



**GABRIEL JERONYMO CURTI**

**ESTUDO CALORIMÉTRICO COMPARATIVO DO EFEITO DA  
APLICAÇÃO DE HERBICIDAS NA ATIVIDADE MICROBIANA EM  
DIFERENTES SOLOS.**

**CAMPINAS**

**2014**





**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE QUÍMICA**

**GABRIEL JERONYMO CURTI**

**ESTUDO CALORIMÉTRICO COMPARATIVO DO EFEITO DA APLICAÇÃO DE  
HERBICIDAS NA ATIVIDADE MICROBIANA EM DIFERENTES SOLOS.**

**ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ DE ALENCAR SIMONI**

**TESE DE DOUTORADO APRESENTADA AO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP PARA  
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS.**

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA  
POR GABRIEL JERONYMO CURTI, E ORIENTADA PELO PROF. DR. JOSÉ  
DE ALENCAR SIMONI.**

---

**Assinatura do Orientador**

**CAMPINAS  
2014**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Química  
Simone Lucas Gonçalves de Oliveira - CRB 8/8144

C94e Curti, Gabriel Jeronymo, 1984-  
Estudo calorimétrico comparativo do efeito da aplicação de herbicidas na atividade microbiana em diferentes solos / Gabriel Jeronymo Curti. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: José de Alencar Simoni.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Microcalorimetria isotérmica. 2. Solos. 3. Herbicidas. 4. Atrazina. 5. Nicosulfuron. 6. Atividade microbiana. I. Simoni, José de Alencar. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Calorimetric study of the comparative effect of herbicides on the microbial activity in different soils

**Palavras-chave em inglês:**

Isothermal microcalorimetry

Soils

Herbicides

Atrazine

Nicosulfuron

Microbial activity

**Área de concentração:** Físico-Química

**Titulação:** Doutor em Ciências

**Banca examinadora:**

José de Alencar Simoni [Orientador]

João Barros Valim

Zigomar Menezes de Souza

Nelson Henrique Morgon

Fábio Luiz Pissetti

**Data de defesa:** 05-12-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Química



## Agradecimentos

*“O agradecer é o enaltecer de quem pensa e sente,  
Sente as alegrias e as tristezas, vitórias e derrotas,  
Afetos e desafetos e os demais sentimentos frutos das ações humanas.  
O agradecer é o reconhecimento de um ser tão limitado e frágil...  
Que com um ato singelo como esse desabafa e se recorda  
Recorda-se que ainda assim não podemos viver sozinhos e no esquecimento.  
Assim, nada é mais nobre do que o reconhecimento... o agradecimento...”*

Primeiramente, eu gostaria de agradecer humildemente ao Criador do universo por tudo que concedeu à humanidade e pela oportunidade que me concedeu de viver até o dia de hoje. Em seguida, eu gostaria de agradecer aos meus pais (Mauro Curti e Maria de Lourdes Jeronymo Curti) pela paciência que tiveram comigo e por todo o apoio que prestaram desde meu nascimento. Eu também gostaria de agradecer aos meus familiares, sejam os presentes, sejam os entes queridos, em especial à minha avó falecida recentemente, Rachel Augusta Bonati, pelos momentos agradáveis que passei com ela, assim como ao meu tio também falecido recentemente, Idelanir Ernesti, por nos ajudar com despesas em momentos muito difíceis. Aos meus tios e primas que vivem em Curitiba eu também gostaria de expressar a minha gratidão pela convivência proporcionada durante o período de férias que pude desfrutar quando eu visitava o sul. Ademais, eu os agradeço também pelo apoio recebido, quando meus pais e eu nos mudamos para Curitiba. Em seguida, eu gostaria de expressar a minha gratidão aos ex-colegas de Curitiba, pela receptividade que tiveram comigo e aos professores do Colégio Sion desta cidade, em especial às professoras Águeda Thorton e Ana Marina Ribas, por aguçarem o meu interesse pelas ciências. Em Campinas eu gostaria de agradecer ao meu orientador, prof. Dr. José de Alencar Simoni pela acolhida e paciência que vem tendo comigo e por ter permitido que eu pudesse usar as dependências do laboratório para poder aprender um pouco sobre a calorimetria, assim como agradeço ao prof. Dr. Pedro

Volpe pelas conversas agradáveis e por me motivar em momentos críticos, e ao prof. Dr. Claudio Airoidi, por ter compartilhado de seu vasto conhecimento. Ao prof. Dr. Zigomar Meneses de Souza, da FEAGRI – Unicamp, eu gostaria de agradecer muito por seu suporte desde o mestrado e por me ensinar algo sobre os solos, uma área que representou um grande desafio para mim. A todos do Instituto de Química da Unicamp e aos seus funcionários, expresso o meu reconhecimento por seus esforços, e agradeço em especial ao Jonas (segurança) pelas boas conversas que tivemos, tendo me ensinado com sua experiência. Eu gostaria de expressar a minha profunda gratidão aos colegas paquistaneses com os quais tive uma vivência muito profunda, em especial aos senhores Zulqarnain , Hamid Ullah e Adnan Khan, por serem sinceros comigo e por terem me ensinado e me apoiado em momentos que passei, experiência esta que permitiu com que eu pudesse ter uma percepção diferente do mundo. Eu também gostaria de agradecer a toda a Comunidade Islâmica de Campinas pelo apoio e auxílio, em especial ao senhores Nader Habib e Mohammed Elkatter, por seus esforços pelo bem da Sociedade Islâmica da referida cidade, e ao senhor Abdul Amin pelas conversas agradáveis que tivemos. Agradeço muito aos irmãos Mohammad Taha e Ahmad Taha, de Jundiaí, os quais eu também considero como meus irmãos, pela atenção e pelos agradáveis momentos que passamos juntos e que foram muito importantes também, motivando-me em meus estudos e me ensinando muito, assim que se Deus assim o permitir, jamais me esquecerei desses amigos e de todos os demais. Por fim, eu gostaria de agradecer ao colega Hélio Tachinardi pela cooperação e a toda a Unicamp pelo espaço proporcionado aos seus estudantes para o aprendizado, que vem proporcionando com excelência inquestionável.

# 1. Currículo

---

## 1.1. Dados pessoais

---

### Gabriel Jeronymo Curti

Brasileiro, solteiro, 30 anos  
Rua Monte Castelo, 20 apto 09  
Tarumã – Curitiba - Paraná  
Telefone: (41) 3082-5237 / (41) 9512-5332  
e-mail: [gabrielcurtipr@gmail.com](mailto:gabrielcurtipr@gmail.com) / [gabrielcurti@yahoo.com.br](mailto:gabrielcurti@yahoo.com.br)

## 1.2. Formação acadêmica (Graduação e Pós-Graduação)

---

Bacharel em Química – Universidade Estadual de Campinas - 2007  
Licenciado em Química – Universidade Estadual de Campinas – 2009  
Mestre em Físico-Química – Universidade Estadual de Campinas – 2009

## 1.3. Produção Científica

---

### 1.3.1. Iniciação científica

**Calorímetro de Combustão para Uso no Ensino de Química.** Orientador: prof. Dr. José de Alencar Simoni, Universidade Estadual de Campinas, 2006-2007.

### 1.3.2. Congressos

**32ª. Reunião da Sociedade Brasileira de Química – Fortaleza-CE - 2009.**

Submissão e admissão de 2 trabalhos (vide anexa):

**(i) Estudo da Atividade Microbiana de um Solo Cultivado com Cana-de-Açúcar, Sob Diversas Condições, Utilizando-se a Calorimetria.** / Divisão de Química Ambiental.

Autores: Gabriel J. Curti, José de Alencar Simoni, Cláudio Airoidi, Zigomar Meneses de Souza (FEAGRI).

**(ii) Comparação entre parâmetros pedológicos e anabolismo microbiano em solos de região canavieira.** / Divisão de Química Ambiental.

Autores: Gabriel J. Curti, José de Alencar Simoni, Cláudio Airoidi, Zigomar Meneses de Souza (FEAGRI).

**XVI ISBC: calorimetry, living systems, biomacromolecules and the holy year: 31<sup>th</sup> may, 03<sup>th</sup> June, 2010, Lugo, Espanha.**

Apresentação oral: **Calorimetric Study of the Microbial Activity in a Sugar Cane Field Soil Tilled under Different Conditions.**

Apresentação de painel: **Comparative Study of the Microbial Activity in a Soil Eutradox Rhodic Cultivated by Three Different Conditions by Using Calorimetry.**

Autores: Amanda C. C. Bertelli, Gabriel J. Curti, Claudio Airoidi, José de Alencar Simoni

**19. Ulm-Freiberger Kalorimetrietage, Freiberg/Sa., 16 – 18 março, 2011, Alemanha.**

Apresentação oral: **Isothermal Calorimetry and Soil Science: Evaluation of the Metabolism in Soils.**

**34ª. Reunião da Sociedade Brasileira de Química – Florianópolis-SC - 2011.**

(i) **Estudo Calorimétrico da Atividade Microbiana de um Latossolo Vermelho Cultivado por Cana e sob o Efeito da Adição de Fenóis.** / Divisão de Físico-química.

Autores: Amanda C. C. Bertelli, Gabriel J. Curti, Claudio Airoidi, José de Alencar Simoni

(ii) **Estudo dos Efeitos da Aplicação da Atrazina em Solo de Região Canavieira Através da Calorimetria Isotérmica.** / Divisão de Físico-química.

Autores: Gabriel J. Curti, José de Alencar Simoni, Claudio Airoidi, Amanda C. Bertelli, Zigomar M. Souza, Hameed Ullah.

## **1.4. Estágios**

---

1.4.1. Laboratório de Espectroscopia de Fluorescência de Raios-X, Química Analítica, Universidade Estadual de Campinas, 1º. semestre de 2004.

1.4.2. Laboratório de Microbiologia do Solo, Instituto Agrônomo de Campinas, IAC, fevereiro-abril de 2009.

1.4.3. Estágio de Capacitação Docente – PEDC – 1º Semestre 2012

1.4.4. Estágio de Capacitação Docente – PED B - 2º Semestre 2012

## **ESTUDO CALORIMÉTRICO COMPARATIVO DO EFEITO DA APLICAÇÃO DE HERBICIDAS NA ATIVIDADE MICROBIANA EM DIFERENTES SOLOS.**

Sabe-se que na agricultura a qualidade de um solo é dependente do tipo de manejo. No presente trabalho foi aplicada a microcalorimetria isotérmica para se investigar a influência do herbicida atrazina na atividade microbiana de um solo envelhecido de mata nativa, mantido a aproximadamente 4 °C, durante três anos. Além da utilização da microcalorimetria isotérmica, foram realizadas as análises de DSC e TG com a finalidade de se avaliar a quantidade de matéria orgânica presente no solo estudado, cujo valor quantificado foi de  $(3,5 \pm 0,2)\%$  g/g. Também foi realizado o cálculo da humidade do solo e as análises elementares [CHN e EDS (*Energy Dispersive X-Ray Detector*) acoplado ao MEV (Microscópio Eletrônico de Varredura)]. As amostras de solo utilizadas na análise microcalorimétrica foram previamente incubadas com acetonitrila e com soluções de atrazina em acetonitrila nas concentrações de 1000 e 2000 ppm, durante aproximadamente 48 horas. Em seguida, foi descoberto com o emprego da microcalorimetria isotérmica que a acetonitrila ainda permanecia no solo após o período de incubação, além do fato de que o efeito da atrazina sobre os microrganismos do solo não era detectável, uma vez que os valores para o calor gerado durante a incubação com aquele solvente e com as soluções de atrazina em acetonitrila nas concentrações de 1000 e 2000 ppm, respectivamente, eram iguais a:  $(-12,8 \pm 0,8)$ ,  $(-12,9 \pm 0,9)$  e  $(-13,5 \pm 0,6)$  J, enquanto que os valores da constante do crescimento microbiano eram iguais a:  $(5,9 \pm 1,4)$ ,  $(6,8 \pm 1,6)$  e  $6,37 \text{ min}^{-1}$ . A análise microbiológica também indicou que a atrazina não estaria influenciando os microrganismos, diferentemente do caso da acetonitrila, a qual foi responsável por uma redução nas quantidades dos microrganismos. No presente trabalho também foi investigada a influência do herbicida nicosulfuron sobre as atividades microbianas nos solos de mata nativa ou floresta e de cultivos do milho e do café. Foram empregadas as mesmas técnicas analíticas como no caso da atrazina, sendo que para se estudar o nicosulfuron foram investigadas as seguintes condições de incubação (durante 48 h) para cada tipo de solo: aplicação de

acetonitrila, aplicação de uma solução de nicosulfuron em acetonitrila com uma concentração igual a 64 ppm e aplicação de uma solução com a mesma natureza, mas com uma concentração igual a 120 ppm. Os resultados indicaram que o solo de floresta era o mais rico em termos de matéria orgânica ( $4,0 \pm 0,1$ )%, enquanto que o solo de cultivo do café era o mais rico em termos de humidade (21 %). Preliminarmente, as análises térmicas realizadas com o auxílio da microcalorimetria isotérmica indicaram que a acetonitrila foi novamente a espécie mais biodegradada, ao passo que nos casos das condições em que havia adição de água ao invés da solução de glicose pôde ser concluído que o solo cultivado com café foi aquele que mais sofreu influência do nicosulfuron do que nos casos dos outros solos, uma vez que para o valor de concentração mais elevado, i.e., 120 ppm, o valor da energia dissipada (calor; Q) foi estatisticamente superior ( $-6,6 \pm 0,3$ )J do que no caso da solução da mesma natureza com concentração igual a 64 ppm ( $-4,8 \pm 0,9$ )J. Para os solos de floresta ou mata nativa e de cultivo do milho o nicosulfuron não exerceu influência detectável. As análises microbiológicas para os solos de cultivo do café e do milho não indicam que ocorram diferenças estatisticamente significativas para algumas das condições estudadas, de tal maneira que para o estudo com o nicosulfuron podemos concluir que a microcalorimetria isotérmica se mostra uma técnica promissora que pode permitir estudos com xenobióticos como os pesticidas.

## **CALORIMETRIC STUDY OF THE COMPARATIVE EFFECT OF HERBICIDES ON THE MICROBIAL ACTIVITY IN DIFFERENT SOILS.**

It is known in agriculture that soil quality does depend on the kind of soil management. In the present work was applied the isothermal microcalorimetry to investigate the influence of the herbicide atrazine on the microbial activity of a forest soil that was aged (resting along 3 years under about 4°C). Besides the application of isothermal microcalorimetry it were performed the DSC and TG analyses with the purpose to evaluated the amount of organic matter present in the soil whose value was equal to  $(3.5 \pm 0.2)$  % to the studied soil. It were also performed the calculation of humidity in the soil and the elemental analyses [CHN and EDS (Energy Dispersive X-Ray Detector) coupled to SEM (Scanning Electron Microscopy)]. The soil samples used for the microcalorimetric analysis were previously incubated with acetonitrile and atrazine solutions in acetonitrile (1000 ppm and 2000 ppm), during approximately 48 hours. Afterwards, with the aid of the Isothermal Microcalorimetry it was discovered that actually the acetonitrile was remaining in the soil, even after the incubation period and that the effect of atrazine on the soil microorganisms was undetectable, once the heat generated for the incubation with acetonitrile and with atrazine solutions in acetonitrile of 1000 and 2000 ppm were equal respectively to:  $(-12.8 \pm 0.8)$ ;  $(-12.9 \pm 0.9)$  and  $(-13.5 \pm 0.6)$  J, whilst that the values of the microbial growth constant were equal to:  $(5.9 \pm 1.4)$ ;  $(6.8 \pm 1.6)$  and  $6.37 \text{ min}^{-1}$ . The microbiological analysis also indicated that the atrazine was not influencing the microorganisms, differently for the case of acetonitrile that was responsible for a decrease on the amounts of them. It was also investigated in that work the influence of the herbicide nicosulfuron on the microbial activities of soils under forest, and under maize and coffee tree crops. The same kind of analyses were performed as for the case of atrazine, but the investigations occurred after a previous period of incubation along 48 h, and the conditions evaluated were: application of acetonitrile, application of nicosulfuron solution in acetonitrile with

concentration equal to 64 ppm and application of a solution with the same nature but with concentration equal to 120 ppm. The results indicated that the forest soil was the richest one in terms of organic matter ( $4.0 \pm 0.1$  %), whilst the soil that lies under a coffee tree crop was the richest one in terms of humidity (21 %). The thermal analyses with the aid of the Isothermal Microcalorimetry indicated preliminary that again acetonitrile was biodegraded mostly. However, for the soil tilled under coffee tree crop, considering the same conditions discussed previously for nicosulfuron but with the addition of deionized water after 48 h, the microbial activity was more stimulated by the nicosulfuron than respect to the other conditions, once with the solution of nicosulfuron with the highest concentration, i. e., 120 ppm, the value for the heat dissipated (Q) was statistically higher ( $-6.6 \pm 0.3$ ) than for the concentration equal to 64 ppm ( $-4.8 \pm 0.9$ ), while that in the forest soil and for the soil tilled with maize crop its influence was undetectable. The microbiological analysis for the forest soil and for the soil under maize crop shown that there are no differences that are statistically significant for some conditions studied, in such a way that for the study with nicosulfuron we can conclude that the Isothermal Microcalorimetry shows itself a promising technique that can allow studies with xenobiotics as the pesticides.

# Sumário

<b>Lista de Tabelas</b>	<b>xvii</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>xix</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1. A natureza do solo e de seus constituintes .....	1
1.2. Os pesticidas e os solos .....	7
1.2.1. Os herbicidas e a atrazina .....	10
1.2.2. As sulfoniluréias e o nicosulfuron .....	17
1.3. O cafeeiro ( <i>Coffea spp.</i> ) e sua rizosfera .....	21
1.4. O milho ( <i>Zea mays</i> L.) e sua rizosfera .....	23
1.5. A microcalorimetria isotérmica e sua aplicação ao estudo do solo .....	24
<b>2. Objetivos</b>	<b>27</b>
<b>3. Materiais e métodos</b>	<b>29</b>
3.1. Coleta das amostras de solo .....	29
3.2. Análises de DSC, TG e elementar (CHN) .....	29
3.3. O pH e o teor percentual de umidade (umidade % <sub>g/g</sub> ) .....	30
3.4. A microcalorimetria isotérmica .....	31
3.5. Análises microbiológicas .....	41
3.5.1. Estudos com a atrazina .....	42
3.5.2. Estudos com o nicosulfuron .....	42
3.6. Incubação de amostras de solo para estudos calorimétricos (estudos com a atrazina) .....	43
3.7. Incubação de amostras de solo para estudos no microcalorímetro isotérmico (estudos com a acetonitrila e o nicosulfuron) .....	44
<b>4. Resultados e discussão</b>	<b>47</b>
4.1. Estudos com a atrazina .....	47
4.2. Estudos com o nicosulfuron .....	60

5. <u>Considerações Finais</u>	85
6. <u>Referências bibliográficas</u>	87

## Lista de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Alguns derivados triazínicos conhecidos e seus respectivos nomes químicos e substituintes .....	<b>12</b>
<b>Tabela 2.</b> Algumas propriedades físico-química do nicosulfuron (tabela modificada) .	<b>19</b>
<b>Tabela 3.</b> Alguns atributos físico-químicos avaliados para o solo de mata nativa envelhecido .....	<b>47</b>
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros relacionados com o crescimento microbiano em estudos comparativos com a atrazina e a acetonitrila para um Latossolo Vermelho, envelhecido .....	<b>57</b>
<b>Tabela 5.</b> Quantificação de bactérias + actinomicetos + leveduras .....	<b>60</b>
<b>Tabela 6.</b> Atributos físico-químicos avaliados para os solos de floresta e de cultivos de milho e de café .....	<b>61</b>
<b>Tabela 7.</b> Dados termodinâmicos e cinéticos para os solos estudados .....	<b>72</b>
<b>Tabela 8.</b> Valores calculados dos coeficientes estequiométricos da equação macroquímica para formação de biomassa .....	<b>75</b>
<b>Tabela 9.</b> Valores de biomassa viva formada com o crescimento microbiano para as respectivas condições .....	<b>77</b>
<b>Tabela 10.</b> Dados microcalorimétricos relacionados com a adição de água (100 µL / 1 g solo) a amostras de solo incubadas com soluções do nicosulfuron em acetonitrila (incubação por aprox. 48 h) e com amostras incubadas com acetonitrila, às quais também foi adicionada a água (100 µL / 1 g solo) .....	<b>79</b>
<b>Tabela 11.</b> Valores de unidades formadoras de colônias (cel/mL) e respectivas condições .....	<b>85</b>



## Lista de figuras

- Figura 1.** Representação esquemática de um exemplo de perfil de solo. Em um perfil de solo podem ser observados diferentes horizontes, o que é resultado da ocorrência de diferentes processos físico-químicos ao longo do tempo, os quais atuam inicialmente sobre uma rocha ..... **2**
- Figura 2.** Representação de um agregado e dos diferentes organismos envolvidos com sua manutenção ..... **4**
- Figura 3.** Representação esquemática da raiz de uma planta com suas diferentes partes. <sup>22</sup> (A) Corte longitudinal do eixo principal de uma raiz; (B) Corte transversal da raiz. As raízes das plantas liberam exsudatos, os quais influenciam a microbiota dos solos ..... **5**
- Figura 4.** Fluxograma representando a classificação química dos exudatos radiculares. **6**
- Figura 5.** Fluxograma representando as possíveis vias de contaminação dos pesticidas ..... **9**
- Figura 6.** Utilização de herbicidas em função da área geográfica ..... **10**
- Figura 7.** Fórmula estrutural da s-triazina ..... **12**
- Figura 8.** Fórmula estrutural da atrazina ..... **13**
- Figura 9 .** Os 10 herbicidas mais empregados no cultivo do milho nos Estados Unidos em 2005 em função dos acres de terra tratados (% dos acres cultivados) ..... **14**
- Figura 10 .** Utilização média da atrazina por lavoura nos Estados Unidos no período de 2000–2002 ..... **14**
- Figura 11 .** Esquema geral do catabolismo microbiano relacionado com os compostos s-triazínicos, o qual é constituído por reações enzimáticas hidrolíticas de deslocamento dos substituintes dos três átomos do heterociclo ..... **16**
- Figura 12.** Fórmula estrutural do **nicosulfuron** [2-[(4,6-dimetóxi pirimidina-2-ilcarbamoil-sulfanoil]-N,N-dimetilnicotinamida] ..... **17**

<b>Figura 13.</b> Rotas metabólicas para o nicosulfuron .....	<b>21</b>
<b>Figura 14.</b> Imagem do microcalorímetro isotérmico TAM 2277 .....	<b>31</b>
<b>Figura 15.</b> Representação simplificada da célula calorimétrica .....	<b>32</b>
<b>Figura 16.</b> Esquema geral modificado do metabolismo nos seres vivos .....	<b>33</b>
<b>Figura 17.</b> Representação generalizada das trocas estabelecidas por uma célula viva com o meio ambiente .....	<b>34</b>
<b>Figura 18.</b> Exemplo de padrão de curva calorimétrica que pode ser obtido com o crescimento microbiano em solos .....	<b>35</b>
<b>Figura 19.</b> Imagem esquemática do sistema empregado para se realizar a incubação de amostras de solo com a atrazina em acetonitrila .....	<b>44</b>
<b>Figura 20.</b> Imagem do sistema empregado para se realizar a incubação de amostras de solo com o nicosulfuron .....	<b>45</b>
<b>Figura 21.</b> Curvas de DSC <b>(a)</b> e de TG <b>(b)</b> para o solo de região de mata nativa, em atmosfera oxidante .....	<b>48</b>
<b>Figura 22.</b> Curvas de DSC para a celulose cristalina <b>(a)</b> e a matéria húmica <b>(b)</b> , obtidas em atmosfera oxidante .....	<b>50</b>
<b>Figura 23.</b> Curvas calorimétricas da atividade microbiana do solo de mata nativa envelhecido: <b>(a)</b> adição de solução aquosa de glicose; <b>(b)</b> adição de acetonitrila + glicose; <b>(c)</b> adição de solução de atrazina em acetonitrila (1000 ppm) + glicose e <b>(d)</b> adição de solução de atrazina em acetonitrila (2000 ppm) + 1 mg glicose .....	<b>53</b>
<b>Figura 24.</b> Curvas calorimétricas do solo de mata nativa envelhecido, sob diversas condições .....	<b>54</b>
<b>Figura 25.</b> Representação das duas etapas de degradação de nitrilas alifáticas como a acetonitrila .....	<b>56</b>
<b>Figura 26.</b> Equação química da degradação de acetonitrila para a formação de amônia e ácido acético .....	<b>56</b>
<b>Figura 27.</b> Gráfico da constante de crescimento microbiano em função da energia dissipada por grama de solo para o solo de mata envelhecido tratado com a atrazina	

- ..... 59
- Figura 28.** Curvas de TG para os três tipos de solo estudados. **(a)** solo de área de cultivo de café; **(b)** solo de área de cultivo de milho e **(c)** solo de área florestal ..... 62
- Figura 29.** Curvas calorimétricas obtidas nos estudos com o emprego do nicosulfuron (incubação durante 48 h e adição final de solução aquosa de glicose) aplicado às diferentes amostras de solo. Na condição em que há acetonitrila foi adicionada água, após incubação por aproximadamente 48h ..... 64
- Figura 30.** Curvas calorimétricas obtidas nos estudos com o emprego de glicose **(a)** e com a incubação da solução de nicosulfuron em acetonitrila (C= 64 ppm) seguida pela adição de glicose **(b)** ..... 68
- Figura 31.** Valores de efeito térmico da atividade microbiana nos diversos solos, em função das condições experimentais ..... 73
- Figura 32.** Dados de da energia dissipada por unidade de massa de solo em função das diferentes condições empregadas, tendo sido adicionada água após 48h. **(a)** Solo de área de cultivo de milho [nicosulfuron em acetonitrila (120 ppm)]; **(b)** Solo de área de cultivo de milho [nicosulfuron em acetonitrila (64 ppm)]; **(c)** Solo de área de cultivo de milho (acetonitrila PA); **(d)** Solo de área de cultivo de café [nicosulfuron em acetonitrila (120 ppm)]; **(e)** Solo de área de cultivo de café [nicosulfuron em acetonitrila (64 ppm)]; **(f)** Solo de área de cultivo de café (acetonitrila PA); **(g)** Solo de área florestal [nicosulfuron em acetonitrila (120 ppm)]; **(h)** Solo de área florestal [nicosulfuron em acetonitrila (64 ppm)]; **(i)** Solo de área florestal (acetonitrila PA) ..... 79
- Figura 33.** Curvas calorimétricas para os solos incubados, tendo sido adicionada água desionizada após 48h (sem adição de glicose). **(I) Solo de cultivo de café:** **(a)** Solução de nicosulfuron em acetonitrila (120 ppm); **(b)** Incubação com acetonitrila; **(c)** Nicosulfuron em acetonitrila (64 ppm); **(II) Solo de floresta:** **(a)** Acetonitrila PA; **(b)** Nicosulfuron em acetonitrila (64 ppm); **(c)** Nicosulfuron em acetonitrila (120 ppm); **(III) Solo de cultivo de milho:** **(a)** Acetonitrila PA; **(b)** Nicosulfuron em acetonitrila (64 ppm); **(c)** Nicosulfuron em acetonitrila (120 ppm) ..... 81

**Figura 34.** Curvas calorimétricas obtidas para os solos incubados por 48 h com acetonitrila e com soluções de nicosulfuron em acetonitrila, sem adição de glicose e com adição de água após o período de incubação. **(I)** Acetonitrila PA: **(a)** Solo de cultivo de café; **(b)** Solo de Floresta; **(c)** Solo de cultivo de milho; **(II)** Nicosulfuron em acetonitrila (64 ppm): **(a)** Solo de cultivo de café; **(b)** Solo de Floresta; **(c)** Solo de cultivo de milho; **(III)** Nicosulfuron em acetonitrila (120 ppm): **(a)** Solo de cultivo de café; **(b)** Solo de cultivo de milho; **(c)** Solo de floresta ..... **82**

# 1. Introdução

*“A nação que destrói seu solo destrói a si mesma”*

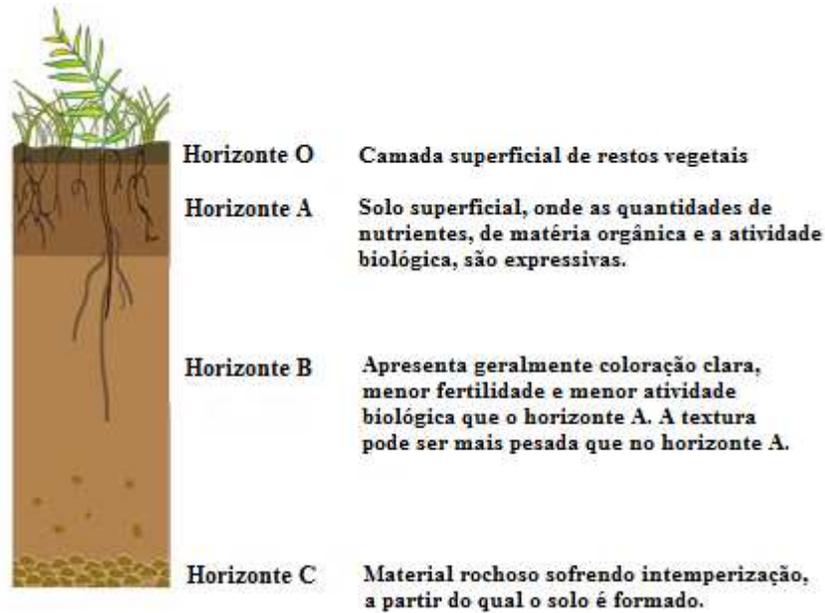
Franklin D. Roosevelt (1882-1945)

## **1.1. A natureza do solo e de seus constituintes.**

Quando se fala em solo, uma das ideias que pode surgir se relaciona à agricultura, especialmente no Brasil, um país altamente desenvolvido no agronegócio, o que significa que o solo é capaz de afetar a economia de uma nação. Todavia, para uma parcela da população é possível que o vocábulo solo esteja associado à sujeira como, por exemplo, nos casos das frequentes queixas de acúmulo de poeira nas casas. Um engenheiro civil diria que o solo é imprescindível no tocante às estabilidades de estruturas como as fundações das construções, enquanto que um geólogo consideraria o solo como um compartimento da Terra que está relacionado com processos da pedogênese, além de constituir um registro histórico da evolução do planeta em que vivemos.

Independentemente de qual seja o enfoque escolhido, deve-se reconhecer que o solo é de suma importância para a sociedade, pois direta e indiretamente ela é afetada pela maneira com que essa região da crosta terrestre é manipulada. Isso significa que o solo é uma das partes mais importantes do ambiente natural, desempenhando importantes papéis ambientais, sociais e econômicos.<sup>1</sup>

O solo é o produto do intemperismo, ou seja, é o resultado de um conjunto de modificações de ordem física (degradação) e química (decomposição) que as rochas sofrem ao aflorarem à superfície terrestre, que são dependentes do clima, relevo, fauna e flora, rocha parental e do tempo de exposição.<sup>2</sup> Como resultado dessas modificações, surgem diferentes horizontes que são estabelecidos ao longo do perfil do solo (pedológico), conforme mostra a figura 1.



**Figura 1.** Representação esquemática de um exemplo de perfil de solo.<sup>3</sup>

De fato, o solo apresenta quatro componentes principais: minerais, matéria orgânica, água e ar.<sup>4</sup> Assim, de seu volume total, aproximadamente metade corresponde aos sólidos e destes, 45% se relaciona aos minerais, 5% à matéria orgânica, enquanto que a outra metade corresponde aos espaços dos poros, onde pode haver presença de ar e/ou água.<sup>4</sup>

Os organismos vivos constituem menos que 1% do volume total do solo, sendo essenciais à produtividade das lavouras e à sua fertilidade<sup>2</sup>. Ademais, os solos são ambientes muito complexos em termos de microrganismos e de atributos espaciais, podendo apresentar diferenças quanto às comunidades microbianas, devendo ser destacado que essas diferenças constituem um reflexo da disponibilidade dos nutrientes.<sup>4,5</sup>

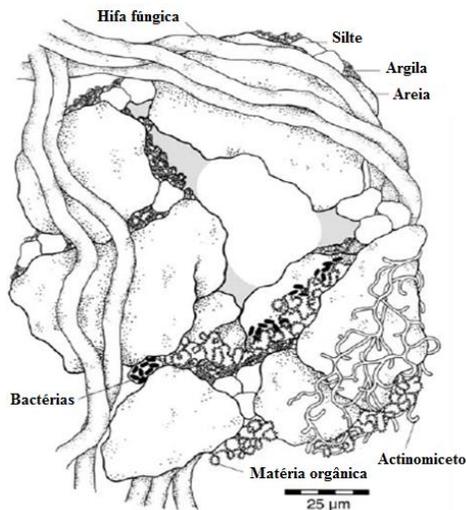
Assim como caso das vias de tráfego de uma cidade, o solo<sup>3</sup> apresenta uma expressiva quantidade de canais microscópicos que são chamados de poros, os quais permitem os fluxos de: água, ar e de nutrientes e, que se formam graças à natureza agregada do solo ou à presença de fissuras, canais de raízes ou orifícios criados por vermes.<sup>6</sup>

Um agregado, elemento estrutural ou agregado natural é um sólido definido por formas geométricas mais ou menos regulares, sendo o resultado da aglomeração dos constituintes de granulações finas presentes no solo.<sup>7</sup>

Os macroagregados são formados graças aos crescimentos das raízes e das hifas, enquanto que os microagregados são formados e estabilizados nestes macroagregados como resultado de diferentes processos, tais como: decomposição de resíduos orgânicos, deposição de subprodutos microbianos, reorientação de partículas de argila e interações entre íons, óxidos inorgânicos, moléculas orgânicas e argilas.<sup>8</sup> Esses tipos de agregados protegem fisicamente a matéria orgânica do solo, além de influenciarem na estrutura da comunidade microbiana, limitarem a difusão do oxigênio gasoso, regularem o fluxo d'água, determinarem a sorção/desorção de nutrientes e reduzirem o escoamento superficial d'água, afetando desse modo, a dinâmica da matéria orgânica e a ciclagem dos nutrientes.<sup>9</sup>

Os agregados podem ser classificados quanto ao seu diâmetro médio,  $\phi_m$ , em cinco grupos (<2  $\mu\text{m}$ ; de 2 a 20  $\mu\text{m}$ ; de 20 a 250  $\mu\text{m}$ , de 250  $\mu\text{m}$  a 2 mm; e >2 mm). Os de dimensões menores que 250  $\mu\text{m}$  são denominados de microagregados, enquanto que aos maiores que 250  $\mu\text{m}$  são denominados como macroagregados. Um agregado maior pode ser formado ao custo dos menores devendo ser obedecida uma ordem hierárquica quanto ao tamanho.<sup>9</sup>

Além disso, para que ocorram as formações dos agregados maiores, tornam-se importantes as presenças dos agentes cimentantes, os quais atuam como “colas naturais” que permitem as junções de diferentes partículas dos solos. Tais agentes podem ser diferentes, dependendo do grupo de agregado e, tal diferença pode implicar em uma maior força de interação entre as partículas, assim como em uma maior ou menor estabilidade dos agregados frente aos produtos metabólicos excretados pelos microrganismos.



**Figura 2.** Representação de um agregado e dos diferentes organismos envolvidos com sua manutenção.<sup>7</sup>

Considerando-se o fato de que o solo pode acumular muito carbono e que os microrganismos do solo (biomassa microbiana) são agentes de transformação da matéria orgânica e dos nutrientes, também sendo responsáveis pela maioria dos processos-chave que ocorrem nesses ambientes, pode-se compreender o fato de que tais formas de vida sejam cruciais quanto à ciclagem de carbono na biosfera.<sup>14</sup>

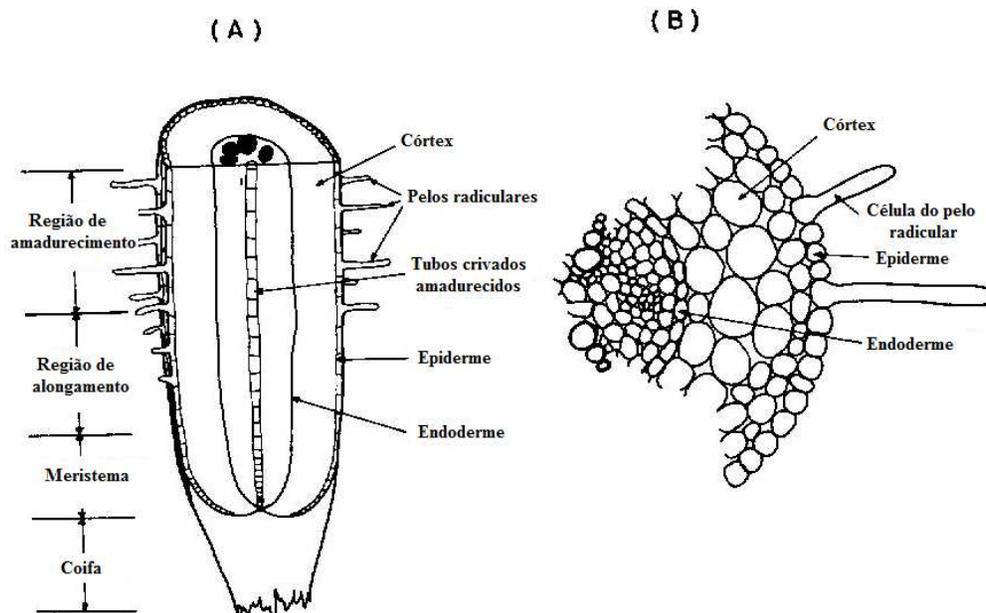
Em termos ecológicos, as comunidades dos organismos presentes nos solos podem ser impactadas de diferentes maneiras, como nas seguintes situações: mudanças climáticas<sup>14</sup> e também pela ação antropogênica, como nos casos das contaminações com metais pesados prejudiciais aos microrganismos<sup>16,17</sup>, ou pelos pesticidas como os herbicidas, que podem causar mudanças nas populações microbianas ao influenciarem suas atividades metabólicas.<sup>18</sup>

Todavia, não são somente os compostos sintetizados pelos seres humanos e os fatores climáticos que podem afetar a microbiota do solo, pois as plantas por meio das suas raízes podem também influenciá-la. Tal situação pode ser ilustrada com a rizosfera, que é a zona do solo que sofre a influência das raízes<sup>19</sup>, além de ser uma região em que se concentram as mais intensas atividades microbianas no solo<sup>20</sup> e ser o local onde se encontra a maior biodiversidade em nosso planeta. Conseqüentemente, poder-se-ia dizer

que a rizosfera é provavelmente o hábitat mais dinâmico do planeta Terra.<sup>21</sup>

O papel das raízes (Figura 3) começa com a fixação da plântula no solo e com a absorção de água. Neste caso, as raízes promovem a condução ao longo da planta de nutrientes minerais, íons inorgânicos, água, e etc, além de atuarem como depósitos de nutrientes.<sup>22</sup> A colonização radicular por microrganismos é afetada por fatores bióticos (p. ex., através dos exsudatos) e abióticos, tais como as dinâmicas das populações microbianas, as características das plantas e os tipos dos solos.<sup>23</sup>

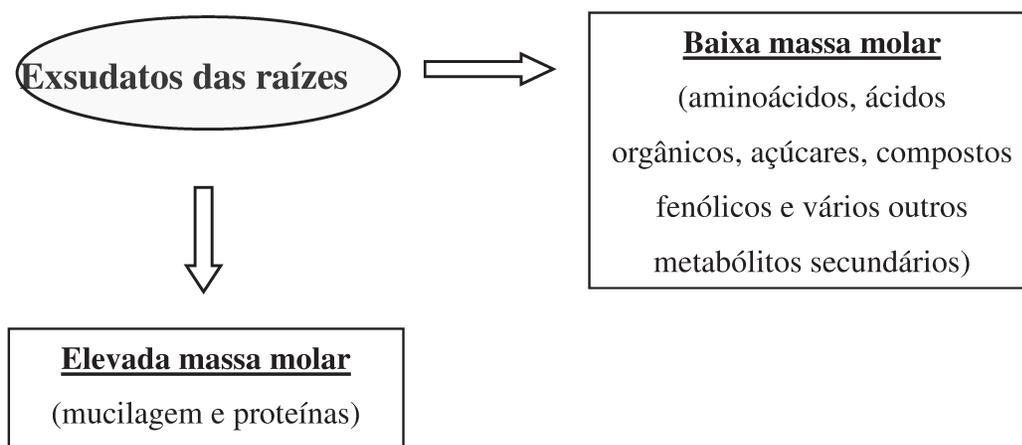
Quando as sementes germinam e originam as raízes, passa a ocorrer a liberação de material orgânico vegetal (i.e., exsudatos), o que favorece o desenvolvimento de populações microbianas ativas ao redor da raiz, cuja influência é conhecida como efeito rizosférico.<sup>24</sup>



**Figura 3.** Representação esquemática da raiz de uma planta com suas diferentes partes.  
<sup>22</sup> (A) Corte longitudinal do eixo principal de uma raiz; (B) Corte transversal da raiz. As raízes das plantas liberam exsudatos, os quais influenciam a microbiota dos solos.

Dentre os diferentes tipos de compostos orgânicos que podem ser liberados pelas raízes há os **exsudatos**<sup>19,25</sup>, que são compostos orgânicos que podem ser classificados em: **compostos de elevada massa molar** e **compostos de baixa massa molar** (Figura

4).<sup>26</sup> Ademais, sabe-se que cerca de 5 a 21% do carbono fixado fotossinteticamente é transferido à rizosfera através dos exsudatos radiculares, o que regula a comunidade microbiana do solo, pois há muita competição em relação aos outros sistemas radiculares presentes<sup>26</sup>. Dessa forma, tais exsudatos representam um tipo de mecanismo adotado pelos vegetais com o intuito de se garantir a manutenção das vidas dos vegetais em seus respectivos ambientes naturais.



**Figura 4.** Fluxograma representando a classificação química dos exsudatos radiculares.

Em termos funcionais, os exsudatos são capazes de atrair ou de repelir quimicamente organismos, atuando desse modo como “mensageiros” químicos ao longo de uma estreita zona do solo imediata ao sistema radicular, o que permite a iniciação das interações entre as raízes e os microrganismos existentes em tais ambientes.<sup>25</sup>

Por meio da exsudação de uma ampla variedade de compostos, as raízes podem regular a comunidade microbiana do solo ao seu redor, favorecendo simbioses, alterando os atributos químicos e físicos do solo, além de poderem inibir o crescimento de espécies vegetais competidoras.<sup>26</sup>

Além disso, a liberação de material orgânico pelas raízes (rizodeposição) incrementa o crescimento microbiano e permite a orientação quanto às estruturações das

comunidades microbianas na rizosfera, favorecendo a certas populações microbianas, as quais passam a formar biofilmes nas raízes.<sup>27</sup>

Na rizosfera, as bactérias são encontradas em colônias e na forma de cadeias constituídas por células individuais, podendo ocupar de 4 a 10% da área radicular, resultando em uma competição intensa. Como consequência, sabe-se que a densidade bacteriana na rizosfera é enorme, podendo chegar a  $10^9$  bactérias por grama de solo dessa região.<sup>25</sup>

Entrementes, os fungos filamentosos e os actinomicetos são observados com pouca frequência nessa região, ao passo que os protozoários são relativamente abundantes e estão presentes ao longo de filmes aquosos em pelos radiculares, mais precisamente sobre o tecido epidérmico.<sup>28</sup>

## 1.2. Os pesticidas e os solos.

“Only within the moment of time represented by the present century has one species -  
- man -- acquired significant power to alter the nature of the world.”

— Rachel Carson, *Silent Spring*

Os pesticidas ou defensivos agrícolas são agentes químicos responsáveis pelo aumento nos rendimentos das lavouras, mas que também podem causar impactos ambientais<sup>29</sup>, pois constituem contaminantes ímpares nos ambientes, sendo normalmente sintetizados para serem tóxicos de alguma forma.<sup>30</sup> Idealmente, um pesticida deve ser tóxico somente ao organismo-alvo, ser biodegradável e deve originar resíduos que não afetam outras estruturas além de seus alvos.<sup>31</sup>

Essas substâncias podem ser classificadas com base em diferentes critérios. Se o critério a se considerar for o organismo-alvo, por exemplo, os defensivos podem ser classificados como: inseticidas, fungicidas, etc. No entanto, se o critério for o tipo da estrutura química, eles podem ser classificados de acordo com a função química e em

contrapartida, recebem denominações, tais como: organofosforados, carbamatos, alifáticos, etc. Por fim, os pesticidas podem ser classificados com base no tipo de formulação (líquidos, sólidos ou gasosos).<sup>32</sup>

Em termos históricos, os empregos dos pesticidas não é recente, pois nas épocas dos Sumérios, dos Gregos e dos Romanos já eram empregadas substâncias, tais como: enxofre, mercúrio, arsênico, cobre e extratos vegetais, com o intuito de se combater pestes.<sup>33</sup>

Dentre os pesticidas mais recentes, os organoclorados (p.ex., o DDT\*) foram empregados com sucesso para o controle de doenças como a malária e o tifo, sendo banidos nos anos de 1960 na maioria dos países desenvolvidos. Então, surgiram outros defensivos como os organofosforados, nos anos de 1960, enquanto que os carbamatos passaram a ser utilizados nos anos 1970, os piretróides nos anos 1980 e tempos depois, os herbicidas e os fungicidas foram introduzidos entre os anos 1970 e 1980.<sup>34</sup>

A indústria dos defensivos agrícolas é muito lucrativa e sabe-se que seu mercado foi avaliado em US\$ 30 bilhões em 1995<sup>35</sup> e em aproximadamente US\$ 35 bilhões, no ano seguinte. Esse mercado está em franca expansão, principalmente considerando-se o fato de que a população mundial é expressiva, contabilizando atualmente cerca de 6 bilhões de pessoas, havendo projeção de que seja de 9 bilhões nos próximos anos.<sup>36</sup>

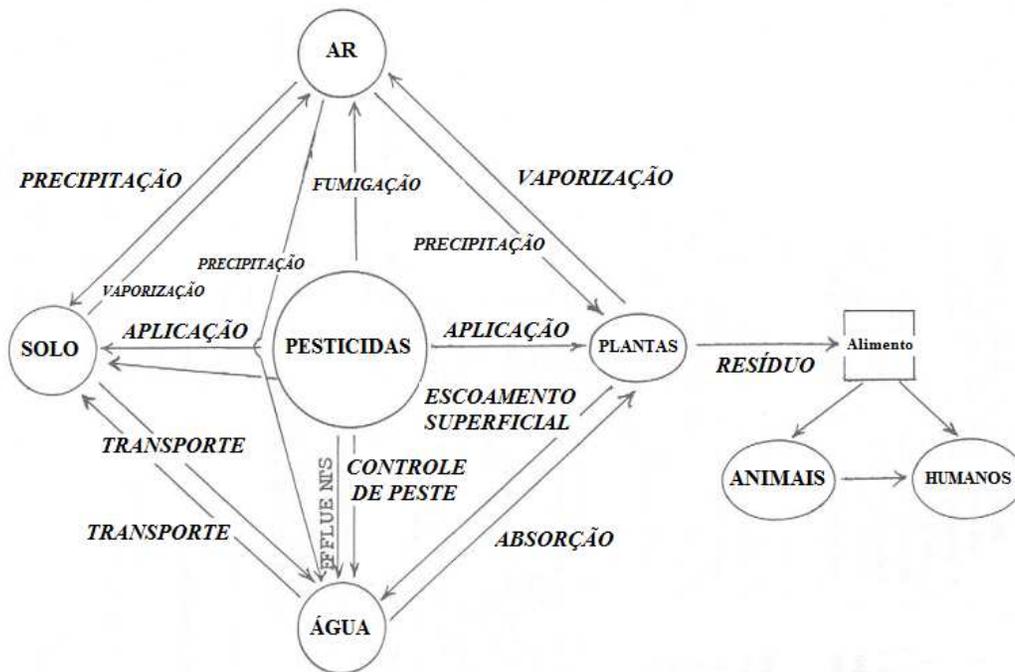
A Europa é atualmente a maior consumidora de pesticidas no mundo, seguida pela Ásia. Todavia, em termos de produção, a China, os Estados Unidos, França, Brasil e o Japão são os maiores produtores, consumidores ou negociantes de pesticidas.<sup>37</sup>

Enquanto o emprego mundial dos pesticidas vem aumentando, também vêm aumentando as evidências quanto aos seus efeitos adversos na natureza,<sup>38</sup> pois esses produtos são tóxicos e tornam-se particularmente perigosos quando empregados de maneira inapropriada.<sup>39</sup>

Atualmente, estima-se que entre 500 mil e 2,9 milhões de pessoas no mundo são envenenadas anualmente pelos pesticidas, com uma taxa de mortalidade igual a aproximadamente 1%.<sup>40</sup> Há também estudos indicando que as exposições a esses

compostos químicos estão associadas a problemas de saúde, como: problemas respiratórios, problemas de memorização, problemas dermatológicos, tumores, depressão, problemas neurodegenerativos como o “mal de Parkinson”, abortos espontâneos e “efeitos teratogênicos”.<sup>41,42</sup>

Em termos dissipativos, os pesticidas podem ser considerados como poluentes orgânicos persistentes e recalcitrantes (i.e., de degradação difícil), podendo contaminar: solos, sedimentos e águas subterrâneas, como ocorre com os pesticidas aromáticos clorados, aromáticos polinucleares, heterocíclicos e os nitroaromáticos.<sup>43</sup> Sabe-se também que os pesticidas podem estar presentes ou geram resíduos em alimentos, no ambiente e em tecidos vivos, podendo se deslocar de diversas formas a partir das áreas agrícolas, logrando atingir outras regiões, inclusive em diferentes continentes (Figura 5).<sup>44</sup>

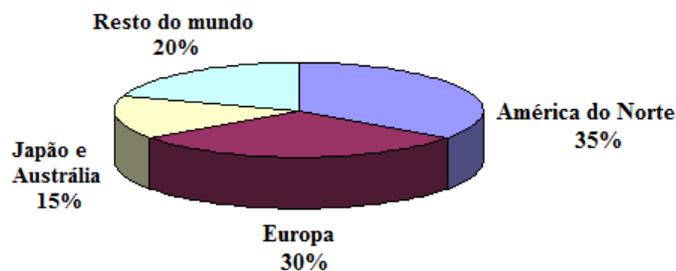


**Figura 5.** Fluxograma representando as possíveis vias de contaminação dos pesticidas.<sup>38</sup>

### 1.2.1. Os herbicidas e a atrazina.

Durante os desenvolvimentos das lavouras, as ervas daninhas devem ser controladas de forma que não possam afetar de modo adverso os rendimentos e as qualidades das culturas cultivadas.<sup>45</sup> Para que isso ocorra, pode-se empregar os herbicidas, que agem ao nível dos sítios metabólicos e de transferência de energia nas células vegetais.<sup>46</sup> Não obstante, dentre os efeitos indesejáveis dos empregos dos herbicidas pode-se mencionar o desenvolvimento de resistência das ervas daninhas, graças ao emprego repetitivo desses compostos.<sup>47</sup>

Os países mais desenvolvidos tendem a empregar mais herbicidas, ao contrário dos países em desenvolvimento, os quais empregam mais inseticidas (Figura 6).<sup>48</sup> Em 2008, o Brasil ultrapassou os Estados Unidos e assumiu o posto de maior mercado mundial de agrotóxicos. Na safra que envolveu o segundo semestre de 2010 e o primeiro semestre de 2011, o mercado nacional de vendas de agrotóxicos movimentou 936 mil toneladas de produtos, dos quais os herbicidas representaram 45%.<sup>49</sup>



**Figura 6.** Utilização de herbicidas em função da área geográfica.<sup>48</sup>

Além da aplicação direta na lavoura, os herbicidas também podem ser empregados em: acostamentos de rodovias, jardins, áreas industriais, áreas de conservação florestal, etc., com o intuito de se combater ervas daninhas e de se reduzir o risco de incêndios<sup>50</sup>. No entanto, alguns herbicidas podem ser administrados em animais, na forma de injeção ou combinados com a alimentação, sendo capazes de controlar

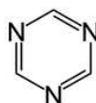
parasitas.<sup>51</sup>

Um exemplo clássico do emprego inadequado de herbicidas ocorreu com o “agente laranja”, o qual foi utilizado como uma arma química de guerra, durante a guerra do Vietnã (1961-1971). Esse agente é um desfolhante que constitui uma mistura dos ésteres n-butílicos dos herbicidas 2,4-D (ácido 2,4- diclorofenoxiacético) e o 2,4,5-T (ácido 2,4,5 – triclorofenoxiacético).<sup>52</sup> Naquela época, essa mistura foi pulverizado em quantidades muito maiores que as empregadas para se controlar ervas daninhas.<sup>53</sup>

Soube-se que esse produto corresponde a um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de próstata<sup>54</sup>, além de ter sido descoberto que ele continha dentre seus contaminantes uma dioxina conhecida como 2,3,7,8-tetraclorodibenzodioxina (TCDD), que pode causar sérios efeitos na saúde humana e que, segundo alguns estudiosos, resultou em um aumento na incidência de anomalias congênitas.<sup>55</sup>

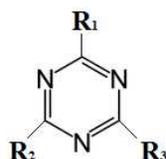
A maioria dos herbicidas aplicados nas lavouras é absorvida pelas plantas ou é transformada (degradada) no solo.<sup>56</sup> Todavia, alguns desses compostos vêm ingressando na biosfera na forma de compostos químicos tóxicos persistentes,<sup>57</sup> como metabólitos, e estão presentes em: águas subterrâneas,<sup>58,59</sup> águas superficiais<sup>60,61</sup> ou acumulados em peixes e algas.<sup>62</sup>

Dentre os herbicidas conhecidos, a classe dos derivados triazínicos (Tabela 1) foi investigada inicialmente em 1952, pela companhia J. R. Geigy S.A., em Basle, Suíça, tendo sido considerados como herbicidas potenciais<sup>63</sup>. A maioria das triazinas é derivada da s-triazina (Figura 7), um composto heterocíclico que contém seis átomos, destacando-se os de nitrogênio que se encontram arranjados simetricamente nas posições 1, 3 e 5, podendo apresentar substituintes nas posições: 2, 4 e 6.<sup>64</sup>



**Figura 7.** Fórmula estrutural da s-triazina

**Tabela 1.** Alguns derivados triazínicos conhecidos e seus nomes químicos e substituintes, respectivos.<sup>62</sup>



Nome comum	Nome Químico	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
Ametrina	2 - (etilamino) - 4 - (isopropilamino) - 6 - (metiltio) - s - triazina	- SCH <sub>3</sub>	- NH.iso-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	- NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Atratona	2 - (etilamino) - 4 - (isopropilamino) - 6 - metóxi - s - triazina	- OCH <sub>3</sub>	- NH.iso-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	- NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Atrazina	2 - cloro - 4 - (etilamino) - 6 - (isopropilamino) - s - triazina	- Cl	- NH.iso-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	- NC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Clorazina	2 - cloro - 4,6 - bis (dietilamino) - s - triazina	- Cl	- NH(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	- N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>
Desmetrina	2-(isopropilamino)-4-(metilamino)-6-(metiltio) - s - triazina	- SCH <sub>3</sub>	- NH.iso-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	- NHCH <sub>3</sub>
Ipazina	2-cloro-4-(dietilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina	- Cl	- NH.iso-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	- N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>
Prometona	2,4 - bis(isopropilamino)-6-metóxi-s-triazina	- OCH <sub>3</sub>	- NH.iso-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	- NH.iso-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
Prometrina	2,4 - bis(isopropilamino)-6-(metiltio)-s-triazina	- SCH <sub>3</sub>	- NH.iso-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	- NH.iso-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
Propazina	2 - cloro - 4,6 - bis(isopropilamino) - s - triazina	- Cl	- NH.iso-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	- NH.iso-C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>
Simazina	2 - cloro - 4,6 - bis (etilamino) - s - triazina	- Cl	- NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	- NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Simetona	2 - bis (etilamino) - 6 - metóxi - s - triazina	- OCH <sub>3</sub>	- NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	- NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Simetrina	2,4 - bis (etilamino) - 6 - (metiltio) - s - triazina	- SCH <sub>3</sub>	- NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	- NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Terbutin	2-(terc-butilamino) - 4 - (etilamino) - 6 - (metiltio) - s - triazina	- SCH <sub>3</sub>	- NH.terc-C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	- NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>
Trietazina	2 - cloro - 4 - (dietilamino) - 6 - (etilamino) - s - triazina	- Cl	- N(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	- NHC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>

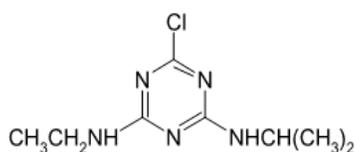
As triazinas constituem um grupo de herbicidas que é muito consumido no mundo, especialmente nos Estados Unidos, onde a atrazina é o segundo herbicida mais comercializado<sup>65</sup>, sendo que esse país é o que mais o consome<sup>66</sup>. Além disso, deve-se destacar que nessa nação aproximadamente 75% das lavouras de milho é tratada com esse tipo de pesticida.<sup>67</sup> Uma das razões da grande utilização das triazinas se refere à flexibilidade quanto à sua aplicação, além da capacidade que apresenta de poder se misturar com outros herbicidas, proporcionando um amplo espectro para o controle de ervas daninhas.<sup>68</sup>

A aplicação extensiva das triazinas ao longo de muitos anos, aliada à sua persistência, pode resultar na contaminação de solos e da água subterrânea.<sup>69</sup> Sabe-se que a maior parte das triazinas é perdida no ambiente por meio da água superficial, podendo se salientar que os eventos mais importantes dessa natureza ocorrem aproximadamente duas semanas após suas aplicações.<sup>70</sup>

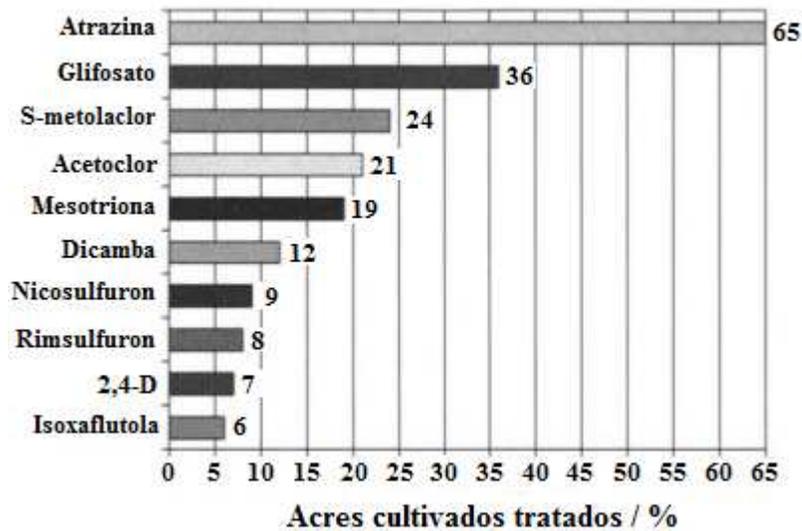
Dentre os herbicidas triazínicos é bem conhecida a **atrazina** [2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina] (Figura 8), cujo emprego anual no mundo é estimado em 111000 t<sup>71</sup> e que é aplicada frequentemente em combinação com outros herbicidas, sendo seletiva<sup>72</sup> e efetiva<sup>73</sup>.

Outrossim, ela pode ser empregada em pré e pós-emergência com o intuito de controlar ervas daninhas anuais, perenes e as de folhas largas.<sup>74</sup> No Brasil, a atrazina é muito empregada em lavouras de cana-de-açúcar e de milho, culturas que ocupam o segundo e o terceiro lugar, respectivamente, na produção nacional anual.<sup>75</sup>

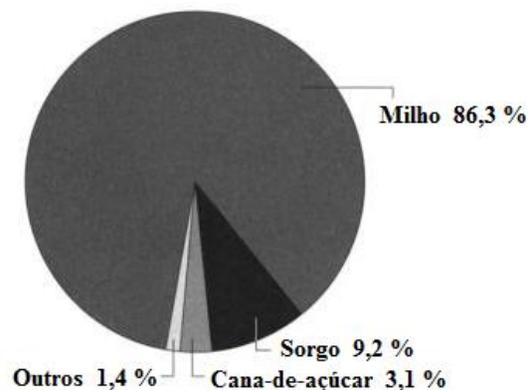
Em termos de seus efeitos na saúde do ser humano, sabe-se que a atrazina também pode atuar como um disruptor endócrino<sup>77,78</sup>, enquanto que em termos ambientais, é digno de nota o fato de que nos Estados Unidos é o poluente mais suscetível de ser encontrado em lagos e córregos.<sup>76</sup> Alguns dados interessantes sobre a utilização da atrazina nos Estados Unidos estão indicados nas Figuras 9 e 10.



**Figura 8.** Fórmula estrutural da atrazina.



**Figura 9 .** Os 10 herbicidas mais empregados no cultivo do milho nos Estados Unidos em 2005 em função dos acres de terra tratados (% dos acres cultivados).<sup>67</sup>



**Figura 10 .** Utilização média da atrazina por lavoura nos Estados Unidos no período de 2000 - 2002.<sup>67</sup>

A atrazina pode ser transportada aos córregos por meio do fluxo de água superficial que se desloca entre as partículas de argila e de matéria orgânica e em solução, principalmente quando há precipitação pluviométrica forte sobre o local de aplicação do herbicida<sup>76,77</sup>, fato que motivou a União Européia a bani-la em 2004.<sup>78-80</sup>

Reforçando-se o que foi destacado anteriormente, em termos clínicos esse herbicida é capaz de interferir no sistema endócrino em seres humanos, ou seja, é capaz

de influenciar nas atividades dos hormônios nestes organismos.<sup>80,81</sup>

Especificamente nos Estados Unidos, a atrazina corresponde a um dos herbicidas mais empregados, principalmente no controle de muitos tipos de ervas daninhas de folha larga e de algumas gramíneas<sup>79</sup> em lavouras de milho e sorgo<sup>82</sup>, apresentando seletividade além de poder ser empregada na pré- ou pós-emergência.<sup>83</sup>

Em termos de propriedades, a atrazina é pouco volátil, apresentando meia-vida sob condições de neutralidade de aproximadamente 200 dias, mas que também pode variar de 4 a 57 semanas dependendo de vários fatores ambientais, tais como: o pH do meio, a umidade, a temperatura e a atividade microbiana.<sup>84</sup> Ademais, ela apresenta uma solubilidade em água de apenas 33 ppm (33 mg L<sup>-1</sup>), a temperatura de 20 °C.<sup>84</sup>

O modo de ação desse herbicida ocorre ao nível dos cloroplastos, inibindo a reação de Hill e sua respectiva fosforilação não-cíclica em certas ervas daninhas, sendo que tal inibição não é eficiente com relação à fosforilação cíclica.<sup>85</sup> Também se sabe que esse composto atua no sítio Q<sub>B</sub> presente no polipeptídeo D1 do fotosistema II<sup>86</sup> o qual está relacionado com a reação de Hill.

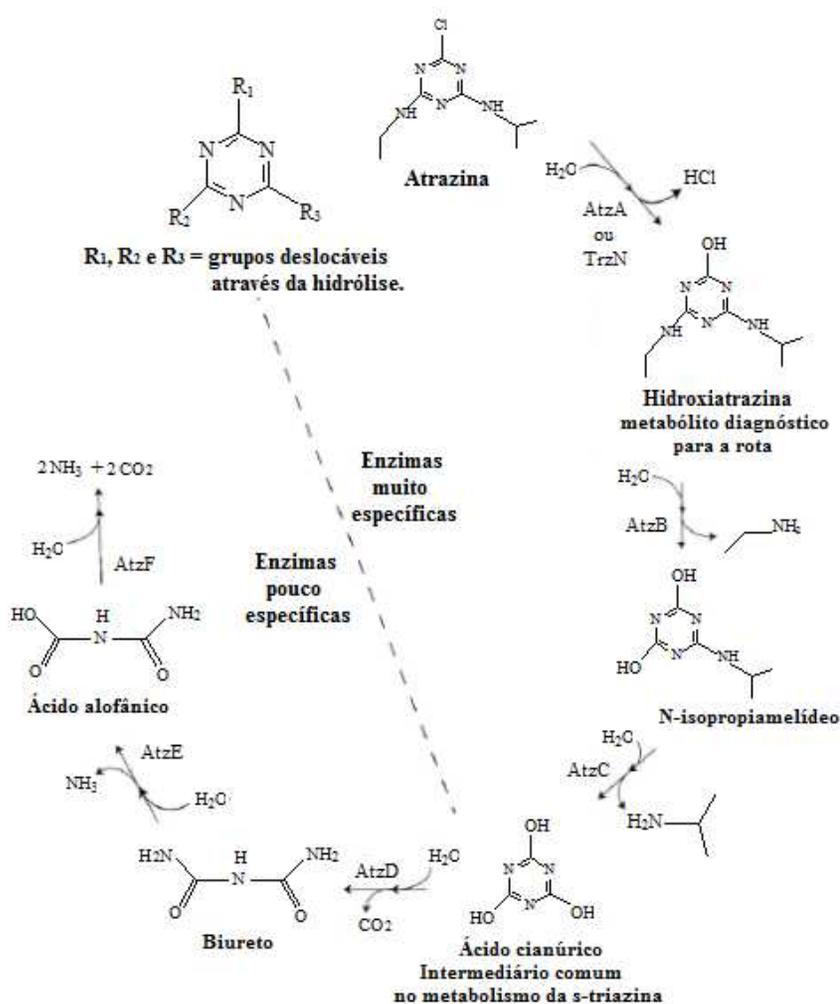
A degradação microbiana constitui o principal mecanismo de dissipação da atrazina no meio ambiente,<sup>87</sup> variando de acordo com o tipo de solo, com a microbiota e com a disponibilidade de carbono e nitrogênio.<sup>88</sup> Tal degradação pode ocorrer por meio de processos bióticos ou abióticos, sendo que nos casos daqueles podem ser destacados os papéis desempenhado pelas plantas e os microrganismos.<sup>89</sup>

Sabe-se também que a biodegradação da atrazina no solo é dependente do espaço, ocorrendo de modo mais lento ao longo das zonas subsuperficiais, resultando nas formações de CO<sub>2</sub> e NH<sub>3</sub>.<sup>90</sup> Inicialmente considerava-se que a atrazina era degradada lentamente e de maneira parcial, predominantemente devido às atuações das enzimas monoxigenases P450 não específicas, as quais não suportam o crescimento microbiano. Não obstante, os microrganismos evoluíram gradualmente como resultado da exposição repetitiva e passaram a ser capazes de mineralizá-la.<sup>91</sup>

O catabolismo bacteriano da atrazina e dos compostos s-triazínicos ocorre via

reações enzimáticas hidrolíticas de deslocamentos de substituintes dos três átomos de carbono do heterociclo (Figura 11).<sup>92</sup> A primeira etapa corresponde à desalquilação, em que há remoção da cadeia etílica lateral, o que geralmente procede à remoção do grupo isopropila.<sup>93</sup>

Em termos mais específicos, certos microrganismos são capazes de degradar a atrazina por meio de reações de N-desalquilação<sup>93,94</sup> ou de desalogenação, o que pode levar ao desenvolvimento de comunidades microbianas que podem utilizar o nitrogênio do anel triazínico.<sup>93,95</sup> Assim, o metabolismo da atrazina pode envolver reações de: hidroxilação, desalquilação, clivagem do heterociclo e desalogenação.<sup>96</sup>

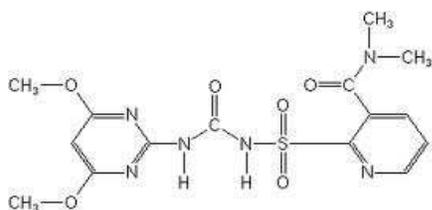


**Figura 11** . Esquema geral do catabolismo microbiano relacionado com os compostos s-triazínicos, o qual é constituído por reações enzimáticas hidrolíticas de deslocamento dos substituintes dos três átomos do heterociclo.<sup>92</sup>

## 1.2.2. As sulfoniluréias e o nicosulfuron.

Um herbicida que vem sendo empregado há pouco tempo é o nicosulfuron [2-[(4,6-dimetóxi pirimidina-2-ilcarbamoil-sulfanoil)-N,N-dimetilnicotinamida], que pertence ao grupo das sulfoniluréias<sup>97</sup> e que apresenta um largo espectro de atuação (Figura 12). Esse herbicida pode ser empregado para se controlar muitos tipos de gramíneas e ervas daninhas de folhas largas, em lavouras de uva, arroz, frutas cítricas, milho, batata e tomate<sup>98</sup>, devendo ser destacado que sua utilização principal ocorre em lavouras de milho.<sup>99</sup>

No tocante à saúde humana, estudos revelam que uma maior exposição a algumas sulfoniluréias está associada a um aumento na mortalidade em indivíduos recentemente tratados contra a diabetes mellitus do tipo 2, devendo ser salientado que as sulfoniluréias são agentes químicos que promovem a liberação da insulina, o que resulta numa redução da hiperglicemia.<sup>100</sup>



**Figura 12.** Fórmula estrutural do **nicosulfuron** [2-[(4,6-dimetóxi pirimidina-2-ilcarbamoil-sulfanoil)-N,N-dimetilnicotinamida].

Do ponto de vista químico, a molécula dessa substância apresenta uma ligação em ponte do tipo piridila-sulfoniluréia, de modo que ela pertence ao grupo das piridilasulfoniluréias substituídas, um grupo que também inclui a outros herbicidas, tais como: rimsulfuron, flupirsulfuron-metila e o flazasulfuron.<sup>101</sup>

Os herbicidas do grupo das sulfoniluréias, como o nicosulfuron, constituem um

grupo de herbicidas pós-emergentes, com uma baixa taxa de aplicação, elevada seletividade e baixa toxicidade a mamíferos, peixes e ao ser humano, não causando efeitos indesejáveis ao meio ambiente<sup>102</sup>, e favorecendo a uma elevação da atividade bioquímica.<sup>103</sup>

Apesar desses atributos positivos, o nicosulfuron apresenta forte capacidade de sofrer transferência para águas subterrâneas, de forma que pode as contaminar.<sup>104</sup> Assim, o interesse ambiental relacionado ao emprego dos herbicidas do grupo das sulfoniluréias está relacionado com a possibilidade destas serem transportados ao longo do ambiente até alcançar as camadas mais profundas do solo, particularmente em solos arenosos, i.e., aqueles pobres em argila, alcançando inclusive o lençol freático.<sup>105</sup> Na Tabela 2 estão indicadas algumas propriedades físico-químicas para o nicosulfuron.

Em termos de mecanismo de atuação, as sulfoniluréias inibem a enzima chamada de *sintase acetolactato* ou *sintase acetohidroxiácida*, em vegetais sensíveis a este herbicida, sendo que tal enzima é a primeira comum à biossíntese dos aminoácidos ramificados: valina, leucina e a isoleucina.<sup>106,107,108</sup> Além disso, todos os herbicidas do grupo das sulfoniluréias apresentam um comportamento incomum de “slow-binding” ou “ligação-lenta” com a enzima, fato este que pode estar relacionado com a eficiência desses herbicidas.<sup>109</sup> Por fim, sabe-se que sob condições que favoreçam a persistência do nicosulfuron, seus resíduos podem afetar o crescimento de plantas suscetíveis por mais que 1 ano após a aplicação, em razão de que seus derivados são muito tóxicos.<sup>110</sup>

**Tabela 2.** Algumas propriedades físico-química do nicosulfuron<sup>111</sup> (Tabela modificada).

Parâmetro	Valor(es) e condições	Pureza / %	Método	Referências
Pressão de vapor	1,6 x 10 <sup>-14</sup> Pa a 25 °C (extrapolado com base em medições de 136,6 °C até 165,9 °C)	desconhecida	Método da efusão Gasosa de Knudsen. Subdivisão D de orientações para avaliações de pesticidas DA US EPA, Série 63-9	Knudsen 1909 USEPA 1982a AMR 1263-88
Ponto de fusão, temperatura de decomposição	Ponto de fusão: 183,3 ± 0,3 °C Temperatura de decomposição: (mudanças de cor) 180 – 190°C	97,9	OECD 102 OPPTS 830.7200	USEPA 1996 <sup>a</sup> DuPont-13183
Densidade	1,4222 g/cm <sup>3</sup> a 20°C	97,9	OECD 109 Método do picnômetro OPPTS 830.7300	USEPA 1996b DuPont-13183
Solubilidade em água	Todas em soluções tamponadas a 25°C* 407 mg/Kg a pH 5 7,1 g/Kg a pH 7 46 g/Kg a pH 9	92 (monohidratado)	Subdivisão D de orientações para avaliações de pesticidas DA US EPA, Série 63-8	USEPA 1982b V9360.D
	Todas em soluções tamponadas a 28°C** 370 mg/L a pH 5 (4,6) 390 mg/L a pH 5 (5,1-5,6) 9,0 g/L a pH 7 (6,3) 15,0 g/L a pH 7 (6,6) 18,0 g/L a pH 9 (7,2) >250 g/L a pH 9 (9)	97,3 (monohidratado)	Subdivisão D de orientações para avaliações de pesticidas DA US EPA, Série 63-8	AMR-1333-88

\* O composto empregado no teste foi a forma monohidratada, enquanto que os resultados estão representados com relação ao nicosulfuron. As densidades das soluções tampão do composto empregado no teste nos valores de pH 7 e 9 foram iguais a 1,11 e 1,05 g mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A densidade da solução no pH 5 não foi medida.

\*\* O composto utilizado no teste foi o monohidratado, enquanto que os resultados são expressados em termos do nicosulfuron. O valor inicial do pH do tampão está indicado, enquanto que o valor final do pH está indicado entre parênteses.

No tocante à degradação, alguns estudos sugerem que os herbicidas da classe das sulfoniluréias podem ser degradados nos solos por meio dos processos de: fotólise, hidrólise e degradação microbiana.<sup>97</sup> Em condições de neutralidade e em pH maior que sete, as sulfoniluréias deixam de ser degradadas através da principal rota que é a hidrólise.<sup>112</sup>

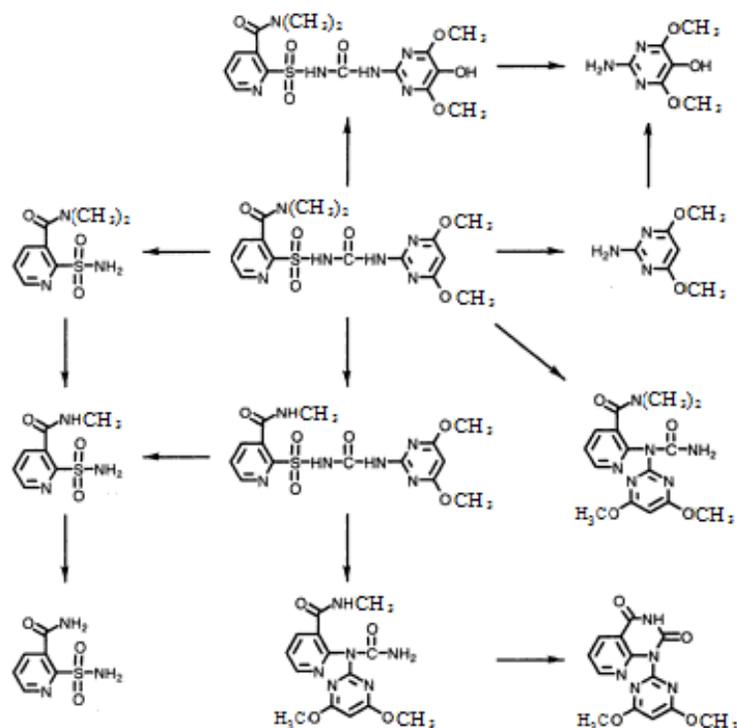
No solo, as sulfoniluréias, que são ácidos fracos, permanecem fracamente

sorvidas, sendo que essa sorção diminui com o aumento do pH, já que a forma aniônica predomina nessa condição, principalmente quando o  $\text{pH} > \text{pK}_a$  ( $\text{pK}_a = 4,3$ ; nicosulfuron).<sup>113</sup>

Os processos químicos e biológicos de degradação do nicosulfuron se combinam nos solos, proporcionando um processo que culmina com uma meia-vida de 1 a 6 semanas no campo, dependendo do tipo de solo e da localização do herbicida.<sup>114</sup> No entanto, também há relato de que menos que 1,3% do nicosulfuron foi mineralizado após 41 dias de incubação, ao se empregar cinco tipos de solo, o que indicaria que a biodegradação não é um processo ambiental importante no solo.<sup>115</sup>

Na literatura também há relato de que a atividade bioquímica do nicosulfuron no solo depende de sua taxa de aplicação e da duração dessa atividade, podendo ser inibida ou estimulada.<sup>116</sup> Ademais, relata-se que diferentes tipos de sulfoniluréias podem resultar numa significativa diminuição da comunidade microbiana do solo.<sup>117</sup>

As rotas gerais de degradação/metabólicas para o nicosulfuron no solo, plantas e animais são similares (Figura 13), ocorrendo inicialmente a clivagem hidrolítica da ligação sulfoniluréia<sup>118,119</sup>, reações de N-desmetilação, desidroxilação na posição 5 do anel pirimidínico<sup>118</sup>, além de uma reação de contração/rearranjo, originando uma estrutura fundida de múltiplos anéis.<sup>118,119</sup> As hidrólises desses herbicidas depende da temperatura e do pH, sendo que a substância na forma neutra sofre esses processos mais rapidamente que as suas respectivas formas iônicas.<sup>120</sup>



**Figura 13.** Rotas metabólicas para o nicosulfuron.<sup>118</sup>

### 1.3. O cafeeiro (*Coffea spp.*) e sua rizosfera.

*"A amizade é semelhante a um bom café; uma vez frio, não se aquece sem perder bastante do primeiro sabor."*

**Immanuel Kant** (1724-1804)

O café (*Coffea spp.*) tem uma grande importância econômica, sendo cultivado em mais de 70 países, além de corresponder a uma das “commodities” mais comercializadas no mundo moderno, perdendo somente para o petróleo.<sup>121,122</sup> No Brasil, é uma das “commodities” mais importantes na atualidade, sendo que o estado do Paraná é um importante produtor na federação.<sup>123</sup> A importância dessa atividade agrícola pode ser compreendida observando-se que a cada dia são consumidas 2,25 bilhões de xícaras de café (infusão) no mundo.<sup>124</sup>

Apesar de existirem mais de 100 espécies de café, duas são as mais importantes

comercialmente: *Coffea arabica* L. (café do tipo arábico), a qual se desenvolve em regiões de altitudes maiores e a *Coffea canephora* p. ex. Fr. (café do tipo canefora ou robusta), que cresce em altitudes menores.<sup>127,128</sup>

A maior parte do sistema radicular do café arábica<sup>139</sup> se concentra na primeira camada de 0,30 m de profundidade do solo, distribuindo-se ao longo de um círculo de aproximadamente 1,50 m de diâmetro ao redor do tronco.<sup>140</sup> As raízes podem apresentar uma superfície de sorção que varia de 400 a 500 m<sup>2</sup>, sendo que seu sistema radicular é muito afetado pelo tipo do solo e pelo teor de minerais.<sup>141</sup>

O cafeeiro se desenvolve melhor em solos bem drenados, podendo crescer em locais pouco profundos devido ao desenvolvimento de uma grande rede de raízes superficiais, destacando-se que os solos ricos em húmus (matéria orgânica) e os levemente ácidos são os mais propícios para o desenvolvimento da planta.<sup>143</sup>

O sistema radicular do cafeeiro é influenciado por um tipo de fungo conhecido como micorriza arbuscular, que é capaz de estabelecer associações simbióticas com as raízes dessa planta<sup>144</sup> e de outros vegetais, levando a um incremento na absorção de nutrientes, particularmente do fósforo.<sup>121</sup>

Os fungos formadores das micorrizas arbusculares têm importância agrícola e ambiental, desempenhando funções-chave em termos da ciclagem de nutrientes, nutrição vegetal e quanto à proteção das plantas frente às situações de estresse ambiental.<sup>145</sup> Outrossim, sabe-se que são estabelecidas relações específicas entre a microbiota da micorrizosfera e os fungos formadores das micorrizas.<sup>148</sup>

Dentre os microrganismos que podem ser influenciados pela rizosfera do cafeeiro há o procarionte *Acetobacter diazotrophicus*, uma bactéria fixadora do nitrogênio. A possibilidade do isolamento desse tipo de bactéria pode ser explicada pelo fato de que ela viva dentro dos esporos dos fungos formadores de micorrizas, o que sugere que as *bactérias diazotróficas endofíticas* sejam mais prevalentes do que se pode imaginar.<sup>149</sup>

Além do que foi mencionado anteriormente, supõe-se que o cafeeiro apresenta uma grande quantidade de microrganismos benéficos, presentes na rizosfera, incluindo-

se bactérias solubilizadoras do fosfato, as quais podem contribuir para as necessidades nutricionais da planta.<sup>150</sup> Um outro exemplo de microrganismos que pode estar presente na rizosfera do cafeeiro são as bactérias do gênero *Burkholderia*, como no caso da bactéria *B. kururiensis*, que apresenta a capacidade de fixar o nitrogênio.<sup>151</sup>

#### **1.4. O milho (*Zea mays* L) e sua rizosfera.**

O milho (*Zea mays* L) é um membro da família das gramíneas que se originou nas Américas central e do sul, correspondendo à cultura mais importante no mundo após o trigo e o arroz, com relação às áreas cultivadas e à produção total.<sup>152,153</sup>

O cultivo do milho exige irradiação solar abundante, sendo que a taxa de maturação desse vegetal é influenciada pela duração do dia<sup>160</sup>. Além disso, o solo deve ter textura média, com teores de argila entre 30-35%, ou seja, deve ser argiloso, de modo a permitir uma drenagem adequada e a uma boa capacidade de retenção de água e de nutrientes importantes à planta.<sup>161</sup>

O milho apresenta um sistema radicular fibroso, cuja estrutura e arquitetura está relacionada com a absorção d'água e de minerais,<sup>162</sup> e com a ancoragem da planta ao solo.<sup>163</sup> Este sistema apresenta dois tipos de raízes: as raízes primárias ou seminais, que se originam no embrião e as raízes secundárias que se originam em espirais presentes nas bases dos internós individuais do caule.<sup>164</sup>

O pH, o potencial hídrico, a textura e a disponibilidade de nutrientes, assim como as populações microbianas existentes, podem ser influenciados pelos exsudatos da raiz do milho, os quais podem ser ácidos orgânicos, açúcares, compostos aromáticos e enzimas, que levam ao crescimento e desenvolvimento do vegetal.<sup>165</sup>

Na rizosfera do milho, o principal exsudato liberado é o composto DIMBOA (2,4-dihidróxi-7-metóxi-2H-1,4-benzoxazina-3(4H)-ona, que é capaz de atrair a bactéria *Pseudomonas putida*.<sup>166</sup> Neste local também há diversificação das comunidades microbianas, sendo que tal diversidade é hereditária e sofre significativa

influência do ambiente, através de interações do tipo planta-microbiota.<sup>167</sup> Há também neste sítio microrganismos do gênero *Serratia*, os quais podem exercer funções ecológicas que são extremamente diferentes, tais como: patógenos de plantas, agentes de biocontrole de patógenos de plantas, promotores do crescimento de plantas e simbioses de insetos.<sup>168</sup>

Dentre os microrganismos presentes na rizosfera do milho também pode ser destacada a bactéria *Burkholderia cepacia*, a qual representa aproximadamente 4% das rizobactérias totais culturáveis<sup>169</sup>, também tendo sido relatadas as presenças de populações que variavam de 4 a 35% do total das bactérias culturáveis da rizosfera dessa gramínea.<sup>170</sup> O complexo de bactérias do qual é integrante a *B. cepacia* (complexo *B. cepacia*) estimula o crescimento da planta, além de conferir atividades antifúngicas na rizosfera, sendo que alguns desses microrganismos também podem degradar compostos aromáticos clorados.<sup>171</sup> Por fim, a *B. Burkholderia* também pode inibir o fungo fitopatogênico *Fusarium spp.*<sup>172</sup>

## **1.5. A microcalorimetria isotérmica e sua aplicação ao estudo do solo.**

Todos os processos naturais ocorrem com absorção ou liberação de energia na forma de calor, e este pode ser monitorado adequadamente com um instrumento da primeira lei da termodinâmica, conhecido como calorímetro.<sup>173</sup> Dentre os diferentes tipos de calorímetro, o microcalorímetro isotérmico é o que permite o monitoramento mais adequado e contínuo da dissipação de energia relacionada com as atividades biológicas de organismos vivos<sup>174-176</sup>.

Outrossim, a calorimetria é uma técnica não-destrutiva, não requerendo muito tempo para que possa ocorrer o preparo da amostra,<sup>175</sup> sendo muito precisa<sup>176</sup>, muito embora não seja específica. Dessa forma, os sinais calorimétricos registrados, representam um somatório de todos os processos que ocorrem no vaso calorimétrico.<sup>177</sup> Essa não-especificidade significa, também, que sinais térmicos de diferentes processos

podem ou não ser distinguidos diretamente no sinal registrado pelo calorímetro, dependendo de sua simultaneidade no tempo e do tempo de resposta do calorímetro.

A calorimetria é, também, uma técnica particularmente útil para se estudar processos em fase sólida<sup>178</sup>, tais como nos casos dos estudos relacionados com as estabilidades de fármacos e explosivos e a caracterização da cinética e da termodinâmica da hidratação do cimento.<sup>179</sup>

Dentre as aplicações da técnica calorimétrica para se monitorar a atividade biológica, interessam particularmente aquelas relativas com as avaliações das atividades microbianas em solos<sup>178,180-182</sup>, o que permite a obtenção de informações bastante confiáveis sobre a quantidade de carbono assimilado, a formação de biomassa viva em função da fonte energética<sup>183</sup> e a respeito da cinética do crescimento microbiano e da degradação de nutrientes.<sup>184</sup>

As metodologias tradicionais que são empregadas para se quantificar as atividades microbianas em solos são: fumigação<sup>185</sup>, avaliação da respiração ou respirometria<sup>186</sup>, quantificação do CO<sub>2</sub><sup>187</sup>, quantificação do ATP<sup>188</sup>, atividade da enzima desidrogenase<sup>189</sup> e degradação de glicose marcada com <sup>14</sup>C.<sup>190</sup> Não obstante, a microcalorimetria isotérmica, por seu lado, é bastante apropriada para avaliar a atividade metabólica, pois, além de ser muito sensível, é uma ferramenta analítica não destrutiva, o que permite a utilização da amostra em outro estudo.<sup>191</sup>

Neste documento, optou-se por explicar em profundidade a microcalorimetria isotérmica na parte de materiais e métodos (Seção 5), de modo a facilitar o entendimento do protocolo que foi seguido com as respectivas condições e de como foi obtida grande parte dos parâmetros físico-químicos estudados nesse trabalho.



## **2. Objetivos**

**Objetivo geral:** Investigar por via calorimétrica as possíveis influências de herbicidas nas atividades microbianas de diferentes solos, e quanto à emissão de CO<sub>2</sub>.

### **Objetivos específicos:**

- 1- Investigar a influência da adição da atrazina no metabolismo da glicose em um Latosolo Vermelho da região de Pirassununga (SP), cultivado com cana de açúcar e mantido sob condição de estresse, devido a um processo de envelhecimento ao longo de 3 anos.
- 2- Investigar a influência da adição do nicosulfuron no metabolismo da glicose em um Latosolo de áreas de cultivo de café e milho, e de uma região de mata nativa da região de Carmo do Rio Claro (MG).



### **3. Materiais e métodos**

#### **3.1. Coleta das amostras de solo.**

Para a realização dos estudos com a atrazina foram utilizadas amostras de Latossolo Vermelho, oriundas da região de Pirassununga – SP (21 ° 56'33, 54 "S, 47 ° 19'51, 85" O). Após a coleta, as amostras foram secadas ao ar por aproximadamente 24h e foram submetidas posteriormente ao processo de peneiramento, empregando-se peneira com diâmetro de malha igual a 2 mm. O material obtido foi acondicionado em embalagens de polietileno, e armazenado a temperatura de 4 °C, por aproximadamente 3 meses. Foram empregadas amostras “envelhecidas” para se realizar estudos físico-químicos e biológicos (solos submetidos a uma condição de “estresse”), sendo que tais amostras foram mantidas refrigeradas ao longo de 3 anos, aproximadamente.

Para se realizar estudos com o nicosulfuron foram coletadas amostras de solos de áreas de cultivo de café e de milho, além de uma amostra de solo de uma região de mata nativa ou florestal, localizadas nas proximidades das coordenadas de 20°58'50.24"S 46°03'42.24"O. As demais etapas foram similares ao que foi relatado anteriormente para o caso da atrazina.

#### **3.2. Análises de DSC, TG e elementar (CHN).**

As análises de DSC e de TG das amostras de solos foram realizadas com o intuito de se quantificar o teor da matéria orgânica presente no solo. As análises de DSC foram realizadas em um calorímetro de varredura da *DuPont Instruments*, modelo 910, enquanto que as de TG foram realizadas em um analisador termogravimétrico da *TA Instruments*, modelo 2050. A faixa de temperatura avaliada variou de 298-773 K, em atmosfera oxidante. Com o intuito de se obter os registros de DSC, foi empregado um

porta-amostra que apresentava um pequeno orifício que permitia o escape de gases originados com o aquecimento. Além disso, foi aplicada uma velocidade de varredura de  $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  em ambos os tipos de análise. A análise elementar foi realizada em um aparelho *Perkin Elmer Series II CHNS/O*, modelo 2400.

### 3.3. O pH e o teor percentual de umidade (umidade % g/g).

Foram realizadas as análises de pH em água desionizada, sob temperatura ambiente, empregando-se um pHmetro *Micronal*, modelo B474. Com esse intuito, foram utilizadas 10 g de solo secado ao ar, apresentando partículas de diâmetro menor que 2 mm e que foram mantidas suspensas em 20 mL de água desionizada.

Em seguida, o sistema foi mantido sob agitação durante 30 min, sendo que ao final deste período a suspensão foi mantida em repouso por aproximadamente 1 h. Em seguida, o eletrodo de pH foi submergido no sobrenadante para se determinar o valor de pH.

Para se realizar a determinação do teor de umidade, foram empregadas 10 g de uma amostra de solo que foi mantida a *posteri* em uma estufa, a 378 K, por aproximadamente 12 h. Ao final desse período, realizou-se uma nova aferição da massa da amostra que já que esta se encontrava desidratada. O teor percentual de umidade pôde ser obtido através da equação 14:

$$\text{Umidade \%} = (m_{\text{H}_2\text{O}} / m_s) \times 100\% \quad (\text{eq. 14})$$

em que,  $m_{\text{H}_2\text{O}}$  corresponde à massa d'água eliminada com a secagem na estufa, enquanto que  $m_s$  era a massa do solo antes da secagem.

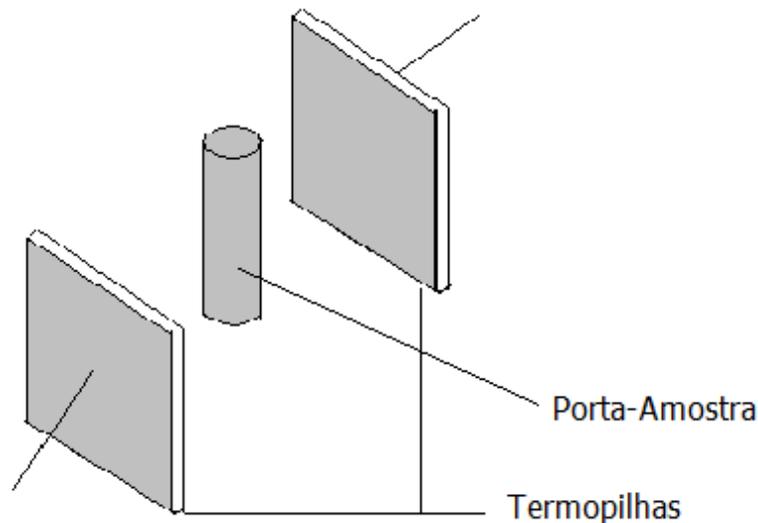
### 3.4. A microcalorimetria isotérmica.

Na seção 3.5 foi mencionado a respeito da aplicação da microcalorimetria isotérmica para se realizar estudos envolvendo sistemas vivos. Neste trabalho foi empregado um microcalorímetro *TAM 2277* (Figura 14), o qual permite monitorar eventos dessa natureza. Tal equipamento é ideal para se monitorar eventos térmicos de curta e de longa duração, sendo que os estudos com solos se enquadram na última condição.



**Figura 14.** Imagem do microcalorímetro isotérmico *TAM 2277*.

Em essência, a cela calorimétrica (i.e., o porta-amostra onde se coloca o solo), encontra-se entre duas termopilhas (Figura 15) e todo o conjunto permanece inserido em um termostato cuja temperatura é mantida constante, enquanto que sua variação é de  $\pm 10^{-4}$  K. Se nenhum evento térmico ocorre na cela calorimétrica, o equipamento registra um sinal contínuo ao longo do tempo, de mesma magnitude, o qual é chamado de “linha base”. Na ocorrência de um processo térmico de qualquer natureza, como no caso do crescimento microbiano, ocorre um fluxo de energia entre as termopilhas, e ele origina um sinal elétrico que é digitalizado na forma de potência ao longo do tempo.



**Figura 15.** Representação simplificada da célula calorimétrica.

Para se realizar os estudos calorimétricos, era adicionado aproximadamente 1 g de solo à ampola calorimétrica, vertendo-se em seguida uma solução específica contendo água ou solução aquosa de glicose (1 mg de soluto em 100  $\mu$ L de solução). Nos casos dos herbicidas estudados (i.e., atrazina e nicosulfuron), foram realizados alguns estudos em que, ao invés da solução de glicose, foram adicionados 100  $\mu$ L de água desionizada, e o sistema era incubado com o herbicida ao longo de aproximadamente 48 h.

Após a adição do soluto ou água desionizada, a ampola era termostatizada e inserida no porta-amostra do calorímetro com o objetivo de se monitorar a energia dissipada. O tipo de registro calorimétrico que pode ser obtido corresponde a uma curva de potência em função do tempo.

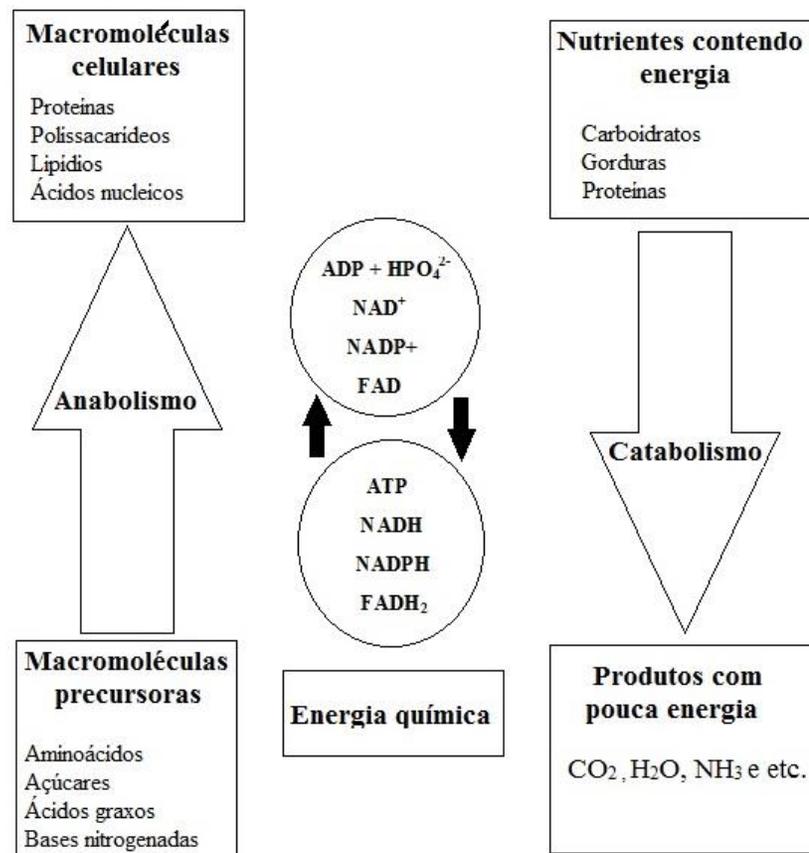
Ademais, foram empregadas as seguintes condições: sensibilidade de 1000  $\mu$ W, coleta de sinal a cada 5 segundos e registro do valor médio dos sinais a cada 300 s, ou seja, a cada 5 segundos o sinal calorimétrico era coletado, enquanto que a cada 300 segundos um valor médio desses sinais era registrado na curva calorimétrica. As variáveis que puderam ser obtidas a partir da curva calorimétrica serão discutidas a seguir.

De uma maneira geral, o metabolismo corresponde à soma de todas as

transformações químicas que ocorrem em uma célula ou organismo, sendo constituídas por uma série de reações catalisadas enzimaticamente (i.e., rotas metabólicas).<sup>192</sup>

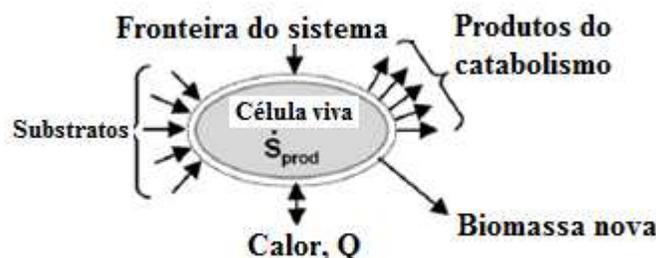
Além disso, o metabolismo pode ser separado em duas componentes: **catabolismo** e **anabolismo**, como mostra a Figura 16. O catabolismo envolve a degradação de substratos orgânicos, normalmente por processos oxidativos, disponibilizando energia química e/ou gerando intermediários metabólicos que podem ser empregados em reações anabólicas subsequentes<sup>193</sup>, enquanto que o anabolismo corresponde ao conjunto dos processos que resultam nas sínteses de componentes celulares, a partir de precursores de baixa massa molecular.<sup>194</sup>

Em termos energéticos, considera-se que o catabolismo ocorre com uma variação negativa de energia livre (ou seja, é exergônico), enquanto que no anabolismo ocorre o inverso (ou seja, é endergônico).



**Figura 16.** Esquema geral modificado do metabolismo nos seres vivos.<sup>194</sup>

O crescimento microbiano ocorre espontaneamente, além de constituir um fenômeno irreversível que está associado a uma produção de entropia e de produtos do catabolismo, como mostra a Figura 17.<sup>195</sup> Esse crescimento é largamente dependente do pH, da temperatura e dos nutrientes.<sup>196</sup>



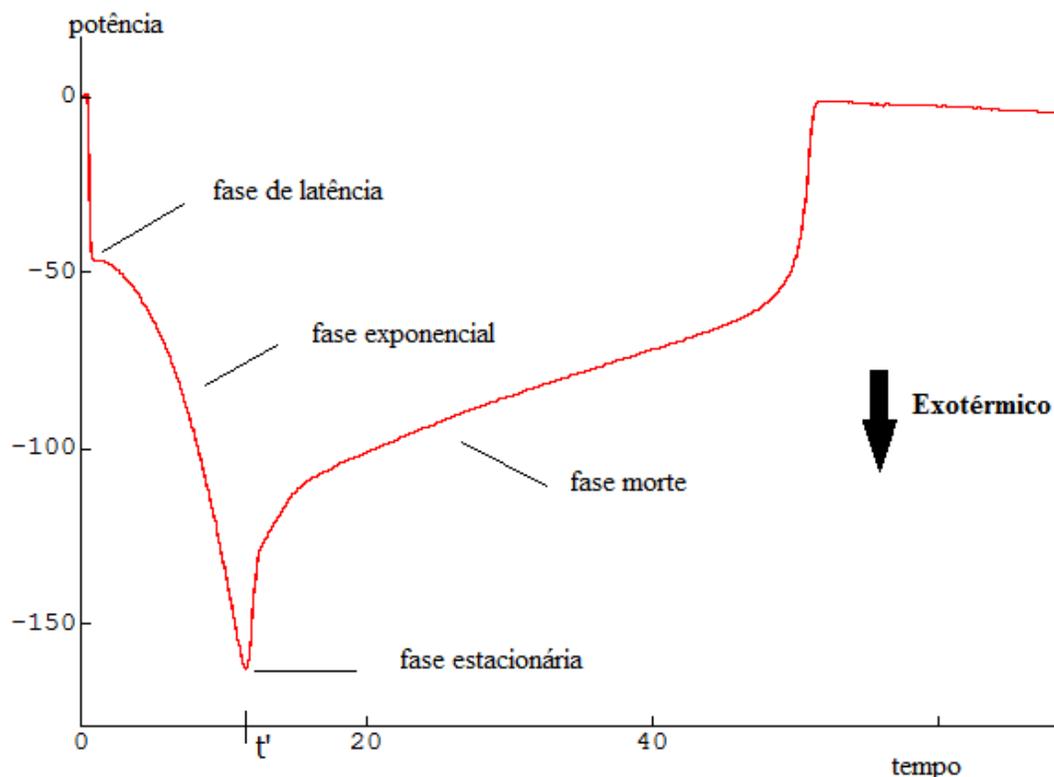
**Figura 17.** Representação generalizada das trocas estabelecidas por uma célula viva com o meio ambiente.<sup>195</sup>

A energia liberada devido ao processo metabólico, não convertida em biomassa, é transferida ao ambiente. Se o ambiente for o de um calorímetro, a parcela que estiver na forma de energia térmica poderá ser detectada pelo calorímetro isotérmico. Assim, a atividade dos microrganismos se relaciona com a energia registrada pelo instrumento na forma de um sinal contínuo ao longo do tempo.<sup>197</sup> O sinal registrado permite a avaliação de variáveis cinéticas e termodinâmicas do processo metabólico, que podem ser acessadas a partir da curva de potência em função do tempo.<sup>198</sup>

Em estudos com solos, por meio da microcalorimetria isotérmica, a glicose tem sido empregada normalmente como o substrato energético, já que seu metabolismo é bastante rápido. Os dados termodinâmicos que podem ser obtidos a partir da curva calorimétrica se baseiam no pressuposto de que toda a energia registrada pelo instrumento está relacionada com a oxidação completa da glicose, como indicado pela equação 1.



Quando os microrganismos degradam a glicose, a variação resultante de entalpia pode ser calculada a partir de uma curva calorimétrica (Figura 18). Considerando-se o perfil dessa curva, sabe-se que há quatro fases distintas: **fase de latência**, **fase exponencial**, **fase estacionária** e **fase de morte**.<sup>199</sup>



**Figura 18.** Exemplo de padrão de curva calorimétrica que pode ser obtido com o crescimento microbiano em solos.<sup>199</sup>

Na fase de latência as células microbianas carecem de muitos constituintes essenciais, de modo que logo após a adição do substrato energético as células são levadas a se adaptarem frente ao novo ambiente. Durante esse período observa-se, por exemplo, as sínteses de novas enzimas que serão necessárias para que possam ocorrer as produções de novos compostos essenciais ao crescimento, ou então para as reações de hidrólise ou metabolização dos compostos presentes.

Outro fato relevante é que a fase de latência pode ser mais ou menos extensa de acordo com o estado da cultura e das condições de crescimento, podendo-se dizer de uma maneira mais simples que ocorre um preparo do “maquinário” celular para degradar o substrato adicionado.

Na fase exponencial há condições favoráveis para que o crescimento celular possa ocorrer e desse modo, as células passam a se dividir exponencialmente.<sup>200</sup> Enquanto todos os nutrientes estão presentes em excesso, os microrganismos se dividem e as populações microbianas crescem segundo uma taxa específica que depende dos seguintes fatores: o potencial genético do microrganismo, a composição do meio de cultura e as condições de crescimento.

No entanto, quando passam a existir carências de nutrientes essenciais, ou há efeitos inibitórios de certos produtos excretados, inicia-se a fase estacionária. Então, interrompe-se a fase exponencial, o que resulta em um aumento nulo ou diminuição da quantidade de células microbianas, o que constitui a fase estacionária.<sup>200,201</sup>

Por fim, na fase de morte ocorre uma perda irreversível da capacidade de divisão celular, o que leva a um declínio da concentração de células viáveis da população microbiana ao longo do tempo.<sup>202</sup>

De uma maneira bem simplificada, a curva da Figura 18 representa fielmente o perfil de uma curva de crescimento microbiano em função do tempo, devendo ser salientado que a cada microrganismo está relacionado um tipo de metabolismo que por sua vez está associado a um padrão de liberação de energia em função do tempo, o que resulta em um perfil *sui generis* para a curva calorimétrica.

A área da curva, que pode ser calculada a partir da integração do registro calorimétrico, corresponde ao valor total da energia dissipada pelos microrganismos (**Q**). Essa energia é uma medida direta da quantidade de substrato metabolizado, além de ser dependente de uma série de fatores, como a quantidade de microrganismos.

Consequentemente, ao se realizar estudos calorimétricos de solos, os valores de energia relacionados devem sempre ser comparativos e normalizados para a massa do solo, muito embora sejam utilizadas massas de solo cujos valores são muito próximos entre si. Portanto, nesse trabalho, a energia registrada pelo calorímetro ( $Q$ ) é normalizada em relação à massa de solo empregada ( $m_{\text{solo}}$ ), com o objetivo de se obter uma energia  $Q'$ , conforme equação 2.

$$Q' = Q / m_{\text{solo}} \quad (\text{eq. 2})$$

A partir do cálculo da variável  $Q'$  pode-se calcular a variação entálpica metabólica ( $\Delta_{\text{met}}H$ ), como indicado na equação 3.

$$\Delta_{\text{met}}H = Q' / n_{\text{subs}} \quad (\text{eq. 3})$$

Em que  $n_{\text{subs}}$  corresponde à quantidade adicionada de substrato. No caso do presente estudo, esse substrato na maioria das vezes corresponde à glicose, pela razão apresentada anteriormente.

A **variação entálpica catabólica**,  $\Delta_{\text{cat}}H$ , representa a parcela da energia total produzida pela célula que é dissipada e que pode ser convertida em trabalho celular (i.e., crescimento, movimento, etc). O parâmetro  $\Delta_{\text{anab}}H$  (**variação entálpica anabólica**) corresponde a fração da energia total liberada pela célula por meio do catabolismo que pode ser convertida em ligações químicas, originando a biomassa, por conseguinte. Por fim, a fração energética gerada com o catabolismo que não é aproveitada para o anabolismo é dissipada ao meio ambiente, sendo chamada de **variação entálpica metabólica**,  $\Delta_{\text{met}}H$  (sendo dependente do calor liberado, da massa de solo e da quantidade de glicose empregada). As grandezas mencionadas acima estão relacionadas através da equação 4.

$$\Delta_{\text{met}}\mathbf{H} = \Delta_{\text{cat}}\mathbf{H} + \Delta_{\text{anab}}\mathbf{H} \quad (\text{eq. 4})$$

Pode-se considerar que a **variação entálpica catabólica** representaria a soma dos processos degradativos do substrato. Para os estudos neste trabalho, como apontado anteriormente, o substrato é a glicose e a equação da degradação (catabolismo) é a da combustão completa dessa substância, cujo valor é igual a 2805 KJ mol<sup>-1</sup>.<sup>205</sup>

Outrossim, a equação 4 pode ser reescrita de modo a permitir o cálculo da eficiência percentual do crescimento microbiano,  $\eta_{\mathbf{H}}$ , o que pode ser logrado com a aplicação da equação 5.

$$\eta_{\mathbf{H}} = [(\Delta_{\text{met}}\mathbf{H} - \Delta_{\text{cat}}\mathbf{H}) / \Delta_{\text{cat}}\mathbf{H}] \times 100\% \quad (\text{eq. 5})$$

O registro calorimétrico também permite obter alguns parâmetros cinéticos, tanto do crescimento microbiano quanto da degradação do substrato. Para o crescimento microbiano, considera-se a **fase exponencial**, na qual os microrganismos são mais ativos metabolicamente, dividindo-se segundo uma equação exponencial.<sup>206</sup>

$$\mathbf{P}_t = \mathbf{P}_1 + e^{k t} \quad (\text{eq. 6})$$

Em que  $\mathbf{P}_t$  corresponde ao valor da potência no *peak time*, ou seja, no instante em que se registra o valor máximo de potência, enquanto que  $\mathbf{P}_1$  corresponde ao valor da potência na **fase de latência** e  $t$  é t-ésimo instante do experimento. A equação 6 pode ainda ser representada em sua forma linearizada (equação 7), o que facilita cálculos da **constante do crescimento microbiano (k)**.

$$\ln \mathbf{P}_t = \ln \mathbf{P}_1 + k t \quad (\text{eq. 7})$$

A **constante de crescimento microbiano, k**, é um importante parâmetro cinético quando se estuda o crescimento de culturas; o mais importante na calorimetria é que essa constante não exige metodologias complexas para sua avaliação, embora ela representa o comportamento global de todos os microrganismos presentes no solo.

Outro aspecto interessante da análise cinética da curva calorimétrica, diz respeito ao tempo necessário para iniciar a **fase de latência** e também o tempo que ela persista até que comece a fase de crescimento. Esses parâmetros são importantes na discussão do real estado do solo e para se compreender como os microrganismos aí presentes se adaptam para consumir um novo substrato. Ainda do ponto de vista cinético, outro ponto relevante é o *peak time*, ou seja, o período tempo necessário para que os microrganismos alcancem a fase estacionária.

Alguns aspectos cinéticos da degradação do substrato podem ser obtidos a partir do registro calorimétrico, por meio de integrações por etapas. Como apontado anteriormente, a integração total da curva calorimétrica fornece a energia resultante dissipada ao meio ambiente pelos microrganismos.

Não obstante, caso a integração seja realizada em função do tempo, ou seja, por meio de intervalos infinitesimais de tempo, os dados obtidos permitem obter informações sobre a cinética de degradação do substrato. Vale a pena ressaltar que essa informação cinética é bem diferente daquela do crescimento microbiano, do valor de *peak time* e da **fase de latência**, que são aspectos relativos ao crescimento microbiano.

Por outro lado, a cada microrganismo presente no solo associa-se uma energia metabólica (potência), de modo que a potência registrada no calorímetro é função da potência térmica de cada microrganismo e de sua respectiva quantidade. Muitos estudos nesse sentido foram realizados, culminando com a proposta de Sparling, que estabeleceu uma equação que relaciona a quantidade de biomassa viva com a potência térmica (equação 8).<sup>207</sup>

$$\log X = 1,025 + 0,856 \log \varphi \quad (\text{eq. 8})$$

Em que  $X$  é a quantidade de biomassa em  $\mu\text{g}$ , relacionada com o valor de potência  $\phi$ . Assim, para se calcular a quantidade de biomassa viva formada no processo de crescimento microbiano,  $\Delta X$ , deve-se aplicar a equação 8 à **fase de latência** e seu respectivo valor de potência no registro calorimétrico, além de aplicá-la à fase estacionária, ou mais precisamente ao seu respectivo valor de potência.

É importante ressaltar que, quando a linha base do registro calorimétrico apresenta um valor de potência diferente de zero, esse valor deve ser considerado nos valores de potência na **fase de latência** e no *peak time*. Sendo assim, ao se utilizar a equação de Sparling deve-se considerar a variação do valor de potência entre a linha base e o ponto considerado (i.e, entre **fase de latência** e a potência relacionada com o *peak time*).

Retornando aos aspectos termodinâmicos do metabolismo da glicose, a partir da variação entálpica metabólica e tendo em consideração a variação entálpica de combustão da glicose, pode-se saber quanto de  $\text{CO}_2$  foi liberado com o processo de crescimento microbiano. Esse é o primeiro passo para se determinar os coeficientes estequiométricos da equação macroquímica que descreve o que ocorre com a adição de glicose ao solo (equação 9).



Inicialmente, estabelece-se que há a formação de 1 mol de  $\text{CH}_{1,8}\text{O}_{0,5}\text{N}_{0,2}$ , o que corresponde à fórmula mínima para a biomassa formada. Assim, as equações de conservação são:

$$\text{Carbono} \rightarrow 6a = 1 + c \quad (\text{eq. 10})$$

$$\text{Hidrogênio} \rightarrow 12a + 0,8 = 1,8 + 2d + 0,2 \quad (\text{eq. 11})$$

$$\text{Oxigênio} \rightarrow 6a + 2b = 0,5 + 2c + d \quad (\text{eq. 12})$$

$$\text{Nitrogênio} \rightarrow c = 0,2 \quad (\text{eq. 13})$$

$$\text{Carga} \rightarrow c = f \quad (\text{eq. 14})$$

O segundo passo é o cálculo do valor da constante **a**, que pode ser calculado ao se considerar que 1 mol de glicose sofre combustão liberando 2805 KJ de energia. Assim, cada **valor de variação entálpica metabólica** que foi calculado deve estar relacionado com uma determinada quantidade de glicose (**quantidade de matéria, n**), que corresponde ao coeficiente **a**. Finalmente, a partir do parâmetro **a**, pode-se calcular os outros coeficientes da equação macroquímica.

### **3.5. Análises microbiológicas.**

Para se realizar as análises microbiológicas de contagem de colônias de bactérias + actinomicetos + leveduras, foram seguidas as etapas descritas abaixo para o solo de mata nativa envelhecido (período de envelhecimento de aproximadamente 3 anos) e para os solos de áreas de cultivo de milho, de café e de área de mata nativa, baseando-se no protocolo adotado pelo **Laboratório de Microbiologia de Solos do IAC-Campinas (Instituto Agrônomo de Campinas)**.

Previamente ao plaqueamento, foi realizada uma pré-incubação de amostras de solo em frascos de Wheaton, a temperatura de 24 °C. Para cada amostra de solo, dois frascos de Wheaton, contendo cada um, 12 gramas de solo, recebiam a solução incubadora. Uma dessas amostras era o controle, enquanto que a outra se destinava ao plaqueamento.

Os dois frascos de Wheaton apresentavam um pequeno orifício na tampa, isolado do meio ambiente devido à utilização de um filme de PET. O período de pré-incubação ao se utilizar a atrazina para o solo envelhecido foi de 24 h, enquanto que nos casos da acetonitrila e do nicosulfuron esse período foi de 48 h. No plaqueamento utilizou-se o meio de cultura **TSA** (“trypticase soy agar”) e um valor de temperatura de 28°C.

### 3.5.1. Estudos com a atrazina.

1. Incubação inicial por 24 horas de 12 g de solo com 2,4 mL da solução de atrazina (Syngenta) em acetonitrila (Aldrich), nas concentrações de 1000 e 2000 ppm.
2. Incubação inicial por 48 horas de 2 g de solo com 2,4 mL da solução de acetonitrila (Aldrich).

### 3.5.2. Estudos com o nicosulfuron.

1. Incubação inicial por 48 horas de 12 g de solo (cultivos de: milho, café e solo de área de mata nativa) com 2,4 mL de solução do nicosulfuron (DuPont) na concentração de 120 ppm;
2. Incubação inicial por 48 horas de 12 g de solo (cultivos de: milho, café e solo de área de mata nativa) com 2,4 mL de acetonitrila (Aldrich).

Como mencionado anteriormente, para se realizar os estudos microbiológicos foram realizadas contagens gerais de colônias de bactérias + leveduras + actinomicetos, baseando-se no procedimento seguido pelo **Instituto Agronômico de Campinas (IAC)**, e que consiste no emprego de 90 mL de uma solução aquosa de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (solução extratora) de concentração igual a  $2,46 \text{ g mL}^{-1}$ .

Também foram empregados tubos de ensaio contendo alíquota de 9 mL da solução extratora ( $C = 2,46 \text{ g mL}^{-1}$ ), cada, contabilizando um total de 3 tubos para cada análise (foram empregados tampões de algodão hidrofóbico).

A autoclavagem foi realizada a 393 K, por 20 min, para todos os materiais utilizados, assim como para as soluções. A cada fração de 10 g de solo eram adicionados 90 mL da solução extratora e a suspensão era agitada por 20 min. Coletou-se uma alíquota de 1 mL da suspensão mantida sob agitação, a qual era vertida a um tubo de

ensaio contendo 9 mL da solução extratora (diluição=  $10^{-1}$ ) . Após a agitação, duas alíquotas de 0,1 mL da suspensão eram transferidas para 2 placas de Petri (uma alíquota para cada placa), contendo o meio de cultura TSA.

A partir da solução resultante de diluição  $10^{-1}$ , era transferida uma alíquota de 1 mL a um segundo tubo de ensaio contendo 9 mL de solução extratora, obtendo-se a diluição  $10^{-2}$  e, repetiu-se esse processo até a diluição  $10^{-3}$ . As placas obtidas foram incubadas a 28 °C, durante 12 h. Os cálculos das quantidades de unidades formadoras de colônia por grama de solo seco foram realizados a partir da aplicação da equação 15 aos dados obtidos.

$$\text{ufc} = (\langle \text{colônias} \rangle * 10^{-1}) / x * m \quad (\text{eq. 15})$$

Na equação 15, **ufc** é a quantidade de unidades formadoras de colônias; **<colônias>** corresponde ao número médio de colônias, **m** é a massa do solo seco, enquanto que **x** é a diluição. A quantidade aceitável de colônias de microrganismos deve estar dentro de um intervalo ótimo de 30 a 300 colônias, utilizando-se para isso, diluições de  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e assim sucessivamente, até ser possível a obtenção da contagem na faixa indicada. Para cada condição estudada foi realizado um total de no mínimo 4 contagens, sendo que as inoculações foram feitas em duplicata.

### **3.6. Incubação de amostras de solo para estudos calorimétricos (estudos com a atrazina).**

Para se estudar a influência da atrazina na atividade microbiana do solo e, com isso, avaliar seu possível efeito quanto à emissão de CO<sub>2</sub>, foi necessário garantir uma boa distribuição desse herbicida ao longo de toda a amostra de solo. Como a atrazina é muito pouco solúvel em água (solubilidade = 33 mg mL<sup>-1</sup>)<sup>41</sup>, foi empregada solução da atrazina em acetoneitrila.

Assim, para se preparar as amostras foram adicionados 200 mL de soluções de atrazina, nas concentrações de 1000 e 2000 ppm, a 1 g de solo, sendo que as amostras foram acondicionadas no interior de uma campânula de vidro com pescoço de cisne (Figura 19), com o objetivo de promover a volatilização da acetoneitrila, ao longo de aproximadamente 48 horas.

Em suma, no presente trabalho foram contempladas as seguintes condições:

1. Solo de mata nativa envelhecido durante aproximadamente 3 anos, incubado com acetoneitrila;
2. Solo de mata nativa envelhecido durante aproximadamente 3 anos, incubado com solução de atrazina em acetoneitrila (1000 ppm);
3. Solo de mata nativa envelhecido durante aproximadamente 3 anos, incubado com solução de atrazina em acetoneitrila (2000 ppm).



**Figura 19.** Imagem do sistema empregado para se realizar a incubação de amostras de solo com a atrazina em acetoneitrila.

### **3.7. Incubação de amostras de solo para estudos no microcalorímetro isotérmico (estudos com a acetoneitrila e o nicosulfuron).**

Para se preparar as amostras de solo para incubação com o herbicida

nicosulfuron, foram adicionadas a frações de 1 g de solo, alíquotas de 200  $\mu$ L de soluções deste herbicida em acetonitrila, nas concentrações de 64,4 ppm e 120 ppm. Os experimentos foram realizados em duplicata, sendo que a mistura entre o solo e as soluções/solvente tornava-se possível com o auxílio de uma haste metálica.

As amostras eram então acondicionadas no interior de um recipiente plástico (Figura 20) com tampa, contendo um pouco de água em seu interior. Por meio de um orifício na tampa da caixa, um fluxo de ar comprimido, que passava inicialmente por uma solução de permanganato e em dois frascos lavadores contendo água, era injetado. Esse fluxo de ar umedecido tinha o propósito de eliminar a acetonitrila por arraste, sem provocar uma secagem do solo.

Esse processo de incubação e eliminação da acetonitrila durava aproximadamente 48 h, sendo que após esse período a amostra era retirada para as análises calorimétricas. Então, era vertida uma alíquota de 200  $\mu$ L da solução aquosa contendo 1 mg de glicose a uma subamostra de solo incubado, de massa de aproximadamente 1g, contido em uma cela calorimétrica. Por fim, esta subamostra era devidamente selada e inserida no calorímetro com o intuito de se monitorar a energia liberada (atividade microbiana).



**Figura 20.** Imagem do sistema empregado para se realizar a incubação de amostras de solo com o nicosulfuron.



## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Estudos com a atrazina.

Neste trabalho foram avaliados alguns atributos físico-químicos para o solo de mata envelhecido, os quais estão indicados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Alguns atributos físico-químicos avaliados para o solo de mata nativa envelhecido.

pH	Umidade / %	M.O.* % (m/m)	(C:N) (mol/mol)
4,73 ± 0,06	17,6 ± 0,4	3,5 ± 0,2	8,6

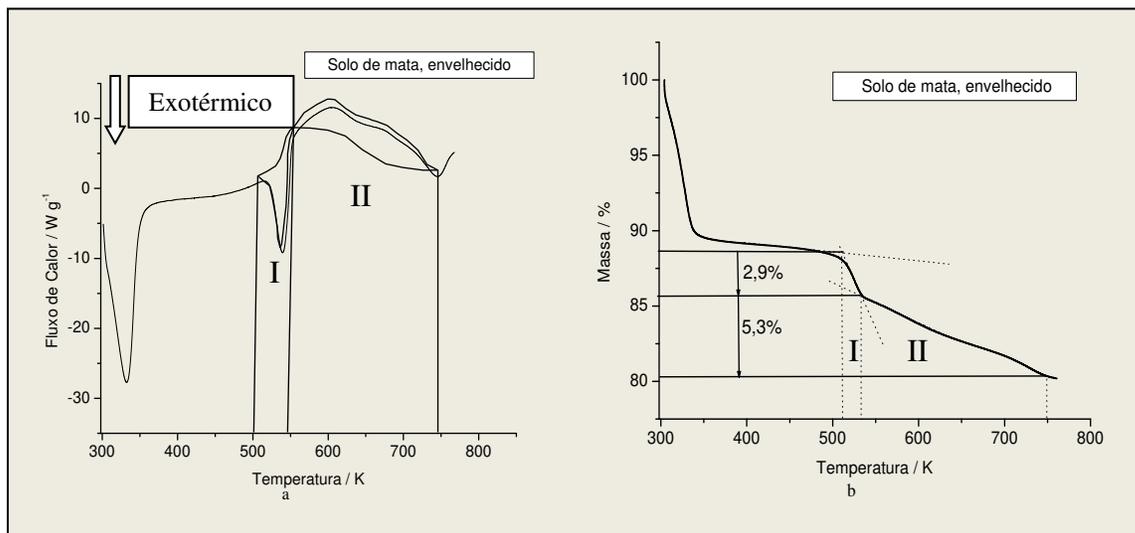
\* M.O.= matéria orgânica

O valor de pH igual a 4,73 mostra que o solo estudado apresenta caráter ácido, o que é característico dos latossolos ferríferos.<sup>208</sup> Os dados indicam que há um baixo percentual de matéria orgânica, cujo valor calculado foi de 3,5%, teor este que também foi avaliado por meio da análise termogravimétrica (Figura 21b).

As perdas de matéria orgânica aparecem como picos exotérmicos nos registros de calorimetria exploratória diferencial, DSC. A curva de DSC obtida (Figura 21a) indica a presença de um evento endotérmico entre aproximadamente 520 e 550 K que deve se relacionar à matéria orgânica e que segundo a literatura<sup>209</sup> corresponderia à volatilização de resíduos da celulose e da matéria alifática.

Todavia, a mesma referência também relata a respeito de um evento térmico exotérmico que ocorre ao longo da faixa de temperatura que se estende de aproximadamente 600 a 800 K, e que está relacionado com as presenças de compostos

aromáticos, tais como a lignina e outros polifenóis.



**Figura 21.** Curvas de DSC (a) e de TG (b) para o solo de mata (envelhecido), em atmosfera oxidante.

Para melhor se avaliar em termos qualitativos, os processos de decomposição térmica da fração orgânica do solo, foram obtidas curvas de DSC para a celulose cristalina e para a matéria húmica extraída do solo envelhecido.

A curva de DSC da celulose cristalina (Figura 22a) indica a presença de um evento endotérmico que começa por volta de 560 K. Tal evento é interrompido por volta de 600 K, quando ocorre um processo exotérmico bem pronunciado.

De acordo com a literatura<sup>210</sup>, o evento I (endotérmico), centrado em 575 K, trata-se da produção e volatilização de produtos da pirólise da celulose. Entrementes, o evento II, que começa por volta de 600 K apresenta maior valor energético e termina por volta de 710 K, correspondendo à oxidação do resíduo que sobrou do evento I. Além disso, a volatilização do material da pirólise (fase I) e dos produtos da combustão (II) ocorre concomitantemente aos processos químicos citados supra<sup>211</sup>.

Na literatura também se relata a inexistência do pico exotérmico para a celulose<sup>212</sup>,<sup>211</sup>, podendo se justificar que ocorreria uma decomposição da celulose (processo

exotérmico), além de uma rápida volatilização do material formado (evento endotérmico).

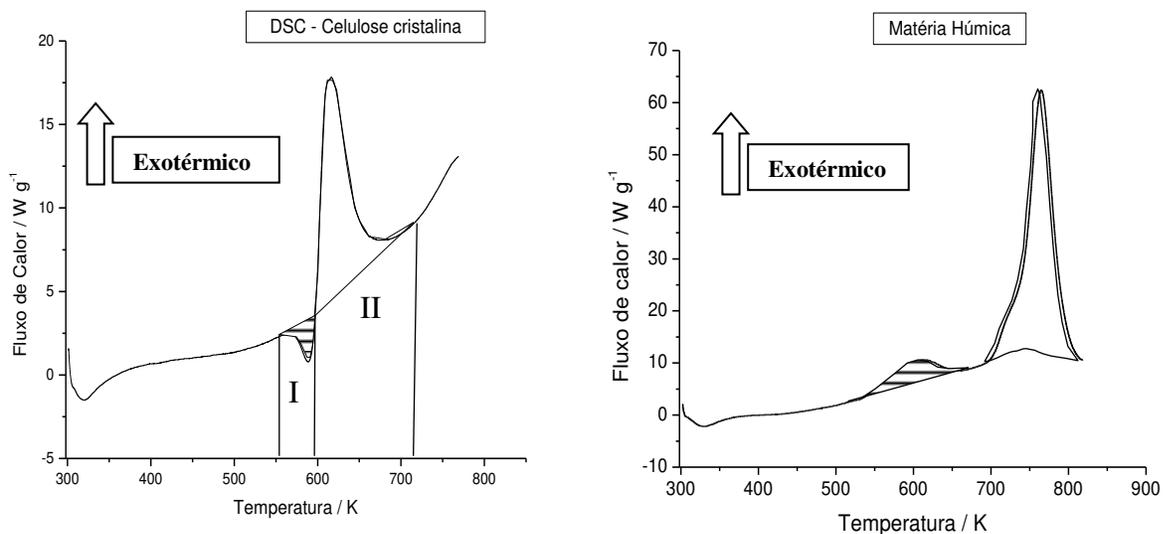
Por outro lado, há referência ao fato de que a decomposição térmica da lignina, centrada em 640 K, leva à formação de muito material sólido e, dessa forma, esse evento se caracteriza por ter caráter endotérmico.<sup>212</sup> Assim, se os resultados obtidos no presente trabalho forem combinados com os relatados pela literatura, pode-se inferir que o solo envelhecido deve possuir celulose e lignina na fração matéria orgânica.

No caso da matéria húmica (Figura 22b) há dois eventos exotérmicos importantes no intervalo compreendido entre aproximadamente 500 e 800 K. O primeiro deles, que engloba a faixa de 480 a 668 K, não está bem definido e se estende ao longo de um intervalo maior de temperatura, enquanto que outro pico exotérmico no intervalo de 680 a 820 K é de magnitude maior, além de estar melhor definido.

Sabe-se que os ácidos húmicos saem em valores de temperatura ligeiramente menores que os ácidos fúlvicos.<sup>213</sup> Entretanto, como mostra este grupo de pesquisa, a separação entre essas duas classes de substâncias também não é uma tarefa fácil.

Além disso, relata-se que inicialmente até por volta de 550 K predominam processos endotérmicos que não foram observados no presente trabalho, enquanto que após 550 K prevalecem os processos exotérmicos de decomposição da matéria orgânica.<sup>213</sup> Os processos químicos são bem diversificados, iniciando-se com a perda de grupos que contêm oxigênio e terminando com a perda de grupos alifáticos do tipo  $\text{CH}_2$ , que sofrem oxidação.

A literatura indica que embora o perfil de decomposição térmica de extratos húmicos de solos modifica-se, de acordo com o tipo de solo e clima, sempre surgem dois picos exotérmicos.<sup>214</sup> Além disso, relata-se que a degradação térmica de carboidratos, a desidratação de estruturas alifáticas e a descarboxilação de grupos carboxílicos ocorrem no pico associado a um valor de temperatura menor, estando sobrepostos na faixa de 470 a 620 K.<sup>214</sup> O segundo pico corresponderia à decomposição térmica de estruturas aromáticas, mais estáveis termicamente.



**Figura 22.** Curvas de DSC para a celulose cristalina e a matéria húmica, obtidas em atmosfera oxidante.

Dessa forma, ao se comparar a curva de DSC do solo envelhecido com as respectivas curvas para a celulose e os ácidos húmicos, observa-se a presença de material celulósico no solo, devendo ser salientado que é mais difícil tentar justificar as presenças dos ácidos húmicos, pois o segundo pico de decomposição desse material, que ocorre a partir de 700 K, não aparece bem destacado na curva de DSC do solo envelhecido.

Um dado interessante da literatura é que nos solos tropicais o segundo pico exotérmico é mais intenso em comparação ao primeiro, já que as condições de temperatura e umidade favorecem as permanências dos compostos aromáticos mais estáveis termicamente.<sup>214</sup> No entanto, como a quantidade de matéria orgânica no solo é pequena, os efeitos térmicos totais observados no registro de DSC, que são uma soma de todos os eventos, tornam-se bastante complexos e, frequentemente, de pequena magnitude.

É importante se ressaltar que as curvas de DSC da Figura 22 foram obtidas para uma matéria orgânica “extraída”, enquanto que no caso da Figura 21 essa matéria orgânica encontra-se “diluída” no solo, tanto por materiais inertes ao aquecimento

quanto por materiais diversos que são passíveis de sofrer decomposição.

Embora seja possível calcular as energias envolvidas nos processos de decomposição térmica, os resultados sinalizariam meramente a “valores”, não podendo ser associados a um evento específico. Assim, mesmo que seja efetuada a análise química do material que é eliminado e do que permanece na cela calorimétrica do equipamento de DSC, seria impossível uma determinação precisa do fenômeno que está ocorrendo, já que eventos térmicos distintos estão ocorrendo concomitantemente.

Da mesma forma, os resultados de energia de decomposição térmica da celulose e da matéria húmica só poderiam ser parcialmente comparados, devendo ser realizadas outras análises como as termogravimétricas e químicas dos materiais envolvidos e dos que permanecem como resíduo.

No entanto, se ambos os materiais sofressem uma combustão total e tudo fosse eliminado na forma gasosa, então seria possível comparar essas energias e, nesse caso, esses valores deveriam se aproximar daqueles determinados com o auxílio da calorimetria de combustão.

De maneira semelhante, não seria confiável a comparação dos possíveis resultados da análise quantitativa para a matéria orgânica obtida por meio de uma titulação redox, em relação aos valores obtidos através da Análise Termogravimétrica, já que alguns materiais da fração inorgânica do solo podem liberar moléculas de água de cristalização na faixa de temperatura em que ocorre a perda de matéria orgânica<sup>215</sup>, mascarando o teor real de material orgânico presente na amostra de solo.

Com relação à razão C:N, a literatura indica que em solos que apresentam uma razão C:N (em mol) na faixa de 5 a 15, há preponderância de biomassa fúngica, enquanto que para a faixa de 3 a 6 prepondera uma biomassa bacteriana.<sup>216</sup> No caso do solo estudado, o valor encontrado é igual a aproximadamente 9, o que indicaria que em tal substrato haveria predomínio da biomassa constituída por fungos. Isso faz sentido, já que esse solo foi retirado de uma região de mata nativa, com significativa cobertura de matéria orgânica.

A microcalorimetria foi empregada com o objetivo de se estudar o comportamento da atividade microbiana de um solo envelhecido (após um longo período de tempo) na presença de atrazina, para diferentes condições (Fig. 23 a-d). Como um modo alternativo de se analisar essas curvas, foi realizada as sobreposições das curvas calorimétricas, originando a figura 23.

Qualitativamente, a figura 23a mostra que a glicose estimula a atividade microbiana muito rapidamente, devendo ser destacado que após cerca de 1 dia essa atividade atinge o máximo (*peak time*). Com a adição de acetonitrila Figura 23b houve aparecimento de dois picos bem definidos, separados por um intervalo de aproximadamente 24 h, enquanto que no caso em que há somente a adição de glicose (Fig. 23a) há um pico.

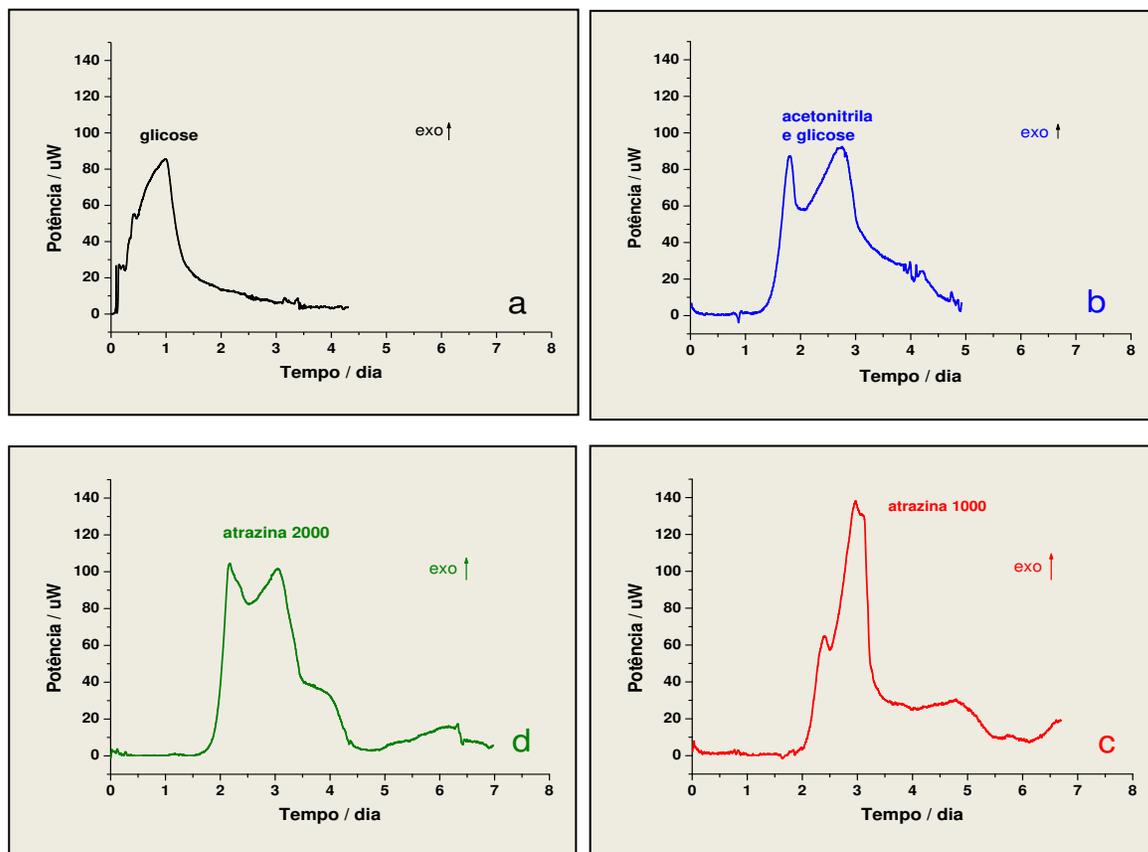
O que se observa é um retardamento do início da atividade microbiana com a adição da acetonitrila. No entanto, considerando-se o fato de que a glicose é um substrato facilmente metabolizado, pode-se ainda justificar as constatações de que os registros dos eventos térmicos tenham surgido relativamente precocemente.

É de se esperar a existência de um pico relacionado com o metabolismo da glicose nas outras condições experimentais, mas a discriminação quanto à extensão de quanta glicose é metabolizada em cada caso torna-se difícil, pois pode estar ocorrendo cometabolismo e/ou diferentes populações microbianas podem estar catabolizando esse carboidrato.

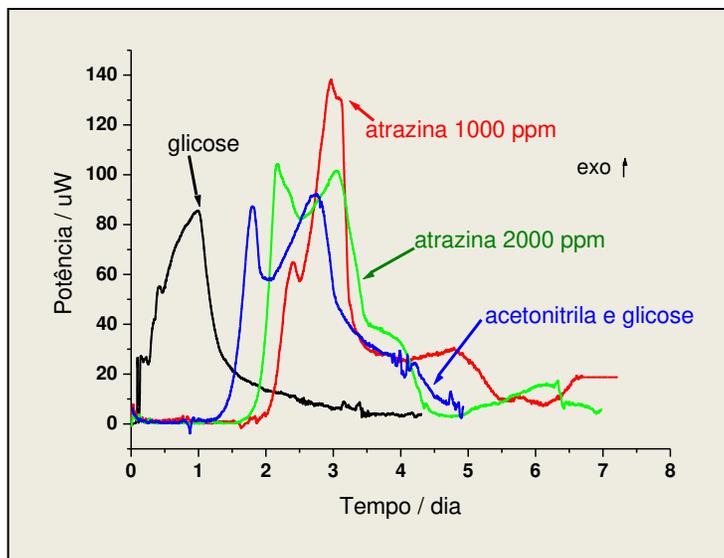
Na figura 23a o máximo de potência ocorre por volta de 1 dia após a adição da glicose, sendo que tal comportamento não é igualmente observado nas outras condições, ou seja, a adição de acetonitrila retarda a atividade microbiana. Por outro lado, o aparecimento do segundo pico pode estar relacionado provavelmente à presença da acetonitrila.

Todavia, sob tais circunstâncias há grande probabilidade de que a atrazina não tenha sido cometabolizada com a acetonitrila e também com a glicose, já que estudos com a atrazina evidenciam que seu tempo de meia-vida em Latossolo Vermelho-Escuro

é de 54 a 56 dias.<sup>217</sup> Há no entanto, alguns estudos que mostram que a atrazina só começa a ser metabolizada a partir de 14 dias após as aplicação. Como os experimentos calorimétricos foram realizados com no máximo 8 dias de duração, poderia ser inferido que a atrazina não estaria sendo metabolizada.



**Figura 23.** Curvas calorimétricas que mostram a atividade microbiana do solo de mata nativa envelhecido, sob diferentes condições.



**Figura 24.** Curvas calorimétricas do solo de mata nativa envelhecido, sob diversas condições.

Outro aspecto a se ressaltar é que a quantidade de atrazina empregada foi muito pequena quando comparada com a da acetoneitrila. Evidentemente, com o processo de secagem da amostra se buscava a eliminação da acetoneitrila, embora o período considerado (i.e., 48 h) possa ter sido insuficiente para garantir a total eliminação desse solvente.

Reforçando o argumento de que ainda havia acetoneitrila após a secagem, é digno de nota o fato de que experimentalmente foi constatado que amostras de solo contendo esse solvente ainda assim não apresentavam estabilidade de massa após incubação por aproximadamente 48 h, em atmosfera fechada, de forma que pode ser concluído que a acetoneitrila não se encontra sorvida fortemente ao solo.

No caso da sorção da acetoneitrila em argilomineral, como no caso da montmorilonita, sabe-se que a sorção desse solvente não se deve à ligação específica entre as moléculas orgânicas e a superfície, mas sim a uma partição ao longo das interfaces entre a solução e a fase sólida<sup>218</sup>. Consequentemente, pode-se inferir que a acetoneitrila não interage fortemente com a superfície desse tipo de argilomineral,

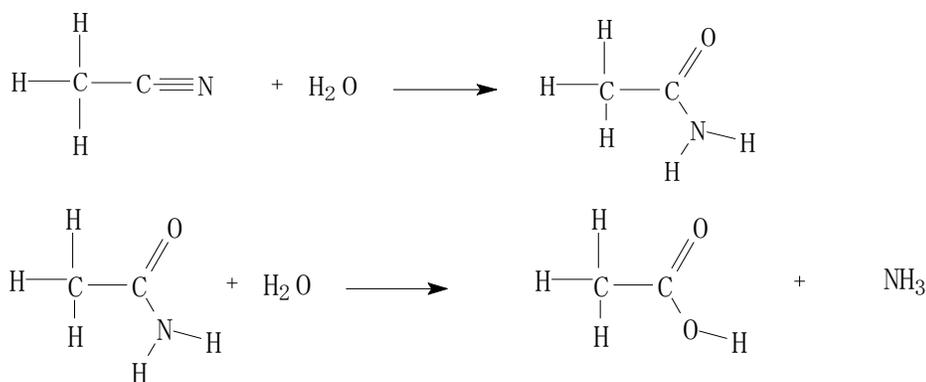
comportamento que poderia se repetir em outros argilominerais como a caulinita, que é representativa em latossolos no Brasil.

Um fato importante a ser salientado é que a atrazina, *a priori*, poderia exercer certa influência na atividade microbiana, embora se soubesse inicialmente que seu metabolismo é bem tardio no solo, mesmo nas condições naturais, i.e., ambientais. Outro aspecto a enfatizar é que provavelmente sobrou acetonitrila no solo, uma vez que os efeitos térmicos variaram de aproximadamente 8 até 13 J g<sup>-1</sup> de solo.

A acetonitrila pertence à classe química das nitrilas e se sabe que estas podem ser degradadas por meio de rotas catalisadas pela *nitrilase* (EC.3.5.5.1), a qual é responsável pela clivagem direta das nitrilas originando os ácidos correspondentes mais amônia, enquanto que a *hidratase de nitrila* (E.C.4.2.1.1.84) catalisa a hidratação de nitrilas originando amidas, as quais são hidrolisadas *a posteriori* a ácidos e amônia pela *amidase* (E.C.3.5.1.4).<sup>219</sup>

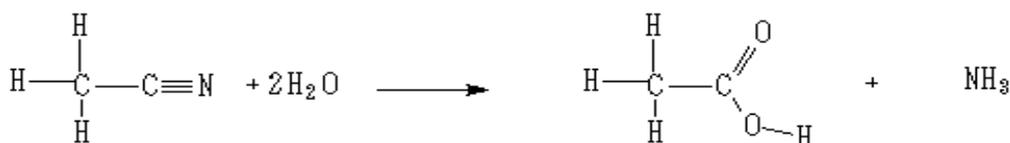
Os microrganismos empregam a *nitrilase*, a *hidratase de nitrila* e a *amidase* como as enzimas responsáveis pela biodegradação da acetonitrila.<sup>220</sup> Além disso, a degradação de nitrilas alifáticas como a acetonitrila ocorre através de duas etapas levando à formação de amônia e ácido acético (fig. 25 e 26).<sup>221</sup>

A função nitrila presente na acetonitrila não corresponde a um elemento estrutural xenobiótico recalcitrante, ou seja, que seja mais resistente à biodegradação, pois alguns dos compostos com essa função ocorrem como produtos naturais em organismos como bactérias, fungos, plantas e insetos.<sup>222</sup>



**Figura 25.** Representação das duas etapas de degradação de nitrilas alifáticas como a acetnitrila.

Alguns exemplos de microrganismos que podem utilizar a acetnitrila como fonte exclusiva de carbono e de nitrogênio são: *Nocardia rhodochrous* LL100-21, *Pseudomonas putida*, *Chromobacterium* sp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Geotrichum* sp. JR1, *Rhodococcus* sp. RHA1 e *Mesorhizibium* sp. F28.<sup>223</sup>



**Figura 26.** Equação química da degradação de acetnitrila para a formação de amônia e ácido acético.

Em termos energéticos, sabe-se que a decomposição da acetnitrila é um processo endotérmico, com uma variação de entalpia de 49 KJ mol<sup>-1</sup>. Esse é um valor bem pequeno se comparado ao da glicose, que é igual a -2805 KJ mol<sup>-1</sup>. Considerando o valor da densidade da acetnitrila que é igual a 0,786 g cm<sup>-3</sup> e que a acetnitrila não houvesse sido eliminada, haveria 157,2 mg desse solvente, o que corresponderia a 3,83 x 10<sup>-3</sup> mol. Isso levaria a um efeito térmico de 187,7 J.

Para se avaliar os possíveis efeitos da atrazina e da acetnitrila, são de grande

utilidade os dados biotermodinâmicos presentes na Tabela 4, assim como os valores da **constante do crescimento microbiano (k)** para as diferentes condições experimentais, também presentes na mesma Tabela 4.

**Tabela 4.** Parâmetros relacionados com o crescimento microbiano em estudos comparativos com a atrazina e a acetonitrila para um Latossolo Vermelho, envelhecido.

Condição	- Q / J	$\eta_H\%$	$k^* \times 10^{-3} \text{ (min}^{-1}\text{)}$
Solo + glicose	$8,0 \pm 0,2$	$50 \pm 10$	$2,7 \pm 0,5$
Solo + acetonitrila + glicose	$12,8 \pm 0,8$	-	$5,9 \pm 1,4$
Solo + sol. atrazina em acetonitrila (1000 ppm) + glicose	$12,9 \pm 0,9$	-	$6,8 \pm 1,6$
Solo + sol. atrazina em acetonitrila (2000 ppm) + glicose	$13,5 \pm 0,6$	-	*6,37

\* Para se calcular esses parâmetros foi considerada a primeira fase exponencial do crescimento microbiano; \*\* Único valor que foi considerado.

A Tabela 4 mostra que no caso em que houve apenas adição de glicose a energia metabólica passou a ser de aproximadamente 8 J, o que significa que apenas metade da quantidade original da glicose foi catabolizada como  $\text{CO}_2$  e água (i.e., considerando-se a adição de 1 mg de glicose e que o valor da variação entálpica de combustão da glicose seja igual a  $-2880 \text{ KJ mol}^{-1}$ ).<sup>205</sup>

O valor da energia dissipada passou a ser igual a aproximadamente 13 J, com a adição da acetonitrila, o que representa um valor bem maior que no caso em que há simples adição de glicose. O valor do rendimento metabólico,  $\eta_H$ , mostrado na Tabela 4 foi calculado apenas para o caso da glicose, já que o provável cometabolismo da acetonitrila deva ter ocorrido.

A metabolização da atrazina não pôde ser confirmada unicamente com o emprego da microcalorimetria isotérmica, uma vez que com base no que foi comentado anteriormente, as curvas calorimétricas são muito parecidas.

Uma constatação interessante se refere ao fato de que com o emprego da

acetonitrila ocorreu uma aceleração no crescimento microbiano, embora essa adição tenha resultado num atraso do início da fase exponencial (i.e, fase de divisões celulares).

A constante do crescimento microbiano no caso em que houve adição exclusiva da glicose era igual a aproximadamente  $2,7 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$ , tendo praticamente dobrado após a adição da solução de atrazina.

O fato da razão C:N ser mais elevada no solo envelhecido indica que há uma carência maior de nitrogênio. Além disso, sabe-se que as comunidades microbianas dos solos respondem à carência de nitrogênio obtendo esse elemento de fontes como proteínas e compostos como os N-heterocíclicos.<sup>224</sup>

Assim, sabe-se que muitas cepas, principalmente de bactérias, como discutido anteriormente, bem como vários tipos de fungos, são produtores ativos de enzimas que hidrolisam nitrilas, como a acetonitrila. O grupo mais ativo para produzir essas enzimas pertence ao gênero *Rhodococcus*<sup>225</sup>, existindo também microrganismos como a espécie *Pseudomonas putida*, que é capaz de utilizar a acetonitrila como única fonte de C e N.<sup>226</sup>

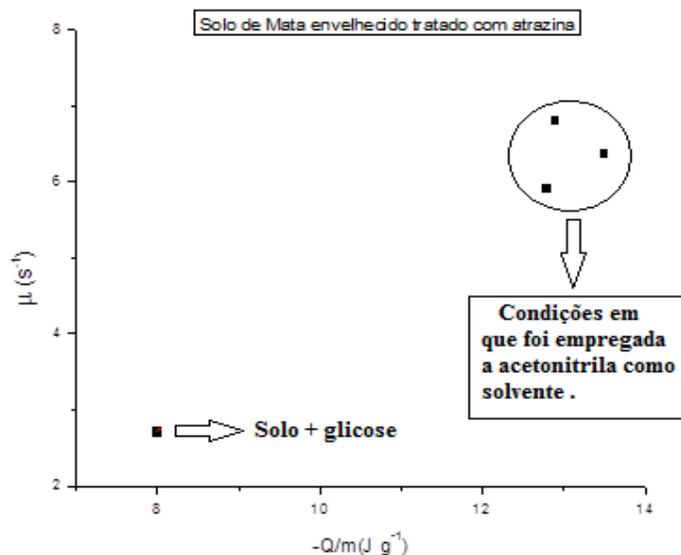
Como discutido anteriormente, a acetonitrila apresenta o grupo nitrila, e por pertencer ao grupo das nitrilas, ela pode ser catabolizada em geral por microrganismos por meio da conversão direta a ácidos carboxílicos e amônia.<sup>227</sup>

Os fatos relatados até aqui a respeito das nitrilas vêm a reforçar a idéia de que a acetonitrila foi a espécie química metabolizada majoritariamente nos casos em que foi empregada a solução de atrazina, baseando-se nos dados presentes na Tabela 4.

A Figura 27 relaciona a **energia dissipada** (-Q) pelos microrganismos presentes no solo de mata envelhecido com a **constante do crescimento microbiano** (k), indicando que as condições nas quais foi empregada a acetonitrila estão relacionadas com pontos próximos entre si, o que reforça a ideia de que a atrazina não influencia de maneira clara as atividades microbianas no solo estudado.

Portanto, considerando-se o que foi discutido anteriormente com relação às curvas calorimétricas e à degradação de compostos contendo o nitrogênio, pode-se inferir que é a acetonitrila que parece estar suplementando as carências nutricionais dos

microrganismos presentes nesse tipo de solo. Tal hipótese é sustentada pelos valores da constante do crescimento microbiano que são de magnitudes maiores quando há emprego da acetonitrila, além do fato de que eles estão muito próximos entre si (Tabela 4).



**Figura 27.** Gráfico da constante de crescimento microbiano em função da energia dissipada por grama de solo para o solo de mata envelhecido tratado com a atrazina.

Foram realizadas contagens de bactérias + actinomicetos + leveduras (Tabela 5), com o intuito de se avaliar os possíveis efeitos da atrazina no solo de mata nativa envelhecido. Os resultados obtidos mostram que para a série de condições em que a acetonitrila foi utilizada não há diferenças que sejam significativas estatisticamente em termos das contagens das colônias.

Ao se comparar tal série com a condição em que foi adicionada somente a água se nota que neste caso a contagem é maior, o que indica que aparentemente a acetonitrila é a substância que poderia estar afetando significativamente os microrganismos presentes nesse solo, dificultando os desenvolvimentos de colônias. Tal constatação parece contraditória ao se pensar a respeito dos resultados cinéticos, os quais indicam que com a aplicação concomitante da acetonitrila e da atrazina houve favorecimento do

crescimento microbiano.

Uma hipótese que pode ser aventada para se justificar tal observação é que a acetonitrila apesar de suprir as carências nutricionais de certos microrganismos e de inicialmente tornar mais rápido o crescimento destes, poderia ser a responsável pela geração de produtos ou intermediários tóxicos que estariam prejudicando os desenvolvimentos das colônias de microrganismos, o que implicaria nos surgimentos de colônias de dimensões menores.

**Tabela 5.** Quantificação de bactérias + actinomicetos + leveduras.

Condição	UFC* x 10 <sup>3</sup> g <sup>-1</sup> solo seco
Solo + H <sub>2</sub> O	3,32 ± 0,60
Solo + acetonitrila	1,52 ± 0,43
Solo + acetonitrila + ATZ 1000 ppm	2,09 ± 0,30
Solo + acetonitrila + ATZ 2000 ppm	2,01 ± 0,60

\* UFC = “Unidade formadora de colônia”= unidade empregada em microbiologia que é diretamente proporcional à quantidade de microrganismos presentes na amostra; \*\* Para a condição “Solo + H<sub>2</sub>O”, a cada 12 g de solo foram adicionados 1,2 mL de acetonitrila P.A. a cada 12 g de solo, enquanto que para as condições: “Solo + acetonitrila + ATZ 1000 ppm” e “Solo + acetonitrila + ATZ 2000 ppm” foram adicionadas em separado alíquotas de 1,2 mL das soluções respectivas de atrazina em acetonitrila a cada 12 g do solo.

## 4.2. Estudos com o nicosulfuron.

Neste trabalho foram realizados estudos microcalorimétricos com solos de regiões de cultivo de: café, milho e mata nativa. Na Tabela 6 estão indicados os valores para alguns atributos físico-químicos relacionados com tais solos.

A Tabela 6 indica que os solos da região de mata nativa e de cultivo de milho apresentam valores de pH que são muito próximos (solos ligeiramente ácidos), além de apresentarem valores de umidade e de matéria orgânica que também o são.

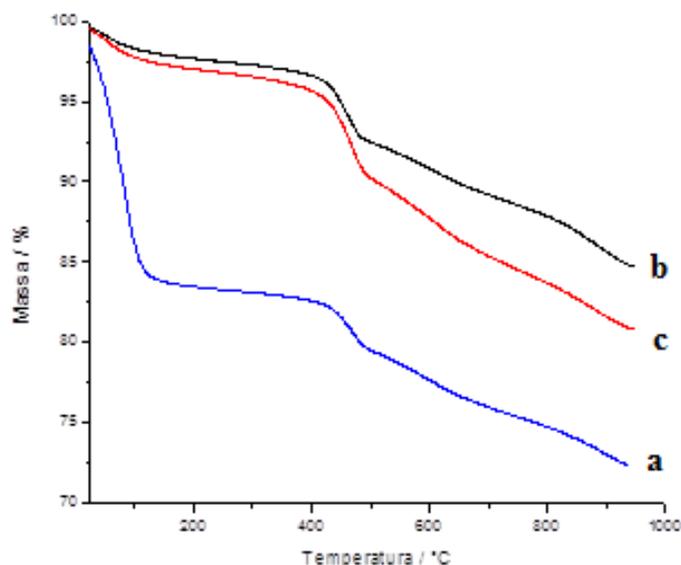
**Tabela 6.** Atributos físico-químicos avaliados para os solos de floresta e de cultivos de milho e de café.

Solos	pH	Umidade / % g/g	M. O / % g/g	C:N (mol:mol)
Mata nativa	6,2 ± 0,1	18,2	4,0 ± 0,1	7,0
Milharal	6,9 ± 0,0	17,5	3,3 ± 0,2	6,5
Cafezal	-	21,5	3,3	6,3

O teor de matéria orgânica no solo de mata nativa é maior que os dos solos de regiões onde há cultivos de milho e de café, em cerca 1%, o que é uma consequência do fato de que esse solo tenha recebido um aporte elevado de material orgânico de origem vegetal e animal. Como justificativa para o maior teor de matéria orgânica no solo de mata nativa, deve ser mencionado o fato de que no local em que essa amostra foi retirada havia uma camada espessa de material orgânico depositado (camada de 10 cm de profundidade), ao contrário das situações relativas aos outros dois solos.

Os valores das relações C:N são aproximadamente iguais, o que pode sugerir que tais solos poderiam apresentar um mesmo tipo de matéria orgânica (i.e., mesma natureza química), considerando-se também a biomassa microbiana. Além disso, como os valores da razão C:N se situam entre 6 e 7, há indícios de que o tipo de biomassa presente seja preponderantemente fúngica.<sup>216</sup>

No tocante às análises térmicas, há uma similaridade muito grande quanto ao comportamento dos diferentes solos (padrões das curvas) ao se avaliar o conjunto das curvas de TG (Figura 28).



**Figura 28.** Curvas de TG para os três tipos de solo estudados. **(a)** solo de área de cultivo de café; **(b)** solo de área de cultivo de milho e **(c)** solo de área florestal.

No entanto, a grande diferença está nos valores de perda de massa d'água para o solo de cafezal. Este solo apresentou uma perda d'água de aproximadamente 16% na faixa de temperatura de 25 a 80 °C, enquanto que os outros solos apresentaram uma perda de aproximadamente 3%. Embora a determinação da umidade realizada por meio da secagem em estufa também tenha mostrado essa tendência, os valores obtidos não foram tão diferentes como esses.

Além disso, a Figura 28 mostra que as curvas de TG para os solos da área de cultivo de milho e o solo de floresta são mais semelhantes em termo de perfil, o que pode ser um indício que apresentam uma composição química similar. Tal constatação corrobora com os dados das análises químicas, i.e., matéria orgânica percentual e análise elementar, haja vista que nesses solos os respectivos valores para os indicadores químicos estudados são próximos, ao contrário do observado para o solo de cafezal.

Deve ser ressaltado que para se efetuar as análises de TG as amostras foram maceradas, de forma a se garantir uma maior homogeneidade. O padrão de uma curva de TG é dependente dos materiais existentes na amostra, além de que variações na

composição química da amostra podem influenciar significativamente na forma da curva TG<sup>228</sup>, assim que pode ser inferido *a priori* que os solos estudados devem apresentar uma constituição química relativamente semelhante, tendo em vista que os perfis das curvas de TG são similares, com a exceção da região correspondente à perda d'água (na região próxima ao valor de temperatura de 100°C ou seja, 373 K).

Outro fato relevante é que a umidade percentual do solo de área de cultivo de café é maior que nas outras condições, pois a inclinação ou derivada da respectiva curva de TG ao longo do intervalo de 25°C a aproximadamente 100 °C é maior neste solo (i.e., a derivada é mais positiva) que para o mesmo intervalo nos outros solos estudados. A partir desse intervalo, foram calculados os valores de umidade percentual que estão indicados na Tabela 6.

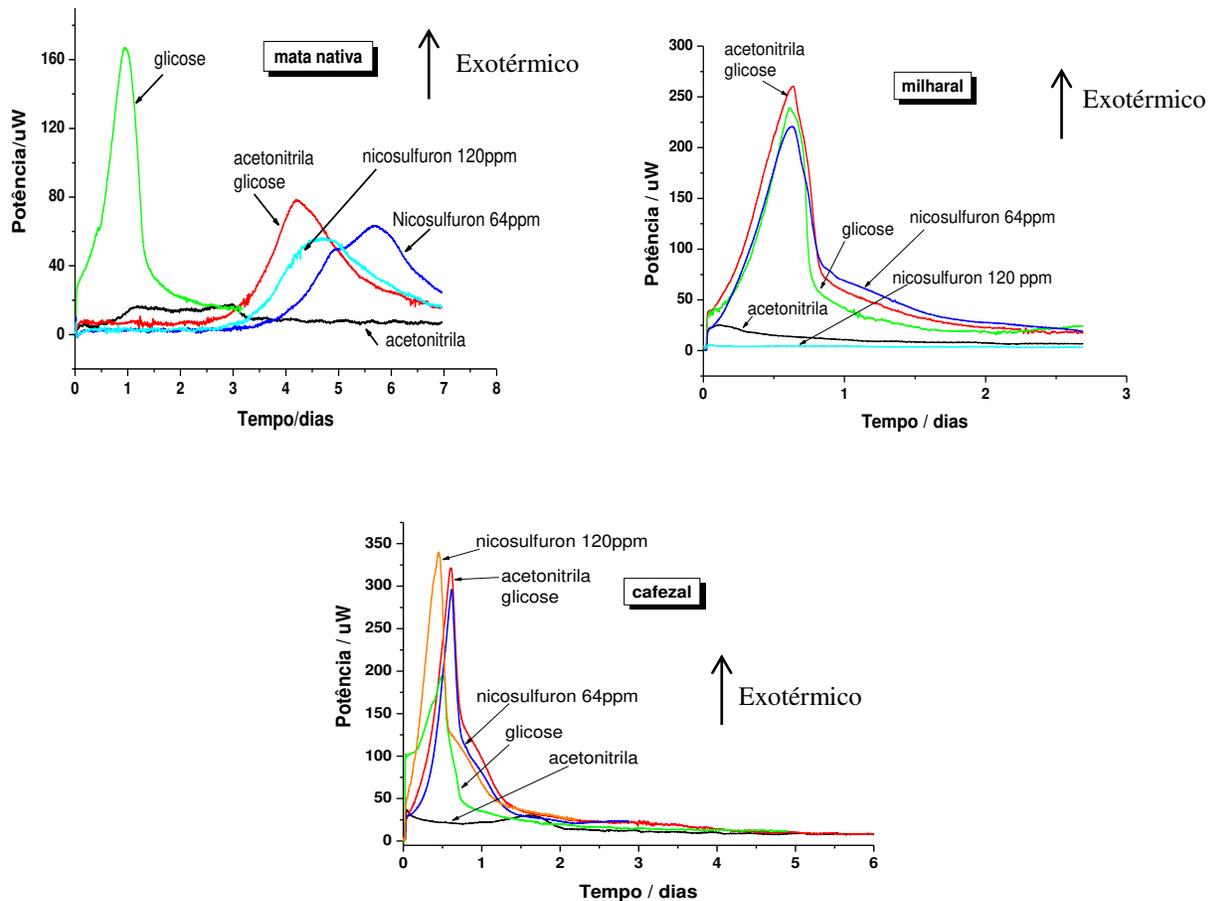
Sabe-se que a umidade do solo influencia uma série de atributos físico-químicos nesses ambientes, tais como: potencial redox, pH e os níveis de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub>, os quais influenciam as populações microbianas e suas atividades.<sup>229</sup>

Além disso, a umidade do solo controla significativamente a atividade microbiana, estando fortemente correlacionada com a diversidade funcional das comunidades microbianas e negativamente correlacionada com as enzimas que degradam a lignina, quitina e a celulose.<sup>230</sup> Sabe-se também que há uma correlação positiva entre a porcentagem de umidade, a energia liberada (calor) pelos microrganismos e a constante do crescimento microbiano em solos<sup>229</sup>, além de existir uma forte correlação entre a respiração da biomassa e o teor de umidade da camada que recobre o solo.<sup>231</sup>

Com base no que foi discutido a respeito da umidade dos solos, pode ser inferido que no solo de cultivo de café a atividade microbiana é possivelmente maior que nas outras condições. Todavia, para se avaliar tal hipótese foram realizados estudos microcalorimétricos.

Assim, com os três solos foram realizados estudos com o emprego da

microcalorimetria isotérmica e os resultados estão resumidos na Figura 29. A figura 29 indica que apenas o solo de floresta ou mata nativa apresentou uma diferença nítida de comportamento no tocante à atividade microbiana, levando-se em conta somente o aspecto geral das curvas calorimétricas.



**Figura 29.** Curvas calorimétricas obtidas nos estudos com o emprego do nicosulfuron (incubação durante 48 h e adição final de solução aquosa de glicose) aplicado às diferentes amostras de solo. Na condição em que há acetonitrila foi adicionada água, após incubação por aproximadamente 48 h.

No caso específico do solo de mata nativa, observa-se que a curva se tornou mais achatada com o emprego da acetonitrila e do nicosulfuron, enquanto que houve um grande aumento no valor do *peak time*. Também ocorreu uma diminuição no valor da potência relacionada com o *peak time*, desde aproximadamente -170  $\mu$ W até

aproximadamente  $-70 \mu\text{W}$ . O *peak time* aumentou em 1 dia (condição em que há adição de solução aquosa de glicose) para valores bem maiores que 4 dias (adição de acetonitrila e desse solvente mais o nicosulfuron), sendo que também ocorreram incrementos nos valores dessa grandeza para o solo de mata nativa, os quais parecem ser muito dependentes da presença da acetonitrila. Paralelamente, pôde ser constatada certa contribuição do nicosulfuron, a qual deve ser considerada com cautela, uma vez que a quantidade de acetonitrila adicionada é muito maior que a desse herbicida.

O solo de área florestal, como a exemplo da Mata Atlântica, apresenta elevada diversidade microbiana.<sup>232</sup> Além disso, as espécies arbóreas dominantes em florestas são capazes de exercer influências importantes na estrutura, função e atividades das comunidades microbianas dos solos, devido: à qualidade e quantidade dos resíduos vegetais que se acumulam no solo, às arquiteturas das raízes, aos respectivos exsudatos, aos requisitos nutricionais e ao processo de decomposição.<sup>233</sup>

Consequentemente, é de se esperar que no solo de mata estudado haja uma grande diversidade microbiana, o que pode estar relacionado com uma maior competição entre as diferentes espécies microbianas. Ao mesmo tempo, pode estar ocorrendo um melhor aproveitamento dos substratos fornecidos graças às diversidades de espécies, as quais podem ocupar diferentes nichos, ou seja, podem desempenhar diferentes funções metabólicas.

Com base no que foi discutido no último parágrafo a respeito do solo de floresta, pode se sugerir que a acetonitrila e o nicosulfuron possam estar sendo aproveitados metabolicamente de uma maneira mais eficiente. Como justificativa, pode-se imaginar que quando estes são aplicados ocorra uma redução dos efeitos térmicos, o que pode ser depreendido ao se considerar o balanço energético ilustrado pela equação 4.

Um fato interessante se refere ao caso da aplicação exclusiva de acetonitrila, pois sob tal condição o efeito térmico é o menor de todos, o que pode nos levar a concluir que o aproveitamento da biomassa possa ser o maior com relação às outras condições.

Outro aspecto relevante com respeito à Figura 29 e a condição de solo de mata

nativa refere-se ao fato de que ao se adicionar o nicosulfuron se observa uma variação singular no *peak time*, levando-se em conta os desvios experimentais no valor dessa grandeza, mesmo sem haver mudanças no sistema estudado.

Também sem entrar nos detalhes quantitativos das curvas apresentadas na Figura 29, pode se observar que a potência máxima no *peak time* aumenta de forma totalmente diferente para os três solos com as adições de acetronila e do nicosulfuron, sendo que para os solos de áreas de cultivo de milho e de café esse valor praticamente não se modifica (com a exceção do solo de região de cultivo de milho tratado com solução de nicosulfuron de concentração igual a 120 ppm), diminuindo no caso do estudo com solo de região de mata nativa.

No caso do solo de área de cultivo de milho, quando houve a adição de acetonitrila e glicose, e adição de acetonitrila mais nicosulfuron (com a exceção da concentração de 120 ppm), não ocorreram alterações apreciáveis nos registros calorimétricos, como discutido brevemente no último parágrafo, apesar de que os efeitos térmicos tenham sido mais elevados. Conseqüentemente, com base no balanço energético ilustrado pela equação 4, há uma indicação que a eficiência foi menor em termos da formação de biomassa, o que é oposto ao observado no caso em que houve adição exclusiva da acetonitrila, em que o *peak time* foi menor (em aproximadamente 3h).

Pelo fato de não existir uma grande diversidade em termos de tipos de rizosfera para os solos de cultivo de milho e café é possível que haja uma redução quanto às possibilidades de biodegradação dos xenobióticos nesses solos.

Ao se adicionar solução de nicosulfuron de concentração igual a 120 ppm a uma amostra de solo de área de cultivo de milho, não foi registrado efeito térmico o que parece sugerir que o nicosulfuron possa estar inibindo o crescimento microbiano, o que também poderia justificar os valores dos efeitos térmicos que são próximos entre si quando há aplicação concomitante da acetonitrila e do herbicida.

No entanto, em princípio, não há qualquer indício do que poderia ter ocorrido

precisamente. Embora as repetições dos experimentos com amostras que contenham organismos vivos apresentam incertezas “não usuais” para os químicos, muitas vezes não há uma explicação “muito lógica” do ponto de vista da Química.

Da mesma forma que no caso do solo de região em que há cultivo de milho, quando há aplicação da solução de glicose em acetonitrila e de soluções em diferentes concentrações de nicosulfuron em acetonitrila, não são observadas diferenças bem nítidas quanto aos efeitos térmicos registrados, diferentemente da situação em que há aplicação exclusiva da solução de glicose em acetonitrila.

Na situação em que há aplicação exclusiva da solução de glicose em acetonitrila, é de se esperar que as possibilidades quanto às capacidades de biodegradação dos xenobióticos sejam menores que no caso do solo de mata, por haver uma monocultura, e assim, há uma menor competição microbiana em comparação com o solo de mata nativa. Isto poderia justificar as similaridades com relação aos sinais térmicos registrados quando ocorrem adições de acetonitrila e do nicosulfuron.

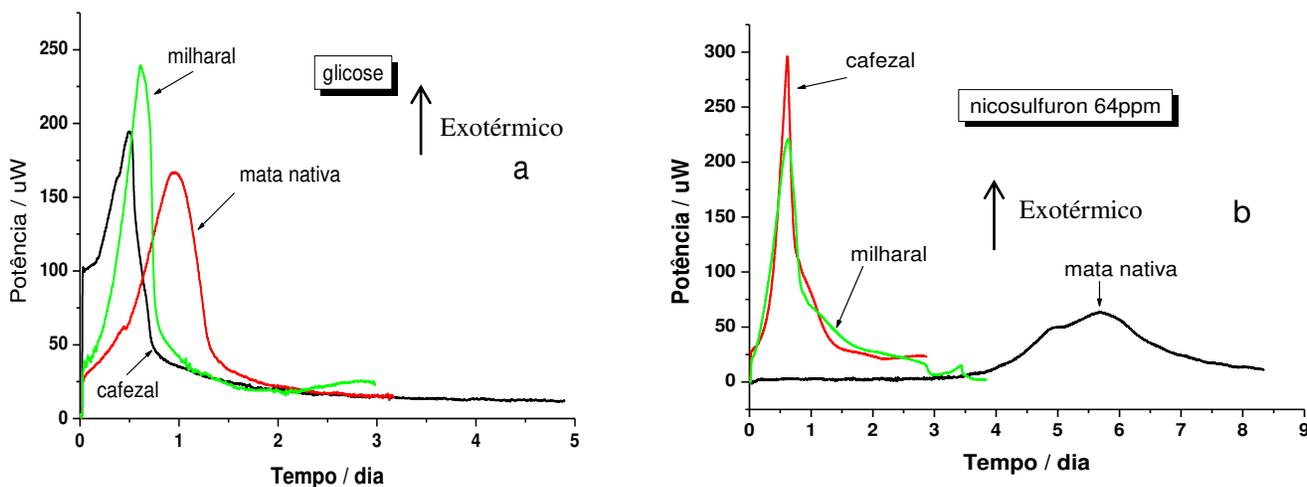
Além disso, a presença do nicosulfuron poderia estar reduzindo a eficiência da assimilação da biomassa, com base no balanço energético tratado anteriormente (equação 4), pois os respectivos efeitos térmicos são maiores quando há aplicação desse xenobiótico. Da mesma forma que no caso do solo de região de cultivo do milho, parece que a rizosfera do cafeeiro apresenta microrganismos capazes de degradar a acetonitrila de uma maneira mais eficiente, o que pode ser depreendido graças ao efeito térmico de magnitude pequena registrado nesta condição.

Em suma, do ponto de vista energético, observa-se um efeito térmico singelo quando há adição da acetonitrila e da água nos três conjuntos de curvas da Figura 29, lembrando que em todos os experimentos aqui relatados foi empregada a água. Ademais, as curvas calorimétricas nesse caso apresentam valores de dissipação de energia (potência) que são máximos na faixa 25  $\mu\text{W}$ , enquanto que com a adição de glicose os valores são maiores que 150  $\mu\text{W}$ .

Em termos microbiológicos, a literatura informa que alguns microrganismos são

capazes de metabolizar nitrilas como a acetonitrila, de acordo com o que foi discutido na introdução e em parágrafos anteriores. Todavia seria possível se supor que outros microrganismos poderiam sofrer inibição de suas atividades microbianas quando em contato com a acetonitrila.

A Figura 30a indica que em todos os solos estudados a energia dissipada com a aplicação da glicose foi elevada, o que é um reflexo da facilidade de metabolização desse tipo de substrato. No entanto, nos solos em que há cultivo de café e de milho os respectivos valores de *peak time* são ligeiramente menores que no caso do solo de mata nativa, cujo pico da curva calorimétrica é mais achatado, indicando que nesta condição a metabolização da glicose ocorreu de uma maneira mais difícil.



**Figura 30.** Curvas calorimétricas obtidas nos estudos com o emprego de glicose (a) e com a incubação da solução de nicosulfuron em acetonitrila (C= 64 ppm) seguida da adição de glicose (b).

Tais observações justificam a constatação de que há grande biodiversidade em solos florestais, como foi discutido anteriormente, assim como em tal condição poderia haver maior competição pelo substrato, resultando em um crescimento microbiano global mais lento.

De uma maneira geral, os valores de *peak time* ocorrem em períodos de tempo de até 24 h para as três amostras, no caso da aplicação da glicose, sendo ligeiramente menor para o solo onde há cultivo de café. Neste solo há adição frequente de matéria orgânica, já que toda a varredura advinda da “panha” e da “desbrota” do café. Ao mesmo tempo, os combates às ervas daninhas ao redor da plantação eram realizados nas proximidades da cultura, de forma que o solo permanecia úmido e com grande quantidade de matéria orgânica passível de sofrer decomposição e ser incorporada ao solo.

Deve ser destacado neste ponto que o solo de área de cultivo de milho era adubado com resíduos vegetais das safras anteriores desta cultura, tendo sido exposto à radiação solar além de ter sido muito compactado pelas máquinas agrícolas, tornando-se pouco permeável à água, o que justificaria o menor valor para o teor de umidade que foi registrado para esse solo. Similarmente, o solo de mata nativa também recebia o aporte de matéria orgânica advindo do acúmulo de material vegetal, mas neste caso estava menos exposto à radiação solar. Portanto, pode-se depreender que a biodiversidade de microrganismos era diferenciada nos três tipos de solo.

Na Figura 30b é mais evidente o atraso quanto ao crescimento microbiano para o solo de mata nativa, o qual de inicia após aproximadamente 7 dias. Além de haver maior competição entre os microrganismos nesse tipo de solo, deve-se considerar o fato de que o nicosulfuron é uma molécula mais complexa, demandando a presença de microrganismos específicos para sua degradação, como discutido na introdução do presente trabalho.

Para esses microrganismos se desenvolverem e começarem a se multiplicar em um ambiente muito competitivo, há necessidade de um maior intervalo de tempo, o qual constitui a *lag phase*, sendo tal período maior que no caso da glicose. As curvas estão sobrepostas nos casos dos solos de cultivo de regiões de milho e de café, o que indica que a aplicação do nicosulfuron (C= 64 ppm) a esses tipos de solo não permite a diferenciação quanto ao comportamento biodegradativo para esse xenobiótico.

Até este ponto do trabalho discutiram-se aspectos qualitativos. Todavia é imprescindível que os resultados possam ser discutidos do ponto de vista quantitativo, de modo a se verificar a hipótese de que o nicosulfuron não estaria influenciando as atividades microbianas nos solos estudados. Assim, devem ser considerados os resultados da Tabela 7, para que se possa iniciar uma discussão quantitativa das curvas calorimétricas.

Na Tabela 7, a segunda coluna apresenta as diferentes condições experimentais, os tipos de solo e a substâncias adicionadas. A quarta coluna indica os valores de energia dissipada (calor) obtidos por meio da integração da curva calorimétrica de potência em função do tempo. Essa grandeza é importante, pois a partir dela torna-se possível calcular outras grandezas, como a eficiência do crescimento microbiano. Além disso, essa eficiência permite a quantificação da matéria orgânica assimilada ( $\eta_H$ ), dentre outros parâmetros como a quantidade de biomassa viva formada e os coeficientes estequiométricos da equação macroquímica.

Em termos cinéticos, o *peak time* e a constante do crescimento microbiano são parâmetros importantes, pois enquanto o primeiro indica o tempo necessário para se iniciar a fase estacionária do crescimento microbiano, o segundo permite a avaliação da velocidade do crescimento microbiano, de forma que esses parâmetros permitem o estabelecimento de correlações com os crescimentos das populações de microrganismos.

Um primeiro aspecto a se considerar se refere ao metabolismo da acetonitrila. Conforme indica a Tabela 7, quando há adição desse solvente nos três solos pode ser constatada certa atividade microbiana. Sabe-se que essa atividade leva à formação de ácido acético e amônia, baseando-se no que foi discutido na introdução.

Levando-se em conta que a variação entálpica dessa reação é bem menor que quando ocorre uma combustão completa originando  $\text{CO}_2$  e  $\text{NO}_2$ , pode-se inferir que ainda restou uma quantidade apreciável de acetonitrila no solo. Se esse metabolismo ocorre de forma similar, também pode ser inferido que restam diferentes quantidades de acetonitrila nos diferentes solos, graças aos diferentes valores de energia dissipada

(calor) para esse solvente.

Desconsiderando-se diferenças quanto ao processo de eliminação da acetonitrila, pode ser concluído que as possíveis diferenças quanto à acetonitrila remanescente nas três amostras de solo são devidas às diferenças nos constituintes desses solos, muito provavelmente devido à qualidade da matéria orgânica, pois se sabe que a sorção de compostos orgânicos nesses meios aquosos ocorre principalmente na matéria orgânica ao invés de ocorrer ao longo das superfícies dos minerais.<sup>234</sup>

Além disso, propõem-se na literatura que um material rico em matéria orgânica como a turfa apresenta certos sítios polares que interagem entre si, mas que podem se ligar a moléculas polares de solventes, como no caso da água, surgindo novos sítios de sorção.<sup>235</sup> Assim, é possível que a acetonitrila possa ainda estar presente no material, o que justificaria os efeitos térmicos registrados quando da aplicação desse solvente.

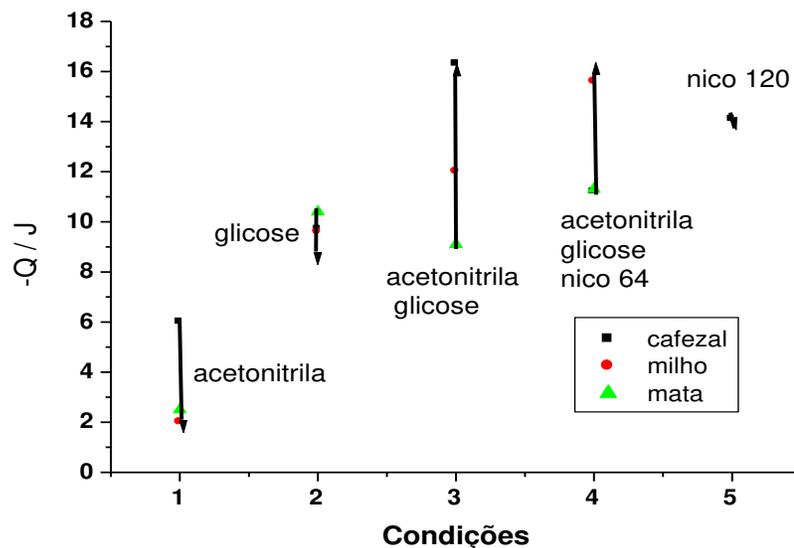
Outro aspecto a se comentar se refere ao aumento na energia registrada pelo calorímetro. Na proposta inicial desse trabalho, esse aumento deveria ser correlacionado com modificações no metabolismo provocadas pelas adições dos herbicidas. No entanto, visto que essa adição não resultou em mudanças significativas da energia, ao se comparar as condições com e sem o herbicida, conclui-se que nos casos das condições estudadas esse efeito não foi observado para o nicosulfuron (Figura 31).

As dificuldades nesse tipo de estudo refere-se ao fato de que os defensivos agrícolas geralmente são pouco solúveis em água. Assim, a *OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development)* e a *US EPA (US Environmental Protection Agency)* recomendam as utilizações de co-solventes para esses casos, devendo ser destacado que a acetonitrila é uma das substâncias indicadas.

Todavia, tal utilização pode modificar o padrão de biodegradação no solo, além de que outras substâncias presentes nas formulações comerciais podem atuar como interferentes dos herbicidas, pois há compostos que permitem uma dispersão uniforme do defensivo na lavoura. Conseqüentemente, é possível que haja interferentes que possam afetar a biodegradação do nicosulfuron, o que inviabilizaria os estudos.

Tabela 7. Dados termodinâmicos e cinéticos para os solos estudados.

Condição		Código	- Q / KJ g <sup>-1</sup> *	η <sub>H</sub> / %	Peak time/ h	k (x 10 <sup>-3</sup> min <sup>-1</sup> )
<b>Solo de cultivo de café</b>	Acetonitrila	1	6,0±0,1	-	-	-
	Glicose	2	9,7±1,0	39	11,8±0	1,4±0,1
	Acetonitrila e glicose	3	16,3±0,9	-	15±4	2,5±0,1
	Acetonitrila, glicose e Nicossulfuron 64 ppm	4	11,2±0,6	-	14,8±2,0	3,7±0
	Acetonitrila, glicose e Nicossulfuron 120 ppm	5	14,2±0,4	-	13,5±2,8	3,1±0,2
<b>Solo de cultivo de milho</b>	acetonitrila	1	2,0±0,5	-	4,7±1,0	25±1
	glicose	2	9,6±1,2	40	18,6±2,0	2,8±0,1
	Acetonitrila e glicose	3	12,0±1,5	-	14,5±0,7	2,6±0,1
	Acetonitrila, glicose e Nicossulfuron 64 ppm	4	15,6±1,5	-	15,2±0,1	2,6±0,1
	Acetonitrila, glicose e Nicossulfuron 120 ppm	5	-	-	160	0,9
<b>Solo de mata nativa</b>	acetonitrila	1	2,5±2,0	-	29±1	1,2±0,1
	glicose	2	10,4±1,2	35	23±2	1,7±0,0
	Acetonitrila e glicose	3	9,1±1,3	-	101±5	1,1±0
	Acetonitrila, glicose e Nicossulfuron 64 ppm	4	11,3±0,1	-	137±7	1,0±0
	Acetonitrila, glicose e Nicossulfuro 120 ppm	5	-	-	-	1,2



**Figura 31.** Valores de efeito térmico da atividade microbiana nos diversos solos, em função das condições experimentais.

Com relação ao crescimento microbiano, a Tabela 7 indica que há diferentes comportamentos no tocante aos três solos, após a adição de acetoneitrila. Para o caso do solo de região de cultivo de café, pode ser observado que houve um aumento na velocidade do crescimento microbiano, enquanto que um efeito inverso foi verificado no caso da mata nativa.

Além disso, no solo de região de cultivo de café houve um aumento no *peak time* após as adições da acetoneitrila e das soluções do herbicida em diferentes concentrações, em comparação com a glicose. Tal constatação pode ser consequência do fato de que o nicosulfuron apresenta estrutura com maior complexidade, o que pode prolongar as respectivas fases exponenciais dos microrganismos.

No caso do solo de mata nativa, o aumento do *peak time* foi mais pronunciado, podendo ser um reflexo da maior competição entre a vasta gama de espécies, relacionada com o metabolismo da acetoneitrila e do nicosulfuron, lembrando-se que em solos de áreas florestais há uma grande biodiversidade de microrganismos. Para o solo

da região de cultivo do milho, a adição de acetonitrila seguida pela adição de água após aproximadamente 48 horas resultou num rápido crescimento microbiano, tendo ocorrido em seguida uma redução na cinética, a qual se manteve relativamente constante quando houve adição da acetonitrila e glicose e da solução de nicosulfuron em acetonitrila com concentração igual a 64 ppm.

Concomitantemente, ocorreram aumentos nos respectivos valores do *peak time*. Finalmente, para esse tipo de solo houve uma redução da cinética do crescimento microbiano quando foi aplicada um solução de nicosulfuron em acetonitrila de concentração igual a 120 ppm, o que suporta o que havia sido discutido a respeito da possível inibição quando do emprego da solução com essa concentração, no caso do solo de área de cultivo de milho (Figura 29).

O fato de existirem diferentes comportamentos cinéticos e tendências em termos da energia dissipada nesses solos (Tabela 7) pode ser um reflexo das diferenças quanto às populações microbianas nesses diferentes ambientes, atuando como indicadores específicos para as condições dos diferentes solos.

Os dados de variação entálpica metabólica ( $\Delta_{\text{met}}\mathbf{H}$ ) permitiram as avaliações dos coeficientes estequiométricos da equação macroquímica para formação de biomassa (equação 8). Os respectivos valores calculados para as diferentes condições estudadas se encontram listados na Tabela 8. Na Tabela 8, um dos coeficientes estequiométricos que foi calculado e que é de grande importância é o coeficiente  $d$ , o qual é proporcional à quantidade de  $\text{CO}_2$  que foi liberado pelo metabolismo da glicose.

**Tabela 8.** Valores calculados dos coeficientes estequiométricos da equação macroquímica para formação de biomassa.

<b>Condição</b>		<b>a</b>	<b>b</b>	<b>d / CO<sub>2</sub></b>	<b>E</b>
<b>Solo de cultivo de café</b>	H <sub>2</sub> O + glicose	0,8	3,9	3,9	4,3
	ACN + glicose	1,2	6,1	6,1	6,5
	Nicos/ACN 120 ppm + glicose	1,1	5,3	5,4	5,8
	Nicos/ACN 64 ppm + glicose	0,9	4,3	4,3	4,7
<b>Solo de cultivo de milho</b>	H <sub>2</sub> O + glicose	1,1	5,3	5,3	5,7
	ACN + glicose	0,9	4,5	4,6	5
	Nicos/ACN 120 ppm + glicose	0,4	1,6	1,6	2
	Nicos/ACN 64 ppm + glicose	1,2	6,2	6,2	6,6
<b>Solo de mata nativa</b>	H <sub>2</sub> O + glicose	-	-	-	-
	ACN + glicose	0,9	4,1	4,2	4,6

Para o solo de cultivo de café, a condição que proporcionou a maior liberação de CO<sub>2</sub> foi aquela em que houve a aplicação da acetonitrila mais a glicose, o que indica que nesta condição houve um maior estímulo à atividade microbiana, reflexo do valor de maior magnitude para a energia dissipada ( $-Q = 16,3 \pm 0,9 \text{ KJ g}^{-1}$ ).

Uma observação interessante no que tange ao solo de região de cultivo de café é que para as condições em que houve a aplicação de acetonitrila e do herbicida, as quantidades de CO<sub>2</sub> que foram liberadas foram maiores que no controle, i.e., para a condição em que houve adição de água e glicose, o que é um indicativo de que a acetonitrila e o herbicida poderiam estar influenciando na liberação desse gás.

Todavia, houve uma ligeira redução da emissão de CO<sub>2</sub> quando foram adicionadas as soluções de nicosulfuron em acetonitrila, o que leva a crer que o herbicida poderia estar inibindo a atividade microbiana no solo de região cultivo de café. Tal constatação é

um tanto intrigante ao se considerar o fato de que o dado na Tabela 7 indica que nas condições em que houve as adições das soluções de nicosulfuron ocorreu um aumento na velocidade da reação metabólica global no solo.

Uma hipótese que pode ser aventada para se justificar tal situação no solo de cultivo de café refere-se ao fato de que apesar do crescimento microbiano ser mais rápido e estar relacionado com uma maior atividade microbiana (maiores valores de energia dissipada; Tabela 7), em tal condição se chegaria a uma situação de estresse mais rapidamente, graças a um aumento na competição e na quantidade resultante de CO<sub>2</sub> que foi liberado. Assim, para esse solo a fase estacionária poderia ocorrer mais precocemente, como pode ser observado na figura 30, quando foi aplicada solução de nicosulfuron em acetonitrila com concentração igual a 64 ppm.

Para o solo de área de cultivo de milho houve maior liberação de CO<sub>2</sub> na condição em que foi empregada a solução de nicosulfuron em acetonitrila com concentração igual a 64 ppm, enquanto que a mesma tendência foi observada para o solo de mata nativa. Conseqüentemente, há indícios de que o nicosulfuron esteja influenciado mais significativamente a metabolização da glicose, pois ela é um substrato que pode ser metabolizado facilmente.

Outro tipo de cálculo que foi realizado foi o da quantidade de biomassa viva, por meio da equação de Sparling (equação 7), a qual é formada paralelamente ao crescimento microbiano (Tabela 9).

A Tabela 9 mostra que no solo em que houve cultivo de café ocorreu maior formação de biomassa para a condição em que foi adicionada solução de nicosulfuron com concentração igual a 120 ppm mais glicose, seguida pela condição em que foi utilizada a acetonitrila mais glicose. Para o solo de região de cultivo de milho houve maior formação de biomassa na condição em que foi empregada a solução do herbicida em concentração igual a 64 ppm. Por fim, pode-se observar que no solo de mata nativa houve maior formação de biomassa para a condição em que foi empregada a acetonitrila mais a glicose.

Os resultados presentes na Tabela 9 parecem indicar que foram formadas maiores quantidades de biomassa, de um modo geral, quando foram utilizados a acetonitrila e este solvente mais o nicosulfuron, o que é um indicativo de que a acetonitrila e o nicosulfuron possam estar sendo co-metabolizados.

**Tabela 9.** Valores de biomassa viva formada com o crescimento microbiano para as respectivas condições.

Condição		$\Delta X / \mu\text{g}$
Solo de cultivo de café	H <sub>2</sub> O + glicose	393,3
	ACN + glicose	776,3
	Nicos/ACN 120 ppm + glicose	1221,0
	Nicos/ACN 64 ppm + glicose	599,5
Solo de cultivo de milho	H <sub>2</sub> O + glicose	842,0
	ACN + glicose	921,7
	Nicos/ACN 120 ppm + glicose	207,0
	Nicos/ACN 64 ppm + glicose	1021,3
Solo de mata nativa	H <sub>2</sub> O + glicose	-
	ACN + glicose	327,6
	Nicos/ACN 120 ppm + glicose	297,3
	Nicos/ACN 64 ppm + glicose	278,1

Até este ponto da discussão faltam dados que possibilitam a formulação de uma conclusão contundente a respeito do efeito da acetonitrila e do herbicida, pois até agora há dúvida se a acetonitrila estaria sendo metabolizada majoritariamente, ou se isto ocorreria no caso da acetonitrila mais o nicosulfuron.

Para se avaliar essas possibilidades foram realizados ensaios empregado-se a acetonitrila e as soluções do herbicida naquele solvente, submetendo-se os solos estudados com esses meios à incubação, ao longo de um período de aproximadamente 48 h. Após este intervalo de tempo, foi adicionada água desionizada e foram realizadas

análises microcalorimétricas. Os valores de energia dissipada (calor) e as respectivas condições estão indicados na Tabela 10.

Com o objetivo de se avaliar melhor os dados de calor expostos na tabela 10, também foi obtido o histograma indicado na Figura 32, indicando que conforme foi empregada maior quantidade do nicosulfuron no solo de região de cultivo de milho, menor foi o efeito térmico registrado, o que significa que a microbiota presente estaria menos ativa com o incremento nas quantidades empregadas do nicosulfuron.

A Tabela 9 também nos indica a mesma tendência, em termos da biomassa, quando houve aplicação da glicose, i. e., menos biomassa microbiana foi formada com o aumento na quantidade utilizada de nicosulfuron. A Tabela 8, no entanto, indica que a quantidade de CO<sub>2</sub> que foi liberada foi menor, com base na equação macroquímica (equação 8).

Conseqüentemente, pode ser inferido que o nicosulfuron inibe a atividade microbiana, no solo de região de cultivo de milho. No caso do solo de área de cultivo de café, as atividades microbianas foram maiores que no caso quando houve aplicação da solução de nicosulfuron de concentração igual a 120 ppm.

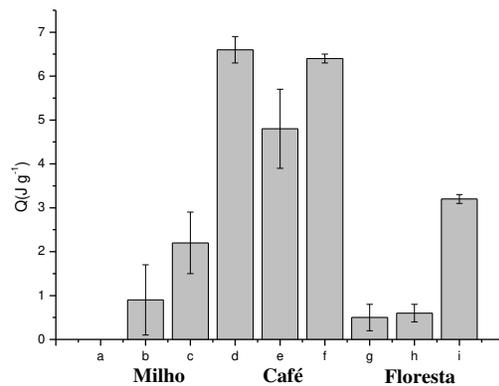
Quando houve aplicação da acetonitrila, as atividades microbianas foram maiores que ao se aplicar solução de nicosulfuron de concentração intermediária, i. e., concentração igual a 64 ppm. Mesmo assim, as atividades microbianas foram maiores que com a utilização do solo de região de cultivo de milho, indicando que é possível que o herbicida possa estar sendo biodegradado em uma maior extensão. No caso do solo florestal ou de mata nativa, com a aplicação do herbicida houve redução na atividade microbiana, além de uma formação de menor quantidade de biomassa (Tabela 9), o que pode significar que a biodegradação desse herbicida neste tipo de solo seja possivelmente mais difícil.

Desse modo, há indícios de que a microbiota seja mais sensível ao nicosulfuron no solo de área de cultivo de milho e no de mata nativa, ao contrário do solo de região de cultivo de café, onde as atividades microbianas foram mais intensas, haja vista que o

calor gerado é proporcional à quantidade de CO<sub>2</sub> liberada por meio dos processos catabólicos da microbiota, baseando-se na equação macroquímica (equação 8).

**Tabela 10.** Dados microcalorimétricos relacionados com a adição de água (100 µL / 1 g solo) a amostras de solo incubadas com soluções do nicosulfuron em acetonitrila (incubação por aprox. 48 h) e com amostras incubadas com acetonitrila, às quais também foi adicionada a água (100 µL / 1 g solo).

Solo	Tratamento	- Q / J g <sup>-1</sup> solo
Cultivo de milho	Nicos/ACN (120 ppm) + H <sub>2</sub> O	0
	Nicos/ACN (64 ppm) + H <sub>2</sub> O	0,9 ± 0,8
	ACN + H <sub>2</sub> O	2,2 ± 0,7
Cultivo de café	Nicos/ACN (120 ppm) + H <sub>2</sub> O	6,6 ± 0,3
	Nicos/ACN (64 ppm) + H <sub>2</sub> O	4,8 ± 0,9
	ACN + H <sub>2</sub> O	6,4 ± 0,1
Florestal	Nicos/ACN (120 ppm) + H <sub>2</sub> O	0,5 ± 0,3
	Nicos/ACN (64 ppm) + H <sub>2</sub> O	0,6 ± 0,2
	ACN + H <sub>2</sub> O	3,2 ± 0,1



**Figura 32.** Dados de da energia dissipada por unidade de massa de solo em função das diferentes condições empregadas, tendo sido adicionada água após 48h. **(a)** Solo de área de cultivo de milho [nicosulfuron em acetonitrila (120 ppm)]; **(b)** Solo de área de cultivo de milho [nicosulfuron em acetonitrila (64 ppm)]; **(c)** Solo de área de cultivo de milho

(acetonitrila PA); **(d)** Solo de área de cultivo de café [nicosulfuron em acetonitrila (120 ppm)]; **(e)** Solo de área de cultivo de café [nicosulfuron em acetonitrila (64 ppm)]; **(f)** Solo de área de cultivo de café (acetonitrila PA); **(g)** Solo de área florestal [nicosulfuron em acetonitrila (120 ppm)]; **(h)** Solo de área florestal [nicosulfuron em acetonitrila (64 ppm)]; **(i)** Solo de área florestal (acetonitrila PA).

As curvas microcalorimétricas relacionadas com os dados da tabela 10 estão representadas na Figura 33. A Figura 33(I) nos indica que no caso do solo de área de cultivo de café os padrões das curvas estão muito próximos entre si, como demonstraram os resultados de energia dissipada (calor) presentes na tabela 10, indicando que o crescimento microbiano global ocorre de maneira similar para ambas as condições.

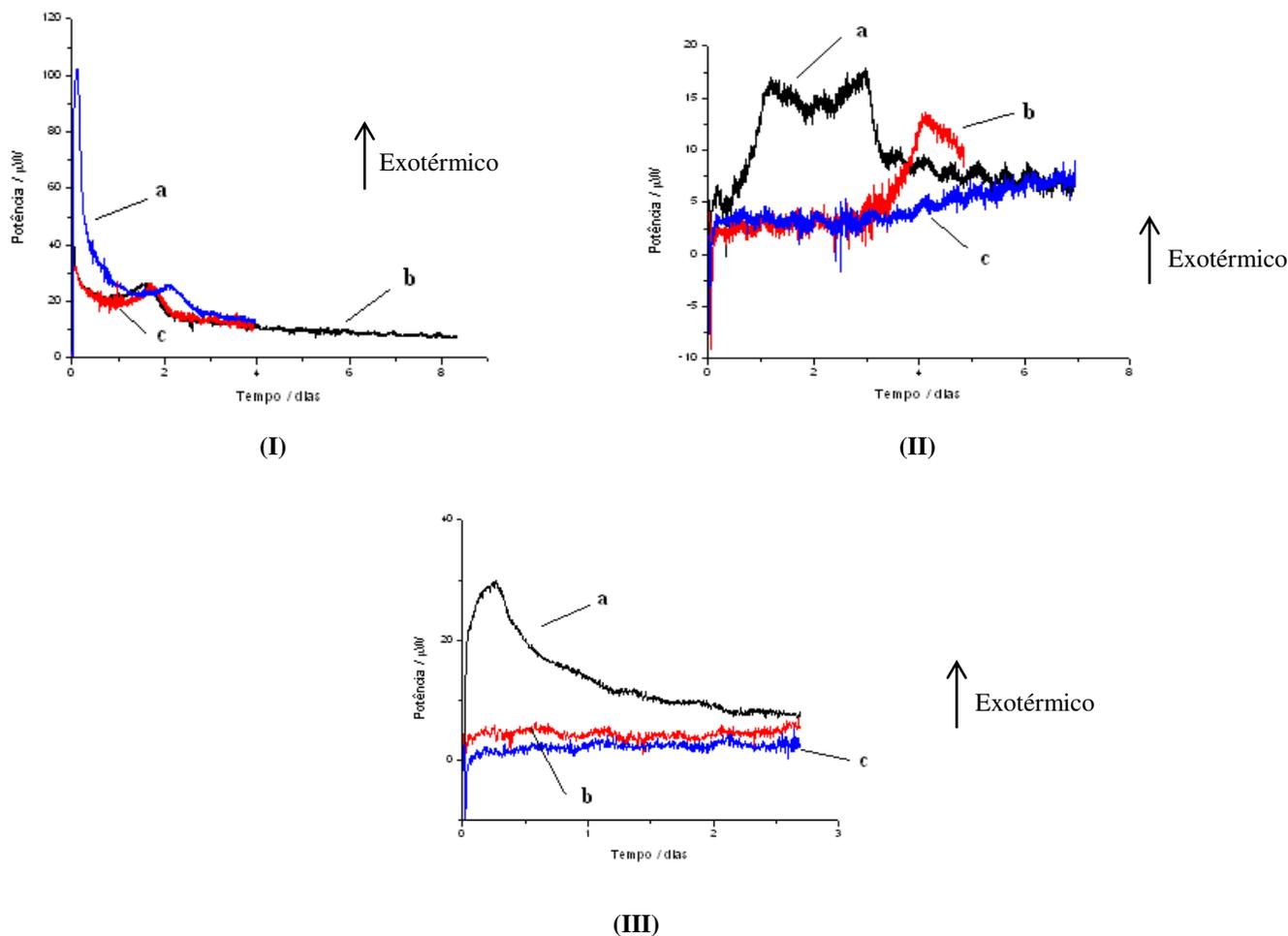
No caso do solo de floresta ou mata nativa os perfis das curvas são mais diferentes entre si, devendo se destacar que no caso da aplicação da solução de nicosulfuron em acetonitrila com concentração 120 ppm (C) o efeito térmico é quase nulo, i.e, há quase uma linha base. Enquanto isso, quando há emprego da solução de concentração 64 ppm (B) há um perfil mais característico para a curva do crescimento microbiano, ao passo que o *peak time* (aproximadamente 4 dias) ocorre posteriormente em comparação com o caso em que há aplicação exclusiva da acetronitrila (aproximadamente 2 dias; A).

Desse modo, é provável que a acetonitrila seja metabolizada mais facilmente no solo de floresta ou de mata nativa que nas condições em que há aplicação do nicosulfuron, para o mesmo tipo de solo.

A Figura 33(III) indica que no caso do solo de área de cultivo de milho, quando foram realizadas incubações com as soluções de nicosulfuron, cujas concentrações eram de 64 e 120 ppm, o efeito térmico foi praticamente nulo, conferindo às respectivas curvas calorimétricas aspectos semelhantes a linhas base. No entanto, no caso quando houve aplicação da acetonitrila o efeito térmico foi mais pronunciado, originando uma forma característica de curva de crescimento microbiano aos registros calorimétricos.

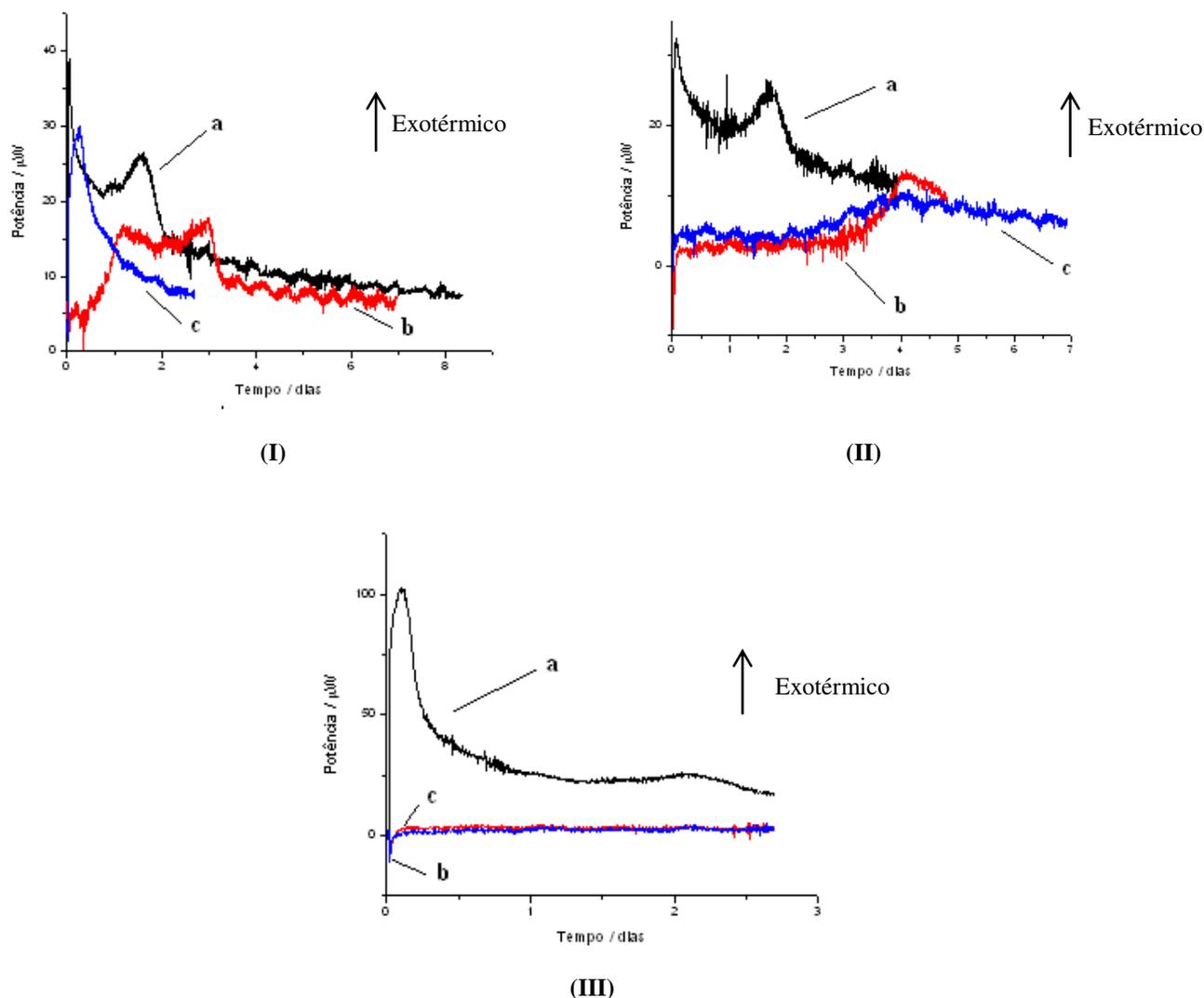
Desse modo, pode-se dizer que em termos qualitativos a acetonitrila parece ser a

responsável por um aumento na atividade microbiana no solo de região de cultivo de milho, o que conseqüentemente permite inferir que os microrganismos presentes neste tipo de solo sejam os mais sensíveis à presença do nicosulfuron que exclusivamente à acetonitrila.



**Figura 33.** Curvas calorimétricas para os solos incubados, tendo sido adicionada água desionizada após 48h (sem adição de glicose). **(I) Solo de cultivo de café:** (a) Solução de nicosulfuron em acetonitrila (120 ppm); (b) Incubação com acetonitrila; (c) Nicosulfuron em acetonitrila (64 ppm); **(II) Solo de floresta:** (a) Acetonitrila PA; (b) Nicosulfuron em acetonitrila (64 ppm); (c) Nicosulfuron em acetonitrila (120 ppm); **(III) Solo de cultivo de milho:** (a) Acetonitrila PA; (b) Nicosulfuron em acetonitrila (64 ppm); (c) Nicosulfuron em acetonitrila (120 ppm).

Na Figura 34 estão indicadas as curvas calorimétricas obtidas ao se comparar os comportamentos dos diferentes solos frente aos tratamentos empregados. No caso em que houve aplicação da acetonitrila (I), o solo que apresentou o menor valor de *peak time* foi o de onde houve cultivo de milho (a), enquanto que o solo de área de cultivo de café e o solo florestal ou de mata nativa se comportaram de maneira relativamente similar.



**Figura 34.** Curvas calorimétricas obtidas para os solos incubados por 48 h com acetonitrila e com soluções de nicosulfuron em acetonitrila, sem adição de glicose e com adição de água após o período de incubação. **(I)** Acetonitrila PA: **(a)** Solo de cultivo de café; **(b)** Solo de Floresta; **(c)** Solo de cultivo de milho; **(II)** Nicosulfuron em acetonitrila (64 ppm): **(a)** Solo de cultivo de café; **(b)** Solo de Floresta; **(c)** Solo de cultivo de milho;

**(III)** Nicosulfuron em acetonitrila (120 ppm): **(a)** Solo de cultivo de café; **(b)** Solo de cultivo de milho; **(c)** Solo de floresta.

No caso do solo florestal ou de mata nativa, a fase de crescimento se estendeu mais que no caso do solo de região de cultivo de café, apresentando aparentemente uma sucessão de duas fases exponenciais, o que poderia indicar a presença de uma sucessão de populações microbianas, as quais podem estar degradando o substrato e/ou os possíveis intermediários.

Considerando-se que em solos florestais há uma grande biodiversidade da microbiota, como mencionado anteriormente, parece razoável se considerar que haja uma maior quantidade de microrganismos especializados nesse tipo de solo, os quais sejam capazes de degradar diferentes tipos de compostos.

Com base nas observações relatadas acima, pode ser inferido que dentre os tipos de solo estudados, aquele que apresenta microrganismo(s) mais especializado(s) em termos da degradação da acetonitrila é o solo onde há cultivo de milho.

Na figura 34(II) foi realizada a incubação com uma solução de nicosulfuron em acetonitrila de concentração igual a 64 ppm, podendo ser salientado que o solo onde houve cultivo de café foi aquele associado com o maior efeito térmico, enquanto que o solo de região de cultivo de milho e o florestal ou de mata nativa apresentaram perfis de curva calorimétrica que eram semelhantes. Consequentemente, pode-se concluir que o solo de área de cultivo de café foi aquele no qual existiam microrganismos mais especializados, em termos da degradação do nicosulfuron presente em acetonitrila, para a solução com concentração igual a 64 ppm.

De maneira análoga, foi no solo de área de cultivo de café que o efeito térmico registrado foi de maior magnitude, que ao se aplicar solução de nicosulfuron em acetonitrila de concentração igual a 120 ppm, o que indica que o nicosulfuron na quantidade aplicada afetou de maneira mais efetiva as atividades microbianas dos microrganismos presentes nesse tipo de solo.

A aplicação de solução de nicosulfuron nessa concentração aos solos de regiões de cultivo de milho e de área florestal resultou nas obtenções de curvas com aspectos similares a uma linha base, o que aparentemente indica que nesses dois solos o nicosulfuron inibiu de maneira mais pronunciada as respectivas atividades microbianas.

Assim, pode-se concluir que com a aplicação do nicosulfuron houve um maior estímulo à atividade microbiana no solo de cultivo de café, de forma que é provável que neste tipo de solo esse herbicida possa estar sendo mais biodegradado, enquanto que a acetonitrila é degradada de maneira relativamente similar em todos os solos, ocorrendo mais rapidamente no caso do solo em que há o cultivo de milho.

A Tabela 11 mostra os resultados obtidos para as análises microbiológicas (contagens de bactérias + actinomicetos + leveduras) relacionadas com os solos de áreas de cultivo de milho e de café, sendo que foram realizadas as análises para o solo florestal ou de mata nativa, por questão de tempo.

A análise microbiológica para o solo de região de cultivo de milho indica que não foi possível se concluir se a aplicação da acetonitrila resultou em maiores contagens em comparação com a condição em que houve a aplicação da solução de nicosulfuron em acetonitrila, com concentração igual a 120 ppm. Todavia, o mesmo pode ser inferido para o caso do solo em que há o cultivo de café, além de que não foi constatada diferenciação quanto às contagens de microrganismos para os solos estudados.

Em suma, ao se analisar os resultados das contagens de microrganismos da Tabela 11, os dados calorimétricos e suas respectivas curvas para os solos estudados, tem-se uma indicação de que a microcalorimetria isotérmica é a técnica mais sensível em termos analíticos, dentre as técnicas que foram utilizadas no presente trabalho, permitindo estudos mais aprofundados em termos das aplicações do nicosulfuron às lavouras.

**Tabela 11.** Valores de unidades formadoras de colônias (cel/mL) e respectivas condições.

<b>Solo</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Ufc x 10<sup>1</sup> (cel / mL)</b>
<b>Cultivo de milho</b>	acetoneitrila	4,5 ± 1,7
	sol. Nicos/acetoneitrila 120 ppm	4,9 ± 1,6
<b>Cultivo de café</b>	acetoneitrila	4,6 ± 0,4
	sol. Nicos/acetoneitrila 120 ppm	4,2 ± 1,0

## **5. Considerações Finais**

**As análises realizadas com a atrazina permitem concluir que:**

1. A acetoneitrila retardou o início do crescimento microbiano, enquanto que aumentou a velocidade desse crescimento;
2. O aparecimento de dois picos no registro calorimétrico quando foram adicionadas a acetoneitrila e a glicose leva à conclusão de que aquele solvente continuou presente no solo, tendo sido possivelmente cometabolizado com a glicose;
3. O aumento da energia relacionada à atividade microbiana, quando houve adição de acetoneitrila ou na solução de atrazina, reforça a hipótese de que essa substância continuou presente no solo mesmo após o processo de eliminação utilizado, além de reforçar a ideia da ocorrência da cometabolização da glicose e da acetoneitrila;
4. As modificações ocorridas nos registros calorimétricos não permitem afirmar que essa substância tenha provocado alterações na atividade microbiana do solo envelhecido para as condições estudadas, ao se levar em conta a presença e as quantidades empregadas da atrazina.

**As análises com o nicosulfuron, por sua vez, permitem concluir que:**

1. A acetonitrila retardou o início crescimento microbiano, nos casos dos solos de mata nativa e de área de cultivo de café;
2. A presença da acetonitrila aumentou a velocidade do crescimento microbiano para o solo de região de cultivo de milho, tendo permitido as obtenções de perfis de curvas que foram relativamente similares para os solos estudados, de forma que aparentemente a acetonitrila é metabolizada em todos os solos;
3. As adições do nicosulfuron aos três tipos de solo não parecem ter causado modificações perceptíveis nas atividades microbianas no solo de área de cultivo de milho e no solo florestal ou de mata nativa, embora os valores de energéticos relacionados com as atividades microbianas tenham sido ligeiramente diferentes;
4. A atividade microbiana no solo de região de cultivo de café é estimulada pelo nicosulfuron, de forma que este herbicida aparentemente sofre uma maior biodegradação nesse tipo de solo;
5. A eficiência anabólica dos três solos apresentam valores bem próximos entre si (35%-40%), com respeito à degradação da glicose. As discussões frente a esses dados de eficiência com a adição da acetonitrila e do nicosulfuron são irrelevantes caso não seja realizada uma análise química que permita definir quais metabólitos foram eliminados devido à atividade microbiana;
6. O nicosulfuron pode permanecer mais tempo sem ser biodegradado no solo de região de cultivo de milho e em solo florestal ou de mata nativa, que no caso do solo onde há cultivo de café;
7. A acetonitrila pode ser biodegradada em solos de áreas de cultivo de café e milho, da mesma forma que no solo florestal ou de mata nativa;
8. A análise microbiológica (contagens de bactérias + actinomicetos + leveduras) se mostra inadequada como uma metodologia a ser empregada para se realizar estudos comparativos com o nicosulfuron.

9. A microcalorimetria isotérmica permite estudos comparativos envolvendo as aplicações do nicosulfuron em diferentes solos.

## **6. Referências bibliográficas**

- [1] Blum, W. E. H.; *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 4 (2005) 75-79.
- [2] Melfi, A. J., Oliveira, S. M. B., Toledo, M. C. M.; *Da rocha ao solo: intemperismo e pedogênese*, em: *Decifrando a Terra*, Organizadores: Fairchild, T. R., Taioli, F., Teixeira, W., Toledo, M. C.M., Companhia Nacional, 2ª. Edição, São Paulo, 2010.
- [3] Queensland Government, Department of Natural Resources and Mines - [http://www.nrm.qld.gov.au/science/slr/soil\\_profile.html](http://www.nrm.qld.gov.au/science/slr/soil_profile.html). Acessado: 15/08/13, às 10:36 h.
- [4] Brady, N. C., *Natureza e Propriedades dos Solos*, Livraria Freitas Bastos, 7ª. edição, 1989.
- [5] Chen, G., Zhang, Y., Zhu, H.; *Res. Microbiol.*, 154 (2003) 393-398.
- [6] Russell, A. R.; *Eur. J. of Soil Sci.*, 61 (2010) 412-424.
- [7] Bruns, M. A. V.; *Encyclopedia of Soil Science*, edited by Rattan L., Taylor & Francis, London, 2006.
- [8] Jastrow, J. D., *Soil Biol. Biochem.*, 28 (1996) 665-676.
- [9] Bossuyt, H., Degryze, S., Deneff, K., Six, J.; *Soil Tillage Research*, 79 (2004) 7-31.  
TISDALL, J.M. &  
.
- [10] Allen, O. N., Aspiras, R. B., Chesters, G., Harris, R. F.; *Soil Biol. Biochem.*, 3 (1971) 347-353.
- [11] Kandeler, E., Kiem, R.; *Appl. Soil Ecol.*, 5 (1997) 221-230.
- [12] Kandeler, E., Murer, E.; *Geoderma* (1993) 56: 503-513.
- [13] Martin, J. P.; *Soil Biol. Biochem.*, 3 (1971) 33-41.
- [14] Brookes, P. C., Hirsh, P. R., Powelson, D. S.; *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 61 (2001) 41-51.

- [15] Bardgett, R. D., Manning, P., Morriën, E., De Vries, F. T.; *J. Ecol.*, 101 (2013) 334-343.
- [16] Marcin, C., Marcin, G., Maria, N., Justyna, M.-P., Katarzyna, K.; *Appl. Soil Ecol.*, 64 (2013) 7-14.
- [17] Fließbach, A., Martins, R., Reber, H. H.; *Soil Biol. Biochem.*, 26 (1994) 1201-1205.
- [18] Amusan, O. A., Ayansina, A. D. V.; *Unique Res. J. Agric. Sci.*, 1 (2013) 1-5.
- [19] Hattori, T.; *Microbial Life in the Soil – An Introduction*, Marcel Dekker, New York, 1973.
- [20] Baum, C., Hryniewicz, K.; *The Potential of Rhizosphere Microorganisms to Promote the Plant Growth in Disturbed Soils*, em: *Environmental Protection Strategies for Sustainable Development, Strategies for Sustainability*, editores: Grohmann, E., Malik, A., Springer Science+Business Media B.V., 2011.
- [21] Bergough, A., G., Hinsinger, P., Vetterlein, D., Young, I. M.; *Plant Soil*, (2009) 321: 117-152.
- [22] Eichhorn, S. E., Evert, R. F., Raven, P. H.; *Biologia Vegetal*, 7<sup>a</sup>. Edição, Guanabara Koogan, 2011, Rio de Janeiro.
- [23] Bevivino, A., Chiarini, L., Dalmastrì, C., Di Cello, F., Fani, R., Paffetti, D., Tabacchioni, S.; *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (1997) 4485-4493.
- [24] Whipps, J. M.; *J. Exp. Bot.*, (2001) 52: 487-511.
- [25] Alexander, M., *Introduction to Soil Microbiology*, 2<sup>nd</sup> edition, John Wiley & Sons, 1977.
- [26] Bais, H. P., Grotewold, E., Vivanco, J. M., Walker, T. S.; *Plant Physiol.*, 132 (2003) 44-51.
- [27] Davey, M. E., O'Toole, G. A.; *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64 (2000) 847-867.
- [28] Bevivino, A., Chiarini, L., Dalmastrì, C., Di Cello, F., Fani, R., Paffetti, D., Tabacchioni, S.; *Appl. Environ. Microbiol.*, (1997) 63: 4485-4493.
- [29] Agrawal, A., Pandey, R. S., Sharma, B.; *J. Water Res. Prot.*, 2 (2010) 432 - 448.
- [30] Allan, I. J., Carter, J. E., House, W. A., Parker, A., Warren, N.; *Appl. Geochem.*, 18

(2003) 159-194.

[31] Chowdhury, A., Pradhan, S., Saha, M., Sanyal, N.; *Indian J. Microbiol.*, 48 (2008) 114-127.

[32] Plestina R., em: *Pesticides and Herbicides*, Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, 2<sup>a</sup>. edição, AP Academic Press, Volume 7, 2003, Oxford.

[33] Damalas, C. A.; *Sci. Res. Essays*, 4 (2009) 945-949.

[34] Aktar, M. W., Chowdhury, A., Sengupta, D.; *Interdiscip. Toxicol.*, 2 (2009) 1-12.

[35] Vala Ragnarsdottir, K.; *J. Geol. Soc.*, 157 (2000) 859-876.

[36] Stephenson, G. R.; *Pesticide Use and World Food Production: Risks and Benefits*, em: *Environmental Fate and Effects of Pesticides*, ACS Symposium Series, American Chemical Society, vol. 853, 2003.

[37] Jiang, F., Ou, J., Zhang, W.; *P. Int. Acad. Ecol. Environ. Sci.*, 1 (2011) 125-144.

[38] Krishna Murti, C. R., Nag, D.; *Human Health Impact of Pesticides in the Environment*, em: *Chemistry, Agriculture and The Environment*, editado por: Richardson, M. L., The Royal Society of Chemistry, 1991, Cambridge.

[39] Arslan, H., Gomenc, I. E., Gurel, M., Tanik, A., Uysal, Y., Yalvac, M., Zeren, O.; *Water Sci. Technol.*, 45 (2002) 111-120.

[40] Amaral, A. M., Araújo, A. J., Cosenza, C. A. N., Jacob, S. C., Kubota, A., Lima, J. S., Markowitz, S., Meyer, A., Monteiro, M. C. M., Moreira, J. C., Neves, C., Soares, M. O.; *Ciênc. saúde coletiva*, 12 (2007) 115-130.

[41] Anger, W. K., Keifer, M., Langley, R., McCauley, L. A., Robson, M. G., Rohlman, D.; *Environ. Health Persp.*, 114 (2006) 953 - 960.

[42] Checkoway, H., Longstreth, W. T., Firestone, J. A., Franklin G., Smith - Weller, T., Swanson, P.; *Arch. Neurol.*, 62 (2005) 91 – 95.

[43] Gavrilesco, M.; *Eng. Life Sci.*, 5 (2005) 497-526.

[44] Temur, C., Tiryaki, O.; *J. Biol. Environ. Sci.*, 4 (2010) 29-38.

[45] Martins, D., McElroy, J. S.; *Planta Daninha*, 31 (2013) 455-467.

[46] Duke, S. O., *Environ. Health Persp.*, 87 (1990) 263-271.

- [47] Powles, S. B., Yu, Q.; *Annu. Rev. Plant Biol.*, 61 (2010) 317-347.
- [48] Pacanoski, Z.; *Pak. J. Weed Sci. Res.*, 13 (2007) 135-147.
- [49] Almeida, S. D. B., Cerdeira, A. L., Costa, E. A. D., Franco, D. A. S., Gomes, M. A. F., Luchini, L. C., Matallo, M. B., Moura, M. C. M., Spadotto, C. A.; *Pesticidas, R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, 18 (2008) 17-26.
- [50] Colborn, T., Short, P.; *Toxicol. Ind. Health*, 15 (1999) 241-276.
- [51] Kughur, P. G.; *J. Sustain. Dev. Afr.*, 14 (2012) 206-216.
- [52] Stellman, S. D., Stellman, J. M.; *Am. J. Ind. Med.*, 9 (1986) 305-321.
- [53] Christian, R., Stellmann, S. D., Stellmann, J. M., Tomassallo, C., Weber, T.; *Nature*, 422 (2003) 681-687.
- [54] Ansbaugh, N., Farris, P. E., Garzotto, M., Mori, M., Shannon, J.; *Cancer*, 119 (2013) 2399-2404.
- [55] Constable, J. D., Schechter, A.; *Int. J. Epidemiol.*, 35 (2006) 1230-1232
- [56] Battaglin, W. A., Kalkhoff, S. J., Porter, S. D., Thurman, E. M.; *J. Am. Water Resour. As.*, 39 (2003) 743-756.
- [57] Fukami, J., -I., Murakami, M.; *B. Environ. Contam. Tox.*, 19 (1978) 423-427.
- [58] Kolpin, D. W., Linhart, S. M., Thurman, E. M.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 35 (1998) 385-390.
- [59] Scribner, E. A., Thurman, E. M., Zimmerman, L. R.; *Sci. Total Environ.*, 248 (2000) 157-167.
- [60] Gonçalves, F. F., Kurz, M. H. S., Machado, S. L. O., Marchesan, E., Martins, M. L., Primel, E. G., Zanella, R.; *J. Braz. Chem. Soc.*, 18 (2007) 585-589.
- [61] Huang, X., Mariño, M. A., Massoudieh, A., Young, T. M.; *J. Environ. Eng.*, 131 (2005) 1057-1067.
- [62] Böhm, H., -H., Müller, H.; *Naturwissenschaften*, 63 (1976) 296-296.
- [63] Ashton, F. M., Crafts, A. S.; *Mode of Action of Herbicides*, John Wiley & Sons, 1973.
- [64] Calleja, A., Castro, J. M., Dopico, M. S., González, E., González, M. V., Pérez, J.,

- Rodríguez, M.; *J. Chromatogr. Sci.*, 40 (2002) 523-528.
- [65] Kovačić, N., Prosen, H., Zupančič – Kralj, L.; *Acta Chim. Slov.*, 51 (2004) 395-407.
- [66] Azevedo, D. A., Knoppers, B. A., Schultz-Bull, D., Silva, T. R.; *J. Braz. Chem. Soc.*, 21 (2010) 1096-1105.
- [67] Burnside, O., Farland, J. M., LeBaron, H. M.; *The Triazine Herbicides: A Milestone in the Development of Weed Control Technology*, em: *The Triazine Herbicides: 50 years Revolutionizing Agriculture*, editado por: Burnside, O., Farland, J. M., LeBaron, H. M., Elsevier, 2008.
- [68] US EPA - [http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/atrazine\\_background.htm](http://www.epa.gov/pesticides/factsheets/atrazine_background.htm) ;  
Acessado: 10/07/13, às 11:51h.
- [69] Färber, H., Nick, K., Schöler, H. F.; *Fresenius J. Anal. Chem.*, 350 (1994) 145-149.
- [70] Angle, J. S., Glenn, S.; *Agr. Ecosyst. Environ.*, 18 (1987) 273-280.
- [71] Ahuatzí-Chacón, D., Galíndez-Mayer, J., Juárez-Ramírez, C., Macías-Flores, A., Mondragón-Parada, M. E., Ruiz-Ordaz, N., Salmerón-Alcocer, A., Tafoya-Garnica, A.; *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25 (2009) 2195-2204.
- [72] Converti, A., Secchi, G. A. R., Sene, L., Simão, R. C. G.; *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 53 (2010) 487-496.
- [73] Ralebitso, T. K., Senior, E., van Verseveld, H. W.; *Biodegradation*, 13 (2002) 11-19.
- [74] Barnabas, I. J., Dean, J. R., Wade, G., *J. Chromatogr. A.*, 733 (1996) 295-335.
- [75] Ávila, L. G., Leite, S. B., Dick, D. P., Pohlmann, A. R.; *Quim. Nova*, 32 (2009) 1727-1733.
- [76] Hoagland, K. D., Jurgensen, T. A.; *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 19 (1990) 617-623.
- [77] Christenson, M. K., Davis, P. H., Knight, L. C., Kolok, A. S., Trease, A. J.; *Environ. Toxicol. Chem.*, 32 (2013) 1544-1551.
- [78] Licha, F., Nödler, K., Voutra, D.; *Mar. Pollut. Bull.*, 70 (2013) 112-118.
- [79] Dehghani, M., Hashemi, H., Nasser, S., *J. Environ. Publ. Health*, 2013 (2013) 1-7.
- [80] Bachoon, D. S., Sherchan, S. P.; *J. Appl. Microbiol.*, 111 (2011) 293-299.

- [81] Alleva, E., Belloni, V., Canonaco, M., Dessi-Fulgheri, F., Facciolo, R. M., Giusi, G., Santucci, D.; *Toxicol. Sci.*, 89 (2006) 257-264.
- [82] Dewey, S. L.; *Ecology.*, 67 (1986) 148-162
- [83] Hamill, A. S., Khan, S., U., Marriage, P. B.; *J. Agric. Food Chem.*, 29 (1981) 216-219.
- [84] Ghosh, P. K., Philip, L.; *Global Nest J.*, 8 (2006) 159-178.
- [85] Shimabukuro, R. H., Swanson, H. R.; *J. Agr. Food Chem.*, 17 (1969) 199-205.
- [86] Carpentier, R., Leroux, G. D., Purcell, M.; *Pestic. Biochem. Phys.*, 37 (1990) 83-69.
- [87] Abdelhafid, R., Barriuso, E., Houot, S.; *Soil Biol. Biochem.*, 32 (2000) 389-401.
- [88] Carmo, A. P. B., Carmo, D. A., Oliveira, J. L. M., Pires, J. M. B.; *Rev. Ambient. Água*, 8 (2013) 133-143.
- [89] Białas, W., Cyplik, P., Czaczyk, K., Króliczak, P., Marecik, R., Olejnik, A.; *Biodegradation*, 19 (2008) 293-301.
- [90] Cássia, R., Converti, A., Secchi, G. A. R., Sene, L., Simão, G.; *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 53 (2010) 487-496.
- [91] Martin-Laurent, F., Scott, C., Udiković-Kolić, N.; *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 96 (2012) 1175-1189.
- [92] Daugherty, S. C., Mongodin, E. F., Nelson, K. E., Sadowsky, M. J., Shapir, N, Wackett, L. P.; *J. Bacteriol.*, 189 (2007) 674-682.
- [93] Hao, Y. -L., Radosevich, M., Traina, S. J., Tuovinen, O. H.; *Appl. Environ. Microbiol.*, 61 (1995) 297-302.
- [94] Rieu, C., Soulas, G, Yassir, A.; *Pestic. Sci.*, 54 (1998) 75-82.
- [95] Aliaga, A., García, C., Hernández, T., Moreno, J. L., Navarro, S.; *Appl. Soil Ecol.*, 35 (2007) 120-127.
- [96] Behki, R. M., Khan, S. U.; *J. Agric. Food Chem.*, 34 (1986) 746-749.
- [97] Hou, Z., Mu, W., Pan, H., Zhang, S., Zhang, X., Zhao, W.; *J. Environ. Sci. Health, Part B*, 47 (2012) 153-160.

- [98] Chen, X., Han, L., Xu, Y., Wu, Qiong; *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 85(2010) 79-82.
- [99] Adrian, S., Bordean, D. M., Borozan, A. B., Filimon, M. N., Gotia, S. R., Popescu, R., Verdes, D.; *AJMR*, 5(2011) 5507 – 5511.
- [100] Eurich, D. T., Johnson, J. A., Majumdar, S. R., Simpson, S. H., Tsuyuki, R. T.; *CMAJ*, 174(2006) 169-174.
- [101] Sabadie, J., *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 526-531.
- [102] Dong, J. G., Kang, Z. H., Lu, X. H., Tao, B., Zhang, J. L., Wang, J. N.; *Appl. Biochem. Microbiol.*, 48 (2012) 460-466.
- [103] Gašić, S., Marisavljević, D., Radivojević, L., Šantrić, L.; *J. Serb. Chem. Soc.*, 77(2012) 845-855.
- [104] Tao, B., Yang, Y., Zhang, J., Zhang, W.; *Front. Agric. China*, 2 (2008) 224-228.
- [105] Benzi, M., Gianotti, V., Robotti, E.; *Anal. Bioanal. Chem.*, 399 (2011) 1705-1714.
- [106] Corbin, F. T., Sheldon, Y., Siminszky, B.; *Weed Sci.*, 43 (1995) 163-168.
- [107] Cotterman, J. C., Primiani, M. M., Saari, L. L.; *Plant Physiol.*, 93 (1990) 55-61.
- [108] Diehl, K. E., Simpson, D. M., Stoller, E. W., Taylor, S. L.; *Weed Sci.*, 43 (1995) 306-311.
- [109] Mitra, S.; *Proc. Calif. Weed Sci. Soc.*, 58 (2006) 18-23.
- [110] Bry, C., Einhorn, J., Guichon, R., Nélieu, S., Perreau, F., Seguin, F.; *Anal. Bioanal. Chem.*, 382 (2005) 108-114.
- [111] FAO Specifications and Evaluations For Agricultural Pesticides: Nicosulfuron - [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/Specs/nicosulfuron06.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/Specs/nicosulfuron06.pdf). Acesso: 16/07/13, às 11:56 h.
- [112] Fen, J., Sun, Y., Yu, H., Wang, L., Wei, L.; *Chemosphere*, 37 (1998) 747-751.
- [113] Koskinen, W. C., Regitano, J. B.; *J. Agric. Food Chem.*, 56 (2008) 5801-5805.
- [114] Brown, H. M.; *Pestic. Sci.*, 29(1990) 263-281.
- [115] National Library of Medicine HSDB Database – <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+7950>. Acesso: 14/07/13, às 14:30 h.

- [116] Gašić, S., Radivojević, L., Šantrić, L., Umiljendić, J. G., Vljević, D. M.; *J. Serv. Chem. Soc.*, 77 (2012) 845-855.
- [117] Adrian, S., Bordean, D. M., Borozan, A. B., Filimon, M. N., Gotia, S. R., Popescu, R., Verdes, D.; *Afr. J. Microbiol. Res.*, 5 (2011) 5507-5511.
- [118] Brown, H. M., Gaddamidi, V., Lee, P. W., Sulfonylureas, em: *Metabolic Pathways of Agrochemicals – Herbicides and Plant Growth Regulators – Part One*, editor-chefe: Terri Roberts, The Royal Society of Chemistry, 1998.
- [119] Hayes, R. M., Mueller, T. C., Poppell, C. A.; *J. Agric. Food Chem.*, 50 (2002) 4581-4585.
- [120] Oliveira, M. F., Prates, H. T., Sans, L. M. A.; *Planta Daninha*, 23 (2005) 101-113.
- [121] Andrade, S. A. L., Mazzafera, P., Schiavinato, M. A., Silveira, A. P. D.; *J. Agr. Sci.*, 147 (2009) 105-115.
- [122] Mishra, M. K., Slater, A.; *Biotechnol. Res. Int.*, 2012 (2012) 1-17.
- [123] Carvalho, V. P., Diniz, L. E. C., Oliveira, M., Ruas, C. F., Ruas, E. A., Ruas, P. M., Torrez, F. M.; *Braz. Arch. Biol. Techn.*, 48 (2005) 511-521.
- [124] Ponte, S.; *World Dev.*, 30 (2002) 1099-1122.
- [125] Borgemeister, C., Chabi-Olaye, A., Gathara, S., Jaramillo, A., Jaramillo, J., Maina, J., Muchugu, E., Setamou, M.; *PLOS One*, 8 (2013) 1-10.
- [126] Adams, J., Brien, D. L.; *M/C J.*, 15 (2012) - <http://journal.media-culture.org.au/index.php/mcjournal/article/view/505>. Acesso: 08/07/13, 21:04 h.
- [127] Hernández-Sotomayor, T., Santos-Briones, C.; *Braz. J. Plant Physiol.*, 18 (2006) 217-227.
- [128] Pinto-Maglio, C. A. F.; *Braz. J. Plant Physiol.*, 18 (2006) 37-44.
- [129] Baena, S., Davis, A. P., Gole, T. W., Moat, J.; *PLOS One*, 7 (2012) 1-13.
- [130] Druzhinina, I. S., Kubicec, C. P., Mulaw, T. B.; *Diversity*, 2 (2010) 527-549.
- [131] Brouhan, P., Crouzillat, D., Petiard, V., Teressa, A.; *EJAST*, 1 (2010) 63-79.
- [132] Aguiar, A. T. E., Favarin, J. L., Fazuoli, L. C., Salva, J. G.; *Bragantia*, 64 (2005) 577-582.

- [133] F. G., Meyer; *Econ. Bot.*, 19 (1965) 136-151.
- [134] Martins, A. L.; *História do Café*, Editora Contexto, São Paulo.
- [135] Bealer, B. K., Weinberg, B. A. ; *The world of caffeine: The Science and the Culture of the World's Most Popular Drug*, Routledge, 2002.
- [136] Stone, C.; *SAUDI ARAMCO world*, 64 (2013) 10-17.
- [137] Ferraro, A. R.; *Educ. rev.*, 26 (2010) 219-248.
- [138] Oestreich-Janzen, S.; *Chemistry of Coffee*, em: *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology*, vol. 3, editores-chefes: Mander, L. e Liu, H, -w, Elsevier, 2010.
- [139] FAO CORPORATE DOCUMENT REPOSITORY - Planting coffee trees in the plantation - <http://www.fao.org/docrep/006/ad219e/AD219E05.htm>. Acesso: 15:48h. 17/07/13
- [140] Barros, R. S., DaMatta, F. M., Maestri, M., Ronchi, C. P.; *Braz. J. Plant Physiol.*, 19 (2007) 485-510.
- [141] Coffe Research Web Site - <http://www.coffeeresearch.org/agriculture/coffeeplant.htm>. Acesso: 18/07/13, às 09:17 h.
- [142] Burkhardt, J., Kufa, T.; *J. Agr. Crop Res.*, 1 (2013) 1-9.
- [143] Cultivo do Café Orgânico - Embrapa - [http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cafe/CafeOrganico\\_2ed/solo\\_s.htm](http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cafe/CafeOrganico_2ed/solo_s.htm). Acesso: 19/07/13, às 15:43 h.
- [144] Cardoso, E. J. B. N., Filho, A. C.; *Pesq. Agropec. bras.*, 35 (2000) 2033-2042.
- [145] Di Salvo, L. P., Nardini, C. B., Salamone, I. E. G.; *Rev. Argent. Microbiol.*, 43 (2011) 311.
- [146] Hart, M. M., Trevors, J. T., *Front. Ecol. Environ.*, 3 (2005) 533-539.
- [147] Bayman, P., Lebrón, L., Lodge, D. J.; *ISRN Agronomy*, 2012 (2012) 1-7.
- [148] Sijam, K., Tahat, M. M.; *Afr. J. Microbiol. Res.*, 46 (2012) 7295 – 7501.
- [149] Caballero-Mellado, J., Fuentes-Ramirez, L. E., Jimenez-Salgado, T., Martinez-Romero, E., Mascarua-Esparza, M. A., Tapia-Hernandez, A.; *Appl. Environ. Microbiol.*,

63 (1997) 3676-3683.

[150] Baon, J. B., Kurniawan, A., Wedhastri, S.; *J. Agr. Sci. Tech.*, A2 (2012) 1064-1070.

[151] Caballero-Mellado, J., Martínez-Aguilar, L., Paredes-Valdez, G., Santos, P. E.; *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 54 (2004) 1165-1172.

[152] Adetunji, M. O., Oladejo, J. A.; *Agric. Sci. Res. J.*, 2 (2012) 77-83.

[153] Ali, F., Yan, J.; *J. Integr. Plant Biol.*, 54 (2012) 134-151.

[154] Jones, J. G., Piperno, D. R., Pohl, M. E. D., Pope, K. O.; *PNAS*, 104 (2007) 6870-6875.

[155] Alam, Q. M., Karim, M. K., Monbruzzaman, Rahman, M. S.; *Bangladesh J. Agril. Res.*, 34 (2009) 15-24.

[156] Bommert, P., Jackson, D., Nagasawa, N. S.; *Nat. Genet.*, 45 (2013) 334-337.

[157] Bressani, R., Hussain, M. A., Rottman, M. A.; *FAO Food and Nutrition Series: Maize in human nutrition*, Agriculture and Consumer Protection, FAO, nº. 25, 1992, Itália. -<http://www.fao.org/docrep/t0395e/T0395E01.htm>. Acesso: 17/08/13, às 11:12 h.

[158] Chen, M., Qin, Z., Zhuang, Q.; *Environ. Res. Lett.*, 8 (2013) 1-6.

[159] Jugenheimer, R. W., *Euphytica*, 10 (1961) 152-156.

[160] Dias, F. F., Darshan, C. M., *Starch/Stärke*, 51 (1999) 52-57.

[161] Sistemas de Produção da Embrapa: Cultivo do Milho - <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Milho/CultivodoMilho/clima.htm>. Acesso: 22/07/13, às 10:12 h.

[162] Liu, S., Song, F., Xu, H., Zhu, X.; *J. Agr. Sci.*, 4 (2012) 21-30.

[163] Hochholdinger, F., *The Maize Root System: Morphology, Anatomy, and Genetics*, em: *Handbook of Maize: Its biology*, editores: Bennetzen, J. L., Hake, S. C., Springer, 2009.

[164] Kozinka, V., Luxová, M.; *Biol. Plant.*, 12 (1970) 47-57.

[165] Buckler, E. S., Dangl, J. L., Jin, Z., Koren, O., Ley, R. E., Peiffer, J. A., Spor, A., Tringe, S. G.; *PNAS*, 110 (2013) 6548-6553.

[166] Ahmad, S., Gordon-Weeks, R., Neal, A. L., Ton, J.; *PLoS ONE*, 7 (2012) 1-10.

- [167] Ley, R. E., Peiffer, J. A.; *Commun. Integr. Biol.*, 6 (2013) e25177-1 - e25177-3.
- [168] Christie, A. A., Dashiell, K. E., Lehman, R. M., Prischmann, D. A.; *Appl. Soil Ecol.*, 40 (2008) 417-431.
- [169] Bevivino, A., Chiarini, L., Dalmastrì, C., Di Cello, F., Fani, R., Paffetti, D., Tabacchioni, S.; *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (1997) 4485-4493.
- [170] Bevivino, A., Chiarini, L., Dalmastrì, C., Nacamulli, C., Tabacchioni, S.; *FEMS Microbiol. Ecol.*, 23 (1997) 183-193.
- [171] Bevinino, A., Baldwin, A., Chiarini, L., Dalmastrì, C., Dowson, C., Mahenthiralingam, E.; *Environ. Microbiol.*, 9 (2007) 1632-1639.
- [172] Bevinino, A., Cantale, C., Chiarini, L., Dalmastrì, C., Sarrocco, S., Tabacchioni, S.; *FEMS Microbiol. Ecol.*, 27 (1998) 225-237.
- [173] Ljungholm, K., Norén, B., Sköld, R., Wadsö, I., *OIKOS*, 33(1979) 15-23.
- [174] Braissant, O.; Daniels, A. U., Göpfert, B., Wirz, D.; *Sensor*, 10 (2010) 9369-9383.
- [175] Airoidi, C., Prado, A. G. S.; *Thermochim. Acta*, 349 (2000) 17-22.
- [176] Barja, I., Núñez, L.; *Soil Biol. Biochem.* 31 (1999) 441-447. [177] Hyysalo, P., Jokela, K., Laine, E., Lehto, V. P., Ylianttila, L.; *J. Therm. Anal.*, 53 (1998) 685-695.
- [177] Braissant, O., Daniels, A. U., Göpfert, B., Wirz, D.; *FEMS Microbiol. Lett.*, 303 (2010) 1-8. [178] Alem, N., Beezer, A. E., Beezer, A. E., Gaisford, S., O' Neill, M. A. A., Sousa, L. A. E.; *J. Phys. Chem. B*, 114 (2010) 13173-13178.
- [179] Wadsö, I.; *Thermochim. Acta*, 394 (2002) 305-311.
- [180] Wadsö, I.; *J. Therm. Anal. Cal.*, 95 (2009) 843-850.
- [181] Barros, N., Feijóo, S., Salgado, J.; *Thermochim. Acta*, 458 (2007) 11-17.
- [182] Airoidi, C., Barros, N., Oliveira, D. A.; *Thermochim. Acta*, 471 (2008) 86-89.
- [183] Coucheney, E., Grice, S. M., Harris, J. A., Hermann, A. M., Lerch, T. Z., Pawlett, M., Ritz, K.; *Soil Biol. Biochem.*, 47 (2012) 149-157.
- [184] Airoidi, C., Barros, N., Espina, A., Feijóo, S., García, J. R., Ramajo, B.; *J. Therm. Anal. Calorim.*, 93 (2008) 657-665.
- [185] Bejayalaxmi Devi, N., Yadava, P. S.; *Appl. Soil Ecol.*, 31 (2006) 220-227.

- [186] Bekku, Y., Imaki, H.; Koizumi, H., Oikawa, T.; *Appl. Soil Ecol.*, 5 (1997) 247-254.
- [187] Brinton, W. F., Evans, E., Haney, R. L.; *Renew. Agr. Food Syst.*, 23 (2008) 171-176.
- [188] Martin, R.; *Soil Biol. Biochem.*, 33 (2001) 973-982.
- [189] Camiña, F., Gil-Sotres, F., Leirós, C., Trasar-Cepeda, C.; *Soil Biol. Biochem.*, 30 (1998) 1005-1011.
- [190] Henry, F., Nguyen, C.; *Biol. Fertil. Soils*, 35 (2002) 270-276.
- [191] Laor, Y., Medina, S., Raviv, M., Saadi, I.; *Bioresource Technol.*, 100 (2009) 4814-4820.
- [192] Cox, M. M., Nelson, D. L.; *Lehninger Principles of Biochemistry*, 4ª edição, W. H. Freeman and Company, 2005.
- [193] Glossary of Terms Used in Bioinorganic Chemistry: Catabolism - <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/bioinorg/CD.html#8>. Acesso: 24/07/13, às 11:20 h.
- [194] Glossary of Terms Used in Bioinorganic Chemistry: Anabolism - <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/bioinorg/AB.html>. Acesso: 24/07/13, às 11:18 h.
- [195] Liu, J., Marison, I. W., Mascow, T., Patiño, R., Stockar, U.; *J. Biotechnol.*, 121 (2006) 517-533.
- [196] Heijnen, J. J.; *Bioenergetics of Microbial Growth*, em: *Encyclopedia of Bioprocess Technology*, editores: Drew, S. W., Flickinger, M. C., Wiley Biotechnology Encyclopedias, 1999.
- [197] Brun, R., Scheurer, C., Steinhuber, A., Trampuz, A., Wenzler, T., Wittlin, S.; *PLoS* 6 (2012) 1-7.
- [198] Dai-Hua, J., Qiao-Yun, H., Peng, C., Xing-Min, R., Wei, L.; *Pedosphere* 17 (2007) 137-145.
- [199] Núñez-Fernández, O., Núñez-Regueira, L., Proupín-Castiñeiras, J., Rodríguez-Añón, J. A.; *J. Therm. Anal. Cal.*, 80 (2005) 35-41.
- [200] Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J.; *Microbiologia de Brock*, 10ª. Edição, Person Prentice Hall, 2004, São Paulo.

- [201] Al-Alami, N. I., Al-Holy, M., Al-Qadiri, H. M., Cavinato, A. G., Mengshi, L., Rasco, B. A.; *J. Rapid Meth. Aut. Mic.*, 16 (2008) 73-89.
- [202] Alston, M., Baranyi, J., Betts, R. P., Cameron, A. D. S., Hinton, J. C. D., Lucchini, S., Pin, C., Rice, C. J., Rolfe, M. D., Stringer, M. F., Thompson, A.; *J. Bacteriol.*, 194 (2012) 686-701.
- [203] Belaich, J. P.; *Biological Microcalorimetry*, Academic Press, 1980.
- [204] Airoidi, C., Barros, N., Critter, S. A. M. Feijóo, S., Simoni, J. A.; *J. Therm. Anal. Cal.*, 63(2001) 577-588.
- [205] Atkins, P. W.; *Physical Chemistry*, 5ª edição, Oxford University Press, 1994.
- [206] Zhao, B., Zheng, S., Yao, J., Yu, Z.; *Eur. J. Soil Biol.*, 43(2007) 151-157.
- [207] Sparling, G. P., *J. Soil Sci.*, 34 (1983) 381.
- [208] Ker, J. C.; *Geonomos*, 5 (1997) 17-40.
- [209] Fernández, J. M., Leifeld, J., Plante, A. F.; *Geoderma*, 153 (2009) 1-10.
- [210] Bradbury, G. W., Shafizadeh, F.; *J. Appl. Polym. Sci.*, 23 (1979) 1431-1442.
- [211] Ramiah, M. V.; *J. Appl. Polym. Sci.*, 14 (1970) 1323-1337.
- [212] Huang, M-R., Li, X-G.; *J. Appl. Polym. Sci.*, 68 (1998) 293-304.
- [213] Chubarova, M. A., Kononova, M. M., Larina, N. K., Shurygina, E. A.; *Geoderma*, 6 (1971) 169-177.
- [214] Benedetti, A., Brookes, P. C., Dell'Abate, M. T.; *J. Sep. Sci.*; 26 (2003) 433-440.
- [215] Airoidi, C., Critter, S. A. M.; *J. Braz. Chem. Soc*, 17 (2006) 1250-1258
- [216] Hagerberg, D., Nilsson, L. O., Rosengren, U., Wallander, H.; *Soil Biol. Biochem.* 35 (2003) 997-999.
- [217] Andréa, M. M., Luchini, L. C., Musumeci, M. R., Nakagawa, L. E.; *Pesq. Agropec. Bras.*, 30 (1995) 471-476.
- [218] Scrivnen, N. C., Sparks, D. L., Zhang, Z. Z.; *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 54 (1990) 1564-1571.
- [219] Dias, J. C. T., Linardi, V. R., Rezende, R. P.; *Braz. J. Microbiol.*, 31 (2000) 61-66.
- [220] Chen, M., Liu, L., Liu, X., Liu, Z., Xie, G., Zeng, G., Zeng, Z., Zhang, Y.; *Appl.*

- Biochem. Biotechnol.*, 170 (2013) 1614-1623.
- [221] Håkansson, K., Mattiasson, B.; *Biotechnol. Lett.*, 24 (2002) 287-291.
- [222] Agteren, M. H., Janssen, D. B., Keuning, S.; *Handbook of Biodegradation and Biological Treatment of Hazardous Organic Compounds*, Kluwer Academic Publishers, 1998.
- [223] Feng, Y., -S., Lee, C. -M.; *J. Hazard. Mater.*, 164 (2009) 646-650.
- [224] Sims, G. K., *Soil Biol. & Biochem.*, 38(2006) 2478-2480.
- [225] Muyzer, G., Sonokinm D. Y., Takaichi, S., Tourova, T. P., van Pelt, S.; *Microbiol.*, 153(2007) 1157-1164.
- [226] Aremu, K., Babu, G. R., Chapatwala, K. D., Dudley, C., Williams, R.; *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 39 (1993) 655-666.
- [227] Carraza, F., Dias, J. C. T., Linardi, V. R., Monteiro, A. S., Rezende, R. P.; *Braz. J. Microbiol.*, 34(2003) 117-120.
- [228] Albano, C., Johansson, E., Persson, J. A.; *Anal. Chem.*, 58 (1986) 1173-1178.
- [229] Balsa, R., Barros, N., Feijóo, S., Gomez-Orellana, I.; *Thermochim. Acta*, 249 (1995) 161-168.
- [230] Brockett, B. F. T., Grayston, S. J., Prescott, C. E.; *Soil Biol. Biochem.*, 44 (2012) 9-20.
- [231] Braddock, J. F., Clein-Curley, J. S., Gullledge, J. M., Lindstrom, J. E., Schimel, J. P.; *Soil Biol. Biochem.*, 31 (1999) 831-838.
- [232] Al-Janabi, S. M., Alves, A. C., Baura, V. A., Cruz, L. M., Faoro, H., Monteiro, R. A., Pedrosa, F. O., Rigo, L. U., Souza, E. M.; *Appl. Environ. Microbiol.*, 76 (2010) 4744-4749.
- [233] Cheng, F., Cheng, Y., Cui, C., Peng, X., Yuan, J., Zhang, S., Zhao, P., Zhong, C.; *PLoS One*, 8 (2013) 1-12.
- [234] Bronner, G., Goss, K. -U., *Environ. Sci. Technol.*, 45 (2011) 1307-1312.
- [235] Borisover, M., Graber, E. R., Reddy, M.; *Environ. Sci. Technol.*, 35 (2001) 2518-2524.