

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GABRIELA VAZ LOBO BARROS

**ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DO HERBICIDA 2,4-D SOB
DIFERENTES CONDIÇÕES DE OXIRREDUÇÃO**

POÇOS DE CALDAS/MG

2022

GABRIELA VAZ LOBO BARROS

**ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DO HERBICIDA 2,4-D SOB
DIFERENTES CONDIÇÕES DE OXIRREDUÇÃO**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia Ambiental pelo Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Federal de Alfenas. Linha de pesquisa: Tratamento de Efluentes.

Orientador: Gunther Brucha

POÇOS DE CALDAS/MG

2022

**Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de AlfenasBiblioteca
Campus Poços de Caldas**

Barros, Gabriela Vaz Lobo.

Estudo da biodegradação anaeróbia do herbicida 2,4-D sob diferentes condições de oxirredução/ Gabriela Vaz Lobo Barros. – Poços de Caldas, MG, 2022. 55 f. : il. -

Orientador(a): Gunther Brucha.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) -Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2022. Bibliografia.

1. Biodegradação. 2. Herbicida. 3. Bactérias anaeróbias.

I.Brucha, Gunther, orient. II. Título.

Ficha gerada automaticamente com dados fornecidos pelo autor.

GABRIELA VAZ LOBO BARROS

ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DO
HERBICIDA 2,4-D SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE
OXIRREDUÇÃO

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestra em Engenharia Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Tratamento de Efluentes.

Aprovada em: 05 de maio de 2022

Prof. Dr. Gunther Brucha
Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. João Durval Arantes Junior
Instituição: Fundação Parque Tecnológico Itaipu

Prof. Dr. Rafael Brito de Moura
Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por Gunther Brucha, Vice-Coordenador(a) do Programa de Pós-graduação Em Ciência e Engenharia Ambiental, em 06/06/2022, às 12:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Rafael Brito de Moura, Professor do Magistério Superior, em 07/06/2022, às 08:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por Joao Durval Arantes Junior, Usuário Externo, em 11/06/2022, às 12:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 0743878 e o código CRC F161BF48.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, familiares e amigos, sem eles nada disso seria possível. Ao meu querido orientador Gunther Brucha. Ao João Durval e a todos que de alguma forma me ajudaram, direta ou indiretamente. Além do apoio do laboratório da Usina Binacional de Itaipu.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

O Brasil é um dos países que mais utiliza herbicidas no mundo. Seu uso indiscriminado gera efeitos adversos ao meio ambiente e a saúde. O ácido 2,4-Diclorofenoxiacético está entre os 3 princípios ativos de pesticida mais utilizados no Brasil e é empregado em diversas lavouras. Pode ser encontrado em solos superficiais e profundos, sedimentos de rios, lagos, mares, águas fluviais e subterrâneas. O processo aeróbio de biodegradação deste herbicida é conhecido e bem relatado na literatura científica, entretanto pouco se sabe sobre o processo anaeróbio de degradação deste composto. Este trabalho se propõe a aprofundar os estudos relacionados a degradação anaeróbia do 2,4-D. Dessa maneira, o presente estudo teve como objetivo a analisar a degradação do 2,4-D em diferentes condições de oxirredução. Para isso, foram realizados ensaios de enriquecimento das comunidades microbianas anaeróbias metanogênicas, sulfatorredutoras e desnitrificantes, na presença de 2,4-D, utilizando como inóculo o sedimento coletado no reservatório de Itaipú. Os resultados dos ensaios apontam que houve variação de remoção do 2,4-D entre os diferentes meios de oxirredução, sendo 9,26%, para a condição desnitrificantes, 63,33%, para a condição sulfetogênica e 100% no meio para a condição metanogênica. Portanto, o meio metanogênico foi o que apresentou melhores condições para a remediação do herbicida 2,4-D nas condições estudadas. Os resultados apresentados podem contribuir para análise mais completa do comportamento deste composto no meio ambiente, ajudando no desenvolvimento de processos de biorremediação mais eficientes.

Palavras-Chave: sedimento; pesticidas; poluição.

ABSTRACT

Brazil is one of the countries that most uses herbicides in the world. Its indiscriminate use generates adverse effects on the environment and health. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid is among the 3 most used pesticide active principles in Brazil and is used in several crops. It can be found in surface and deep soils, sediments of rivers, lakes, seas, rivers and groundwater. The aerobic process of biodegradation of this herbicide is known and well reported in the scientific literature, however little is known about the anaerobic process of degradation of this compound. This work proposes to deepen the studies related to the anaerobic degradation of 2,4-D. Thus, the present study aimed to analyze the degradation of 2,4-D under different oxidation-reduction conditions. For this, enrichment tests of the anaerobic methanogenic, sulfate-reducing and denitrifying microbial communities were carried out in the presence of 2,4-D, using the sediment collected in the Itaipú reservoir as inoculum. The results of the tests indicate that there was a variation in the removal of 2,4-D between the different oxidation-reduction media, being 9.26% for the denitrifying condition, 63.33% for the sulfetogenic condition and 100% in the medium for the methanogenic condition. Therefore, the methanogenic medium presented the best conditions for the remediation of the 2,4-D herbicide under the conditions studied. The results presented may contribute to a more complete analysis of the behavior of this compound in the environment, helping to develop more efficient bioremediation processes.

Keywords: sediment; pesticides; pollution.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	10
2.1	OBJETIVO GERAL	10
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO	10
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1	HERBICIDAS	11
3.2	PROPRIEDADES DO 2,4-D	12
3.3	IMPACTOS 2,4-D À SAUDE HUMANA	14
3.4	IMPACTOS AMBIENTAIS CAUSADOS PELO 2,4-D	14
3.5	DEGRADAÇÃO 2,4-D	15
3.5.1	Aeróbia	16
3.5.2	Anaeróbia	17
4	METODOLOGIA	19
4.1	DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO	19
4.2	COLETA DE AMOSTRAS	20
4.3	MEIO DE CULTIVO	22
4.4	ARANJO EXPERIMENTAL DOS REATORES	28
4.5	INOCULO DE ENRIQUECIMENTO	29
4.6	ENSAIO DE DEGRADAÇÃO DO 2,4-D	32
4.7	MONITORAMENTO DOS REATORES	35
4.7.1	Reatores de Enriquecimento	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	RESULTADOS ENRIQUECIMENTO	37
5.2	RESULTADOS ENSAIO DE DEGRADAÇÃO 2,4-D	41
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	52
	REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Os agrotóxicos são uma eficiente tecnologia utilizada na agricultura, possuem a capacidade de potencializar a produção e manter a integridade das plantações, além de reduzir custos com mão de obra (CANDIOTTO et al, 2013). Dados recentes sobre o consumo e uso de agrotóxicos no Brasil evidenciam o amplo uso dessas substâncias na agricultura nacional (NEVES et al., 2020).

Os herbicidas são compostos orgânicos, quimicamente sintetizados, utilizados para controle de plantas daninhas. Ambientalmente, são classificados como micropoluentes (JAVARONI; LANGRANDGRAF; RESENDE, 1998). Dentre eles, destaca o ácido 2,4-diclofenoxiacético.

O ácido 2,4-diclofenoxiacético (2,4-D) está entre os 3 princípios ativos de pesticida mais utilizados no Brasil e é empregado principalmente no controle de ervas daninhas de folhas largas em cultivo de cereais, cana-de-açúcar e pastagens (BARBOSA; SOLANO; UMBUZEIRO, 2015).

Muitos resíduos de agrotóxicos, incluindo o 2,4-D, permanecem no ambiente após aplicação. São capazes de fixar-se no solo e, além disso, possuem a capacidade de percolação, podendo atingir o lençol freático e a hidrologia local. Desta forma, informações sobre a degradação do herbicida 2,4-D são importantes para lidar com a problemática que envolve este composto (VIEIRA *et al.*, 2017).

A biorremediação é uma técnica que pode ser eficiente para diminuir a presença desse resíduo no solo tratando áreas poluídas (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016). A degradação do 2,4-D no ambiente pode ser aeróbia ou anaeróbia. Muitos estudos têm mostrado a eficiência da degradação anaeróbia do 2,4-D através do metabolismo de microrganismos metanogênicos, redutores de sulfato ou ferro (BRUCHA *et al.*, 2021; ROBLES-GONZALEZ *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2009, YANG *et al.*, 2017).

Como este herbicida possui alta capacidade de percolação, este chega com facilidade a ambientes anóxicos no solo, onde há uma carência de oxigênio disponível. Nestes ambientes, há uma predominância de microrganismos anaeróbios. Visando trabalhar com condições mais próximas da realidade, o estudo foi feito com microrganismos anaeróbios.

A degradação microbiana é considerada a principal via na decomposição de 2,4-D no solo. O mecanismo mais importante da degradação bacteriana envolve a remoção da cadeia lateral de ácido acético para produzir 2,4-diclorofenol (DCP). Posteriormente, ocorre a clivagem do anel aromático, produzindo ácidos alifáticos, tais como succinato (GHASSEMI *et al.*, 1981).

A biodegradação do 2,4-D é conduzida tanto por fatores bióticos quanto por fatores abióticos. A tipologia dos microrganismos envolvidos, as condições ambientais (temperatura e pH) e os constituintes do ambiente, são elementos que afetam o processo de biodegradação (GUEDES, 2010). Na remoção de matéria orgânica, processos biológicos são os mais vantajosos economicamente. O 2,4-D é passível de degradação tanto em meio aeróbio, quanto anaeróbio. Contudo, devido ao comportamento ambiental, o mesmo se mostrar mais crítico em meio anóxico por ser um composto altamente persistente nesta condição, por tanto é de maior relevância o estudo das possíveis rotas de degradação sob essa circunstância, por efeito do potencial risco ambiental. Assim, o desenvolvimento de tecnologias no âmbito da biorremediação que sejam eficientes em remediar ambientes anóxicos contaminados pelo 2,4-D é de extrema relevância a preservação ambiental e, por conseguinte, a manutenção da saúde humana (BRUCHA *et al.*, 2021).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo analisar o comportamento do herbicida 2,4-D, diante da biodegradação em diferentes condições de oxirredução (metanogênica, sulfetogênica e desnitrificante)

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral o estudo da biodegradação do 2,4-D sob diferentes condições de oxirredução (desnitrificação, sulfetogênese e metanogênese).

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- a) Realizar revisão da literatura sobre degradação anaeróbia do 2,4-D;
- b) Coletar sedimento do Reservatório de Itaipú;
- c) Realizar ensaios de enriquecimento em diferentes meios de oxirredução, com comunidades anaeróbicas desnitrificantes, sulfatoredutoras e metanogênicas, na presença do 2,4-D;
- d) Verificar a ocorrência de degradação do 2,4-D nos reatores.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 HERBICIDAS

O crescimento populacional exigiu um aumento na produção de alimentos. Afim de atender toda essa demanda, intensificou o uso do solo, de produtos agroquímicos, plantas transgenias, além dos herbicidas, visando, assim uma maior produção de alimentos.

Os herbicidas são aplicados em lavouras com a intenção de aniquilar ervas daninhas. Essas, quando crescem de forma desenfreada, são prejudiciais para o cultivo. Quando se aplica herbicidas, parte deles, além de atingir a cultura desejada, também atingem áreas próximas, interagindo com outras culturas de plantas e causando efeitos secundários. Existem relatos de diferentes efeitos fisiológicos secundários induzidos por herbicidas (DEVINE *et al.*, 1993, LYDON; DUKE, 1989).

O uso de agrotóxicos no Brasil ocorre de forma acentuada, sendo o país o maior consumidor destes produtos no mundo (Brasil, 2018a) e, seu uso contribui de maneira substancial para a expansão e desenvolvimento da agricultura no país. Porém, na maioria dos casos, não existe controle eficaz sobre a venda e uso destes produtos, os equipamentos de proteção não são usados rotineiramente, não há monitoramento da exposição ocupacional e o diagnóstico e tratamento dos casos de intoxicação são falhos (FORGET, 1989).

Os herbicidas, sejam eles aplicados no solo, ou na área das plantas, apresenta sempre o solo como seu destino final. O solo é rico em componentes químicos, além de abrigar diversos microrganismos. Os herbicidas, ao entrarem em contato com o solo, estão sujeitos a sofrerem diversos processos, sejam eles químico ou físicos, o que irá regular o seu destino no meio ambiente. Dentre esses processos pode ser citado a lixiviação, a volatilização, a fotodegradação, a decomposição química e microbiológica, o escoamento superficial e absorção pelas plantas (BAILEY; WHITE, 1970)

Herbicidas que apresentam maior permanência no solo, possuem maior risco de lixiviação em intervalos maiores e tempo. Em decorrência de sua retenção, alguns compostos tornam-se indisponíveis para a degradação biológica e sua liberação lenta pode ocasionar contaminação de corpos hídricos subterrâneos, uma vez que, ao longo do tempo, são percolados cada vez mais (ABERNAT, 1994).

O 2,4-D é um dos compostos mais utilizados nos herbicidas. O controle químico advindo da utilização do 2,4-D trouxe inúmeros benefícios para o controle de pragas do Brasil e do mundo, porém esse agente químico pode permanecer ativo no meio ambiente por longos períodos, afetando os ecossistemas. Os efeitos desse agente ao longo do tempo representam um grande risco para a saúde pública, sendo necessários o monitoramento e a vigilância desses produtos em águas, solos, alimentos e ar (JAVARONI *et al.*, 1991).

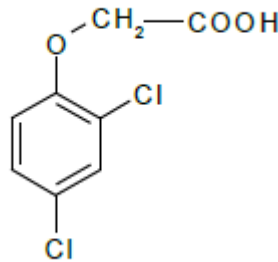
3.2 PROPRIEDADES DO 2,4-D

O ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) foi criado em meados do século vinte, com a intenção de aumentar a produtividade da produção durante a segunda guerra mundial, uma vez que possuíam alta eficácia contra ervas daninhas (LEITENBERG, 2001). Segundo Crafts, (1961), o herbicida acelera o crescimento vegetal de algumas espécies de plantas, podendo atuar também como regulador de crescimento.

Por ser o primeiro herbicida seletivo direcionado para o controle de plantas espontâneas latifoliadas anuais (folhas largas) e tem se mostrado fundamental para o desenvolvimento da indústria química na agricultura, o 2,4-D apresenta grande representatividade na história (MONACO; WELLER; ASHTON, 2002; OLIVEIRA JUNIOR *et al.*, 2011). Ainda nos dias de hoje, o uso deste herbicida, no Brasil, representa a maior parte e o país possui interesse comercial e científico no 2,4-D. Segundo Barbosa, Solano e Umbuzeiro, (2015), o 2,4-D é o terceiro herbicida mais utilizado no Brasil.

Pertencente à família dos compostos fenólicos, o herbicida possui variações da sua fórmula ácida, podendo possuir em sua base sais e éster com baixa volatilidade e elevado peso molecular; são os agentes químicos mais conhecidos e utilizados como herbicida da classe dos fenólicos (AMARANTE JUNIOR; SANTOS; NUNES, 2003; RODRIGUES; SERRA, 1996; SAAD, 1978). É um composto orgânico sintético que possui uma massa molar de 224,01 g/mol, dois átomos de cloro nas posições 2 e 4 do anel aromático e ligado ao carbono alfa do ácido acético (MACHADO, 2004) conforme a Figura 1.

Figura 1 - Formula Estrutural do 2,4-D, em sua formula ácida.



Fonte: Machado (2004,p.4).

Worthing & Hance. (1991), e Messias. (1998), destacam as principais propriedades físico-químicas do 2,4-D, na Tabela 1.

Tabela 1 - Principais características do herbicida 2,4-D

Nome químico (IUPAC)	Ácido 2,4-diclorofenóxiacético
Fórmula molecular	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃
Massa molar	221,04 g/mol
Ponto de fusão	133° - 137° C
pKa	2,64 (ácido fraco)
Pressão de vapor (20°C)	1,1.10 ⁻² Pa (8.10 ⁻⁶ mm Hg)
Densidade relativa (30°C)	1,565
Solubilidade em água (25°C)	620 mg/L (praticamente insolúvel)
Solubilidade em solventes orgânicos	1.250 g/kg de etanol; 243 g/kg de éter etílico
DI ₅₀ oral (ratos)	375 mg/kg (moderadamente tóxico)
Classe toxicológica	II - medianamente tóxico
Modo de ação	Sistêmico seletivo

Fonte: Autor, adaptado de Messias (1998).

Os principais fatores responsáveis pelo sucesso do uso do 2,4-D são o baixo custo e sua alta seletividade contra dicotiledôneas deixando vivas as monocotiledôneas, o que foi uma grande vantagem nos plantios de monocotiledôneas de importância comercial como milho, arroz e cereais. Segundo Taiz e Zeiger, (2004) essa seletividade decorre do fato de que em dicotiledôneas, o 2,4-D o qual atua como auxina sintética, não sofre metabolização na mesma proporção que as auxinas endógenas, ao passo que as monocotiledôneas podem inativar rapidamente o 2,4-D (SOUSA, 2013).

3.3 IMPACTOS 2,4-D À SAUDE HUMANA

Com relação à saúde humana, o 2,4-D acomete o sistema nervoso central, o coração, o fígado e é considerado cancerígeno (VIEIRA *et al.*, 1999). Bukowska. (2003) relatou que o tratamento de eritrócitos humanos *in vitro* com 2,4-D a 250 e 500 ppm resultou em diminuição dos níveis de glutathione reduzida, diminuição da atividade da enzima superóxido dismutase e aumento dos níveis de glutathione peroxidase. Estas mudanças significativas na atividade das enzimas antioxidantes e evidências de estresse oxidativo indicam que o 2,4-D deve ser levado a sério como um agente citotóxico além de potencialmente genotóxico. Sobre isso Nakbi *et al.*, (2010) relatam que o 2,4-D é capaz de produzir estresse oxidativo tanto *in vitro* quanto *in vivo* (SOUSA, 2013).

Além disso o 2,4-D está associado ao aumento dos índices de câncer do tipo linfoma de não-Hodgkin entre os agricultores que o aplicam e já se comprovou que as dioxinas, substâncias extremamente tóxicas e cancerígenas, ocorrem como contaminantes nos fitossanitários (uma mistura de 2,4-D e de 2,4,5-T) (BAIRD, 2002).

Com relação a fatores toxicológicos, o composto tem pouca tendência ao bioacumulação no tecido animal e é excretado geralmente, sem ser metabolizado, através da urina, à exceção de alguns dos ésteres de baixa volatilidade que bioacumularão na ausência de metabolização (HOWARD, 1991).

Uma vez presente nos sistemas de aquíferos anaeróbios, 2,4-D é considerado de "persistente" para "altamente persistente" com uma meia-vida de 42 dias (IBAMA, 2010).

3.4 IMPACTOS AMBIENTAIS CAUSADOS PELO 2,4-D

O uso indiscriminado do ácido 2,4-D, eleva o aumento da poluição das águas, do solo e dos alimentos, além de terem sido identificados como alérgenos do sistema respiratório, uma vez que apresentam alta toxicidade (BAGGIANI *et al.*, 2001; FUKUYAMA *et al.*, 2009).

O 2,4-D é um herbicida altamente seletivo, depois de absorvido pela planta acumula-se dentro das raízes, podendo influenciar diretamente no crescimento, uma vez que impede o transporte de água e nutrientes. (2,4-D: Fact Sheet, 2000). Além disso, as plantas tratadas com o herbicida frequentemente exibem má formação das folhas, hastes e raízes. (EPA, 1988).

A presença dos ácidos fenoxiacéticos nos corpos hídricos se dá em razão da sua solubilidade em água, do seu baixo valor de pKa, da sua baixa biodegradabilidade e por serem fracamente

retidos pela maioria dos solos devido seu baixo coeficiente de adsorção no solo (XI; MALLAVARAPU; NAIDU, 2010; NJOKU; HAMEED, 2011; XI; SOUZA *et al.*, 2017).

O 2,4-D pertence à família dos organoclorados, que são compostos extremamente tóxicos e de longa persistência (HIGARASHI, 1999). Por estas razões, o controle de produção e aplicação de tais espécies está entre as prioridades nas legislações ambientais em todo o mundo, sendo que as concentrações do mesmo no meio ambiente são determinantes para o estabelecimento da forma de uso da área, seja para fim residencial, recreativo ou industrial (HIGARASHI, 1999).

De acordo com Rebelo *et al.*, (2019) o 2,4-D é classificado como classe III, para riscos ambientais, ou seja, o produto é classificado como perigoso para o meio ambiente. No Brasil, a Resolução N° 396 de 03 de Abril de 2008, do Conselho Nacional de Meio Ambiente - CONAMA, determina o limite máximo de 0,03 ppm de 2,4-D na água destinada ao consumo humano e a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), através da NBR 10004/2004, determina o limite de 3 ppm do herbicida em resíduos sólidos como suficiente para a denominação de resíduo perigoso (SBANO *et al.*, 2013). Além disso a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) classificou o 2,4-D como extremamente tóxico (Classe I) para a saúde, e estudos recentes da Agência Internacional de Pesquisas do Câncer (IARC), com a Organização Mundial de Saúde (OMS), classificou o 2,4-D como possivelmente cancerígeno a humanos (LOOMIS *et al.*, 2015).

3.5 DEGRADAÇÃO 2,4-D

A biodegradação do 2,4-D é orquestrada tanto por fatores bióticos quanto por fatores abióticos. Os tipos de microrganismos envolvidos, as condições ambientais (temperatura e pH) e os constituintes do ambiente, são elementos que afetam o processo de biodegradação (GUEDES, 2010). Na remoção de matéria orgânica, processos biológicos são os mais vantajosos economicamente.

A biodegradação do 2,4-D pode ser influenciada por diversos fatores, como temperatura, pH, profundidade da coluna de solo, tipo de biomassa, além da aplicação de outros herbicidas.

Observou-se que o 2,4-D é degradado por uma variedade de microrganismos, tais como *Pseudomonas sp.*, *Alcaligenes eutrophus*, *Nocardia sp.* e *Aspergillus niger*. Dentre os principais metabólitos produzidos, citam-se: 2,4-diclorofenol, 4-clorocatecol e clorohidroquinona (MENZIE, 1969; PAUL; CLARK, 1989).

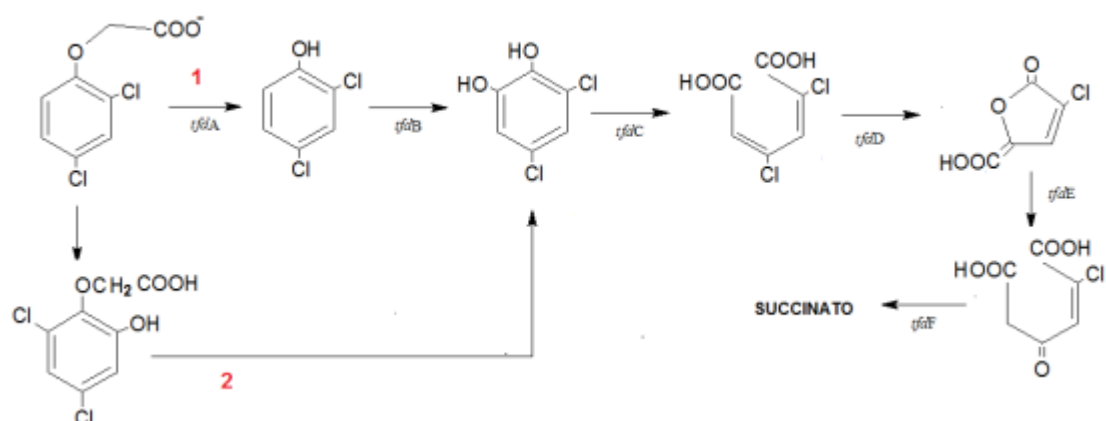
Os processos de tratamento, baseiam-se na degradação da matéria orgânica. Quando este processo ocorre de forma natural por microrganismos é conhecido como biodegradação. A biodegradação deste ácido, pode ocorrer de forma aeróbia e anaeróbia. A primeira já está bem consolidada, já a segunda, existem poucos estudos nesta linha de pesquisa.

3.5.1 Aeróbia

A biodegradação aeróbia é fundamentada na utilização de microrganismos que requerem oxigênio molecular. A biodegradação do herbicida é realizada, em grande parte, por organismos aeróbios como a bactéria *Azotobacter chroococcum* e algumas bactérias do gênero *Pseudomonas sp* (BALAJEE; MAHADEVAN, 1993; BRÜCKMANN *et al.*, 1998).

Kearney e Kaufman, (1975) descreveram a rota de degradação aeróbia, por bactérias *Pseudomonas sp*, a degradação consiste na liberação de subprodutos como 2,4-diclorofenol, 3,5-diclorocatecol, 2,4-dicloro-cismuconato, 2-clorodienactona, 2-cloromaleilacetato, e assim segue até ser transformado em Succinato. Guedes, (2010) percebeu que a rota de degradação por *Arthobacter sp*. é semelhante à via metabólica descrita para o *Alcaligenes eutrophus* A figura a seguir representa a comparação das possíveis vias de degradação do 2,4-D para para a *Pseudomonas sp.* e *Arthobacter sp.*

Figura 2 - Rota de biodegradação aeróbia do ácido 2,4D por *Arthobacter sp.* (1) e *Pseudomonas sp.* (2).



Fonte: Guedes,(2010, p.27)

Sanchis et al. (2014) avaliaram a biodegradabilidade do herbicida sob aeração contínua em reatores em batelada sequenciais. O reator foi operado a 25°C, utilizando inóculo proveniente

de uma Estação de Tratamento de Esgoto e glicose como fonte de carbono. O período de aclimatação observado foi de 21 dias, obtendo uma remoção de 95% de 2,4-D em 135 dias com concentração de 50 mg/L.

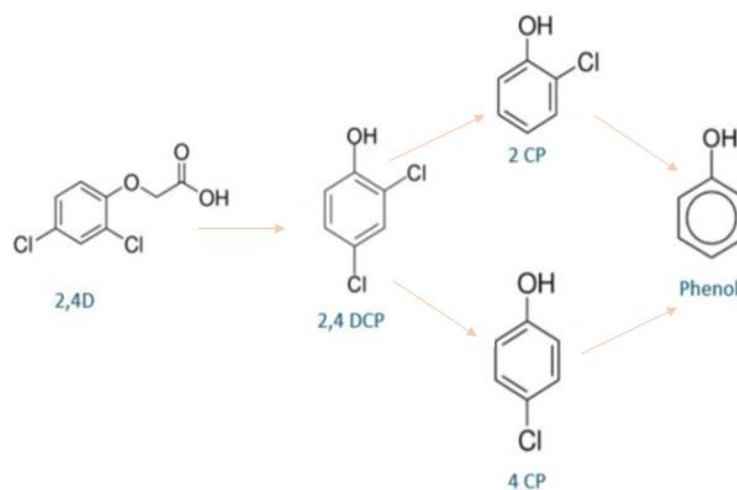
3.5.2 Anaeróbia

O composto 2,4-D é passível a degradação tanto em meio aeróbio, quanto anaeróbio. Contudo, devido ao comportamento ambiental do mesmo se mostrar mais crítico em meio anóxico por ser um composto altamente persistente nesta condição, é de maior relevância o estudo das possíveis rotas de degradação sob essa circunstância, por efeito do potencial risco ambiental. Assim, o desenvolvimento de tecnologias no âmbito da biorremediação que sejam eficientes em remediar ambientes anóxicos contaminados pelo 2,4-D é de extrema relevância a preservação ambiental e, por conseguinte, a manutenção da saúde humana (BRUCHA *et al.*, 2021).

O processo de degradação anaeróbia do 2,4-D pode ser comparado a uma desalogenação reductiva de um composto, é um processo fermentativo microbiano de flora mista onde a matéria orgânica, na ausência de oxigênio livre, é convertida a gases, compostos predominantemente de metano e dióxido de carbono (BARANA, 2001).

De acordo com Brucha *et al.*, (2021), foi proposta uma rota alternativa para a degradação anaeróbia, sendo esta apresentada na figura 3.

Figura 3 - Rota Proposta de Biodegradação Anaeróbia do 2,4-D.



Fonte: Autor adaptado Brucha et al. (2021)

Nesta proposta o 2,4-D perde um grupo de óxido acético, passando a ser 2,4 dicloro-fenol. Este será desalogenado, transformando-se em 2 cloro-fenol ou 4 cloro-fenol. Em seguida, será desalogenado, outra vez em fenol, o qual seguirá a rota do benzoato.

Várias culturas já foram identificadas como capazes de realizar a degradação do 2,4-D através de trabalhos acadêmicos como este apresentado neste tópico. Dentre elas, cinco apresentaram grande potencial degradante, como *Acinetobacter sp*, *Serratia marcescens*, *Stenothrophomonas matophilia*, *Flavobacterium sp* e *Penicillium sp*. (SILVA *et al.*, 2007).

4 METODOLOGIA

4.1 DESCRIÇÃO DA ÁREA DE ESTUDO

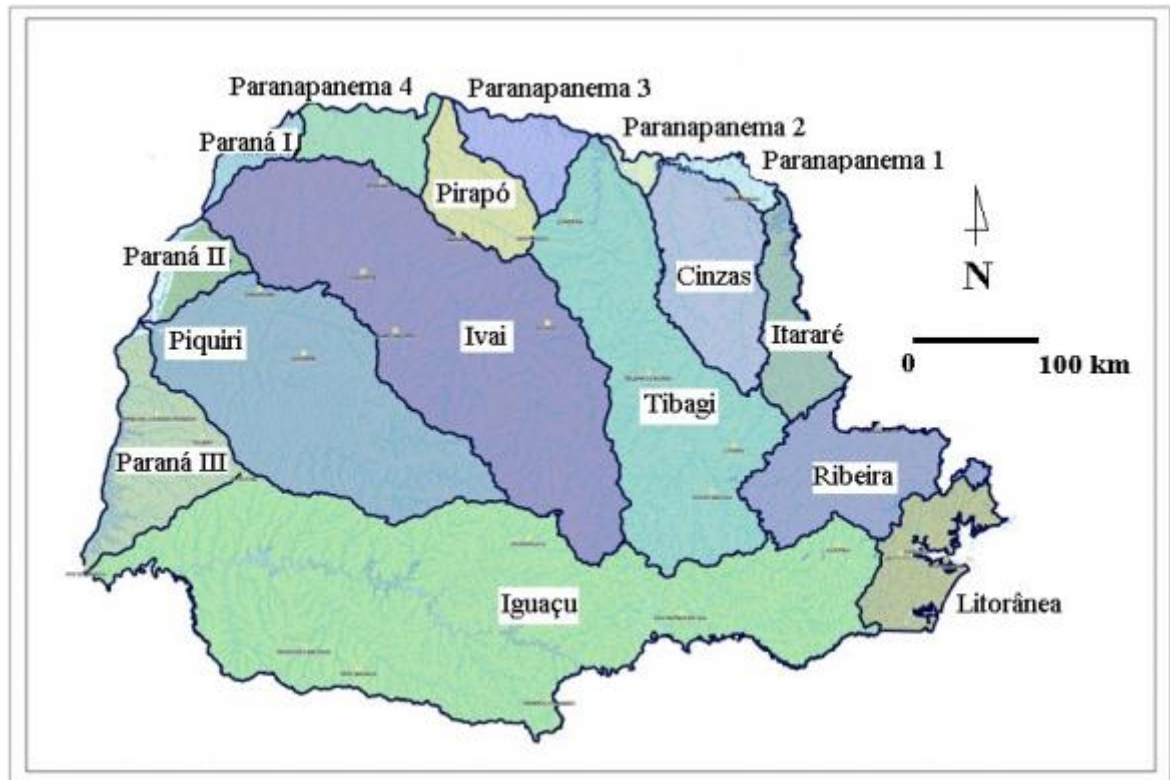
Segundo Rocha e Bade (2018), a agricultura compõe uma classe dominante da área total da bacia. De forma geral, a Bacia hidrográfica do Paraná 3 (BP3) é uma região de extenso plantio de milho e soja. Nesta área usa-se uma intensa quantidade de pesticidas, dentre eles o 2,4-D (PIASSETA *et al.*, 2021). Neste contexto, assumiu que a região apresenta características ideais para compor a área de estudo.

A BP3 está localizada na mesorregião Oeste do Paraná, entre as latitudes 24° 01' S e 25° 35' S e as longitudes 53° 26' O e 54° 37' O, com área de aproximadamente 8000 km² englobando 28 municípios, delimitada ao norte pela bacia do rio Piquiri e ao sul pela bacia do rio Iguaçu (PBHP3,2014).

Com base nas cartas climáticas do estado do Paraná (CAVIGLIONE *et al.*, 2000), a precipitação média anual na bacia varia de 1600 a 2000 mm e as taxas de evapotranspiração média anual encontram-se entre 1000 a 1200 mm. A temperatura média anual apresenta importantes diferenças, variando desde 20-21°C na região de Cascavel, 21-22°C na área de Foz do Iguaçu até 22-23°C nas proximidades do Rio Paraná, estendendo-se no sentido norte em direção à Guaíra e Terra Roxa. A umidade relativa média anual é de 70-75% próximo à Guaíra e de 75-80% nas demais áreas. Bacia Hidrográfica do Rio Paraná 3 (BP3) encontra-se sob o domínio do Clima subtropical úmido (MENDONÇA; OLIVEIRA, 2007).

Por ser uma região de intensa atividade agrícola e haver a detecção do herbicida 2,4-D, a bacia se destaca para estudos de comunidades microbianas com potencial em degradar o 2,4-D. A Figura 4 mostra o mapa referente a localização desta bacia hidrográfica.

Figura 4 - Localização da Bacia Hidrográfica do Paraná III.

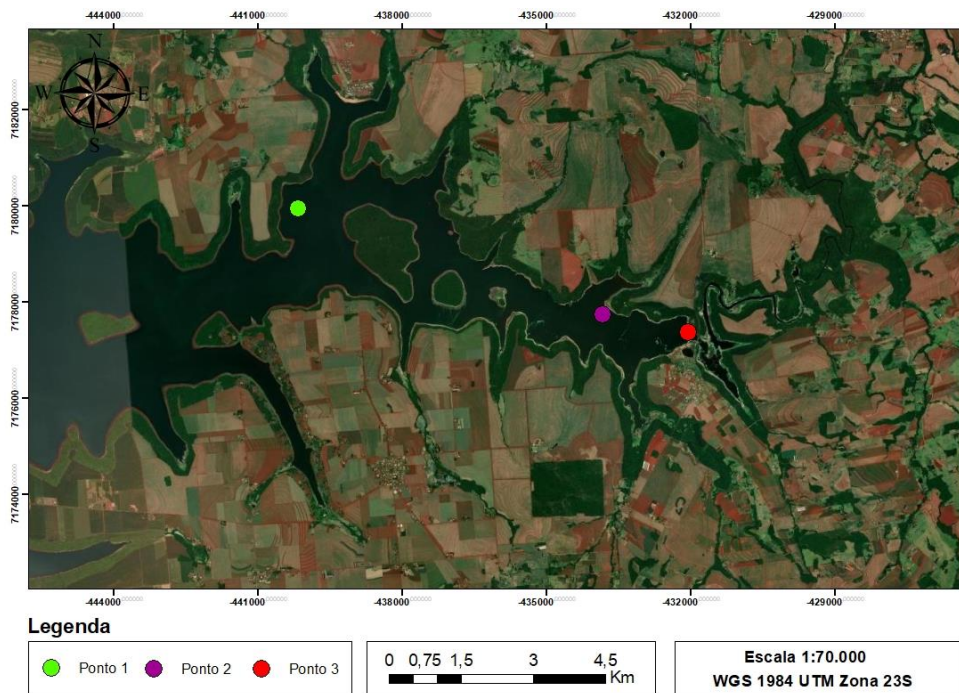


Fonte: PBHP (2014, p.5).

4.2 COLETA DE AMOSTRAS

As amostras de sedimento que foram utilizadas como inóculo, nos ensaios de enriquecimento da comunidade microbiana anaeróbia metanogênicas e nos ensaios de degradação anaeróbia do 2,4-D. Foram coletadas no dia 18 de Novembro de 2020, em três diferentes pontos no reservatório de Itaipú, na sub Bacia Hidrográfica Sanga Memória, com duas subcamadas cada, sendo, P1 ($25^{\circ}12'08.5''S$ e $54^{\circ}18'21.1''O$), coletados em 2 subcamadas de 16 cm e 6 cm, P2 ($25^{\circ}13'33.1''S$ e $54^{\circ}14'43.5''O$), coletados em 2 subcamadas de 18 cm e 10 cm, e por fim, P3 ($25^{\circ}13'49.2''S$ e $54^{\circ}13'42.0''O$), coletados em 2 subcamadas de 30 cm e 20 cm. A Figura 5, representa a aérea de estudo e os três pontos de coleta, na bacia.

Figura 5 - Mapa da Área de Estudo e Pontos de Coleta.



Fonte: Autor

As amostras foram coletadas sobre condições atmosféricas úmidas, em dia ensolarado, com temperaturas acima de 20°C.

Para chegar até o ponto de coleta utilizou barco com motor e foram necessárias duas pessoas para realizar a coleta, como mostra a Figura 6 e 7.

Figura 6 - Amostra de sedimento coletada.



Fonte: Autor

Figura 7 - Coleta de sedimento



Fonte: Autor

Depois de coletadas, as amostras foram armazenadas sob refrigeração (caixa térmica com gelo) e transportadas até o laboratório de Microbiologia ambiental da Universidade Federal de Alfenas – (UNIFAL-MG).

A amostragem de sedimento, foram utilizadas como inóculo nos ensaios de enriquecimento de microrganismos desnitrificantes, sulfetogênicos e metanogênicos na presença do 2,4-D.

4.3 MEIO DE CULTIVO

Os ensaios de degradação anaeróbia do 2,4-D foram realizados utilizando meios de cultivo anaeróbios próprios para as comunidades, metanogênicas, sulfatorredutoras e desnitrificantes

Para que fosse composto os meios de cultivo, nas condições de oxirredução, foram preparadas soluções de macro e micronutrientes, a partir do protocolo de Deursen (2016).

Antes de iniciar as soluções, as vidrarias foram lavadas com Extran, homogeneizadas com água destilada e colocadas na estufa, a uma temperatura de 55 °C. A bancada foi esterilizada com álcool 70, além de todo material pela autoclave. O manuseio foi sempre próximo a chama do bico de bunsen.

Os elementos que compunham a solução de cada reator foram pesados em uma balança de precisão e diluídos em água anaeróbia, e em seguida esterilizados por autoclave (por 30 minutos a 120°C), exceto as soluções que continham vitaminas e sulfeto de sódio, que foram

esterilizadas por filtração empregando membranas de 0,22 mm sob sistema de bombeamento a vácuo.

Depois de esterilizadas, as soluções foram armazenadas no refrigerador, já as vitaminas foram encapadas com papel alumínio afim de evitar fotodegradação.

Para a determinação da massa a ser inserida de cada substância utilizou-se a equação (1).

$$P (g) = vol (L).M \left(\frac{g}{mol} \right); \quad (1)$$

Em que: P é o peso em gramas que foi aferido na balança analítica; vol é o volume em litros, e M a massa molar.

As soluções estoque de macro e micronutrientes utilizadas para cada condição de oxirredução estão listadas nas Tabelas 2, 3 e 4.

Tabela 2 - Soluções para compor os meios utilizados nos reatores desnitrificantes.

(continuação)

Soluções		Volume (L)	Peso (g)
D1	KH ₂ PO ₄	0,500	17,418
D2	Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	0,250	7,801
D3	Resazurin	0,050	0,025
	EDTA		0,063
	FeSO ₄ .7H ₂ O		0,006
	MnCl ₂ .6H ₂ O		0,006
	CoCl ₂ .4H ₂ O		0,002
D4	ZnSO ₄	0,25	0,028
	CuSO ₄ .6H ₂ O		0,002
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O		0,001
	CaCl ₂		0,001
	pH=6 met KOH		
	Vit A		
	Biotina (Vit H)		0,005
D5	p-aminobenzoato (Na-sal)		0,013
	Pantotenato (Na-sal)		0,013

Tabela 2 - Soluções para compor os meios utilizados nos reatores desnitrificantes.

(conclusão)

Soluções	Volume (L)	Peso (g)
Fílico ácido (hidratado)	0,25	0,013
Ácido Lipoico (ácido tioctico)		0,025
Piridoxina (Vit b6)		0,013
Nicotinamida		
D6 Tiamina HCL (Vit B1)	0,1	0,010
Vit C		
D 7 Riboflavina (Vit B12)	0,1	0,01
Vit D		0,0,25
D8 Cianocobalamina (Vit B12)	0,1	1,471
D10 Na ₂ S.9H ₂ O	0,25	0,4686
D11 NH ₄ Cl	0,25	8,499

Fonte: Autor adaptado do protocolo de Deursen (2016).

Tabela 3 - Soluções para compor os meios utilizados nos reatores sulfetogênicos.

(continuação)

Soluções	Volume (L)	Peso (g)
S1 KH ₂ PO ₄	0,50	13,610
S3 Resazurin	0,25	7,801
Elementos traço		
FeCl ₂ .4H ₂ O		0,375
MnCl ₂ .4H ₂ O		0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O		0,030
ZnCl ₂		0,018
S4a	0,25	
CuCl ₂		0,004
H ₃ BO ₃		0,015
NiCl ₂ .6H ₂ O		0,006
1ml conc. HCl		
Elementos traço		
S4b NaOH		0,100
Na ₂ SeO ₃	0,25	0,005
Na ₂ WO ₄ .2H ₂ O		0,008

Tabela 3 - Soluções para compor os meios utilizados nos reatores sulfetogênicos.

(conclusão)

	Soluções	Volume (L)	Peso (g)
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O		
S5	Vit A		0,063
	Biotina (Vit H)		0,001
	p-aminobenzoato (Na-sal)		0,003
	Pantotenato (Na-sal)	0,25	0,003
	iridoxina (Vit b6)		0,013
	Nicotinamida		0,005
S6	Tiamina HCL (Vit B1)		Vit B 0,10 0,060
S7	Riboflavina (Vit B2)		Vit C 0,10 0,005
S8	Cianocobalamina (Vit B12)		Vit D 0,10 0,005
	CaCl ₂ .2H ₂ O		1,103
S11	MgSO ₄ .7H ₂ O		0,25 1,232
	NH ₄ Cl		1,204
	NaCl		3,068
S13	Na ₂ SO ₄	0,25	10,650

Fonte: Autor adaptado do protocolo de Deursen (2016).

Tabela 4 - Soluções para compor os meios utilizados nos reatores metanogênicos.

(continuação)

	Soluções	Peso (g)	Volume (L)
M1	K ₂ HPO ₄	17,418	0,500
M2	Na ₂ HPO ₄ .2H ₂ O	7,801	0,250
M3	Resazurin	0,025	0,050
	EDTA	0,250	
	FeCl ₂ .4H ₂ O	1,000	
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0,050	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,095	
M4	ZnCl ₂	0,035	
	CuCl ₂	0,001	0,500
	AlCl ₃ .6H ₂ O	0,005	
	H ₃ BO ₃	0,003	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,018	
	NiCl ₂ .6H ₂ O	0,012	

Tabela 4 - Soluções para compor os meios utilizados nos reatores metanogênicos.

(conclusão)

Soluções	Peso (g)	Volume (L)
Vit A		
M5	Biotina (Vit H) - GELADEIRA p-aminobenzoato (Na-sal) Pantotenato (Na-sal) Ácido Fólico (Dihydrate) Ácido Lipoico (ácido tioctico) Piridoxina (Vit b6) Nicotinamida	0,025 0,125 0,025 0,010 0,025 0,050 0,275
M6	Vit B	
	Tiamina HCL (Vit B1)	0,010
M7	Vit C	
	Riboflavina (Vit B2)	0,005
M8	Vit D	
	Cianocobalamina (Vit B12)	0,005
M9	NH ₄ HCO ₃	4,509
	NaHCO ₃	38,057
M10	Na ₂ S.9H ₂ O	12,010
M11	CaCl ₂ .2H ₂ O	2,205
	MgCl ₂ .6H ₂ O	2,035

Fonte: Autor adaptado do protocolo de Deursen (2016).

Cada condição de oxirredução exigiu uma solução específica, as quais foram formadas a partir da combinação das soluções estoque, indicada nas tabelas 3,4,5. O procedimento para o reparo dessas soluções está descrito a seguir, de acordo com o protocolo de Deursen (2016).

i. Meio para a condição desnitrificante

MEIO BASAL – para 800 ml de solução deve-se adicionar 48,8ml de D1, 132,8ml de D2, 0,8ml de D3 e 617,6ml de água anaeróbia.

COLD A – para 25 ml de solução deve-se adicionar 1 ml de D4, D5 e D7; 0,5 ml de D6, 0,1 ml de D8 e 21,4 ml de água anaeróbia;

COLD B – para 50 ml de solução deve-se adicionar 49 ml de D13 e 1 ml de D10.

COLD C – para 50 ml de solução deve-se adicionar 50 ml de D11.

ii. *Meio para a condição sulfetogênica*

MEIO BASAL – para 800 ml de solução deve-se adicionar 13,36 ml de S1, 0,8 ml de S3 e 785,84 ml de água anaeróbia.

COLD A – para 50 ml de solução deve-se adicionar 2 ml de S4a, S4b e S5; 0,4 ml de S6, S7 e S8 e 42,8 ml de água anaeróbia.

COLD C – para 50 ml de solução deve-se adicionar 50 ml de S11.

iii. *Meio para a condição metanogênica*

MEIO BASAL – para 800 ml de solução deve-se adicionar 16,8 ml de M1, 1,36 ml de M2 e 0,8 ml de M3 e 781 ml de água anaeróbia.

COLD A – para 50 ml de solução deve-se adicionar 2 ml de cada uma das seguintes soluções: M4, M5, M6, M7 e M8 e 40 ml de água anaeróbia

COLD B – para 100 ml de solução deve-se adicionar 2 ml de M10 e 98 ml de M9.

COLD C – para 50 ml de solução deve-se adicionar 50 ml de M11.

Depois de preparada a solução de meio basal, foi fluxonado nitrogênio por 20 minutos dentro dos frascos Duran[®] que o continham, afim de retirar todo o oxigênio do meio. Em seguida foram lacrados e autoclavados. Toda água anaeróbia utilizada foi preparada minutos antes da utilização, feita a partir de água destilada fervida por 20 min e esfriada sob o fluxo de nitrogênio, por cerca de 20 minutos.

Para a preparação dos COLD's (A, B e C) foi utilizado frascos de antibióticos de 120 ml, que foram autoclavados fechados com tampas de butila e selados com lacres de alumínio. Os reatores metanogênicos passaram por uma troca de atmosfera de 10 ciclos (N₂, CO₂; 80%, 20%), através do sistema de distribuição de gases, enquanto que os reatores das demais condições vão ter o seu headspace preenchido por 100% de N₂ (10 ciclos).

Afim higienizar os frascos, os mesmos foram esterilizados. Também foi feita a troca de atmosfera, para eliminar o oxigênio presente e foram adicionados os colds, nas proporções estabelecias a cima, com seringas e agulhas esterilizadas.

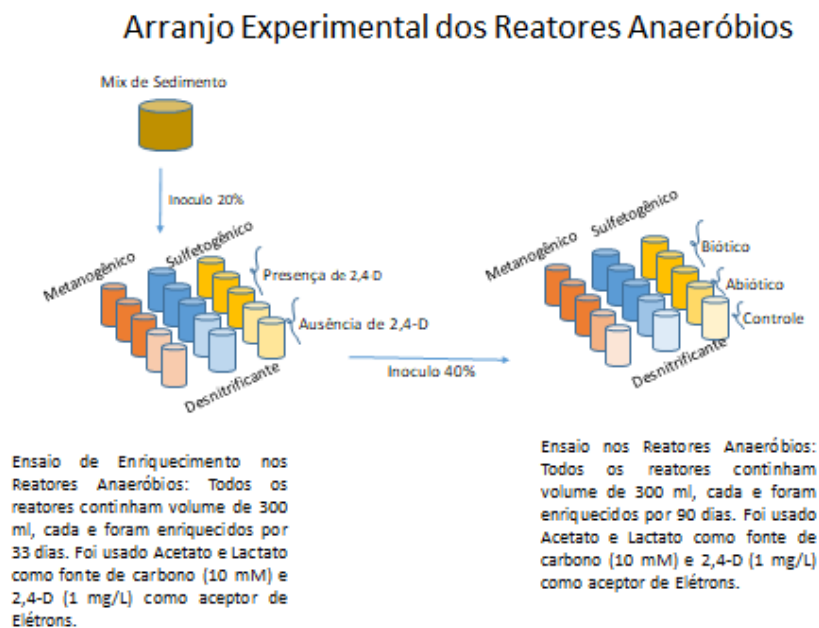
Depois de prontas as soluções passaram por uma nova lavagem pelo distribuidor de gases, com 10 ciclos nas mesmas condições de atmosferas descritas anteriormente.

Os COLDS foram embalados com papel alumínio e armazenados sob refrigeração (4°C).

4.4 ARANJO EXPERIMENTAL DOS REATORES

Os ensaios de enriquecimento das comunidades microbianas anaeróbias metanogênicas, sulfatorredutoras e desnitrificantes, na presença do 2,4-D (1 mg/L) foram realizados utilizando meios de cultivo anaeróbios próprios para cada comunidade microbiana desejada (Deursen, 2016), acrescidos de fonte de carbono Lactato e Acetato (10 mM cada). Amostras dos enriquecimentos do microorganismos desnitrificantes, sulfetogênicos e metanogênicos foram utilizadas como inóculo para ensaios de degradação anaeróbia nas distintas condições de oxirredução, utilizando o meio específico para cada condição descrito acima, fontes de carbono Acetato e Lactato (10mM cada) e 2,4-D (1 mg/L). Os ensaios foram realizados em frasco reatores de 300 ml, sob anaerobiose, assepsia e fluxo de Nitrogênio e mantidos a 30 °C e agitação em 130 rpm. Para cada uma das 3 condições de oxirredução (desnitrificantes, sulfetogênicos e metanogênicos) foram feitos 5 reatores: 3 bióticos, contendo o 2,4-D (1 mg/L) e Lactato e acetato (10 mM cada) como fonte de carbono; 1 abiótico, com adição de azida 1M (NaN_3) e cloreto de mercúrio 1M (HgCl_2) para inativação microbiana, e 1 controle sem adição de 2,4-D.

Figura 8 - Arranjo Experimental dos Reatores Anaeróbios.



Fonte: Autor

Os reatores bióticos foram preparados para avaliar a atividade microbiana (crescimento e degradação do 2,4-D), os abióticos para verificar a degradação do 2,4-D sem a participação microbiana, e o controle para observar se os microrganismos envolvidos no processo de degradação do 2,4-D estão se desenvolvendo (ou não) a partir de outras fontes de carbono.

4.5 INOCULO DE ENRIQUECIMENTO

Os reatores de enriquecimento foram montados no laboratório da Universidade Federal de Alfenas. Antes de iniciar as soluções, as vidrarias foram lavadas com Extran, homogeneizadas com água destilada e colocadas na estufa, a uma temperatura de 55 °C. A bancada foi esterilizada com álcool 70, além de todo material pela autoclave. O manuseio foi sempre próximo a chama do bico de bunsen, para evitar contaminação.

Para cada uma das 3 condições de oxirredução (desnitrificantes, sulfetogênicos e metanogênicos) foram feitos 5 reatores: 3 bióticos, sendo o 2,4-D (1 mg/L) e o conteúdo orgânico do solo as únicas fontes de carbono e 2 reatores controles, sem adição de 2,4-D.

A composição de substâncias em cada reator, preparada com um volume total de 300 ml cada é mostrado na Tabela 4 com 2,4-D na concentração de 1 mg/L.

Tabela 5 - Composição dos reatores de volume (300 ml) feitos com adição de fonte de carbono e 2,4-D.

Desnitrificante			Sulfetogênico			Metanogênico		
Meio Basal	201,00	ml	Meio Basal	200,00	ml	Meio Basal	211,44	ml
Cold A	7,50	ml	Cold A	5,50	ml	Cold A	4,14	ml
Cold B	15,00	ml	S13	16,60	ml	Cold B	8,28	ml
Cold C	7,50	ml	Cold B	5,50	ml	Cold C	4,14	ml
2,4 D	1	mg/L	2,4 D	1	mg/L	2,4 D	1	mg/L
Inóculo	20,00	%	Inóculo	20	%	Inóculo	20	%
Volume líq.	300,00	ml	Volume líq.	300,00	ml	Volume líq.	300,00	ml
Acetato de sódio 1 M	3,00	ml	Lactato de Sódio 1 M	6,40	ml	Acetato de sódio 1M	3,00	ml
						Formiato 1M	3,00	ml

Fonte: Deursen (2016), adaptado.

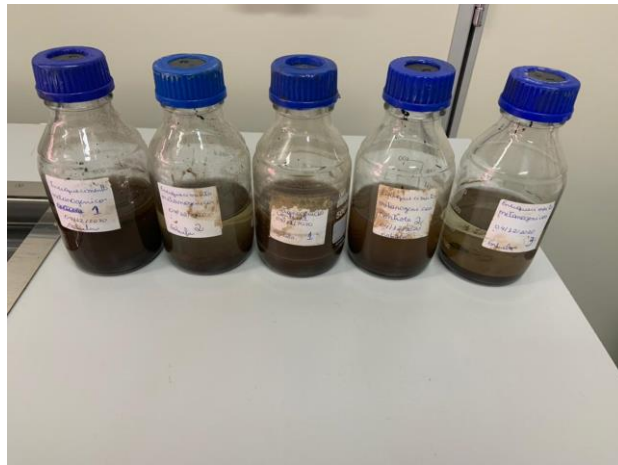
As figuras 9,10 e 11 são dos reatores já montados, em diferentes meios de oxirredução, que continha 2,4-D como micropoluente.

Figura 9 - Reatores de enriquecimento desnitrificantes, sendo os três primeiros com 2,4-D e os dois últimos sem



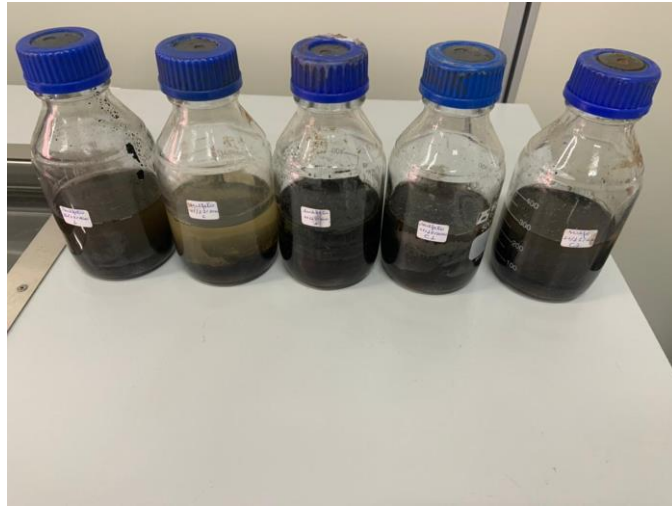
Fonte: Autor.

Figura 10 - Reatores de enriquecimento metanogênicos desnitrificantes, sendo os três primeiros com 2,4-D e os dois últimos sem.



Fonte: Autor

Figura 11 - Reatores de enriquecimento sulfatogênicos desnitrificantes, sendo os três primeiros com 2,4-D e os dois últimos sem



Fonte: Autor.

Todos os reatores foram mantidos sobre agitação 120 rpm, a 30°C. Para evitar a retirada de biomassa os reatores foram inclinados na coleta realizada semanalmente, além disso, depois de coletado eram colocados em eppendorfs, onde seriam centrifugados por 5 minutos a uma agitação de 10.000rpm. Depois de centrifugados, os sedimentos ficavam no fundo, facilitando a retirada do sobrenadante. Os reatores foram monitorados semanalmente através da determinação de DQO.

Figura 12 - eppendorfs com solução desnitrificante após saída da centrifuga.



Fonte: Autor

4.6 ENSAIO DE DEGRADAÇÃO DO 2,4-D

O inoculo do ensaio de degradação anaeróbia do 2,4-D foi retirado dos reatores de enriquecimento. Os reatores foram montados no laboratório da Universidade Federal de Alfenas.

Antes de iniciar as soluções, as vidrarias foram lavadas com Extran, homogeneizadas com água destilada e colocadas na estufa, a uma temperatura de 55 °C. A bancada foi esterilizada com álcool 70, além de todo material pela autoclave. O manuseio foi sempre próximo a chama do bico de bunsen, para evitar contaminação.

Para cada uma das 3 condições de oxirredução (desnitrificantes, sulfetogênicos e metanogênicos) foram feitos 5 reatores: 3 bióticos, sendo o 2,4-D a únicas fontes de carbono dos reatores; 1 abiótico, com adição de azida 1M (NaN_3) e cloreto de mercúrio 1M (HgCl_2) para inativação microbiana, e 1 controle sem adição de 2,4-D.

A composição de substâncias em cada reator, preparada com um volume total de 300 ml cada é mostrado na Tabela 5 com 2,4-D na concentração de 1 mg/L.

Tabela 5 - Composição dos reatores anaeróbios de volume líquido de 300 ml

(continuação)

Desnit.	Composição	Volume (ml)	Sulfet.	Composição	Volume (ml)	Met.	Composição	Volume (ml)
	Meio Basal	141		Meio Basal	140		Meio Basal	151,44
	Cold A	7,5		Cold A	5,5		Cold A	4,14
	Cold B	15		S13	16,6		Cold B	8,28
	Cold C	7,5		Cold C	5,5		Cold C	4,14
Biótico 1,2,3	2,4D	6	Biótico 1,2,3	2,4D	6	Biótico 1,2,3	2,4D	6
	Acetato	3		Lactato	6,4		Acet	3
				Lactato	3			
	Inóculo (40%)	120		Inóculo (40%)	120		Inóculo (40%)	120
	Volume total	300		Volume total	300		Volume total	300

Tabela 5 - Composição dos reatores anaeróbios de volume líquido de 300 ml

(conclusão)

Desnit.	Composição	Volume (ml)	Sulfet.	Composição	Volume (ml)	Met.	Composição	Volume (ml)
	Meio Basal	135		Meio Basal	134		Meio Basal	145,44
	Cold A	7,5		Cold A	5,5		Cold A	4,14
	Cold B	15		S13	16,6		Cold B	8,28
	Cold C	7,5		Cold C	5,5		Cold C	4,14
	2,4D	6		2,4D	6		2,4D	6
Abiótico	Inóculo (40%)	120	Abiótico	Inóculo (40%)	120	Abiótico	Inóculo (40%)	120
	Acetato	3		Lactato	6,4		Acet (Continua)	3
	NaN ₃	3		NaN ₃	3		Lactato	3
	HgCl ₂	3		HgCl ₂	3		NaN ₃	3
	Volume total	300		Volume total	300		HgCl ₂	3
							Volume total	300
	Meio Basal	147		Meio Basal	146		Meio Basal	157,44
	Cold A	7,5		Cold A	5,5		Cold A	4,14
	Cold B	15		S13	16,6		Cold B	8,28
	Cold C	7,5		Cold C	5,5		Cold C	4,14
Controle	Acetato	3	Controle	Lactato	6,4	Controle	Acet	3
	Inóculo (40%)	120		Inóculo (40%)	120		Lactato	3
	Volume total	300		Volume total	300		Inóculo (40%)	120
							Volume total	300

Fonte: Do autor. Valores calculados a partir do protocolo de Deursen (2016).

As figuras 13, 14 e 15 a seguir são dos reatores já montados, em diferentes meios de oxirredução, que continha 2,4-D como micropoluente.

Figura 13 - reatores desnitrificantes, sendo os dois primeiros bióticos, seguidos do controle e abiótico.



Fonte: Autor

Figura 14 - Reatores metanogênicos, sendo os dois primeiros bióticos, seguidos do controle e abiótico.



Fonte: Autor

Figura 15 - Reatores sulfetogênicos, sendo os dois primeiros bióticos, seguidos do controle e abiótico



Fonte: Autor

Todos os reatores foram mantidos sobre agitação 120 rpm, a 30°C. Para evitar a retirada de biomassa os reatores foram inclinados na coleta de amostra feita semanalmente, além disso, depois de coletado eram colocados em eppendorfs, onde seriam centrifugados por 5 minutos a uma agitação de 10.000rpm. Depois de centrifugados, os sedimentos ficavam no fundo, facilitando a retirada do sobrenadante.

Figura 16 - Eppendorfs com solução sulfetogênicas após saída da centrifuga.



Fonte: Autor

4.7 MONITORAMENTO DOS REATORES

4.7.1 Reatores de Enriquecimento

As atividades metabólicas dos reatores foram monitoradas semanalmente, através de coleta de amostra líquida do ensaio. Para os reatores desnitrificantes, foi monitorado o consumo de nitrato segundo a metodologia de Cataldo et al. (1975). Os reatores sulfetogênicos foram monitorados através da detecção de sulfato e sulfeto. O monitoramento dos reatores metanogênicos foi dado a partir da quantificação da produção de metano, utilizando o equipamento Cromatógrafo Gasoso Shimadzu GC-2014 com Detector de Condutividade

Técnica (TCD) e coluna HP-PLOT/Q (30 m x 0,53 mm x 40 µm de espessura de filme). O consumo da matéria orgânica será monitorado através da determinação de DQO, descritas no Standard Methods 5520.

Vale ressaltar que, sempre que os microrganismos consumiam a matéria orgânica do sistema, era acrescentado uma solução de 0,4 M de nitrato, para as desnitrificantes, 0,2 M de Sulfato para as sulfetogênicas, além da mesma quantidade de fonte de carbono, já inseridas em cada sistema inicialmente, para todos os reatores. Sempre que forem acrescentadas as soluções e a fonte de carbono, nomeava-se uma nova etapa.

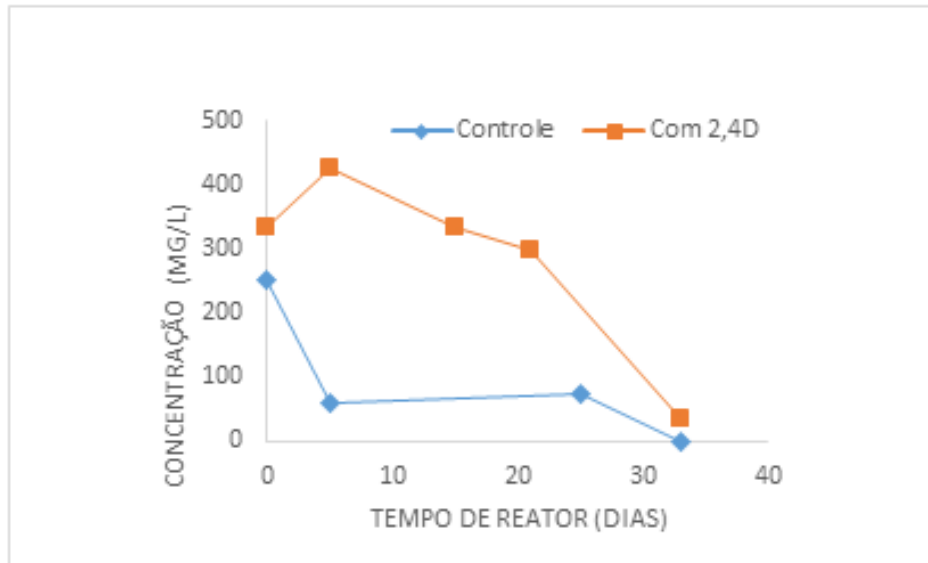
A quantificação do 2,4-D e dos intermediários metabólitos 2,4-DCP, 2-CP, 4-CP e fenol foi realizada através do HPLC UV (Agilent 1220 Infinity LC) e detecção a 230 nm. Foi utilizada uma coluna cromatográfica Zorbax Eclipse Plus C18 (250×4.6 mm, 5 µm). As separações cromatográficas foram realizadas em temperatura de 30 °C. A fase móvel foi constituída por A (0,01% de ácido fórmico em água, v/v) e B (0,1% ácido fórmico em acetonitrila, v/v) com fluxo de 0,8 ml/min em uma eluição gradiente, com as seguintes etapas: : (1) 5 min com 75% solvente A (0,1% ácido fórmico em água) e 25% solvente B (0,1% ácido fórmico em acetonitrila); (2) 8 min com 40% fase móvel A e 60% fase móvel B; (3) 2 min com 75% A e 25% B. As análises e dados foram processados pelo software EZChrom Agilent OpenLAB Chromatography Data System Software (CDS). O limite de quantificação foi 0,1 mg/l para todos os compostos e o limite de detecção foi de 0,05mg/l para o 2,4-D e seus intermediários.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RESULTADOS ENRIQUECIMENTO

O gráfico a seguir é referente a concentração média da demanda química de oxigênio no meio metanogênico.

Figura 17 - Demanda Química de Oxigênio, no Reator Metanogênico

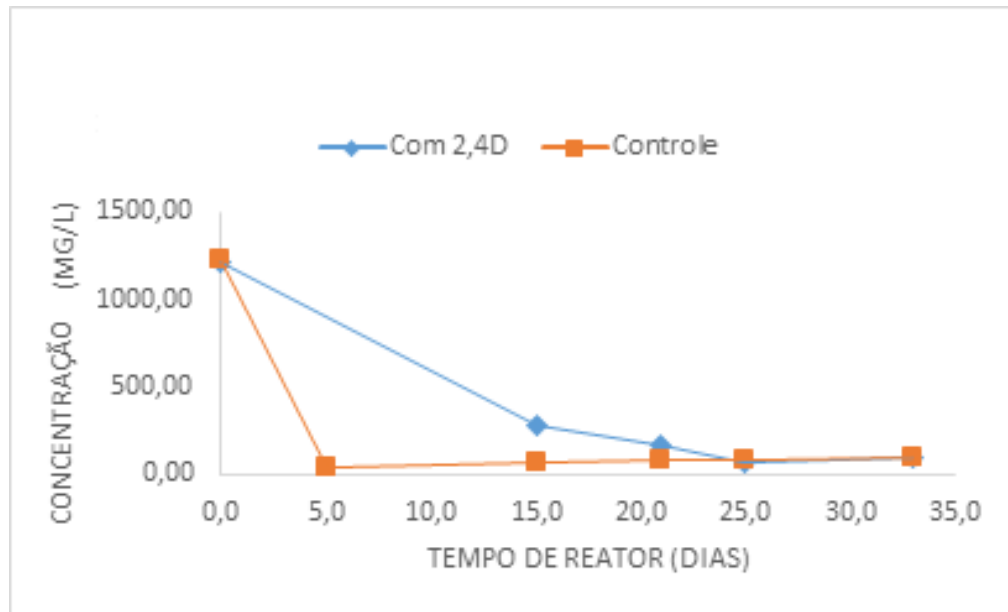


Fonte: Autor

Pode-se observar que, ao longo de 33 dias, a concentração média diminuiu cerca de 90%, no meio com 2,4-D e 99% no controle. Ao longo do dia 20, houve uma queda abrupta na concentração do reator que continha o 2,4-D.

A Figura 18 é referente a concentração média de demanda química de oxigênio no meio sulfetogênico.

Figura 18 - Demanda Quimica de Oxigênio, no Reator Sulfetogênico

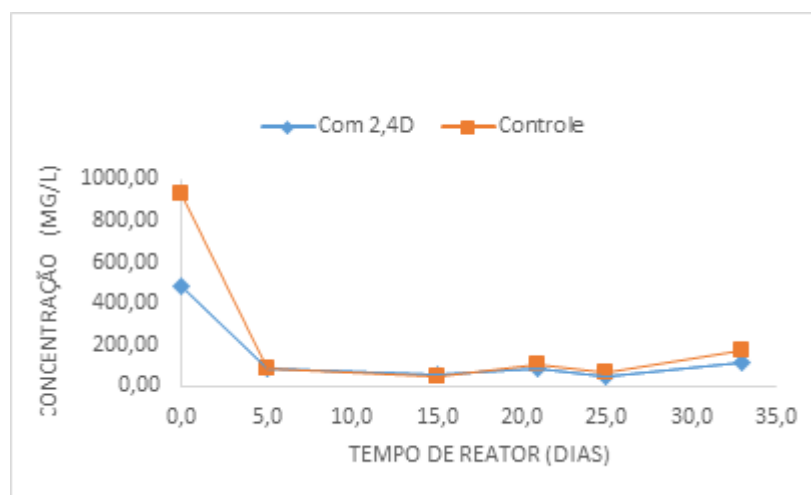


Fonte: Autor

Pode-se observar que, ao longo de 33 dias, a concentração média diminuiu cerca de 92%, no meio com 2,4-D e no controle. A matéria orgânica foi removida mais rapidamente no controle, que no reator que continha 2,4-D

A concentração média de sulfato encontrado em todos os reatores de enriquecimento, ao longo de 33 dias, pode ser observado na figura 19.

Figura 19 - Redução de Sulfato nos Reatores Sulfetogênicos

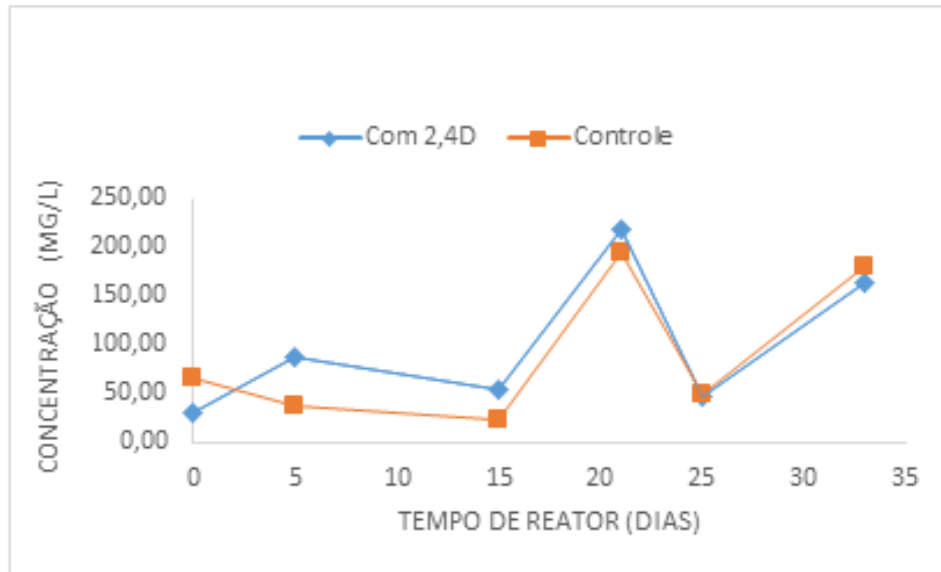


Fonte: Autor.

Notou que, a concentração média de sulfato diminuiu cerca de 75%, no meio com 2,4D e 81% no controle.

A concentração média de sulfeto encontrado em todos os reatores de enriquecimento, ao longo de 33 dias, pode ser observado na Figura 20.

Figura 3 - Produção de Sulfeto, nos Reatores Sulfetogênicos.

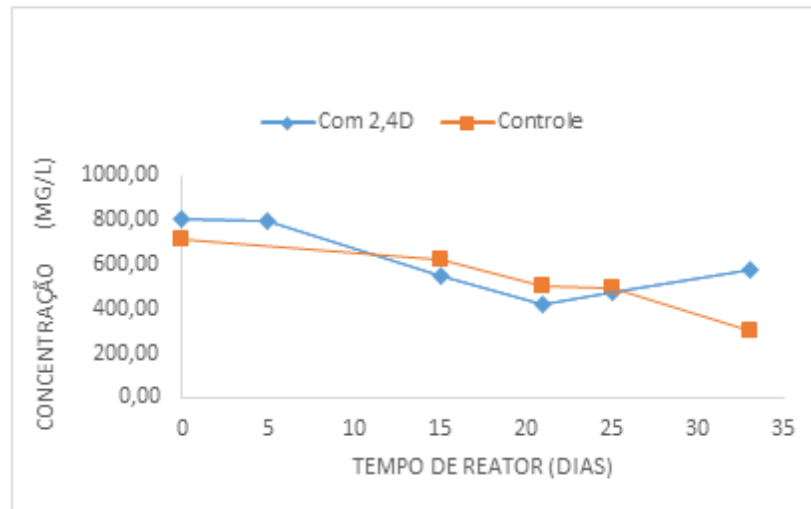


Fonte: Autor

Fazendo uma comparação entre os valores inicial e final notou que, a concentração média de sulfeto aumentou cerca de 80%, no meio com 2,4D e 64% no controle.

A Figura 21 é referente a concentração média de demanda química de oxigênio, no meio desnitrificante.

Figura 21 - Demanda Quimica de Oxigênio, no Reator Desnitrificante

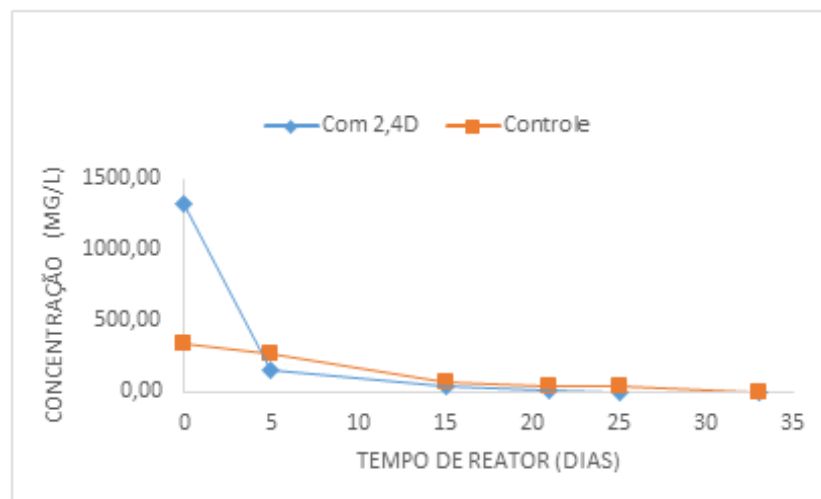


Fonte: Autor

Pode-se observar que, ao longo de 33 dias, a concentração média de DQO diminuiu cerca de 30%, no meio com 2,4D e 57%, no controle.

A concentração média de nitrato encontrado em todos os reatores de enriquecimento, ao longo de 33 dias, pode ser observado na Figura 22:

Figura 22 - Concentração de Nitrato, no Reator Desnitrificante.

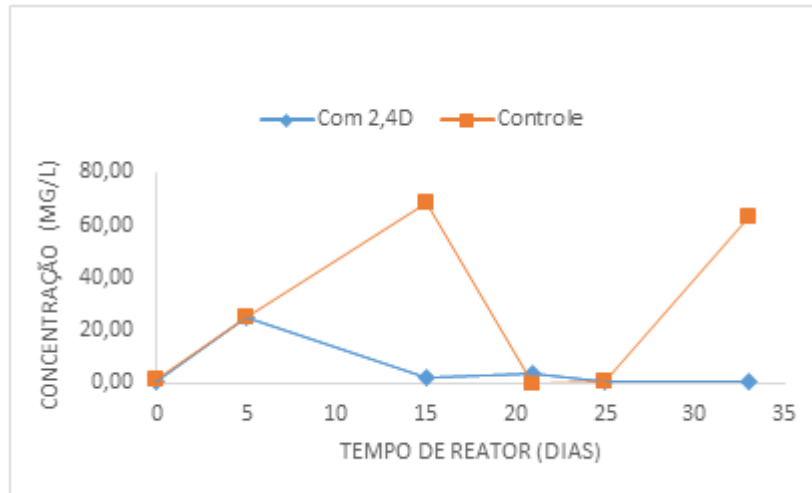


Fonte: Autor

Pode-se observar que, ao longo de 33 dias, a concentração média de nitrato diminuiu cerca de 99%, no meio com 2,4D e 98%, no controle.

A concentração média de nitrito encontrado em todos os reatores de enriquecimento, ao longo de 33 dias, pode ser observado na Figura 23:

Figura 23 - Concentração de Nitrito, no Reator Desnitrificante.



Fonte: Autor

Fazendo uma comparação entre os valores inicial e final notou que, a concentração média de nitrito aumentou cerca 98% no controle. Nos reatores que continham 2,4-D a concentração variou, sendo a maior delas de 25,15 mg/L, porém no final do 33º dia, a concentração final foi igual a inicial

Após o término do enriquecimento, os microorganismos alvo estavam preparados e enriquecidos para o próximo passo desta pesquisa.

5.2 RESULTADOS ENSAIO DE DEGRADAÇÃO 2,4-D

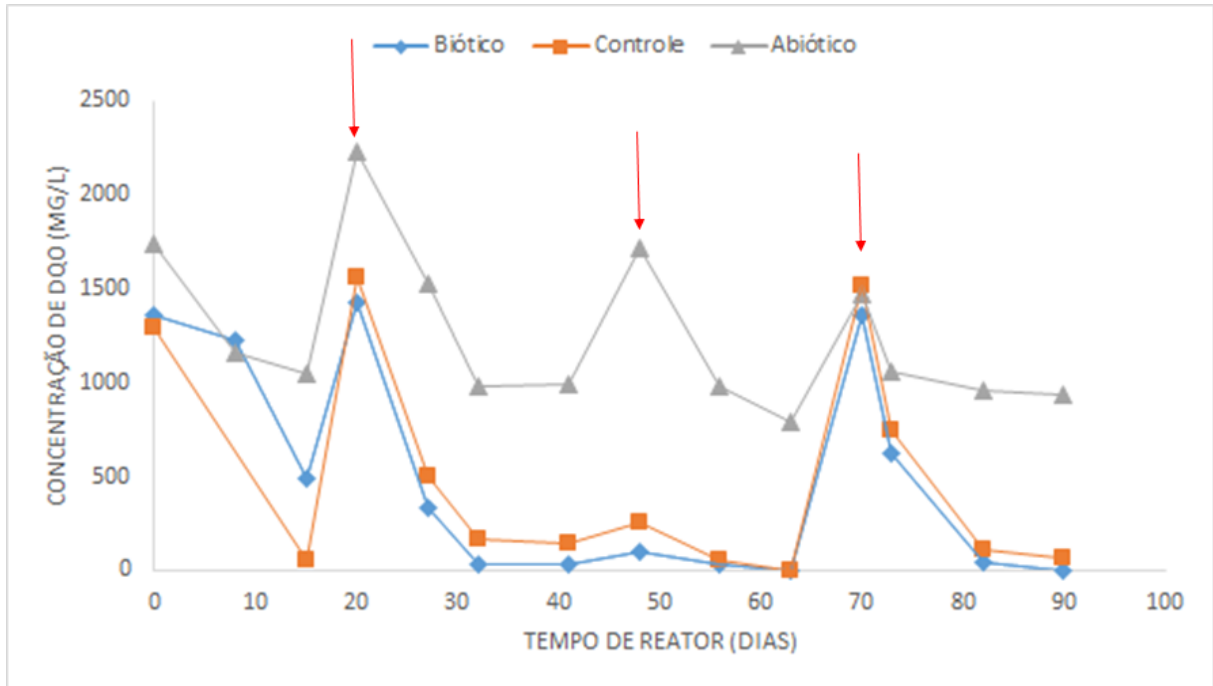
Os reatores ficaram em condições de agitação por 90 dias e apresentou uma coloração num tom de laranja conforme a cor natural do solo argiloso utilizado como inóculo (40%). Entretanto reatores desnitrificantes eram os únicos que apresentavam a fração clarificada num tom de laranja mais escuro. Este fenômeno deve-se as características deste meio ou aos seus subprodutos, produzidos pelo metabolismo microbiano das bactérias desnitrificantes.

No que diz respeito a DQO, sempre que a matéria orgânica era consumida, acrescentava a mesma porção inicial de fonte de carbono para cada meio. Cada vez que era adicionado fonte de carbono ao meio, nomeava-se uma nova etapa. A primeira etapa iniciou no dia 29 de Abril de 2021, chamada de dia 0 e foi até o dia 19 de Maio (depois de 20 dias), quando iniciou a

segunda etapa. Dia 17 de Junho foi o início da terceira etapa (após 49 dias) que seguiu até o dia 29 de Julho, totalizando 90 dias de operação.

A Figura 24 a seguir apresenta a concentração de DQO, em todas as amostras no meio metanogênico, em todas as etapas deste reator.

Figura 24 - Demanda Química de Oxigênio, no Reator Metanogênico

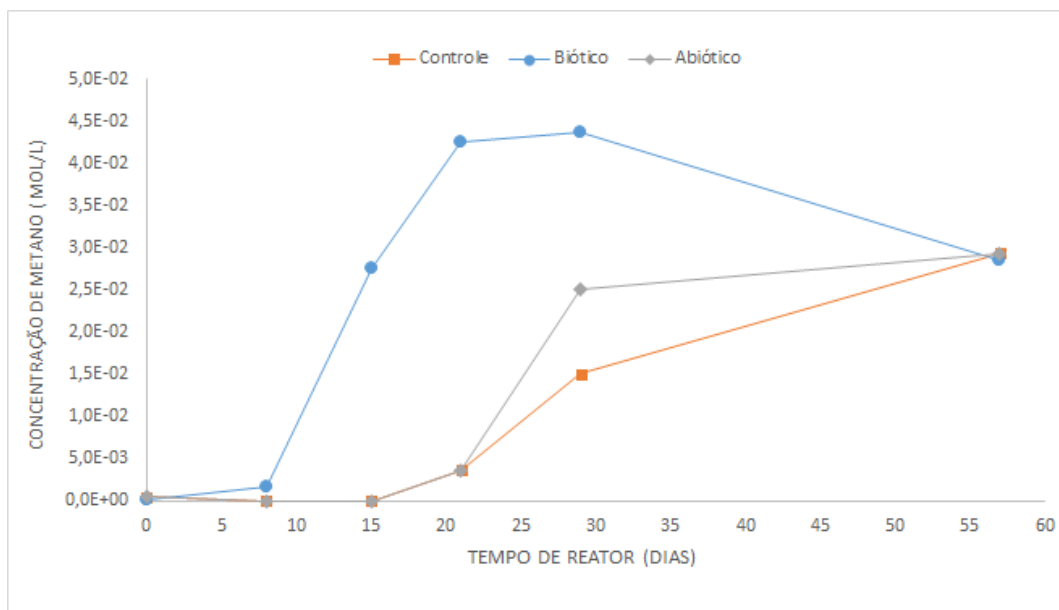


Fonte: Autor

Na primeira etapa, em duas semanas a DQO decaiu uma porcentagem de aproximadamente 64% no meio biótico, 95% de consumo no controle e 39% no meio abiótico. Já na segunda etapa, a DQO também decaiu, sendo em 22 dias, 98% no meio biótico, 91% no controle e 55% no meio abiótico. A terceira etapa foi aquela em que houve um maior decréscimo de DQO no sistema no mesmo intervalo de tempo, em todos os reatores, exceto o abiótico. Nela percebe-se um decaimento de 99,7% de DQO, no meio biótico, 95,9%, no controle e 36,3% no meio abiótico.

De acordo com os resultados, pode-se observar que houve consumo de matéria orgânica no meio e em ambas as etapas a degradação química de oxigênio foi mais rápida no meio biótico e no controle, em relação ao meio abiótico.

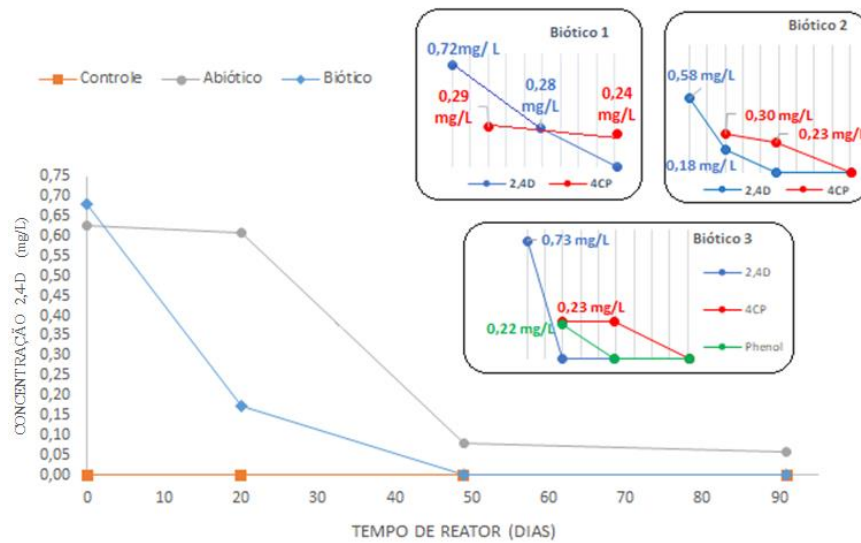
Figura 25 - Produção de Metano (Mol/L) nos Diferentes Meios de Oxirredução



Fonte: Autor

De acordo com os resultados, pode-se observar que houve produção de metano no meio em ambas as etapas a degradação. O meio biótico foi aquele que mais produziu metano, chegando a uma concentração média de 0,04 Mol/L.

Figura 26 - Remoção do 2,4-D nos reatores anaeróbios sob condições metanogênicas.



Fonte: Autor

Nos ensaios de degradação do 2,4-D, os frascos-reatores sob condições metanogênicas apresentaram degradação acentuada do composto em estudo, 2,4-D. No 20° dia de ensaio, os reatores bióticos apresentavam 75% de degradação, enquanto que os frascos abióticos não foi detectada degradação do composto. Nessa fase foi detectado 0,27 (+/- 0,03) mg/L do metabólito 4-CP nos frascos bióticos. O intermediário fenol foi detectado em somente um dos ensaios da triplicata na concentração de 0,22 mg/L, e este composto não foi mais detectado nos outros dias de ensaio, como pode ser observado na figura 3. No 50° dia de experimento não se detectou-se mais o 2,4-D nos reatores bióticos.

Os reatores denominados abióticos apresentaram atividade de consumo da matéria orgânica e degradação do 2,4-D a partir do 20° dia de ensaio. Isso aponta para uma não inativação dos microrganismos pelo acréscimo da azida sódica e do cloreto de mercúrio (1 M cada).

A degradação anaeróbia através de condições metanogênicas tem sido extensivamente estudada nos últimos anos e se apresenta com uma via eficiente de degradação de clorofenóis (Aurora; Bae, 2014; Nicholson *et al.*, 1992). Takeuchi *et al.* (2000) reportou a desalogenação e transformação de 19 isômeros de clorofenóis sob condições anaeróbias. O sedimento de água doce foi capaz de mineralizar 2,4-D em CO₂ e metano via 4CP, fenol e benzoato. O estudo de Yang *et al.* (2017) demonstrou a degradação do 2,4-D em condições metanogênicas usando acetato como fonte de carbono. Foi observado que a adição de acetato promoveu uma degradação 5 vezes mais rápida do que nos meios sem adição de acetato. *Dechloromonas* e *Pseudomonas* foram os microrganismos degradadores predominantes.

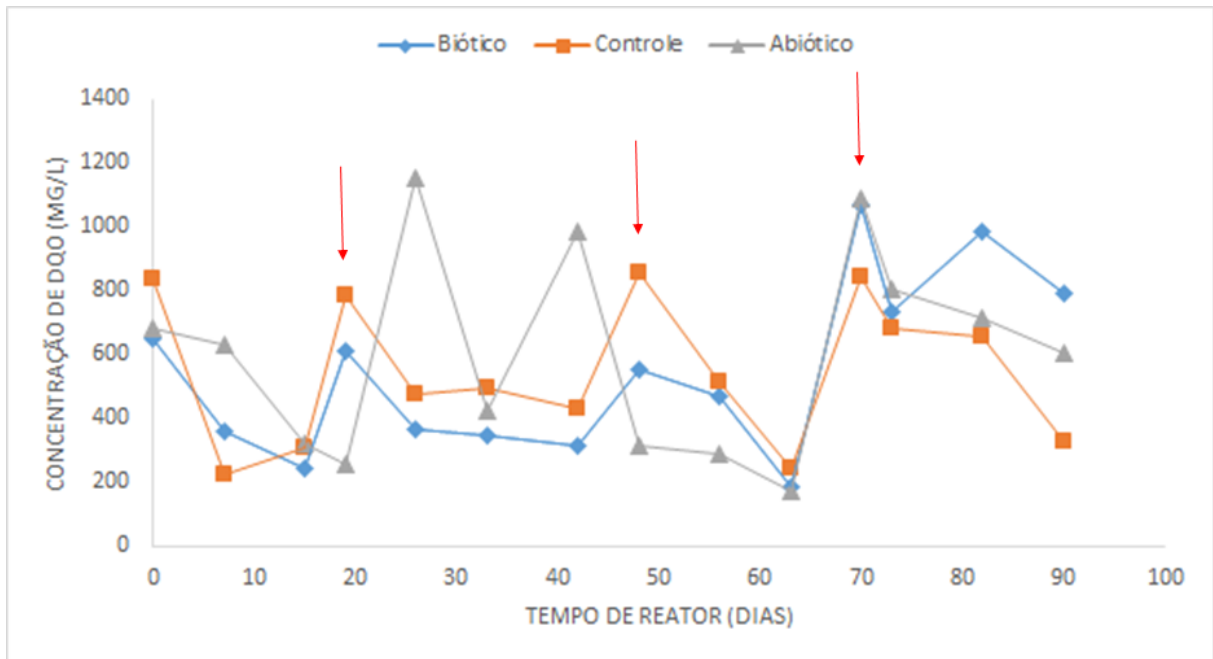
Importante ressaltar que no presente trabalho em condições metanogênicas, foi detectado a presença de concentrações traços dos intermediários originados do 2,4-D, consolidando mais uma vez que além da degradação do mesmo, também foi constatado a sua rota de degradação ocorrida. Como exposto nos gráficos complementares na figura 3, a partir da segunda fase de amostragens analisadas, foi reconhecido o 4CP nos três frascos-reatores que compõem a triplicata dessa condição, sendo que em um dos frascos bióticos foi detectado o composto fenol, este já compreendido como elemento originado na fase final de degradação do 2,4-D por essa rota.

Brucha *et al.*, (2021) estudaram a degradação anaeróbia do 2,4-D, sob condições metanogênicas e acetato e lactato como fonte de carbono. Foi utilizado solo superficial e profundo coletado em área de plantio da Amazônia como inóculo. Os resultados apontaram para a degradação do 2,4-D (1mg/L) em condições metanogênicas, com formação dos intermediários metabólitos 2,4 DCP, 4CP e fenol. Os resultados alcançados pelo presente trabalho vão de encontro ao levantado por Brucha *et al.*, (2021), comprovando que o 4 CP e o fenol são metabólitos encontrados na via 2,4-D – 2,4-DCP, 4-CP e fenol. Brucha et al. (2021), associaram a degradação aos processos co-metabolismo, mas não descartaram a possibilidade de desalogenadores estarem atuando na descloração da molécula 2,4-DCP, levando a fenol. O presente trabalho não analisou a diversidade microbiana durante a degradação do 2,4-D. Entretanto a presença dos metabólitos encontrados corrobora com o processo de desalogenação do composto 2,4-DCP.

Conclui-se pelos resultados levantados que o meio metanogênico apresenta condições para a remediação do herbicida 2,4-D.

A Figura 26 a seguir apresenta a concentração de DQO, em todas as amostras no meio desnitrificante, em todas as etapas deste reator.

Figura 27 - Demanda Química de Oxigênio, no Reator Desnitrificante



Fonte: Autor

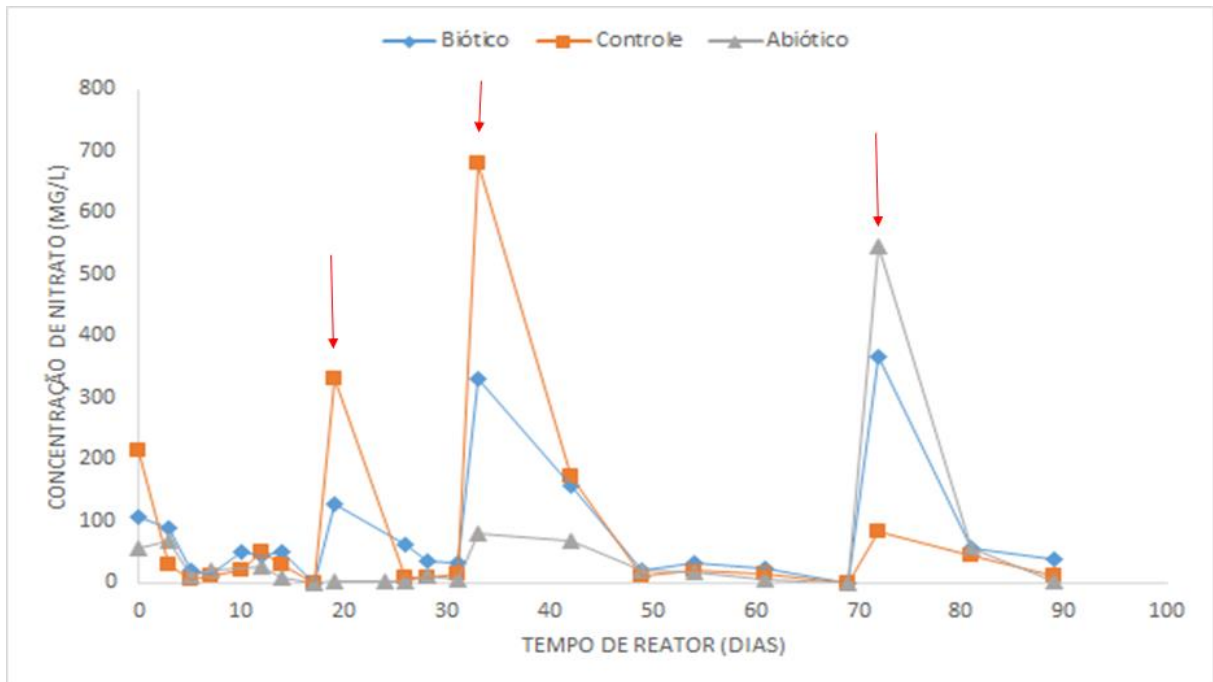
Na primeira etapa, em duas semanas a DQO decaiu uma porcentagem de aproximadamente 63% no meio biótico, 63% de consumo no controle e 53% no meio abiótico. Já na segunda etapa, a DQO decaiu apenas no controle e no meio biótico, sendo 45% e 48% de decaimento, respectivamente. De modo geral, na segunda etapa, houve um aumento de DQO apenas no meio abiótico, o que é uma característica incomum. A terceira e última etapa apresentou uma porcentagem de decaimento de 25,7% de DQO, no meio biótico, 61,4%, no controle e 44,5% no abiótico.

De acordo com os resultados, pode-se observar que houve consumo de matéria orgânica no meio desnitrificante.

Sempre que a concentração de nitrato do meio estava baixa, era acrescentado nitrato ao meio, através do D13, em uma concentração igual a inicial, seguindo sempre o protocolo de Dursen. Vale ressaltar que, sempre que era adicionado nitrato ao meio, uma nova etapa era criada. O dia 30 de abril foi a data 0 do reator. Depois de 19 dias, adicionou fonte de carbono e iniciou uma nova etapa. A terceira fase iniciou dia 33 de junho e ainda segue em andamento.

Os gráficos a seguir retratam a concentração de nitrato durante todas as etapas dos reatores, totalizando 90 dias de reator.

Figura 28 - Concentração Média de Nitrato, no Reator Desnitrificante



Fonte: Autor.

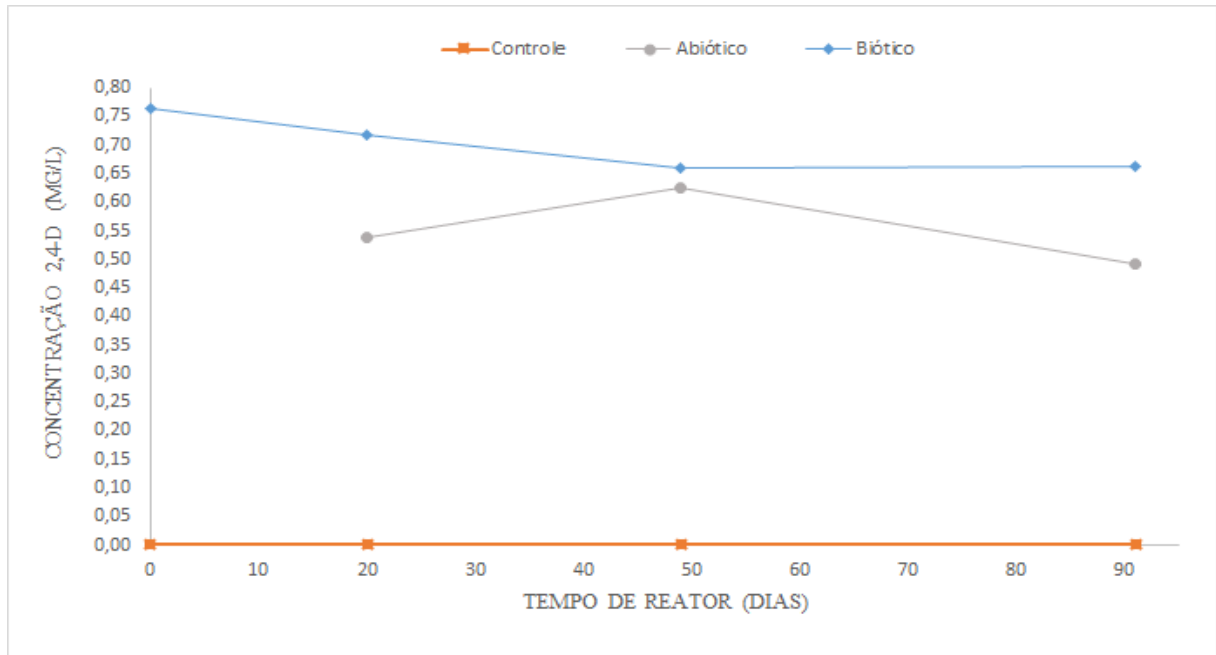
Foi possível observar que houve consumo médio de nitrato, em todos os reatores, na primeira etapa. Durante a primeira etapa, 17 dias de operação, o consumo médio nos reatores foi de 99% em todos os meios de oxirredução.

Na segunda etapa observou também que houve consumo médio de nitrato, em todos os reatores, nos 12 dias de operação. Em relação ao consumo médio de nitrato, nos reatores bióticos seu consumo foi de 74% e 96% no controle. No reator abiótico, houve um aumento médio de nitrato no meio.

A terceira etapa apresentou um consumo médio de nitrato de 89,3%, no meio biótico, 85,45%, no controle e 99,7%, no meio abiótico.

Como no ensaio metanogênico, os reatores abióticos tiveram atividade microbiana, como pode ser observado pelo consumo de matéria orgânica e nitrato, comprovando que as concentrações dos inativantes microbianos não foram suficientes para a inativação total da biomassa.

Figura 29 - Remoção do 2,4-D nos reatores anaeróbios sob condições desnitrificantes.



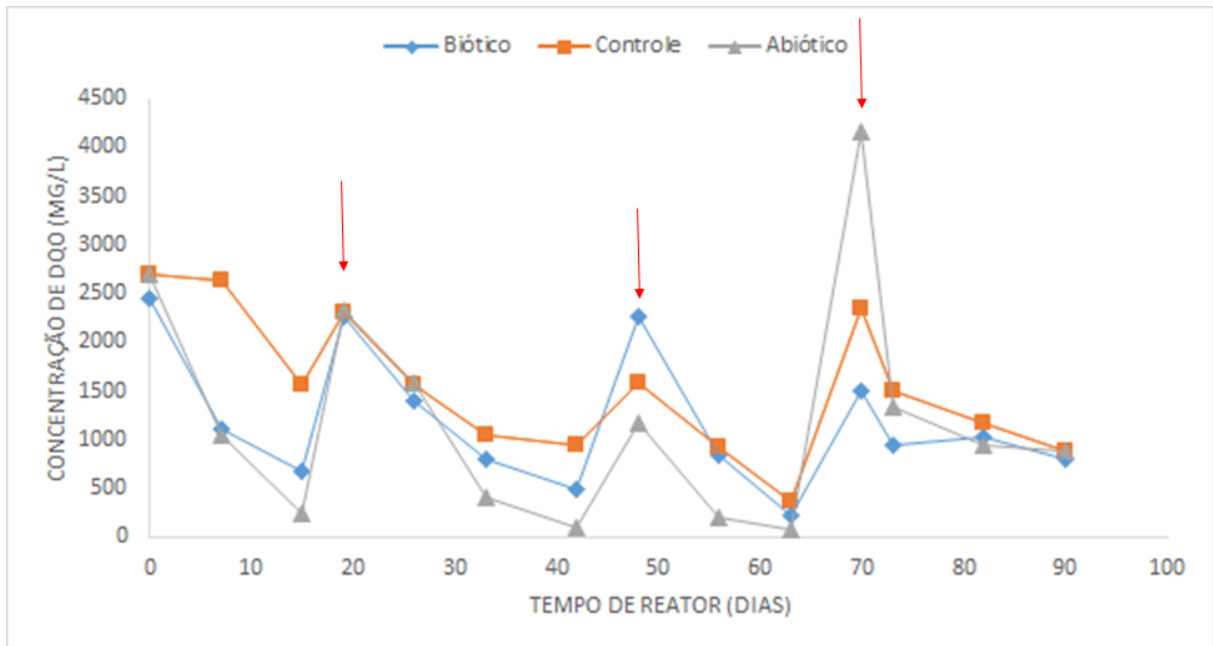
Fonte: Autor

Alguns estudos demonstram que condições desnitrificantes favorecem a degradação anaeróbia e a descloração reductiva de clofenóis, como o 2,4-D (AURORA; BAE, 2014). Sob condições desnitrificantes, a degradação do 2 CP foi estudada em culturas de enriquecimento derivadas de amostras de lodo ativado (BAE; YAMAGOSHI; SUWA, 2002). A presença de nitrato foi essencial como acceptor de elétrons para a mineralização de 2 CP em CO₂.

Os frascos-reatores sob condições desnitrificantes, apesar de também apresentarem queda da concentração inicial do composto 2,4-D, a eficácia é visivelmente menor que a degradação verificada sob condições metanogênicas, tendo atingido em média 13-16% no meio biótico e no meio abiótico 9,26%, como mostra a Figura 5. Outro fator interessante, foi que nesta condição não foram detectadas concentração dos intermediários do 2,4-D.

O gráfico apresenta a concentração de DQO, em todas as amostras no meio sulfetogênico, em todas as etapas deste reator.

Figura 30 - Demanda Química de Oxigênio, no Reator Sulfetogênico



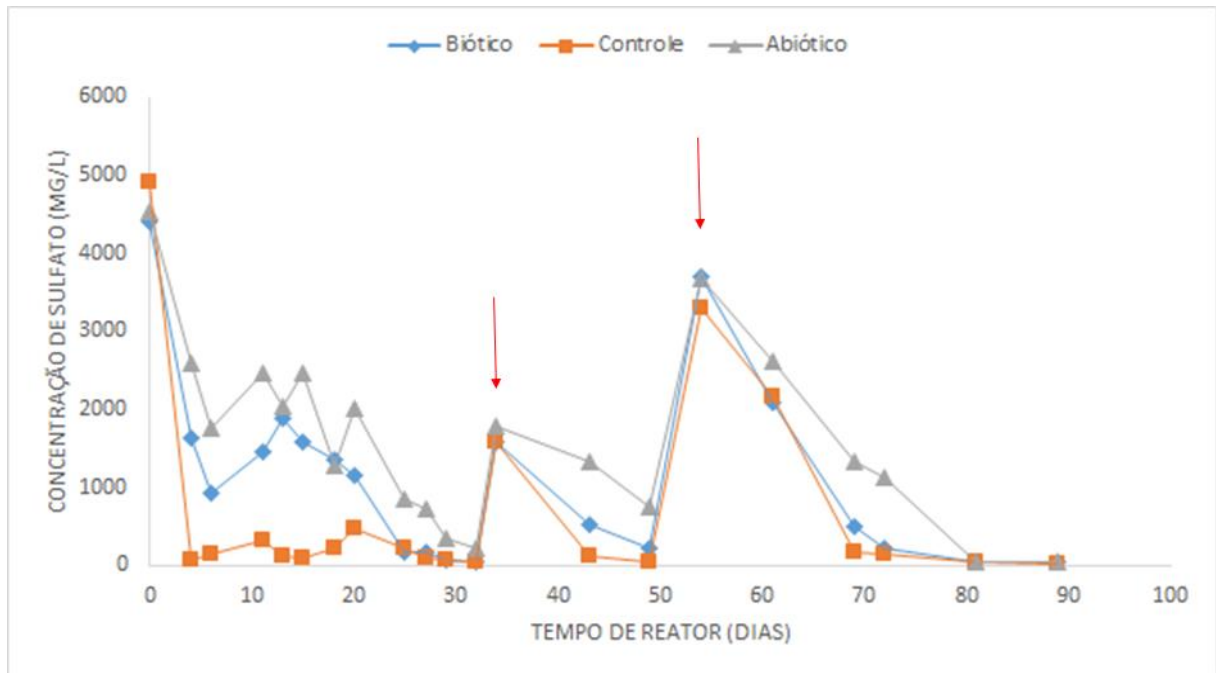
Fonte: Autor

Na primeira etapa, em 15 dias a DQO decaiu uma porcentagem de aproximadamente 72,5% no meio biótico, 42% de consumo no controle e 91% no meio abiótico. Em ambas as etapas a degradação química de oxigênio foi mais rápida no meio biótico e no controle. Já na segunda etapa, a DQO também decaiu, sendo em 22 dias, 78% no meio biótico, 59% no controle e 95% no meio abiótico. Na terceira etapa, houve um consumo médio de DQO de 47,4%, no meio biótico, 85,2% no controle e 95,6%, no meio abiótico.

De acordo com os resultados, pode-se observar que houve consumo de matéria orgânica no meio sulfetogênico.

No meio sulfetogênico, sempre que a concentração de sulfato do reator estava baixa, era acrescentado sulfato ao meio, através do S13, em uma concentração igual a inicial, seguindo sempre o protocolo de Dursean. Vale ressaltar que, sempre que era adicionado sulfato, uma nova etapa era criada. O reator foi iniciado dia 29 de abril, durando 34 dias. A segunda etapa iniciou dia 02 de junho e terminou dia 25 de junho, perdurando até o dia 54. A terceira etapa, vai do dia 25 de junho até dia 29 de julho, totalizando 89 dias de operação.

Figura 31 - Redução de Sulfato nos Reatores Sulfetogênicos

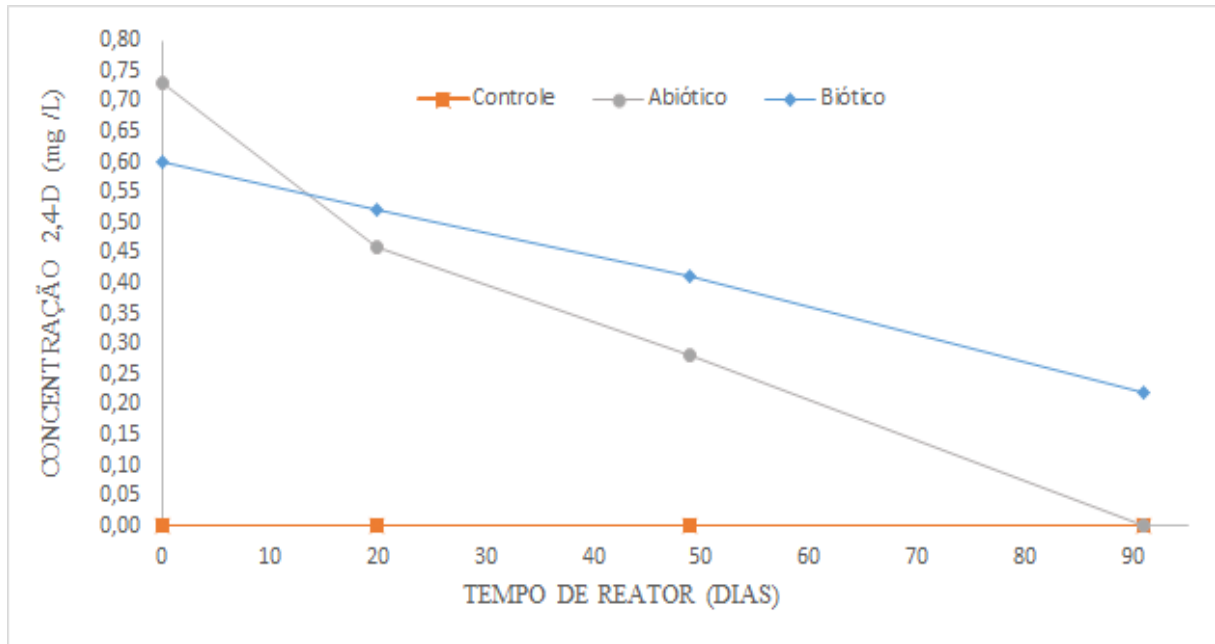


Fonte: Autor

Foi possível observar que, durante os 32 dias de operação, houve consumo médio de sulfato, em todos os reatores, na primeira etapa. O consumo médio nos reatores foi de 99% em todos os meios de oxirredução. Na segunda etapa, houve um consumo médio de sulfato de 85%, no meio biótico, 97%, no controle e 58%, no meio abiótico. Já na terceira e última etapa houve um consumo médio de sulfato de 92,3% no meio biótico, 85,2% no controle e 95,6%, no meio abiótico.

De acordo com os resultados, pode-se observar que houve consumo de matéria orgânica no meio sulfetogênico, assim como a redução do sulfato, durante os 90 dias de operação, em todos os reatores. Esses resultados confirmam o enriquecimento da comunidade sulfetogênica proveniente do reservatório de Itaipú e uma não inativação dos microrganismos presentes no ensaio abiótico.

Figura 32 - Remoção do 2,4-D nos reatores anaeróbios sob condições sulfetogênicas.



Fonte: Autor.

A mineralização de clorofenóis está associada à redução de sulfato. Haggblom (1990) desenvolveram um consórcio redutor de sulfato mineralizante de clorofenóis em sedimentos estuarinos, onde foi mantido o 2CP, 3CP ou 4CP como a única fonte de carbono e energia por vários anos. Seus experimentos utilizando um consórcio utilizando 4CP revelaram que a mineralização de 4CP em CO_2 foi acoplada à redução de sulfato, e que a depleção de 4CP não ocorreu na ausência de sulfato. Nesta reação, sulfato, tiosulfato ou sulfito foram usados como aceptores de elétrons. A associação da redução de sulfato com mineralização de clorofenóis também foi observado na degradação de 2CP ou 4CP por culturas de enriquecimento redutoras de sulfato derivadas do sedimento do Rio Hudson (HÄGGBLOM; RIVIERA; YOUNG, 1993).

No presente estudo observou-se uma degradação de 63,33% do 2,4-D nos ensaios bióticos, entretanto nenhum metabólito intermediário analisado estava presente. O reator denominado abiótico, não estava com os microrganismos inativados, uma vez que houve consumo da matéria orgânica e redução de sulfato.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O 2,4D pode sofrer diferentes tipos de processos de degradação, dependendo do meio de oxirredução que foi introduzido. Esses processos também dependem de condições ambientais específicas, condições físico-químicas do ambiente, além de características intrínsecas deste herbicida.

O reator abiótico apresentou variações de concentração em todos os meios de oxirredução (metanogênico, sulfetogênico e nitrificante), o que conclui que houve atividade microbiana nesses reatores e que elas não foram inativadas na presença de azida sódica e cloreto de prata, nas concentrações utilizadas.

É considerada relevante, na remoção de 2,4-D, os diferentes meios de oxirredução estudados, uma vez que, para cada meio houve concentrações diferentes de remoção. O meio metanogênico foi o que apresentou maior eficiência de remoção do composto estudado, com formação de intermediários metabólitos, indicando a rota 2,4-D, 4 DCP, 4DCP e fenol.

Estes resultados podem contribuir para análise mais completa do comportamento deste composto no meio ambiente. Assim, este trabalho é uma oportunidade para futuras pesquisas que podem ser desenvolvidas nessa área, e ressalta a importância destas informações para a tomada de decisão pelos órgãos públicos e para projetos de biorremediação de áreas contaminadas com 2,4-D.

REFERÊNCIAS

- ABERNATH, J. R. **Relationship of Soil Mobility and Bio-persistence of Herbicides to Surface and Ground Water Interception**. Intensive Course on the Activity, Selectivity, Behavior, and Fate of herbicides in plants and soils. 1994. 508 f. Departments of Horticulture, Agronomy, Botany and Plant Pathology, and Forestry and Natural Resources - Purdue University, Lafayette, USA, 1994.
- AMARANTE JÚNIOR, O.P.; SANTOS, T.C.R.; NUNES, G.S. Breve Revisão de Métodos de Determinação de Resíduos do Herbicida Ácido 2,4- Diclorofenoxiacético (2,4-D). **Quim. Nova**, [s. l.], n. 26, p. 223-229, mar. 2013.
- AZUBUIKE, C.C.; CHIKERE, C.B.; OKPOKWASILI, G.C. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. **World J Microbiol Biotechnol**, Switzerland, v. 32, n. 180, p. 1-18, 2016. Disponível em: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s11274-016-2137-x.pdf>. Acesso em: 25 JAN. 2022.
- BAE, H.S.; YAMAGISHI, T.; SUWA, Y. Evidence for degradation of 2-chlorophenol by enrichment cultures under denitrifying conditions. **Microbiology**, [s. l.], v. 148, p. 221-227.2002
- BAGGIANI, C *et al.* Molecularly imprinted solid-phase extraction sorbent for the cleanup of chlorinated phenoxyacids from aqueous samples. **Journal Of Chromatography A**, [s. l.], ano 01, n. 938, 14 dez. 2001.
- BAILEY, G.W. & WHITE, J.L., Factors influencing the adsorption, desorption and movement of pesticides in soil soil. *In*: GUNTHER F. A. (ed.). **Single pesticide volume: the triazine herbicides**, volume 32. New York: Springer Verlag. 1970. p. 29-92.
- BAIRD, C. (Tradução: RECIO, M. A. L. e CARRERA, L. C. M.). **Química Ambiental**, 2ª ed. Porto Alegre: Ed. Bookman, 2002.
- BARBOSA, A. M. C, SOLANO, M. L. M, UMBUZEIRO, G. A. Pesticides in Drinking Water – The Brazilian Monitoring Progra. **Frontiers in Public Health**, [s. l.], v. 3, p. 229-236, nov. 2015.
- BRUCHA, G. *et al.* 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid degradation in methanogenic mixed cultures obtained from Brazilian Amazonian soil samples. **Biodegradation**, [s. l.], v. 32, p. 419–433, abr. 2021.
- CANDIOTTO. L. Z. P. *et al.* Agricultura orgânica em oito município da região sudoeste do Paraná. **1 ed. Francisco Beltrão: UNIOESTE**, Francisco Beltrão, v. 1250, p. 121. 2013.
- CATALDO, D.A *et al.* Rapid colorimetric determination of nitrate in plant tissue by nitration of salicylic acid. **Communications in Soil Science and Plant Analysis**, [s. l.], v.6, p.71-80. 1975.
- CAVIGLIONE, J.H. *et al.* **Cartas climáticas do Paraná**. Londrina: IAPAR, 2000. 1 Cd-rom.

CRAFTS, A.S. The chlorophenoxy herbicides. In: CRAFTS, A. S. **The chemistry and mode of action of herbicides**: Interscience Publishers, New York and London, v. 6, p. 52-70.1961.

DEURSEN, M. V. **Biodegradation of a pesticide mixture under different redox conditions**, [s. l.]: Sub-department of environmental technology, 2016

FORGET G. **Pesticides: necessary but dangerous p o i s o n s**. [s. l.]: International Development Research Center Report, 1989.

FUKUYAMA, T. E. et al. Allergic reaction induced by dermal and/or respiratory exposure to low-dose phenoxyacetic acid, organophosphorus, and carbamate pesticides. **Toxicology**, [s. l.], v. 261, p. 152-161. 2009.

GUEDES, S. F. **Estudo da Biodegradação do Ácido 2,4-diclorofenoxiacético, um Herbicida Selectivo Amplamente Utilizado na Agricultura, por uma Estirpe de Penicillium**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar)- Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Monte da Caparica, Distrito de Setúbal, Portugal, 2010.

HÄGGBLOM, M. Mechanisms of bacterial degradation and transformation of chlorinated monoaromatic compounds. **J Basic Microbiol**, [s. l.], v.30, p.115–141. 1990.

HÄGGBLOM, M.M.; RIVERA, M.D.; YOUNG L.Y. Influence of alternative electron acceptors on the anaerobic biodegradability of chlorinated phenols and benzoic acids. **Appl Environ Microbiol**, [s. l.], v.59, p.1162-116. 1993.

HOWARD, P. P. **Handbook of Environmental Fate and Exposure Data for Organic Chemicals**. Volume III. Lewis Publishers. [s. l.]. 1991. p.712.

INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E RECURSOS ENERGETICOS. **Relatórios de comercialização de agrotóxicos**, Brasília: IBAMA, 2020. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>. Acesso em: 10 de ago. 2020.

JAVARONI, R.C.A; LANDGRAF, M.D.; REZENDE, M.O. Comportamento dos Herbicidas Atrazina e Alaclor em Solo Preparado para o Cultivo de Cana-de-Açúcar. **Química Nova**, [s. l.], p. 58-64. 1998.

LI, Z., SUZUKI, D., ZHANG, C., YOSHIDA, N., YANG, S., & KATAYAMA, A. Involvement of Dehalobacter strains in the anaerobic dechlorination of 2, 4, 6-trichlorophenol. **Journal of bioscience and bioengineering**, [s. l.], v. 116, p. 602-609. 2013.

LOOMIS, D. *et al.* Carcinogenetic activity of lindane, DDT, and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. **Lancet Oncology**, [s. l.], v. 16, p. 891- 892, Aug. 2015. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)00081-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)00081-9). Acesso em: 11. ago. 2020

LYDON, J.; DUKE, S.O. Pesticide effects on secondary. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 33, n.5, set-out, 2003.

MACHADO, A. F. **DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA 2,4-D POR PROCESSOS OXIDATIVOS AVANÇADOS**. 2004. 97 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

MENDONÇA, F. OLIVEIRA, I.M. **Climatologia: noções básicas e climas do Brasil**. São Paulo: Oficina de Textos, 2007. 206 p.

MESSIAS, RA. **Estudos de adsorção/dessorção e biodegradação de simazina e 2,4-D incorporados em turfa e poliuretana. São Garios: 1998.** Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo.

MONACO, T. J.; WELLER, S. C.; ASHTON, F. M. **Weed science: principles and practices.** New York USA. John Wiley & Sons inc, 2002. 671p.

NEVES, P.D.M. *et al.* Intoxicação por agrotóxicos agrícolas no estado de Goiás, Brasil, de 2005-2015: análise dos registros nos sistemas oficiais de informação. **Ciênc. saúde coletiva**, [s. p.], v.25, p.7, 2020.

NICHOLSON, D.K. *et al.*. Reductive dechlorination of chlorophenols by a pentachlorophenolacclimated methanogenic consortium. **Appl Environ Microbiol.** [s. l.], v. 58, p. 2280-2286. 1992.

NJOKU, V.O.; HAMEED, B.H. Preparation and characterization of activated carbon from corncob by chemical activation with H₃PO₄ for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid adsorption. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 173, p. 391-399. 2011.

PLANO DA BACIA HIDROGRÁFICA DO PARANÁ 3. Características gerais da bacia PBHP3. Cascavel: UNIOESTE; ITAIPU; PARANÁ3, 2014.

RODRIGUES, M. V. N.; SERRA, G. E. Determinação de resíduos de 2,4D em amostras vegetais. **Pesticidas R. Téc. Cient.** Curitiba, V. 6, p.99-104, 1996.

SAAD, O. **A vez dos herbicidas.** 2.ed. São Paulo: Nobel, 1978. 267p.

SANCHIS, S. *et al.* Strategies to evaluate biodegradability: application to chlorinated herbicides. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, n.16, p.207, set. 2013.

SBANO, A. *et al.* Otimização de método cromatográfico para quantificação do herbicida ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D). **Acta Scientiae et Technicae** 1, [s. l.], v. 1, p. 37-45. 2013

SOUSA, A. F. **Biodegradação do ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) por Burkholdeira sp.** SMF042. 2013. 101 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza 2013.

SOUZA, F.L.; SÁEZ, C.; LANZA, M.R.V.; CANIZARES, P.; RODRIGO, M.A. Removal of chlorsulfuron and 2,4-D from spiked soil using reversible electrokinetic adsorption barriers. **Separation and Purification Technology**, [s. l.], v. 178, p. 147-153. 2017.

TAKEUCHI, R. *et al.*. Anaerobic transformation of chlorophenols in methanogenic sludge unexposed to chlorophenols. **Chemosphere**, [s. l.], v. 41, p. 1457-1462. 2000.

VIEIRA, M. G. *et al.* Avaliação da Contaminação por Agrotóxicos em Mananciais de Municípios da Região Sudoeste do Paraná. **Rev. Virtual de Química.** [s. l.], v. 9, n.5, p. 1800-1812. 2017.

XI, Y.; MALLAVARAPU, M.; NAIDU, R. Adsorption of the herbicide 2,4-D on organo-palygorskite. **Applied Clay Science**, [s. l.], v. 49, p.255-261.2010.