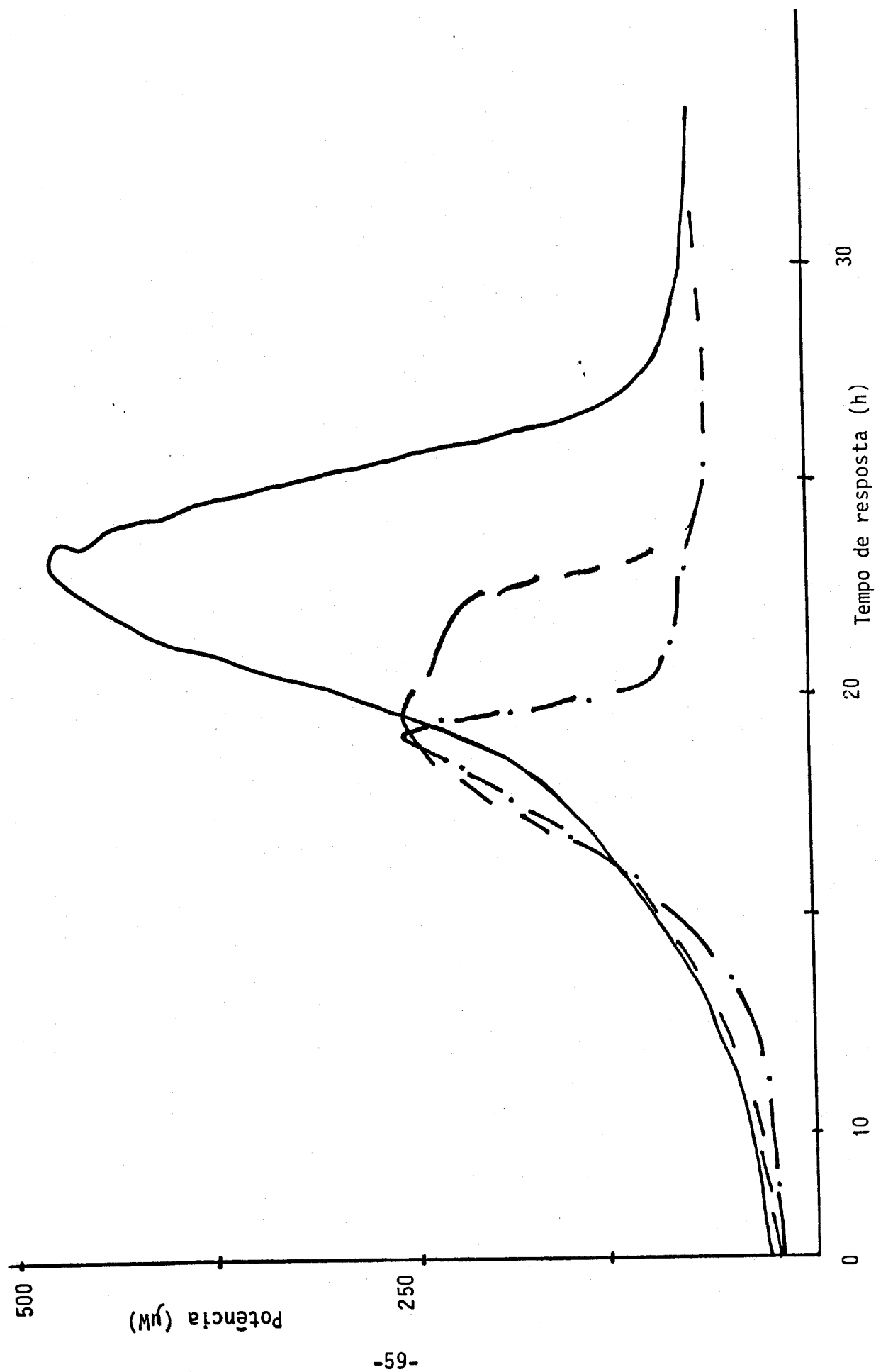


Figura 11: Degradação microbiológica da glicose a 306K com: 0,2 (-.-.), 0,4 (---) e 0,8 (-)% de glicose.

na presença do sal, notando-se que a mudança no formato e deslocamento do pico de tempo, mostra que existe uma proporcionalidade direta na quantidade de CuSO_4 adicionado ao meio [16]. Assim, baseando-se em estudo anterior sobre a toxidez de alguns metais no solo [16], onde a degradação foi ajustada a uma equação cinética, procurou-se verificar este procedimento com a equação abaixo:

$$\frac{\partial i}{\partial \text{Tp}(i)} = C \cdot i^n, \quad (5)$$

onde: $\text{Tp}(i) = \text{Tp}(0) + \frac{1}{C} i \exp(n), \quad (6)$

sendo que: i é a concentração de CuSO_4 (mg),
 $\text{Tp}(i)$ é o máximo do pico de tempo (h),
 $\text{Tp}(0)$ é o máximo do pico de tempo (h) sem CuSO_4
 C é a constante do sistema estudado ($\text{mg} \cdot \text{h}^{-1}$) e
 n é a constante adimensional do sistema relacionada com o grau da equação.

É conveniente lembrar que esta equação (6) tem por objetivo linearizar os dados i e $\text{Tp}(i)$, obtidos experimentalmente. No caso em pauta, a equação acima representa a variação do tempo de resposta do sistema constituído pelo solo, glicose e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ em função da quantidade de sulfato de cobre adicionado ao meio.

O parâmetro $\text{Tp}(0)$ corresponde ao tempo máximo de resposta que pode ser alcançado sem o fornecimento do sal. O $\text{Tp}(i) \rightarrow \infty$ indica uma concentração na qual o metabolismo sofreu máxima alteração e a constante C ($n=1$) representa a inclinação da reta e está relacionada com a intensidade do efeito inibidor, esperando que quanto maior for a inclinação, maior será o efeito.

Se considerarmos a equação (6), podemos calcular os seguintes parâmetros:

$$i_d \text{ para } Tp(i) = Tp(i_d) = 2 \cdot Tp(0) , \quad (7)$$

$$i_d = (C \cdot Tp(0)) \exp (1./n) , \quad (8)$$

$$\text{e } i_1 \text{ para } Tp(i) - Tp(0) = Tp(i_1) = 1 \text{ h} , \quad (9)$$

$$i_1 = C \exp (1./n) , \quad (10)$$

Estes parâmetros i_d e i_1 refletem a mudança nas curvas exponenciais, em solos com aditivos, podendo representar um valor aproximado do efeito inibidor destes poluentes [16]. É bom ressaltar que os valores de i_d e i_1 podem estabelecer comparações em sistemas, onde seja adicionado componentes diferentes. Os resultados obtidos neste estudo cinético estão listados na tabela 10.

TABELA 10: Influência da concentração i de CuSO_4 (mg) sobre as curvas de crescimento obtidas pela adição de glicose no solo a 298 K.

i (mg)	$Tp(i)$ (h)	A (cm ²)	Q (kJ/mol de glicose)
0,00	38,2	23,9±0,5	216±4
0,77	40,9	17,8±0,4	171±3
1,51	42,6	17,9±0,4	159±3
2,01	43,0	14,8±0,3	135±3
2,48	—	13,0±0,3	117±2
3,04	—	13,9±0,3	126±2
4,25	—	9,6±0,2	87±2
5,28	—	17,6±0,4	48±1
6,19	—	—	—

Os resultados da tabela 10 mostram que o aumento na quantidade de CuSO_4 retardou o tempo de resposta com conseqüente diminuição no efeito térmico. Na amostra contendo 2,48mg não foi obtido o tempo de resposta devido ao grande achatamento no máximo do pico de tempo da curva exponencial de crescimento. Tal efeito se manifesta de maneira mais acentuada em concentrações acima deste valor, de tal maneira que em 6,19mg já não é observada a curva exponencial. Em 5,28 mg a sensibilidade utilizada no aparelho foi de 0,3 W/V do registrador enquanto que nos demais experimentos foi de 1,0 W/V do registrador. Os desvios aqui apresentados nas medidas de aproximadamente 2%, referem-se ao valor da área medida na curva exponencial de crescimento, obtida pelo integrador manual. Em curvas bastante alteradas, afetadas pela presença de CuSO_4 , a área considerada foi a medida traçando-se a reta entre dois estados estacionários, supostamente estado inicial e final do processo. O aumento de CuSO_4 no sistema provocou um deslocamento no máximo do pico de tempo, um alongamento e distorção da curva (figura 12), demonstrando um efeito inibidor pronunciado no desenvolvimento de microrganismos no solo (figura 13). Porém, estes resultados demonstram também grande tolerância dos microrganismos, pois em 5,28mg de CuSO_4 adicionado ao meio ainda conseguimos medir a área sob a curva.

A partir dos dados da tabela 10 e da equação (6) foram calculados os valores de $T_p(0)$, C , n , i_d e i_1 que são: 38,6; 0,41; 1,0; 15,9 e 0,41 respectivamente. O valor de $n=1$ demonstrou que na faixa de concentração de 0 a 2mg, que o sistema comportou-se de modo linear (figura 13(a)). Os valores de i_1 e i_d refletem um efeito inibidor do metal na microbiota do solo depois de 1h e do dobro do tempo após atingido o máximo do pico de tempo, respectivamente.

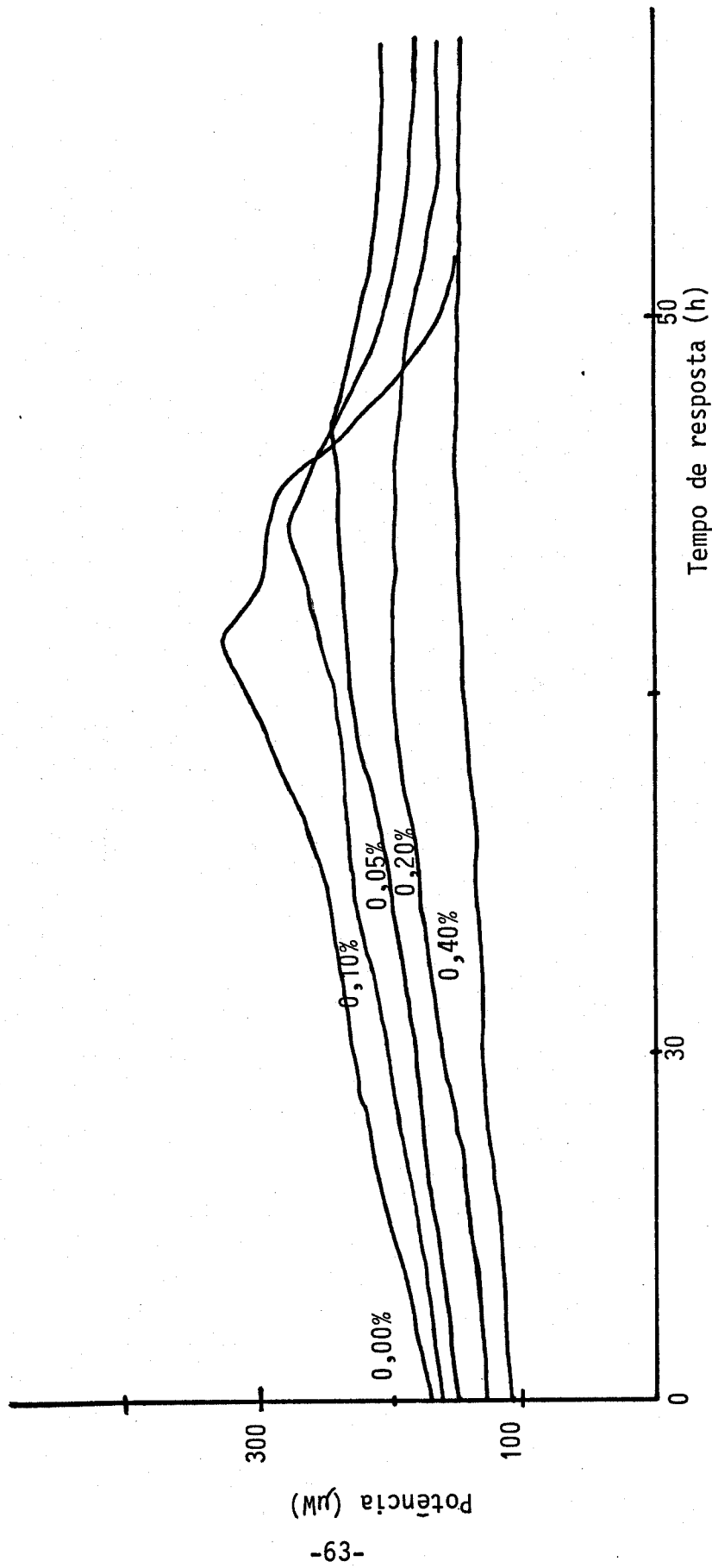


Figura 12: Degradação microbiológica da glicose em presença de CuSO_4 a 298K com 0,0; 0,05; 0,10; 0,20 e 0,40% do sal.

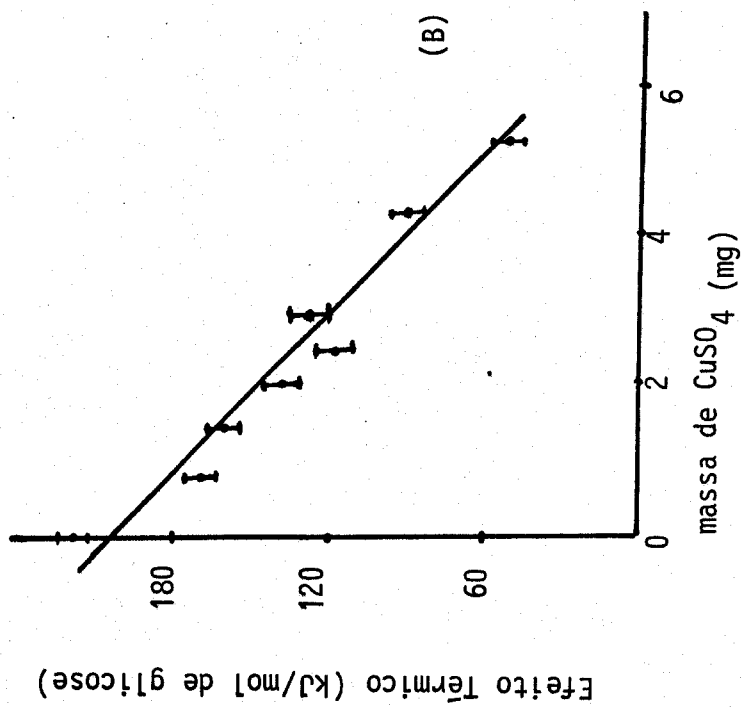
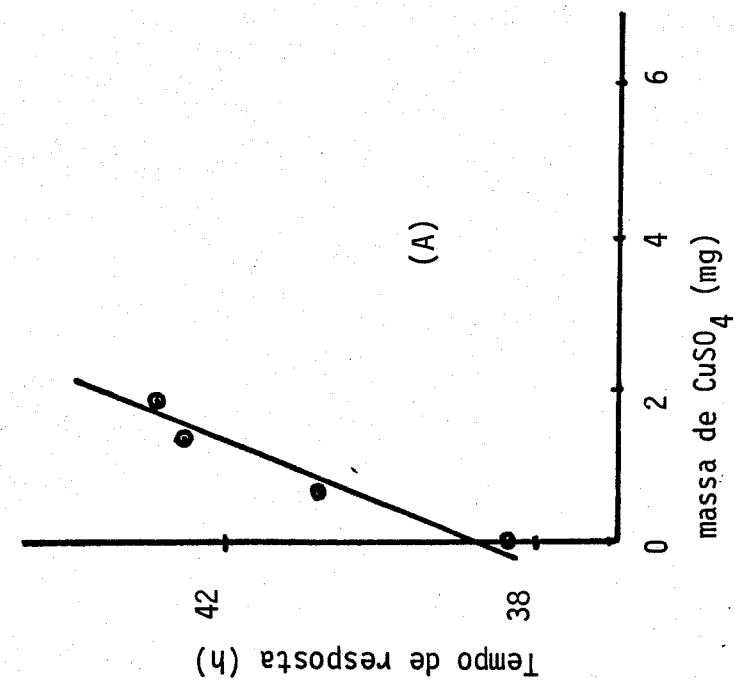


Figura 13: Resultados da degradação microbiológica da glicose em presença de CuSO_4 a 298K:

(A) Tempo de resposta (h) e (B) Efeito Térmico (kJ/mol de glicose).

Dos experimentos envolvendo solo sob plantação de "cerrado" com e sem tratamento de vinhaça, terra roxa e solo de plantação de cana-de-açúcar, verificamos que a adição de glicose levou ao desenvolvimento da microbiota apenas nos dois últimos e a curva exponencial não foi observada para o solo sob plantação de "cerrado". O efeito térmico foi bem maior para o solo roxo ((204 ± 8) kJ/mol de glicose e $T_p = (35,2 \pm 1,4)$ h) do que em relação ao solo de plantação de cana-de-açúcar ($(4,8 \pm 0,2)$ kJ/mol de glicose e $T_p = 84,0$ h). Conclui-se, deste modo, que temos populações ou variedade de microrganismos muito maior para o solo roxo.

Realizamos também o estudo envolvendo os herbicidas bipyridínicos "Paraquat" e "Diquat" no solo e observamos sua influência no metabolismo de microrganismos, cujos resultados estão na tabelas 11 e 12 respectivamente.

TABELA 11: Efeito provocado pela massa de "Paraquat" (m) sob a microbiota do solo desenvolvida com glicose a 298K.

Nutrientes %	m ("Paraquat") (mg)	T_p (h)	A (cm^2)	Q (kJ/mol de glicose)
(glicose)				
0,0	1,0	00,0	00,0	000
0,4	0,0	39,7	$32,5 \pm 0,5$	291 ± 3
0,4	1,0	41,7	$32,6 \pm 0,5$	294 ± 3
0,4	2,0	43,9	$30,8 \pm 0,4$	276 ± 3
0,4	3,0	50,8	$25,8 \pm 0,4$	231 ± 3
0,4	4,0	51,6	$22,6 \pm 0,3$	204 ± 3
0,4	5,0	57,7	$18,1 \pm 0,3$	162 ± 3
0,4	5,7	62,0	$17,5 \pm 0,3$	159 ± 3

Os resultados da tabela 11 mostram que o fator determinante para o aparecimento da curva exponencial é a presença de nutrientes, pois sem glicose não é observada a curva exponencial. O efeito inibidor inicia-se a partir de 1,0mg, sendo que em 5,0mg já observamos uma grande distorção da curva exponencial (figura 14). A presença de nutrientes no sistema sem "Paraquat" demonstrou ser o melhor valor no tempo de resposta e no efeito térmico. A adição de "Paraquat" levou ao aumento no tempo de resposta e diminuição no efeito térmico que pode ser visualizado na figura 15.

Os resultados obtidos envolvendo o herbicida "Diquat" no solo com glicose, são mostrados na tabela abaixo:

TABELA 12: Influência da concentração de "Diquat" (m) no desenvolvimento de microrganismos no solo com glicose a 298K.

glicose %	m (mg)	Tp (h)	A (cm ²)	Q (kJ/mol de glicose)
0,0	3,0	00,0	00,0	000
0,4	0,0	41,1	32,9±0,3	297±3
0,4	1,0	40,8	29,9±0,3	270±3
0,4	2,0	41,5	27,4±0,3	246±3
0,4	4,0	44,3	21,1±0,2	189±3
0,4	5,0	45,0	17,5±0,2	156±3
0,4	6,0	55,0	10,0±0,1	90±3

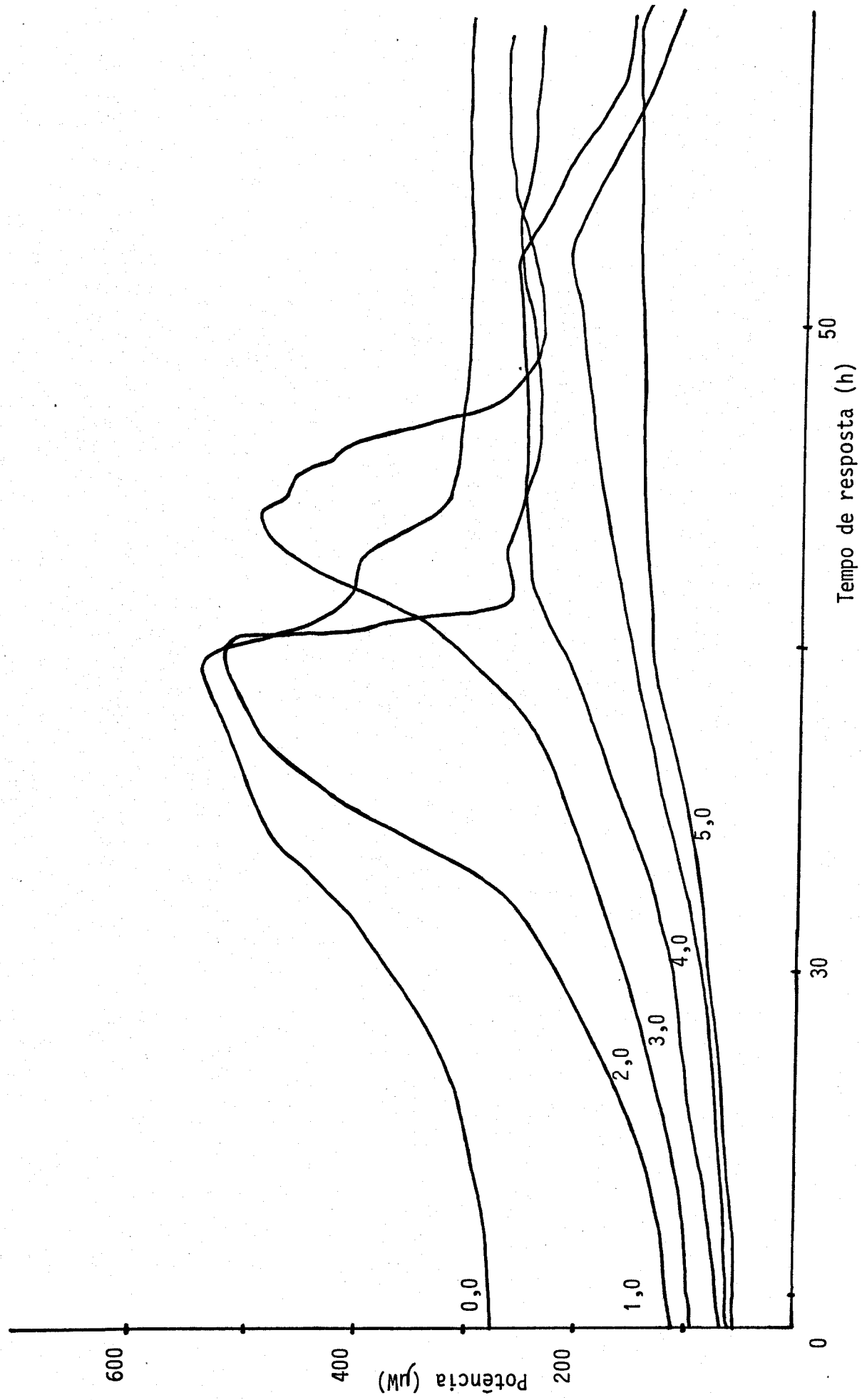


Figura 14: Curva exponencial de crescimento de microorganismos no solo em presença do herbicida

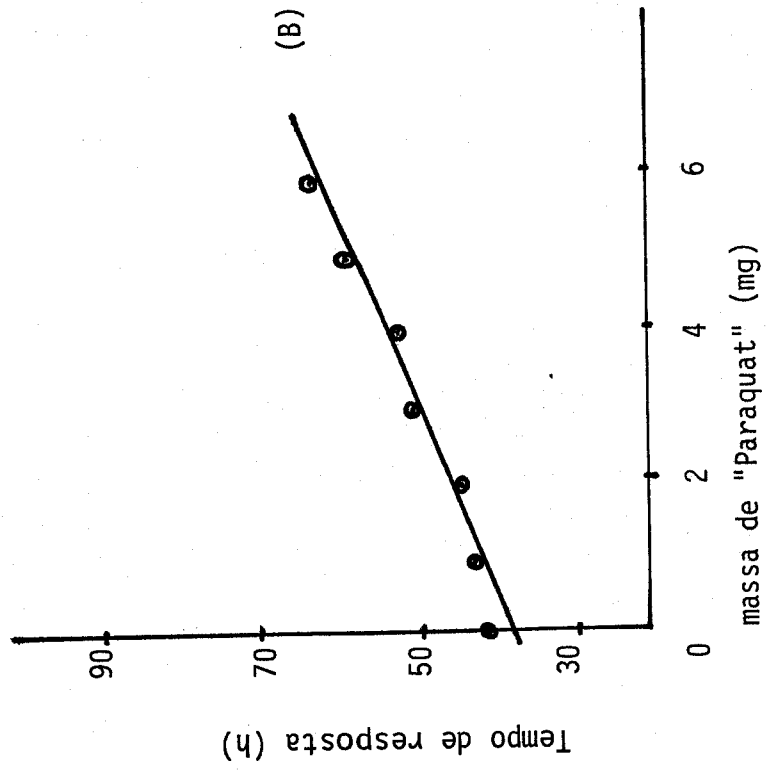
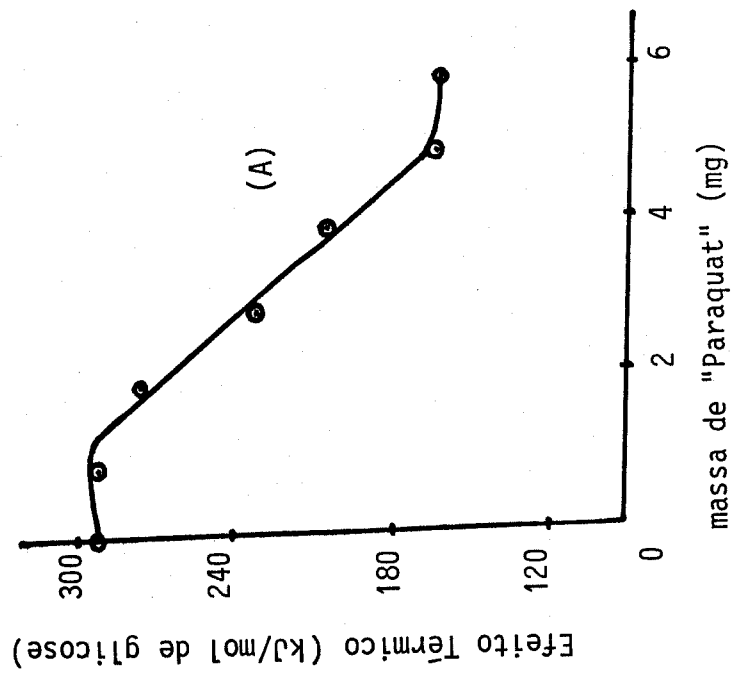


Figura 15: Resultados do efeito provocado pela presença do herbicida bupiridínio "Paraquat" na degradação microbiológica da glicose no solo a 298K:
 (A) Efeito Térmico (kJ/mol de glicose) e (B) Tempo de resposta (h).

A tabela 12 nos mostra que o herbicida bupiridínio "Di-
quat" causou um aumento exponencial no tempo de resposta e dimi-
nuição no efeito térmico a partir de 1,0mg (figura 16). A distor-
ção provocada na curva exponencial de crescimento dos microrga-
nismos pode ser visualizada na figura 17. Os desvios apresenta-
dos nas tabelas 11 e 12 fazem referência ao valor da área obtida
da curva exponencial em integrador manual. É bom lembrar que am-
bos os herbicidas pertencem a mesma classe, ou seja, ambos são
herbicidas bupiridínios, e demonstraram efeito inibidor semelhan-
te em termos de efeito térmico (figura 15(a) e figura 16(b)).
Porém em termos de tempo de resposta, ocorreu diferença signifi-
cativa, onde o "Paraquat" apresenta linearidade nos resultados
(figura 15(b)) e o "Diquat" uma curva exponencial (figura 16(a)).
Talvez estes resultados indiquem efeitos inibidores diferentes
na degradação da glicose no solo.

A partir da equação (6) com $n = 1$ e os dados da tabelas
10, 11 e 12 foram calculados os valores $T_p(0)$, C , i_1 e i_d para
o CuSO_4 , "Paraquat" e "Diquat" que estão listados na tabela 13.

TABELA 13: Valores obtidos dos dados experimentais da massa i (mg)
e do Tempo de resposta, $T_p(i)(h)$, para o metal cobre
e os herbicidas bupiridínios.

Aditivo	$T_p(0)(h)$	$C(\text{mg h}^{-1})$	$i_d(\text{mg})$	$i_1(\text{mg})$
CuSO_4	38,6	0,41	15,9	0,41
"Paraquat"	38,1	0,26	9,7	0,26
"Diquat"	38,9	0,53	20,6	0,53

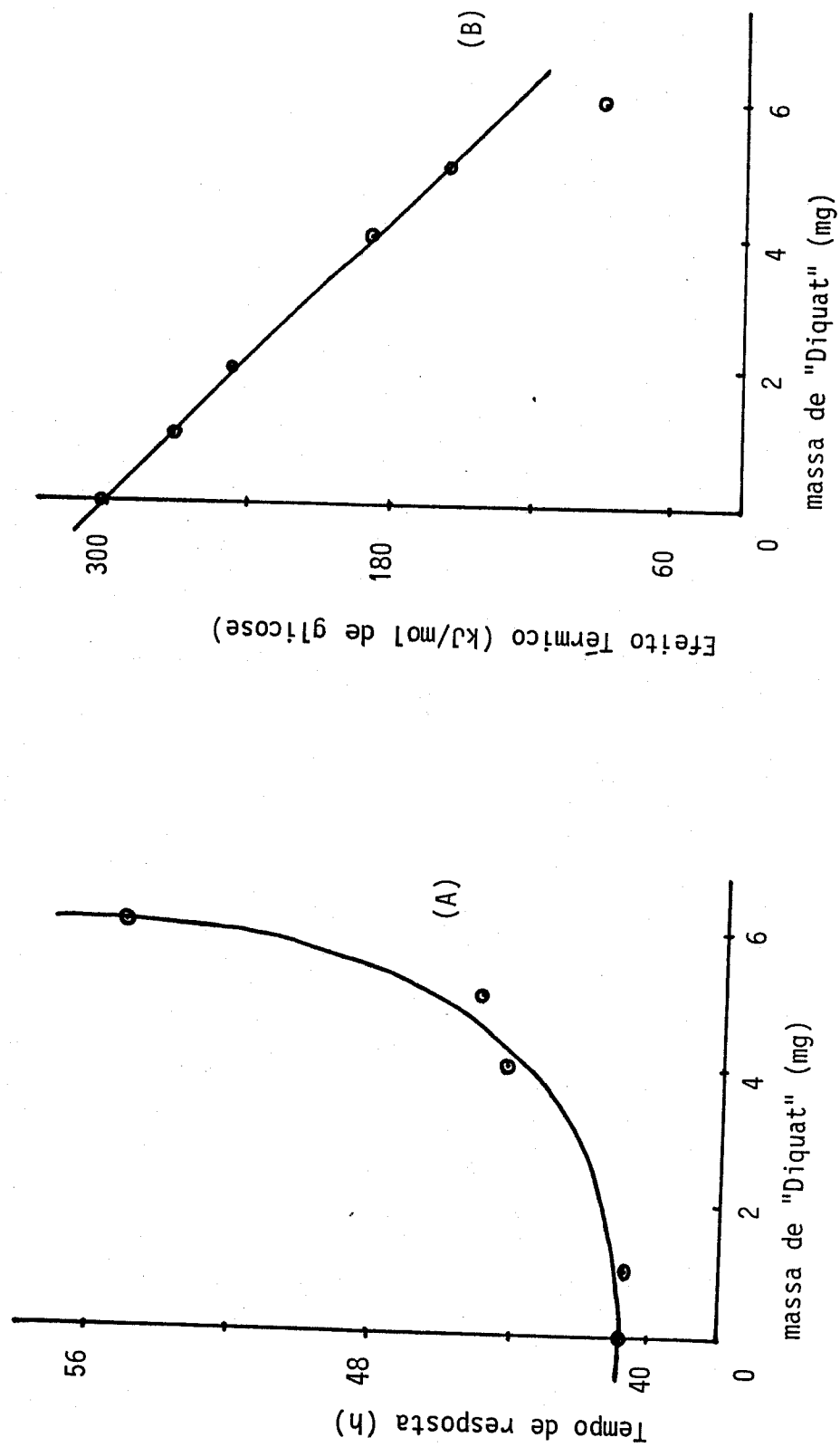


Figura 16: Resultados da degradação microbiológica da glicose no solo em presença do herbicida bupiridônio "Diquat" a 298K: (A) Tempo de resposta (h) e (B) Efeito Térmico (kJ/mol de glicose).

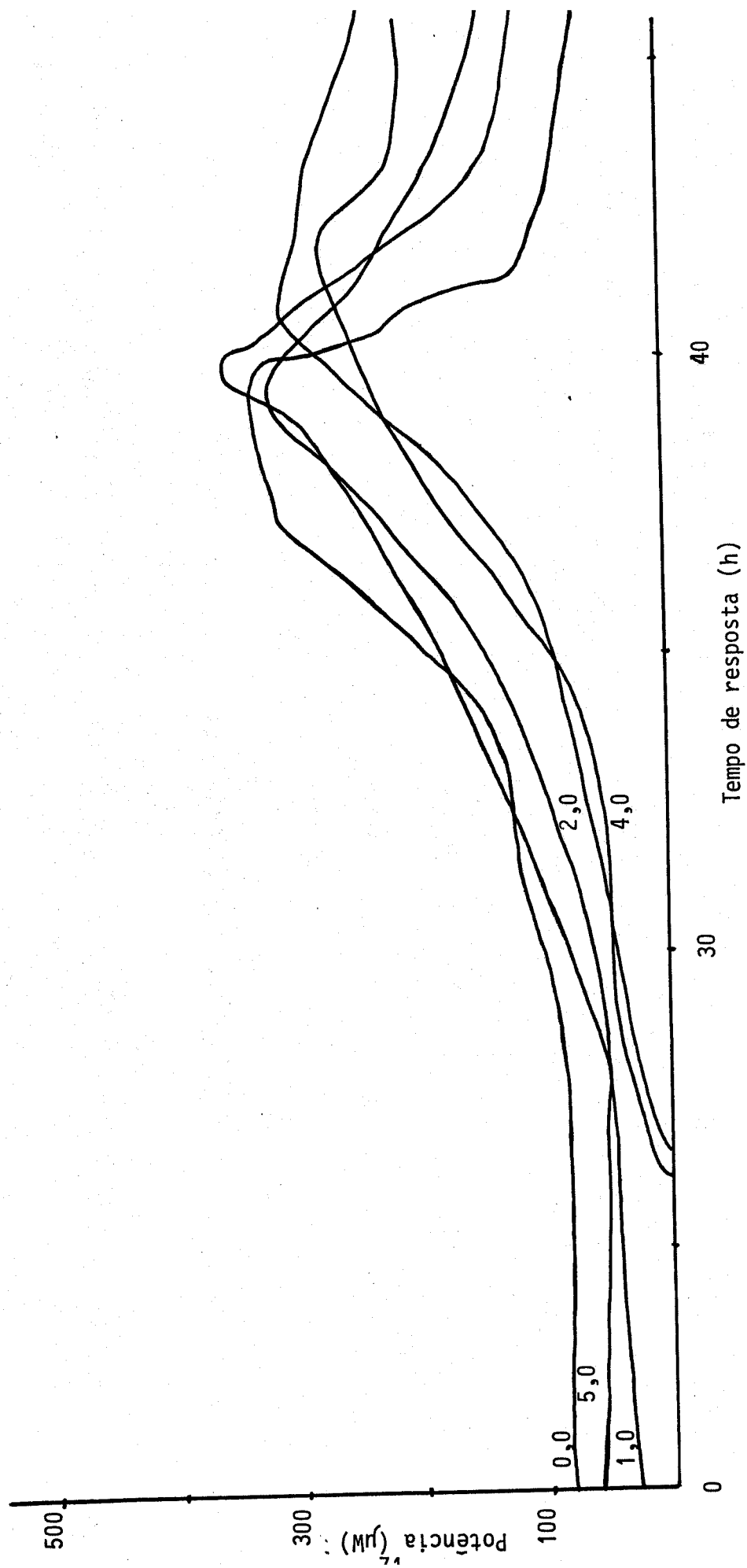


Figura 17: Curva exponencial de crescimento de microrganismos com glicose no solo em presença do herbicida bipiridiflório "Diquat" a 298K com massa: 0,0; 1,0; 2,0; 4,0 e 5,0 mg.

Na tabela 13 verificamos que os valores de $Tp(0)$ são próximos para os três aditivos. Uma vez que $Tp(0)$ está relacionado com o tempo de resposta sem aditivo, podemos dizer que embora os experimentos não tenham sido feitos ao mesmo tempo, a comparação entre os resultados é possível. Quanto ao valor de i_1 e i_d verificamos que são maiores para o $CuSO_4$, demonstrando assim um efeito inibidor mais pronunciado em relação ao "Paraquat". Isto pois, os parâmetros i_d e i_1 refletem uma mudança nas curvas exponenciais, em solos na presença de aditivos. Sendo que para maiores valores de i_d e i_1 demonstram mudanças mais pronunciadas nas curvas calorimétricas, mostrando assim, maior efeito inibidor [16]. É possível que a presença do nitrogênio no "Paraquat" e "Diquat" tenha influenciado nos resultados obtidos, gerando um efeito inibidor menos acentuado sobre a microbiota do solo.

A última etapa deste trabalho envolveu o teste com os antibióticos "cloranfenicol" e "tetraciclina" no solo com glicose. A adição do bactericida "tetraciclina" levou ao aparecimento da curva exponencial com tempo de resposta 58,8h e efeito térmico $(220 \pm 3) \text{ kJ/mol}$ de glicose. Já com o bactericida "cloranfenicol" não foi observada a curva (figura 18). Assim, verificamos que o "tetraciclina" inibiu parcialmente o desenvolvimento de microrganismos enquanto que o "cloranfenicol" inibiu totalmente. Este resultado pode estar relacionado com a eficiência do antibiótico, pois ambos são do tipo bactericidas. Estudos microcalorimétricos em fluxo foram conduzidos a fim de avaliar a influência de alguns antibióticos em culturas de bactérias em crescimento [127-130]. Nestes trabalhos verificaram-se a toxidez de antibióticos do tipo "tetraciclina", "penicilina", "cloranfenicol", "estreptomicina", entre outros, em culturas puras de bactérias. Deste modo concluiu-se que houve uma diminuição no efeito térmico

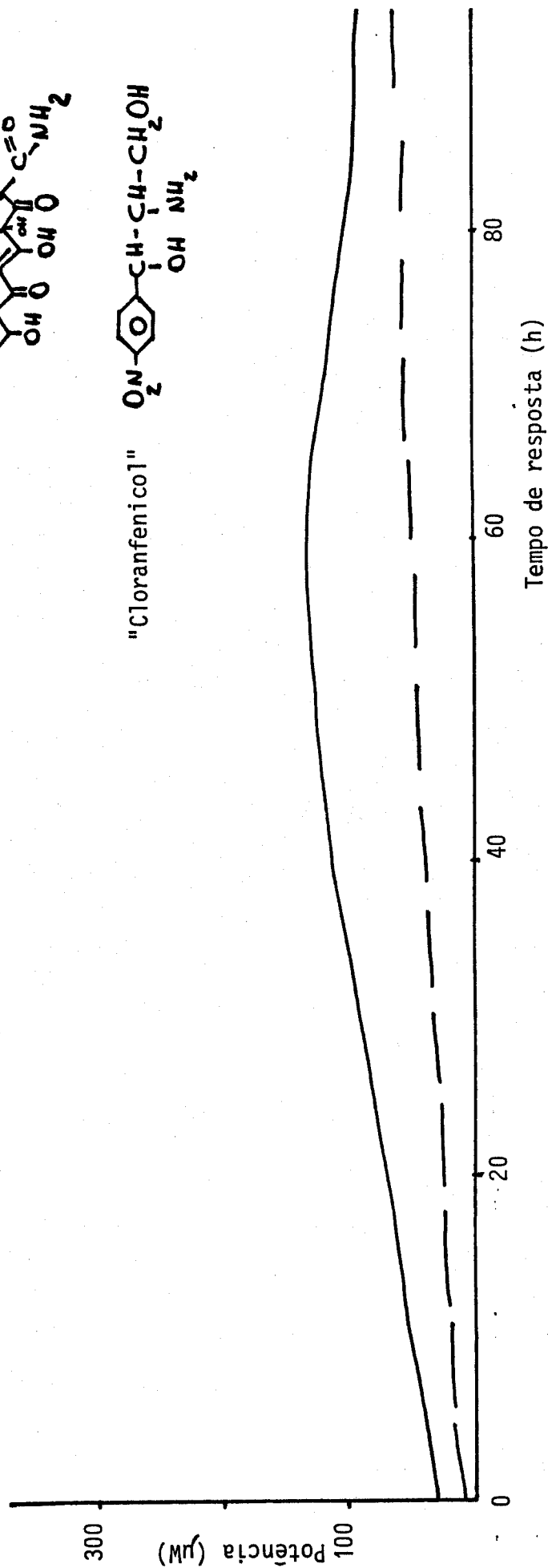
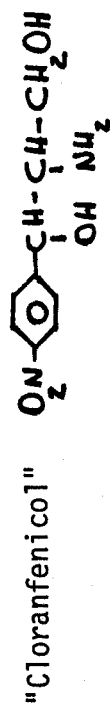
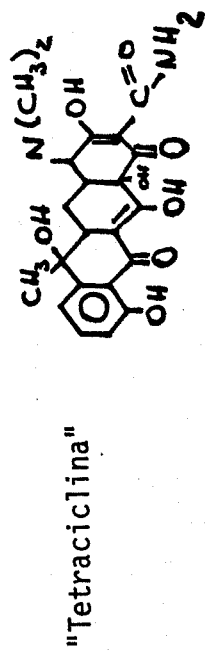


Figura 18: Efeito provocado no solo com glicose pelo bactericida "tetraciclina" (-) e "cloranfenicol" (- -) a 298K, com respectiva estrutura química.

co com adição do antibiótico. Assim, podemos dizer que estes resultados concordam com o teste realizado em nosso sistema. Embora as condições utilizadas sejam diferentes do nosso trabalho, concluímos que a "tetraciclina" e o "cloranfenicol" devido sua ação biologicamente específica, agiu sobre os microrganismos do tipo bactérias em nosso sistema.

V. CONCLUSÕES FINAIS

Os resultados obtidos usando a calorimetria como principal técnica, permitem dizer que a curva exponencial da degradação da glicose em presença de uma fonte de nitrogênio no solo, é um reflexo da ação dos microrganismos.

A degradação de substâncias no solo depende da atividade biológica no mesmo. Uma variedade de microrganismos no solo degrada com facilidade o monossacarídeo, glicose, ao contrário do que ocorre com um polissacarídeo, como por exemplo, a celulose.

A relação direta entre a concentração de glicose e o efeito térmico obtido da curva exponencial de crescimento, mostrou sua atuação como fator limitante do processo metabólico da mistura de culturas.

Quanto a estocagem, esta provocou uma flutuação nos resultados ao longo de um ano e meio, sendo que medidas feitas no período de um mês demonstraram ser coerentes entre si.

A temperatura teve uma considerável influência sobre a curva exponencial, demonstrando que esta altera o crescimento e a atividade de substâncias orgânicas nos microrganismos. A temperatura de 306K foi mais favorável ao desenvolvimento de microrganismos pois obtivemos efeitos térmicos maiores.

A adição de celulose e sais inorgânicos no solo levou ao baixo efeito térmico no tempo considerado. Onde parece ser fácil distinguir o efeito provocado por cada fonte de carbono, utilizando carboidratos diferentes.

A microbiota estudada demonstrou ter grande sensibilidade ao Cu^{+2} , o qual alterou de maneira decisiva o processo metabólico, mostrando ser extremamente inibidor nas condições utilizadas. O fato do cobre ser um micronutriente pode explicar os resultados obtidos nesta etapa. Assim, a quantidade utilizada

ultrapassou àquela tolerável pelos microrganismos. Os herbicidas bipiridínicos demonstraram um efeito inibidor bem menor do que o sulfato de cobre e apresentaram entre si um efeito inibidor em termos de efeito térmico, muito parecidos. Este fato pode ser entendido pois o "Paraquat" e o "Diquat" pertencem a mesma classe dos herbicidas bipiridínicos, embora tenham estruturas químicas diferentes.

Dos resultados obtidos pode-se inferir que é possível estudar o efeito causado por uma gama de metais, incluindo metais pesados, sobre os microrganismos do solo, através das variações apresentadas nas curvas calorimétricas. De maneira análoga, pode-se estender a toda classe de defensivos agrícolas.

Quanto a adição de antibióticos em solo com glicose, podemos concluir que o aparecimento da curva exponencial é devido, em parte, a presença de bactérias no solo. Este fato é comprovado pela adição do "cloranfenicol". Neste caso verificamos que o "cloranfenicol" se mostrou um bactericida mais eficiente do que a "tetraciclina". Nota-se a partir dos resultados obtidos, que a calorimetria é uma importante técnica para dar informação a respeito do teor de microrganismos, que se mostram em população maior em solo mais rico.

O problema da poluição em sistemas biológicos é discutido hoje em dia em termos de concentração de poluentes, o qual é determinado por técnicas de Química Analítica e não em termos da atividade biológica. Uma possível razão para este fato é que não existe metodologia boa e precisa para executá-lo. A calorimetria mostra aqui que é um instrumento poderoso para fornecer informações sobre o efeito total das substâncias, inclusive poluentes, na ciência ambiental.

VI. BIBLIOGRAFIA

- (1) A. C. Moniz, Elementos de Pedologia, Ed. da Universidade de São Paulo, SP, 1972.
- (2) W. H. Fuller and A. W. Warrick, Soil and Waste Treatment and Utilization, vol. 1, CRC Press, Florida, 1985.
- (3) E. Bornemisza, Introduction a La Quimica de Suelos, Ed. E. V. Chesneau, Washington, 1982.
- (4) W. H. Lindsay, Chemical Equilibrium in Solids, John Wiley & Sons, NY, 1979.
- (5) S. M. Tauk, Rev. Microbiol., 19(1988)229.
- (6) S. M. Tauk, Rev. Microbiol., 19(1988)282.
- (7) S. M. Tauk, Rev. Microbiol., 18(1987)67.
- (8) S. R. Ceccato, D. S. Attili, I. H. Schoenlein e S. M. Tauk, Rev. Bras. Ci. Solo, 10(1986)227.
- (9) M. S. Palma, S. M. Tauk e . O. Raymundo Jr., Rev. Bras. Ci. Solo, 12(1988)7.
- (10) J. P. Martin and D. D. Focht, Soil for Management of Organic Wastes and Waters, Eds. American Society of Agronomy, Madison, 1977.
- (11) E. Quarone, U. A. Lima e W. Borzani, Biotecnologia-Tecnologia das Fermentações, Ed. Ed. Blücher Ltda, SP, Vol. 1, 1971.
- (12) T. R. Gray and S. T. Williams, Soil-Microorganisms, Ed. Longman Group Ltda, London, 1971, 75.
- (13) M. Alexander, Introduction to Soil Microbiology, Ed. John Wiley and Sons, NY, 1977.
- (14) A. Y. Stainer, M. Doudoroff and E. A. Adelberg, Mundo dos Micróbios, Ed. Ed. Blücher Ltda, SP, 1969.
- (15) M. S. Palma e S. M. Tauk, Naturália, 7(1982)7.
- (16) T. Kawabata, H. Yamano and K. Takahashi, Agric. Biol. Chem., 47(1983)1281.

- (17) L. A. Golovleva, N. Ahronson, R. Greenhalgh, N. Sethunathan and J. W. Vornk, Pure Appl. Chem., 62(1990)351.
- (18) M. Alexander, Science, 211(1981)132.
- (19) C. Goellner, Ecotoxicologia e Toxicologia do Herbicida Paraquat, Ed. UPF., Passo Fundo, EMBRAPA, 27.
- (20) C. Gardyan and H. P. Thier, F. J. Anal. Chem., 339(1991).
- (21) M. E. Miller and M. Alexander, Environ. Sci. Technol., 25(1991)240.
- (22) M. Alexander, Adv. Appl. Microbiol., 18(1974)1.
- (23) J. R. Duffy and N. Wong, J. Agric. Food Chem., 15(1967)457.
- (24) E. P. Lichtenstein and K. R. Schultz, J. Econ. Entomol., 53(1960)192.
- (25) F. K. Pfaender and M. Alexander, J. Agric. Food Chem., 20(1972)842.
- (26) M. Alexander, Microbial Degradation of Polutants in Marine Environments, Eds. U. S. Environmental Protection Agency, Gulf Breeze, 1979.
- (27) J. J. Perry, Microbiol. Rev., 43(1979)95.
- (28) D. D. Kaufman, J. R. Plimmer, J. Iwan, Abstr. 162nd Meet. Am. Chem. Soc. (Pestic. Chem.), 1971.
- (29) H. Ohyama and S. Kuwatsuka, Annu. Meet. Pestic. Sci. Soc. Jpn., 1(1976)220.
- (30) T. R. Roberts and M. E. Standen, Pestic. Biochem. Physiol., 9(1978)322.
- (31) A. Ide, Y. Niki, F. Sakamoto, I. Watanabe, H. Watanabe, Agric. Biol. Chem., 36(1972)1937.
- (32) R. F. Curtis, D. G. Land, N. M. Griffiths, M. Gee, D. Robinson, J. L. Peel, C. Dennis, J. M. Gee, Nature, 235(1972)223.
- (33) G. Wedemeyer, Appl. Microbiol., 15(1967)569.
- (34) T. K. Castro and T. Yoshida, Soil Sci. Plant Nutr., 20(1974)363.

- (35) F. W. Juengst Jr. and M. Alexander, Mar. Biol., 33(1975)1.
- (36) R. J. Kuhr, A. C. Davis, E. F. Taschenberg, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 8(1972)329.
- (37) C. T. Redemann, R. W. Meikle, J. G. Widofsky, J. Agric. Food Chem., 12(1964)207.
- (38) K. I. Beynon, G. Stoydin, A. N. Wright, Pestic. Sci., 3(1972)293.
- (39) S. Otto, Environ. Qual. Saf. (Suppl.), 3(1975)277.
- (40) G. R. Leather and C. L. Foy, Pestic. Biochem. Physiol., 7(1977)437.
- (41) R. V. Subba-Rao and M. Alexander, J. Agric. Food Chem., 25(1977)855.
- (42) A. E. Smith, J. Agric. Food Chem., 25(1977)893.
- (43) S. Sumida, R. Yoshihara, J. Miyamoto, Agric. Biol. Chem., 37(1973)2781.
- (44) M. Ishida, Environmental Toxicology of Pesticides, Ed. Ac. Press, NY, 1972.
- (45) J. A. Gardiner, R. C. Rhodes, J. B. Adams Jr., E. J. Soboczinski, J. Agric. Food Chem., 17(1969)980.
- (46) T. Yoshida and H. Kojima, Chemosphere, 7(1978)497.
- (47) K. Ishikama, Y. Nakamura, S. Kuwatsuka, Nippon Noyaku Gakkai Shi, 1(1976)49.
- (48) C. C. Yu, D. J. Hansen, G. M. Booth, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 13(1975)280.
- (49) C. C. Yu, G. M. Booth, D. J. Hansen, J. R. Larsen, J. Agric. Food Chem., 22(1974)431.
- (50) B. V. Tucker and D. E. Park, J. Agric. Food Chem., 20(1972)412.
- (51) H. Ohkawa, R. Shibaike, Y. Okihara, M. Morikawa, J. Miyamoto, Agric. Biol. Chem., 40(1976)943.

- (52) W. H. Gutenmann, M. A. Loos, M. Alexander, D. J. Lisk, Soil Sci. Soc. Am. Proc., 28(1964)205.
- (53) H. F. Taylor and R. L. Wain, Proc. R. Soc. London Ser. B, 156(1962)172.
- (54) I. Weisgerber, S. Detera, W. Klein, Chemosphere, 3(1974)221.
- (55) E. Elsner, D. Bieniek, W. Klein, F. Korte, Chemosphere, 1(1972)247.
- (56) S. Otto and N. Drescher, Proc. 7th. Br. Insectic. Fungic. Conf. (Brighton, England), 1(1973)56.
- (57) N. R. Andrawes, W. P. Bagley, R. A. Herrett, J. Agric. Food Chem., 19(1971)727.
- (58) A. S. Jones, J. Agric. Food Chem., 24(1976)115.
- (59) C. C. Yu and J. R. Sanborn, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 13(1975)543.
- (60) D. M. Munnecke and D. P. H. Hsieh, Appl. Environ. Microbiol., 31(1976)63.
- (61) A. K. Sijpesteijn, H. M. Dekhuijzen, J. W. Vonk, Antifungal Compounds, Ed. Dekker, NY, vol. 2, 1977.
- (62) G. Walter-Echols and E. P. Lichtenstein, J. Econ. Entomol., 70(1977)505.
- (63) A. Haque, I. Weisberger, D. Kotzias, W. Klein, Pestic. Biochem. Physiol., 7(1977)321.
- (64) G. M. Tillmanns, P. R. Wallnoefer, G. Engelhardt, K. Olie, O. Hutzinger, Chemosphere, 7(1978)59.
- (65) K. C. Patil, F. Matsumura, G. M. Boush, Environ. Sci. Technol., 6(1972)629.
- (66) M. Ichihashi, R. Takahashi, N. Kimura, I. Yokomichi, Abstr. Annu. Meet. Weed Soc. Jpn., 1(1971)35.
- (67) T. Nakanishi, Ann. Phytopathol. Soc., 38(1972)249.
- (68) T. Nakanishi and H. Oku, Phytopathology, 59(1969)1761.
- (69) Y. Takimoto, M. Hirota, H. Inui, J. Miyamoto, Nippon Noyaku Gakkaishi, 1(1976)131.

- (70) M. Yasuno, S. Hirakoso, M. Sasa, M. Uchida, Jpn. J. Exp. Med., 35(1965)545.
- (71) R. P. Moody, R. Greehalgh, L. Lockhart, P. Weinberger, Bull. Environ. Contam. Toxicol., 19(1978)8.
- (72) A. E. Smith, Weed Res., 11(1971)276.
- (73) A. E. Smith and D. R. Cullimore, Can. J. Microbiol., 20(1974)773.
- (74) C. A. Edwards, Environmental Pollution by Pesticides, Plenum Publishing Company Ltd, NY, 1974.
- (75) A. S. Y. Chau, B. K. Afghan, Analysis of Pesticides in Water, vol. 2, CRC Press, Florida, 1982.
- (76) A. S. Y. Chau, B. K. Afghan, Analysis of Pesticides in Water, vol. 1, CRC Press, Florida, 1982.
- (77) S. D. Faust, Fate of Organic Pesticides in the Aquatic Environment Advances in Chemistry series 111, American Chemical Society, Washington, 1972.
- (78) F. M. Ashton & A. S. Crafts, Mode of Action of Herbicides, Ed. John Wiley & Sons, NY, 1973.
- (79) A. S. Murty, Toxicity of Pesticides to Fish, vol. 1, CRC Press, NY, 1986.
- (80) R. D. O'Brien, Insecticides- Action and Metabolism, Ac. Press, NY, 1967.
- (81) J. L. Hilton, R. W. Bovey, H. M. Hull, W. R. Mullison, R. E. Talbert, Herbicide Handbook of the Weed Science Society of America, Weed Science Society of America, Illinois, 1974.
- (82) P. C. Kear and D. D. Kaufman, Herbicides Chemistry- Degradation and Mode of Action, M. Dekker Inc., vol. 2, NY, 1976.
- (83) P. C. Kear and D. D. Kaufman, herbicides Chemistry- Degradation and Mode of Action, M. Dekker Inc., vol. 1, NY, 1976.

- (84) A.S.Y.Chau, B.K.Alghan, Analysis of Pesticides in Water, vol.1, CRC Press, Florida, 1986.
- (85) G.A.Gelmini, Herbicidas- Indicações Básicas, Fundação Gargill, SP, 1988.
- (86) .Kobayashi and B.E.Rittmann, Envirom.Sci.Tech., 16(1982)170A.
- (87) U.Mortensen, B.Norén and I.Wadsö, Bull.Ecol.Res.Comm., 17(1973)189.
- (88) K.L.Ljungholm, B.Norén and I.Wadsö, Oikos, 34(1980)94.
- (89) M.Hashimoto and K.Takahashi, Agric.Biol.Chem., 46(1982)1559.
- (90) A.Belaich and J.P.Belaich, J.Bacteriol., 125(1976)14.
- (91) A.Belaich and J.P.Belaich, J.Bacteriol., 125(1976)19.
- (92) K.Ljungholm, B.Norén and I.Wadsö, Oikos, 33(1979)24.
- (93) J.Bermudez, J.G.Lorén, M.Viñas and J.Wagensberg, Microb.Lett., 27(1984)61.
- (94) J.Bermudez, J.G.Lorén, J.Wagensberg, Inv.Pesq., 48(1984)3.
- (95) Z.Dermoun and J.P.Belaich, J.Bacteriol., 143(1980)742.
- (96) Z.Dermoun and J.P.Belaich, J.Bacteriol., 140(1979)377.
- (97) L.Gram and H.Sogaard, Thermochim. Acta, 95(1985)375.
- (98) L.Gram and H.Soogard, J.Food Prot., 48(1985)341.
- (99) I.Wadsö, Thermochim. Acta, 137(1988)1.
- (100) R.H.Hammerstedt and R.E.Lovrien, J.Exp.Zoo., 228(1983)459.
- (101) M.Monti, Thermochim.Acta, 172(1990)53.
- (102) L.E.Briggner, X.R.Ni, F.Tempesti and I.Wadso, Thermochim. Acta, 109(1986)139.
- (103) J.C.Sari, R.Gilli, V.Peyrot and C.Briand, Thermochim. Acta, 147 (1989)119.
- (104) K.Takahashi, J.L.Casey and J.M.Sturtevant, Biochemistry, 20(1981)4693.

- (105) R.R. Malherbe, A. Berazain e J.A. del Rosário, J. Thermal Anal. , 32(1987) 949.
- (106) S. Ono, K. Hiromi and K. Takahashi, J. Biochem. , 57(1965)799.
- (107) K. Ljungholm, B. Norén and I. Wadsö, Oikos, 33(1979)24.
- (108) K. Ljungholm, B. Norén, R. Skold and I. Wadsö, Oikos, 33(1979)15.
- (109) H. Yamano and K. Takahashi, Agric. Biol. Chem. , 47(1983)1493.
- (110) S. Itoh and K. Takahashi, Agric. Biol. Chem. , 48(1984)271.
- (111) I. Lamprecht, Ch. Motzkus, B. Schaarschmidt and D. Coenen-Stass, Thermochim. Acta, 172(1990)87.
- (112) M. H. Hayes, M. E. Pick and B. A. Toms, Science Tools, 19(1972)9.
- (113) I. Wadsö, Acta Chem. Scand. , 22(1968)927.
- (114) K. Takahashi, Agric. Biol. Chem. , 37(1973)2743.
- (115) K. Kobayashi, T. Fujita and S. Hagiwara, Thermochim. Acta, 88(1985)329.
- (116) H. Yamano and K. Takahashi, Agric. Biol. Chem. , 50(1986)3145.
- (117) H. Yamano and K. Takahashi, Agric. Biol. Chem. , 50(1986)3157.
- (118) A. E. Beezer, Biological Microcalorimetry, Ac. Press, London, 1980.
- (119) M. N. Jones, Studies in Modern Thermodynamics-Biochemical Thermodynamics, Elsevier, NY, 1988.
- (120) J. D. Cox and G. Pilcher, Thermochemistry of Organic and Organometallic Compounds, Ac. Press, London, 1970.
- (121) J. A. Baldock, J. M. Oades, A. M. Vassallo and M. A. Wilson, Environ. Sci. Technol. , 24(1990)527.
- (122) G. Bitton and B. J. Dutka, Toxicity Testing Using Microorganisms, vol. 1, CRC Press, Boca Raton, 1986.

- (123) A.R. Dechen, D. Sodrzeieski, H.P. Haag, J.C. Kiehl, L.I. Dematte, O.J. Crocamo, Q.A. Carmello e T. Yamada, Simpósio Avançado de Química e Fertilidade do Solo, vol.1, Fund. Gargil, 1986.
- (124) A. Camargo, A.C. Moniz, J.A. Jorge e J.M.A.S. Valadares, Métodos Analíticos, Mineralógicos e Físico dos Solos do Instituto Agrônômico de Campinas, Bol. Téc. 106, 1986.
- (125) J. Basset, R.C. enney, G.H. Jeffery, J. Medham, Vogel-Análise Inorgânica Quantitativa, Ed. Guanabara Dois, RJ, 1981.
- (126) P.R. Hesse, A Textbook of Soil Chemical Analises, Ed. William Clowes e Sons Ltda, London, 1971.
- (127) J.S. Binford, L.F. Binford and P. Adler, Am. J. Clin. Pathol., 59(1973)86.
- (128) D. Kruger and P. Giesbrecht, The Target of Penicilin, Walter de Gruyter, Berlin, 1983.
- (129) P.E. Mardh, T. Ripa, K.E. Andersson and I. Wadsö, Antimicrob. Agents and Chemother., 10(1976)604.
- (130) A.E. Beezer, R.J. Miles, E.J. Shaw and P. Willis, Experientia, 35(1979)795.