

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENERGIA NUCLEAR**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
TECNOLOGIAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**

**BIODEGRADAÇÃO DE PACLOBUTRAZOL EM DOIS SOLOS
CULTIVADOS COM MANGA NO VALE DO SÃO FRANCISCO**

FERNANDA LEITÃO VAZ

**RECIFE - PERNAMBUCO - BRASIL
MARÇO - 2011**

FERNANDA LEITÃO VAZ

**BIODEGRADAÇÃO DE PACLOBUTRAZOL EM DOIS SOLOS
CULTIVADOS COM MANGA NO VALE DO SÃO FRANCISCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Energéticas e Nucleares PROTEN, do Departamento de Energia Nuclear, da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Doutor em Ciências. Área de Concentração: Aplicação de Radioisótopos/Física do Solo.

ORIENTADOR: Prof. Dr. ANDRÉ MACIEL NETTO

COORIENTADORA: Profa. Dra. ESTER RIBEIRO GOUVEIA

RECIFE - PERNAMBUCO - BRASIL

MARÇO - 2011

Catálogo na fonte
Bibliotecária Raquel Cortizo, CRB-4 664

V393b

Vaz, Fernanda Leitão.

Biodegradação de paclobutrazol em dois solos cultivados com manga no Vale de São Francisco / Fernanda Leitão Vaz. - Recife: O Autor, 2011.

71 folhas, il., gráfs., tabs., figs.

Orientador: Prof. Dr: André Maciel Netto.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Energia Nuclear, 2011. Inclui Bibliografia

1. Tecnologia Energéticas e Nucleares. 2.Paclobutrazol 3.Biodegradação 4.Pseudomonas. 5. Glicerol. 6. Modelagem I. Maciel Netto, André (orientador). II. Título.

621.48 CDD (22. ed.)

UFPE
BCTG/2011-130

**BIODEGRADAÇÃO DE PACLOBUTRAZOL EM DOIS SOLOS
CULTIVADOS COM MANGA NO VALE DO SÃO FRANCISCO**

Fernanda Leitão Vaz

APROVADA EM: 24.03.2011

**ORIENTADOR: Prof. Dr. André Maciel Netto
CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Ester Ribeiro Gouveia**

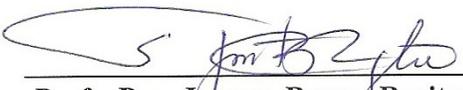
COMISSÃO EXAMINADORA:



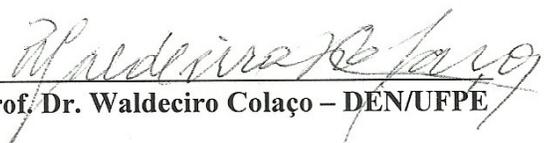
Prof. Dr. André Maciel Netto – DEN/UFPE



Profa. Dra. Maria de Fátima Viera de Queiroz Sousa - CCB-DA/UFPE



Profa. Dra. Jussara Borges Regitano - ESALQ-CENA-USP

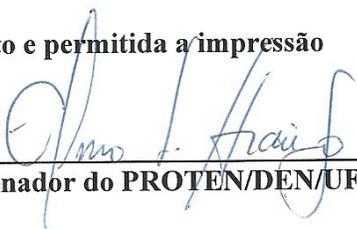


Prof. Dr. Waldecir Colação – DEN/UFPE



Profa. Dra. Ana Maria Souto Maior – CCB-DA/UFPE

Visto e permitida a impressão



Coordenador do PROTEN/DEN/UFPE

Ao meu marido Cláudio,

meu Sol,

meu Norte,

meu Amor

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Os meus mais sinceros agradecimentos:

A Deus, em primeiro lugar, que me guia e me impulsiona a uma vida honesta de estudo e trabalho.

Aos meus familiares, pelo amor, apoio e coragem que sempre me transmitiram; aos meus Pais, João Matos Vaz e Maria Celeste Leitão Vaz e aos meus irmãos, Gustavo, Rafael e Adriano, pela compreensão nos momentos de ausência.; à tia Tarcila pela torcida e incentivo a sempre progredir.

Ao meu querido e amado marido, Antonio Cláudio Marques Afonso por estar sempre presente e por aguentar os meus momentos de ansiedade e estresse.

Ao meu orientador, Professor Doutor André Maciel Netto, por toda a disponibilidade e orientação prestada.

À minha coorientadora, Professora Doutora Ester Ribeiro Gouveia, pela amizade, apoio, disponibilidade e pelo conhecimento transmitido ao longo desses anos.

Aos Professores Doutores Antonio Celso Dantas Antonino e Jean Manuel Fonseca Martins, pela sabedoria transmitida e ajuda prestada durante a realização desta tese.

Aos colegas do grupo de física de solos: Manuella, Edevaldo, Iane, Carlos, Carol, Ingrid, Angelim, Cássio, pela ajuda e companheirismo.

Às amigas cearenses moradoras de Recife: Luciana, Helen, Mellissa e Sandra pela amizade e descontração desde que viemos estudar nesta cidade.

A todos que colaboraram para a concretização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Uso de agroquímicos e impacto ambiental.....	3
2.2 Persistência de xenobióticos.....	5
2.3 Biorremediação de solos.....	6
2.3.1 Biodegradação em solo.....	9
2.3.2 Fatores que afetam a biodegradação de agroquímicos.....	9
2.3.2.1 Solo.....	9
2.3.2.2 Molécula xenobiótica.....	10
2.3.2.3 Interações entre os micro-organismos.....	11
2.3.2.4 Fonte de carbono adicional.....	11
2.3.3 Modelos que descrevem a biodegradação.....	13
2.4 Paclobutrazol (PBZ).....	15
2.4.1 – Possíveis vias de biodegradação de paclobutrazol.....	20
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	25

3.1 Solo.....	25
3.2 Paclobutrazol.....	26
3.3 Micro-organismos.....	27
3.4 Procedimento experimental.....	28
3.4.1 Ensaio de biodegradação.....	28
3.5 Métodos Analíticos.....	31
3.5.1 Quantificação do crescimento microbiano e monitoramento do pH.....	31
3.5.2 Quantificação do paclobutrazol.....	32
3.5.3 Quantificação de glicerol.....	32
3.6 Modelagem da biodegradação de paclobutrazol.....	33
3.7 Análise estatística.....	33
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
4.1 Ensaio utilizando apenas paclobutrazol como fonte de carbono.....	35
4.1.1 Crescimento microbiano.....	35
4.1.2 Medições do pH.....	37
4.1.3 Biodegradação de paclobutrazol.....	39
4.2 Ensaio de biodegradação utilizando paclobutrazol como fonte de carbono e glicerol como fonte de carbono adicional.....	43
4.2.1 Crescimento microbiano.....	43
4.2.2 Medições do pH.....	46
4.2.3 Biodegradação de paclobutrazol.....	46

4.3 Modelagem da biodegradação.....	50
4.3.1 Modelos matemáticos aplicados a biodegradação de paclobutrazol.....	50
5 CONCLUSÃO.....	57
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
ANEXO A - Médias dos crescimentos dos micro-organismos em UFC/mL nos ensaios com paclobutrazol como única fonte de carbono.....	70
ANEXO B – Médias dos crescimentos dos micro-organismos em UFC/mL nos ensaios com paclobutrazol e glicerol (fonte adicional de carbono).....	71
ANEXO C - Análise estatísticas dos dados de biodegradação.....	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Caminhos de contaminação que um agrotóxico pode percorrer (SOARES; PORTO, 2007).....	4
Figura 2	Esquematização do movimento de agroquímicos nos solos (RIBEIRO et al., 2007).....	5
Figura 3	Fórmula estrutural da molécula de paclobutrazol.....	15
Figura 4	Aspecto da redução do vigor vegetativo após aplicação de paclobutrazol em excesso. Destaque para a mangueiras apontadas pela seta que possuem a mesma idade das outras mangueiras da foto.....	18
Figura 5	Via metabólica de degradação do cloro-benzeno em <i>Pseudomonas</i> sp. P51, JS150, RHO1, JS6 (MCLEISH; ESSENBERG, 2004).....	22
Figura 6	Via metabólica de degradação da atrazina em <i>Pseudomonas</i> sp. ADP, <i>Ralstonia</i> sp. M91-3, <i>Clavibacter</i> sp., <i>Agrobacterium</i> sp. J14a, <i>Alcaligenes</i> sp. SG1 (STEPHENS; KOTHARU, 2002a).....	23
Figura 7	Via metabólica de degradação da atrazina em <i>Rhodococcus</i> spp. NI86/2, <i>Pseudomonas</i> spp. 192, 194, <i>Streptomyces</i> sp. PS1/5 e <i>Nocardia</i> sp.(STEPHENS; KOTHARU, 2002b).....	24
Figura 8	Localização das amostras de solo; (a) Pólo de Bebedouro-PE (b) Pólo de Mandacaru-BA (MILFONT, 2006).....	25
Figura 9	Esquema dos ensaios de biodegradação.....	29
Figura 10	Preparo no ensaio de biodegradação.....	30
Figura 11	Experimento conduzido em mesa agitadora.....	30
Figura 12	Esquema para contagem de células viáveis em placa.....	31

Figura 13	Crescimento dos micro-organismos nos dois solos (Argissolo-Amarelo e Vertissolo), utilizando o PBZ (Sigma e Cultar), nos ensaios em condições estéreis e não-estéreis, nos tempos 0, 14 e 21 dias.....	36
Figura 14	Valores médios de pH ao longo do experimento de biodegradação realizado nos dois solos (Argissolo-Amarelo e Vertissolo) utilizando PBZ (Sigma e Cultar) em duas concentrações (10 e 25 mg/L) nos ensaios em condições estéreis e não-estéreis.....	38
Figura 15	Biodegradação de paclobutrazol em dois solos (Argissolo-Amarelo e Vertissolo) em condição estéril e não-estéril utilizando PBZ (Sigma e Cultar) na concentração de 10 mg/L.....	40
Figura 16	Biodegradação de paclobutrazol em dois solos (Argissolo-Amarelo e Vertissolo) em condição estéril e não estéril utilizando PBZ (Sigma e Cultar) na concentração de 25 mg/L.....	41
Figura 17	Crescimento de micro-organismos em dois solos (Argissolo-Amarelo e Vertissolo), em condição estéril e não-estéril, utilizando o PBZ (Cultar) e o glicerol como fonte adicional de carbono.....	45
Figura 18	Valores médios de pH ao longo do experimento de biodegradação realizado nos dois solos (Argissolo-Amarelo e Vertissolo) utilizando PBZ (Cultar) em duas concentrações (10 e 25 mg/L) e glicerol na duas concentrações (50 e 125 mg/L) nos ensaios em condições estéreis e não-estéreis.....	46
Figura 19	Biodegradação de paclobutrazol em dois solos (Argissolo-Amarelo e Vertissolo) em condição estéril e não-estéril utilizando 10 mg/L de PBZ e 50 mg/L glicerol.....	47
Figura 20	Biodegradação de paclobutrazol em dois solos (Argissolo-Amarelo e Vertissolo) em condição estéril e não-estéril utilizando 25 mg/L de PBZ e 125 mg/L glicerol.....	48

- Figura 21** Modelagens de dupla cinética de primeira ordem e logística aplicadas aos dados experimentais de biodegradação de paclobutrazol utilizando o mesmo como única fonte de carbono; (a) Argissolo-Amarelo – PBZ 10 mg/L; (b) Vertissolo – PBZ 10 mg/L; (c) Argissolo-Amarelo – PBZ 25 mg/L; (d) Vertissolo – PBZ 25 mg/L..... 52
- Figura 22** Modelagens de dupla cinética de primeira ordem e logística aplicadas aos dados experimentais de biodegradação de paclobutrazol utilizando PBZ adicionado de glicerol como fontes de carbono; (a) Argissolo-Amarelo – PBZ 10 mg/L e Glicerol 50 mg/L; (b) Vertissolo – PBZ 10 mg/L e Glicerol 50 mg/L; (c) Argissolo-Amarelo – PBZ 25 mg/L e Glicerol 125 mg/L; (d) Vertissolo – PBZ 25 mg/L e Glicerol 125 mg/L..... 53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características dos solos utilizados nos ensaios de biodegradação de paclobutrazol.....	26
Tabela 2	Propriedades físico-químicas do paclobutrazol (SILVA et al., 2003a).....	27
Tabela 3	Equações utilizadas para a análise da variância (CALLEGARI-JACQUES, 2003).....	34
Tabela 4	Constantes e parâmetros cinéticos da biodegradação de paclobutrazol.....	51

BIODEGRADAÇÃO DE PACLOBUTRAZOL EM DOIS SOLOS CULTIVADOS COM MANGA NO VALE DO SÃO FRANCISCO

Autor: Fernanda Leitão Vaz

Orientador: Prof. Dr. André Maciel Netto

Coorientador: Prof. Dra. Ester Ribeiro Gouveia

RESUMO

O paclobutrazol ([2RS,3RS]-1-(4-Clorofenil)-4,4-dimetil-2-(1H-1,2,4-tiazolil-1-pentanol-3)) é um regulador de crescimento vegetal, cujo modo de ação inclui a inibição da giberelina. Quando adicionado ao solo, sua mobilidade é relativamente baixa e, por isso, este composto se acumula ao solo. O objetivo deste trabalho foi investigar a degradação de paclobutrazol (PBZ) por uma cultura mista de *Pseudomonas* spp., isolada de um solo proveniente do vale do São Francisco, localizado no Nordeste do Brasil. Os experimentos de biodegradação foram realizados em batelada, sob condições estéreis e não-estéreis. O paclobutrazol na sua forma pura (Sigma) e na sua formulação comercial Cultar 250 SC (Syngenta), foi utilizado como única fonte de carbono e também adicionado de glicerol. Dois solos (Argissolo-Amarelo e Vertissolo) provenientes da região do Vale do São Francisco foram utilizados. Foi utilizada uma cultura mista de bactérias do gênero *Pseudomonas*, isoladas previamente por enriquecimento. O paclobutrazol foi utilizado nas concentrações de 10 e 25 mg/L e a concentração de paclobutrazol foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Três modelos matemáticos foram utilizados para avaliar a cinética de biodegradação do paclobutrazol obtida experimentalmente. Segundo a análise estatística (ANOVA), os resultados de biodegradação obtidos foram semelhantes, tanto para o Argissolo-Amarelo quanto para o Vertissolo bem como para os experimentos em condições estéreis e não-estéreis, e para o PBZ puro e o PBZ comercial. A biodegradação alcançou valor máximo de 43%, quando foi utilizado apenas PBZ como única fonte de carbono. Entretanto, quando o glicerol foi utilizado como fonte adicional de carbono, a biodegradação chegou a 70%, aproximadamente. Foram obtidos ótimos ajustes utilizando os modelos de dupla cinética

e logístico, pois a biodegradação do paclobutrazol segue visivelmente duas fases bem distintas, uma rápida e outra mais lenta. O tempo de meia-vida do PBZ obtido por meio da equação de dupla cinética foi de aproximadamente 55 dias quando ele foi utilizado na concentração de 10 mg/L, e de 170 dias quando foi utilizado na concentração de 20 mg/L. Em ambos os casos, o PBZ foi utilizado como única fonte de carbono. Quando o PBZ foi utilizado juntamente com o glicerol, o tempo de meia-vida caiu para aproximadamente 10 dias nas duas concentrações utilizadas.

Palavras-chave: Paclobutrazol, Biodegradação, *Pseudomonas*, Glicerol, Modelagem

BIODEGRADATION OF PACLOBUTRAZOL IN TWO SOILS CULTIVATED WITH MANGA IN SÃO FRANCISCO VALLEY

Author: Fernanda Leitão Vaz

Adviser: Prof. Dr. André Maciel Netto

Coadviser: Prof. Dra. Ester Ribeiro Gouveia

ABSTRACT

Paclobutrazol ([2RS, 3RS] -1 - (4-Chlorophenyl) -4,4-dimethyl-2-(1H-1, 2,4-tiazolil1) pentanol3) is a plant growth regulator, whose mode of action includes the inhibition of gibberellin. When applied to the soil, its mobility is relatively low, therefore this compound has accumulated in the soil. The aim of this study was to investigate the degradation of paclobutrazol (PBZ) by a mixed culture of *Pseudomonas* spp. isolated from a São Francisco soil valley, in the northeastern region of Brazil. The biodegradation experiments were conducted in batch mode under sterile and nonsterile conditions. Paclobutrazol was used in its pure form (Sigma) and its commercial formulation Cultar 250 SC (Syngenta). It was used as the sole carbon source and also with additions of glycerol. Two soil types (Argissolo-Amarelo and Vertissolo) from the region of the São Francisco were used. A mixed culture of bacteria of genus *Pseudomonas* isolated previously by enrichment was used in the tests. Paclobutrazol was used at concentrations of 10 and 25 mg/L and the concentration of paclobutrazol was determined by high performance liquid chromatography (HPLC). Three models were used to assess the biodegradation kinetics of paclobutrazol obtained experimentally. According to statistical analysis (ANOVA), the results of biodegradation were similar for both the Argissolo-Amarelo and Vertissolo as well as for the experiments in sterile and nonsterile conditions and for pure PBZ and commercial PBZ (Cultar). The biodegradation reached maximum value of 43% when PBZ was used as sole carbon source, however, when glycerol was used as an additional source of carbon biodegradation reached 70% approximately. Excellent fits were obtained using mathematical models of dual kinetics and logistics, as the biodegradation of paclobutrazol follows two clearly distinct phases, one fast and one slow. The half-life of PBZ obtained through the dual

kinetic equation was approximately 55 days when it was used at a concentration of 10 mg/L, 170 days when the concentration of 20 mg/L was used, both using only PBZ as carbon source. When PBZ was used together with glycerol the half-life decreased to approximately 10 days at the concentrations used.

Keywords: Paclobutrazol, Biodegradation, *Pseudomonas*, Glycerol, Modeling

1 INTRODUÇÃO

A agricultura moderna se vê agora confrontada com um problema muito complexo que é o de achar equilíbrio entre os benefícios da utilização de agroquímicos e a minimização do risco de contaminação de solos e de aquíferos causados por esses compostos.

O destino de um agroquímico a partir do seu ponto de aplicação, pela superfície do solo e dentro do subsolo, é governado por processos interativos de sorção, transformação e transporte. O entendimento da ciência que está por trás desses processos é uma das chaves para assegurar o seu uso ambientalmente correto. Também, é fundamental o desenvolvimento e a validação de modelos computacionais como ferramentas preditivas nas avaliações do impacto ambiental desses produtos (SILVA et al., 2003a).

É primordial a compreensão dos mecanismos envolvidos no destino de poluentes orgânicos e minerais, a fim de poder adaptar os itinerários agrônômicos, estudar o impacto a longo prazo desses produtos sobre o solo, prever os riscos de poluição e elaborar estratégias de biorremediação (HARVEY, 1997).

A maioria dos compostos orgânicos xenobióticos, tais como agroquímicos em geral, não se perpetua no ambiente, pois eles podem ser biodegradados pela ação de organismos vivos presentes na natureza (MARTINS, 1993). A degradação microbiana é considerada o mais importante processo que determina a persistência desses compostos no solo. Os micro-organismos, devido à sua capacidade degradadora, participam de forma significativa na eliminação ou redução acentuada dos níveis desses compostos empregados na agricultura (ARAÚJO et al., 2003). O termo biodegradação tem sido utilizado para a descrição de transformações de todos os tipos, incluindo aquelas que originam produtos menos tóxicos que o composto original, pela sua inativação, assim como aquelas responsáveis pela completa mineralização até CO_2 e H_2O (MUSUMECI, 1992). São cada vez mais frequentes os estudos baseados na adição de micro-organismos para degradar compostos agroquímicos, bem como a degradação total ou parcial desses compostos por populações microbianas naturais presentes em solos (UETA et al., 2002). Bactérias e fungos têm sido descritos como os principais degradadores, e a introdução destes compostos no solo pode servir de fonte de nutriente, principalmente como fonte de carbono, nitrogênio e fósforo (MONTEIRO, 2001).

O paclobutrazol ([2RS,3RS]-1-(4-Clorofenil)-4,4-dimetil-2-(1H-1,2,4-tiazolil-1-pentanol-3)), molécula xenobiótica, é um regulador do crescimento de plantas muito utilizado em culturas de manga, cujo modo de ação é a inibição da giberelina (JACKSON et al., 1996).

O Brasil é o terceiro maior exportador mundial de manga, após o México e a Índia, com cerca de 138 mil toneladas (FAO STATISTICS, 2005). Essa posição no ranking mundial se deve, principalmente, às ótimas condições ambientais da região, associadas a modernas tecnologias de produção, como o uso de fito-reguladores. O principal grupo de reguladores de crescimento atua inibindo a síntese da giberelina, hormônio responsável pelo crescimento da planta (FLETCHER et al., 2000).

O semiárido do Nordeste brasileiro permite a produção de manga em qualquer época do ano, inclusive em períodos em que a oferta do produto é escassa. Entretanto, em algumas épocas dessas, a utilização do paclobutrazol não tem apresentado respostas favoráveis à floração da mangueira, acarretando prejuízos para os produtores (SILVA et al., 2003a). Jackson et al. (1996) reportaram que o paclobutrazol permanece no solo por vários anos, e que isso pode afetar o crescimento e desenvolvimento de colheitas subseqüentes, principalmente pela redução do vigor vegetativo. A análise de contaminação de águas subterrâneas apresentou o paclobutrazol como um agrotóxico que possui baixa mobilidade no ambiente, sendo considerado um contaminante em potencial (SILVA et al., 2003a). Trabalhos recentes, realizados no vale do São Francisco, mostraram que o PBZ utilizado em pomares com manga irrigada em Argissolo-Amarelo e Vertissolo Háplico, oferece risco real de contaminação das águas subterrâneas da região (MILFONT et al., 2008).

Diante do exposto, o objetivo deste trabalho foi estudar aspectos biológicos envolvidos na biodegradação do paclobutrazol, com vistas a serem utilizados na otimização de biotecnologias de tratamento de resíduos. Os objetivos específicos foram:

1- Avaliar a biodegradação do paclobutrazol diante de diversos fatores; i) influência do tipo de solo, ii) impacto da concentração de PBZ, iii) competição com micro-organismos nativos, iv) influência da presença de uma fonte de carbono adicional, v) comparação entre duas fontes de PBZ.

2- Descrever e analisar a cinética de biodegradação do paclobutrazol por meio de modelos já estudados na literatura, e assim, obter um modelo que melhor represente os dados experimentais.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Uso de agroquímicos e impacto ambiental

Devido ao aumento da população e a crise de alimentos no mundo, o uso de agroquímicos tornou-se comum para o aumento da produção agrícola. Em função do uso intensivo de produtos químicos na agricultura moderna e da formação de grandes quantidades de resíduos, nos últimos anos tem havido uma maior preocupação em se conhecer o comportamento e destino desses compostos nos diversos ecossistemas (JAVOREKOVÁ et al., 2001).

Xenobióticos é a denominação dada aos compostos orgânicos produzidos por via de síntese química e que nunca estiveram presentes na natureza. São compostos químicos poluentes da biosfera, pois têm estruturas moleculares e sequências de ligações que não são reconhecidas pelas enzimas degradativas existentes na natureza e, portanto, resistem à biodegradação, ou não são completamente metabolizados, resultando em um acúmulo no ambiente (SILVA; FAY, 1997).

Compostos agroquímicos são xenobióticos utilizados na agricultura com a finalidade de controle fitossanitário, aumento da produtividade e garantia da produção de alimentos para a humanidade que se encontra em contínuo crescimento. Muitos desses produtos têm seu efeito nocivo ao meio ambiente, devendo ser recomendado de maneira criteriosa a fim de reduzir o risco de impacto ambiental (ARAÚJO, 2002). O impacto causado por esses compostos gera um conflito entre a necessidade de manter um nível de atividade de um xenobiótico no ambiente e o desejo de degradar esse composto químico para moléculas menos tóxicas e menos prejudiciais ao ambiente (BAKER; HERSON, 1994).

O Brasil é o maior mercado de agrotóxicos do mundo. O levantamento foi encomendado pela Associação Nacional de Defesa Vegetal (Andef), que representa os fabricantes, e mostra que essa indústria movimentou, no ano de 2008, US\$ 7,1 bilhões ante US\$ 6,6 bilhões do segundo colocado, os Estados Unidos (PACHECO, 2009).

A Figura 1 mostra um esquema dos vários caminhos de contaminação que um agrotóxico percorre. Além da contaminação ambiental, outro problema relacionado ao uso excessivo de agroquímicos é a contaminação de pessoas com o composto.

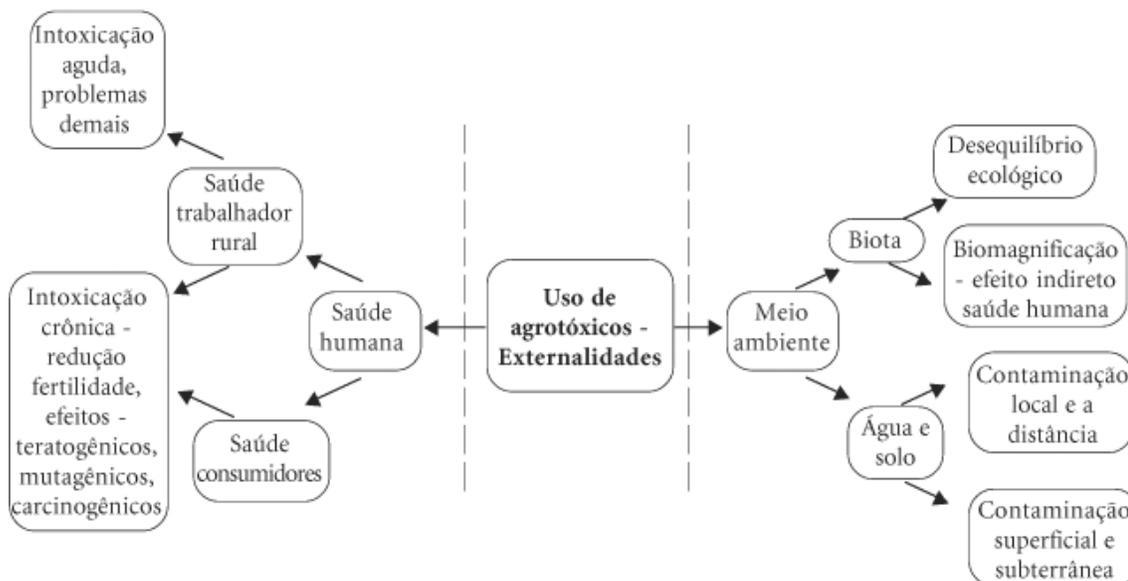


Figura 1 – Caminhos de contaminação que um agrotóxico pode percorrer (SOARES; PORTO, 2007).

Há um consenso de que o impacto ambiental de um xenobiótico depende de alguns critérios (SILVA et al., 2003b), entre eles destacam-se: quantidade do ingrediente ativo aplicado e local de aplicação; partição e concentração nos compartimentos ar, solo, águas superficiais e subterrâneas; taxa de degradação e toxicidade em cada compartimento.

A degradação do meio ambiente é principalmente percebida pela contaminação direta dos lençóis freáticos e da atmosfera, ou pelas suas consequências indiretas sobre o homem e os outros organismos vivos, via a cadeia alimentar. No entanto, a maioria dos poluentes transita pelos solos e é exatamente nesta zona não saturada que vai se condicionar a manifestação de seu caráter poluidor de águas subterrâneas (BARRIUSO et al., 1996). O solo intervém como um filtro bio-físico-químico (HILLEL, 1998) mais ou menos eficaz entre a superfície do solo, onde os produtos são aplicados, e o lençol freático, permitindo a eliminação do poluente por biodegradação ou biotransformação, ou ainda retardando seu efeito pela sorção sobre as partículas sólidas.

O solo é um sistema vivo e heterogêneo, sendo composto de muitas associações microbianas. Essas associações são sensíveis a modificações físicas e químicas, tais como: alteração no modo de cultivo e adição de substâncias biologicamente ativas que podem afetar o equilíbrio microbiano (ARAÚJO, 2002).

Estudos sobre os efeitos dos xenobióticos nos solos e nos organismos do solo são realizados, em sua maioria, a curto-prazo, após a aplicação de uma única dose do composto.

No entanto, no campo, um ou mais agroquímicos podem ser aplicados repetidamente no mesmo solo por muitos anos, o que pode levar a um aumento na concentração de resíduos desses xenobióticos ou de seus metabólitos. Desta forma, a possibilidade de efeitos danosos sobre a biomassa microbiana pode ser muito maior, podendo levar a um decréscimo nas populações microbianas, afetando assim a biodiversidade. Estes efeitos estão associados à sucessão ecológica de bactérias e fungos e à cadeia alimentar associada a estes organismos (SILVA et al., 2003b). A extensão e a duração destas modificações dependerão da intensidade e do tempo de exposição ao composto.

2.2 Persistência de xenobióticos

Quando aplicados às folhas, os compostos agroquímicos podem ser absorvidos pelas plantas e manifestar seu mecanismo de ação, o que é desejável, podem ser transformados, ou retidos e, caso nenhum desses processos ocorra, a molécula pode ser transportada para diferentes compartimentos do ambiente. A Figura 2 mostra, de forma esquemática, as diferentes rotas percorridas pelo composto orgânico.



Figura 2 – Esquemática do movimento de agroquímicos nos solos (RIBEIRO et al., 2007).

Alcançando o solo, parte da molécula pode sofrer volatilização, outra parcela pode escoar superficialmente e contaminar corpos d'água superficiais, em alguns casos, ser lixiviada e, conseqüentemente, contaminar os aquíferos. Durante o transporte, pode ficar

retida no solo, retardando ou até mesmo impedindo o seu movimento ao longo do perfil. Quando está na solução do solo, pode ficar sujeita à degradação química e/ou microbiológica, gerando metabólitos, algumas vezes até mais tóxicos que a molécula original e, em alguns casos, chegar até a mineralização. Devido à presença prolongada de muitas moléculas no solo, a retenção desempenha um papel preponderante no comportamento dos agroquímicos, bem como na segurança do ambiente (RIBEIRO et al., 2007). Portanto, é necessário conhecer bem o ambiente em que a molécula está inserida a fim de melhor compreender a sua dinâmica no meio, bem como os mecanismos envolvidos.

Xenobióticos podem ser classificados como persistentes caso a degradação, pelos micro-organismos nativos do solo, demore mais do que a degradação da maioria das substâncias naturais, que tem em média uma meia vida entre 14 e 21 dias (SILVA et al., 2003b).

Os adsorventes em solos que retêm os agroquímicos são a matéria orgânica, os argilominerais e os óxidos e hidróxidos, principalmente os de ferro e de alumínio pela sua abundância em solos tropicais. A intensidade do processo e a quantidade de agroquímico que será retido pelo solo dependem das características químicas e das propriedades das moléculas ou grupos funcionais dos agroquímicos (SILVA; FAY, 1997).

2.3 Biorremediação de solos

Implementar tecnologias de tratamento de áreas contaminadas por xenobióticos, utilizando micro-organismos nativos e/ou modificados, é uma tendência tecnológica de consenso em todo mundo e requer conhecimentos de várias áreas do saber: microbiologia, bioquímica, biologia molecular, química orgânica e analítica, engenharia. Estes estudos são de grande importância tanto industrial quanto ambiental, e tem por objetivo principal a busca do método ideal de uso e eliminação de agroquímicos na natureza. Por isso é fundamental o conhecimento mais detalhado de todo o comportamento do agroquímico no ambiente, suas interações com o solo e com os micro-organismos, bem como suas características básicas (SILVA; FAY, 1997).

Não existem, na biosfera atual, rotas enzimáticas catabólicas capazes de degradar todos os compostos sintetizados durante os últimos 100 anos. Embora tem-se um cenário de 3,5 bilhões de anos de evolução química e, segundo estimativas recentes, entre sete a vinte milhões de espécies vivas, o tipo de molécula e as rotas metabólicas destas espécies são

semelhantes entre si (BELLINASSO, 2002). O metabolismo atual da biosfera não difere drasticamente do metabolismo da biosfera de milhões de anos atrás, portanto, é de se esperar que as moléculas sintetizadas, que vêm sendo produzidas pela cultura humana, podem ser tóxicas e/ou persistentes ao ambiente.

A biorremediação vem sendo desenvolvida com o objetivo de explorar a diversidade genética e a versatilidade metabólica microbiana para a transformação de contaminantes em produtos menos tóxicos que possam ser integrados nos ciclos biogeoquímicos naturais. São cada vez mais frequentes os estudos baseados na adição de micro-organismos para degradar compostos químicos, bem como a degradação total ou parcial de pesticidas por populações microbianas naturais presentes em solos (UETA et al., 2002).

A degradação microbiana é considerada o mais importante processo que determina a persistência de pesticidas no solo. Os micro-organismos, devido à sua capacidade degradadora, participam de forma significativa na eliminação ou redução acentuada dos níveis desses compostos empregados na agricultura (ARAÚJO et al., 2003).

O metabolismo pode resultar na completa mineralização das moléculas orgânicas, isto é, sua conversão para CO₂, água, íons inorgânicos e energia, que é utilizada na biossíntese dos constituintes celulares. Em contrapartida, muitos micro-organismos são capazes de transformar parcialmente os compostos químicos em produtos sem produção de energia para o seu crescimento; este processo é denominado de cometabolismo e é um fenômeno celular típico. Pesquisas sobre estas transformações cometabólicas microbianas revelam que estes processos são normalmente atribuídos à atividade de enzimas não específicas do metabolismo periférico celular, capazes de modificar outras substâncias que não são seus substratos naturais (SILVA et al., 2003b).

Hoje se sabe que alguns compostos xenobióticos podem ser biodegradados por uma população e por isolados microbianos. Esta biodegradação, comumente, é mais provável quando a estrutura química do xenobiótico é semelhante à estrutura das moléculas naturais (ALEXANDER, 1997). Algumas vezes, as enzimas que catabolizam a degradação desses compostos naturais apresentam baixa especificidade pelo seu substrato, possibilitando que xenobióticos com estruturas químicas semelhantes aos compostos naturais também sejam catabolizados. Realmente, vários trabalhos relatam a biodegradação até CO₂ e H₂O de compostos derivados do benzeno (WHYTE et al., 1997; MARTINS; MERMOUD, 1998; SILVA; FAY, 1997; PAMUKOGLU; KARGI, 2008).

O isolamento e a seleção de linhagens microbianas capazes de degradar xenobióticos em geral, a partir de solos, têm sido realizado na busca de micro-organismos adaptados ao

ambiente onde vai ser empregado e com potencial poder de degradação da substância de interesse. Uma vez que micro-organismos presentes nos solos são capazes de degradar e mineralizar xenobióticos, pode-se desenvolver a biorremediação de sítios contaminados empregando-se micro-organismos selecionados (UETA et al., 2002).

No Brasil, o uso de bactérias e fungos para biorremediar áreas contaminadas é uma atitude recente. Uma das poucas instituições que pesquisam nessa área é a Embrapa Meio Ambiente, localizada em Jaguariúna (SP). Presentes no solo, as bactérias se alimentam dos pesticidas que vão se depositando. Multiplicadas em laboratório e devolvidas à terra sob a forma de grânulos compostos de argila e alginato (polímero usado para dar liga na mistura), as bactérias aceleram o processo natural de biodegradação. O diuron é um exemplo de herbicida que pode ter sua vida útil reduzida com a aplicação de bactéria. Usado no controle de plantas daninhas nas culturas de citros, cana-de-açúcar e milho, o diuron, pelos métodos naturais demora em média 90 dias para se degradar, porém em solo tratado, esse tempo de biodegradação é reduzido pela metade. Outros herbicidas como o propanil, usado no cultivo do arroz e a atrazina, no cultivo de diversas culturas, também têm sua vida útil reduzida pela aplicação de micro-organismos ao solo (MELO, 2006).

As bactérias se destacam por apresentarem uma ampla diversidade metabólica como, por exemplo, o gênero *Pseudomonas*, capaz de metabolizar mais de 90 diferentes compostos orgânicos como única fonte de carbono e energia (BAKER; HERSON, 1994). Registros mais recentes na literatura indicam que esse gênero é capaz de degradar hidrocarbonetos (GHAZALI et al., 2004), 2,4-diclorofenol (KARGI; EKER, 2005), naftaleno (LEE et al., 2003) e organofosfatos (FOSTER et al., 2004), além do próprio paclobutrazol (VAZ, 2006; JACKSON et al., 1996).

Alguns autores também verificaram a participação de *Pseudomonas* em vias metabólicas de degradação de compostos similares ao paclobutrazol, como cloro-benzeno (MCLEISH; ESSENBERG, 2004) e atrazina (STEPHENS; KOTHARU, 2002 a e b; SMITH et al., 2005). Em trabalhos sobre a biodegradação de paclobutrazol, alguns autores obtiveram oito isolados de *Pseudomonas*, dentre os nove com capacidade de biodegradação. Os mesmos encontraram que um dos isolados de *Pseudomonas* foi capaz de degradar o anel cloro fenil, mas não o anel 1,2,4 triazol do paclobutrazol (JACKSON et al., 1996).

2.3.1 Biodegradação em solo

Em geral, experimentos para estudos sobre a biodegradação são iniciados com ensaios em condições saturadas (com todos os poros do solo preenchido com água) utilizando bactérias nativas do solo. Esses experimentos são realizados em frascos contendo solo saturado com uma solução contendo o xenobiótico a ser degradado. Alguns trabalhos fazem o uso desses experimentos na biodegradação de diferentes compostos. Moreels et al. (2004) utilizaram experimentos em batelada na degradação de éter metil *terc*-butílico (MTBE) por bactérias nativas. Pamukoglu; Kargi (2008) utilizaram ensaios em batelada para estudar a cinética de degradação do 2,4,6-triclorofenol por *Rhodococcus rhodochrous*, e ainda, Besse-Hoggan et al. (2009) utilizaram essa metodologia para a biodegradação de atrazina por *Pseudomonas* sp..

Experimentos em batelada permitem verificar o potencial de biodegradação de agroquímicos sob diferentes condições para a sua futura aplicação no solo. Podem ser verificados diversos fatores que interferem na biodegradação ou na persistência de um composto químico. Fatores de natureza biológica ou físico-química podem interferir fortemente na biodegradação.

2.3.2 Fatores que afetam a biodegradação de agroquímicos

2.3.2.1 Solo

Diversos fatores físicos podem influenciar na biodegradação de xenobióticos, principalmente as condições do solo como: umidade, temperatura, pH e matéria orgânica (KARPOUZAS; WALKER, 2000; SINGH et al., 2003). Em trabalho com a degradação de etoprofos, um nematicida, Karpouzas; Walker (2000) verificaram que uma linhagem de *Pseudomonas putida* degradou o composto mais efetivamente em solos com potenciais de água de -33 e -10 kPa, com temperaturas de 20 °C e 35 °C, com pH 6,8 ou 8,3, e com matéria orgânica entre 0,3 e 8,5 %.

Os agroquímicos podem estar presentes de formas distintas nos solos, dissolvidos na solução do solo, vaporizados no ar do solo, adsorvidos ou oclusos nas partículas minerais e orgânicas, fatores estes que também podem dificultar o processo de biodegradação (MONTEIRO, 1997). O grau de associação de poluentes orgânicos e inorgânicos no solo é governado por interações físico-químicas complexas (CHRISTOFI; IVSHINA, 2002).

Tanto a textura como a estrutura do solo influenciam diretamente o comportamento dos agroquímicos. A distribuição dos tamanhos dos poros influi particularmente nos processos de transferência envolvendo a difusão dos agroquímicos em microporos (MARTINS, 1993), porém, a sua composição mineralógica, e o teor e o tipo da matéria orgânica, desempenham papel preponderante no processo de interação solo-agroquímico.

Na matéria orgânica, os grupos funcionais ácidos fúlvicos e ácidos húmicos são os grandes responsáveis pela troca catiônica no solo e a sua capacidade de sorção não deve de forma alguma ser desprezada (CALVET, 1988; MARTINS, 1993). A presença de certo teor de matéria orgânica pode provocar interações do tipo hidrofóbicas (partição entre duas fases).

O excesso de sal pode provocar aumento ou diminuição da solubilidade de agroquímicos. Por exemplo, as moléculas neutras ou levemente básicas, como é o caso das triazinas (GREEN; KARICKHOFF, 1990) podem ter sua solubilidade diminuída, ao passo que as levemente ácidas podem ter sua solubilidade aumentada, como por exemplo, o picloram (CALVET et al., 1980) ou o pentaclorofenol (MARTINS, 1993). Esses efeitos são geralmente explicados devido às variações de forças eletrostáticas na solução (SPOSITO, 1989).

2.3.2.2 Molécula xenobiótica

A rigor, define-se como xenobiótico qualquer substância química estranha ao sistema biológico humano originado externa ou internamente a ele (TEIXEIRA, 2009). Compostos agroquímicos são xenobióticos utilizados na agricultura com finalidade de controle fitossanitário, aumento da produtividade e garantia da produção de alimentos para a humanidade que se encontra em contínuo crescimento. Muitos desses produtos têm seu efeito nocivo ao meio ambiente, devendo ser recomendado ou aplicado de maneira criteriosa a fim de reduzir o risco de impacto ambiental (ARAÚJO, 2002).

Existem várias razões que tornam um composto xenobiótico recalcitrante à biodegradação, como: substituições incomuns com cloro ou outro halogênio, ligações incomuns ou seqüências de ligações em átomos de carbono terciários e quaternários, anéis aromáticos altamente condensados e moléculas de altíssimo peso molecular. Outras razões mais sutis podem ser: incapacidade do composto induzir a síntese de enzimas degradadoras, impossibilidade do composto penetrar nas células microbianas por falta de permeases adequadas, indisponibilidade do composto devido à insolubilidade ou adsorção, e toxicidade excessiva do composto parental ou de seus produtos metabólicos (SILVA; FAY, 1997).

2.3.2.3 Interações entre os micro-organismos

Além de fatores físicos, também existem os fatores biológicos como competição entre os micro-organismos nativos por substratos, antagonismo e predação (KARPOUZAS; WALKER, 2000).

A biodegradação de compostos complexos requer freqüentemente a cooperação de mais de uma espécie microbiana. Culturas puras podem metabolizar somente uma faixa limitada de substratos, assim, a formação de populações mistas com ampla capacidade enzimática é necessária (ALEXANDER, 1997).

Os membros de uma comunidade microbiana têm papéis significantes e podem depender da presença de outras espécies para sobreviver quando a fonte de energia é limitada e confinada a carbonos complexos. As vantagens de uma cultura mista podem ser atribuídas a efeitos de sinergismo entre os membros da associação. O mecanismo é complexo, sendo possível que uma espécie remova os metabólitos tóxicos de outras espécies precedentes. Isto também possibilita a degradação de compostos que a primeira degradou apenas parcialmente, por uma segunda espécie (GHAZALI et al., 2004). Porém, se os organismos envolvidos na cultura mista não fazem parte de uma mesma associação adaptativa, a cultura pode não ser estável, havendo assim a predominância de um ou mais organismos (CALDWELL et al., 1997).

2.3.2.4 Fonte de carbono adicional

As fontes de carbono presentes também podem influenciar na biodegradação. A presença de fontes adicionais pode aumentar ou diminuir a biodegradação de xenobióticos (SINGH et al., 2003; SCHMIDT et al., 1987).

Há diversos exemplos em que os contaminantes orgânicos podem não estar em quantidades suficientes, ou disponíveis para a biodegradação pelos micro-organismos presentes. Se a concentração do composto estiver abaixo de um determinado nível inicial, necessário para fornecer as exigências de fontes de carbono e energia aos micro-organismos, a degradação pode não ocorrer. Alternativamente, se a concentração do composto exceder um determinado nível, problemas de toxicidade podem ocorrer. Finalmente, pode não ser possível a degradação direta do composto, portanto, a degradação através de um processo cometabólico pode ser necessária. Geralmente, a utilização simultânea de diferentes fontes de

carbono favorece o crescimento microbiano numa situação de limitação de carbono (BAKER, 1994).

Além disso, a presença de um repressor catabólico, ou seja, de uma fonte de carbono que reprime a expressão de certos genes e óperons, que são responsáveis pela utilização de fontes alternativas de carbono, pode resultar numa baixa ou nenhuma taxa de biodegradação, havendo apenas o consumo da fonte de carbono preferencial (BRÜCKNER; TITGEMEYER, 2002).

Por outro lado, em inúmeros trabalhos sobre biodegradação, diferentes autores verificaram o benefício de uma fonte de carbono adicional. LaPat-Polasko et al. (1984) encontraram que a degradação de cloreto de metileno por uma linhagem de *Pseudomonas* sp. foi mais rápida quando o acetato estava presente do que quando foi utilizado apenas cloreto de metileno como única fonte de carbono. Schmidt et al. (1987) verificaram que a presença de glicose como substrato secundário aumentou a taxa de degradação de p-nitrofenol por *Pseudomonas*. Além disso, eles verificaram que nem todos os substratos adicionados estimularam a degradação de p-nitrofenol, como a adição de fenol que inibiu a degradação.

Em outros trabalhos, Lee et al. (2003) observaram que o piruvato pode ser usado como fonte adicional de carbono para estimular o crescimento e a degradação de hidrocarbonetos polinucleares aromáticos (HPAs) por *Pseudomonas putida* G7. Figueiredo et al. (2004) e Gondim et al. (2004) verificaram que *Pseudomonas aeruginosa* BB2-572, uma bactéria isolada de poço de petróleo, aumentou significativamente a degradação do paclobutrazol quando, além deste composto, os meios continham glicerol como fonte de carbono adicional. Vaz (2006), em estudos com bactérias isoladas do solo, verificou a degradação de 75 % do paclobutrazol quando foi adicionado glicerol, contra apenas 47 % de biodegradação sem a adição de glicerol. Em contrapartida, este mesmo autor verificou que quando a glicose foi a fonte adicional de carbono, não houve biodegradação de PBZ, indicando que a glicose agiu como um repressor catabólico.

Em trabalhos mais recentes, Passos et al. (2009) observaram uma diminuição de 62 horas na biodegradação de fenol por *Aspergillus* sp. quando havia presença de glicose no meio, neste caso a glicose não agiu como repressor catabólico. Ho et al. (2009) utilizaram o acetato como fonte de carbono secundária na degradação de fenol, verificando uma maior eficiência da biodegradação do composto citado.

2.3.3 Modelos que descrevem a biodegradação

Os modelos matemáticos podem contribuir para prevenir altos níveis de substâncias tóxicas nos solos, ou nos frutos de plantas tratadas com agroquímicos e indicam que tais substâncias devem ser sistematicamente monitoradas. Os modelos matemáticos são descritos para diversas finalidades na agricultura, dentre elas, para simular a absorção de substâncias orgânicas pelas plantas (FUGISAWA et al., 2002; TRAPP et al., 2003), bem como o seu comportamento no solo (GANG et al., 2003; MILFONT et al., 2008).

A determinação de modelos matemáticos que descrevam o processo de cinética de degradação fornece dados necessários para estudar os efeitos negativos de um produto químico em um ecossistema.

Modelo cinético de primeira ordem tem sido largamente utilizado para descrever a cinética de dissipação naturalmente de vários herbicidas no solo tanto em condições de campo, como no laboratório (MARTIN; MERMOUD, 1998; RIGITANO et al., 2001; SCORZA JÚNIOR; RIGITANO, 2009; LÓPEZ-GALINDO et al., 2010).

Um modelo de degradação de primeira ordem é muitas vezes usado para simular a diminuição da massa residual de um composto químico em um sistema solo após a sua aplicação (DYKAAR; KITANIDIS, 1996). Se a constante de velocidade de primeira ordem for constante ou o tempo de meia-vida permanecer inalterado no processo de degradação, a massa residual da degradação química diminuirá exponencialmente com o tempo (WALKER, 1974).

O modelo de cinética de primeira ordem é descrito pela equação 1:

$$\frac{dC}{dt} = -k_1 C \quad (1)$$

Na qual, k_1 é a constante de velocidade de degradação de primeira ordem ($1/t$) e C é a concentração do composto no tempo t e é expressa em g/L. O modelo de primeira ordem tem como solução analítica a expressão obtida na equação 2:

$$C(t) = C_0 e^{-k_1 t} \quad (2)$$

Na qual, C_0 é a concentração inicial do composto.

No entanto, o uso dessa equação para a modelagem da taxa de transformação de poluentes implica que um único sistema microbiano ou enzimático esteja envolvido (com somente uma via de degradação) e que a taxa de degradação não é afetada pela toxicidade do poluente ou a adaptação microbiana (a taxa de degradação máxima não varia durante o processo) (MARTINS; MERMOUD, 1998).

Para muitos compostos complexos, a cinética de primeira ordem não é adequada, pois a biodegradação desses compostos pode ocorrer com velocidades diferentes ao longo do processo. Nesse caso, resultados utilizando modelos de dupla cinética de primeira ordem têm tido bons ajustes, principalmente quando a biodegradação ocorre primeiramente numa reação mais rápida (equação 3) e depois segue uma degradação com uma taxa mais lenta (equação 4) (GANG et al., 2003; LÓPES-GALINDO et al., 2010).

$$\frac{dC_R}{dt} = -k_R C \quad (3)$$

$$\frac{dC_L}{dt} = -k_L C \quad (4)$$

As equações 3 e 4, quando somadas, têm como solução analítica a equação 5, a qual descreve um modelo de dupla cinética de primeira ordem:

$$C(t) = C_0 \{ f \cdot e^{-k_R t} + (1 - f) \cdot e^{-k_L t} \} \quad (5)$$

Na qual $C(t)$ é a concentração do composto no tempo t em (g/L); C_0 é a concentração inicial do composto; f é a fração do composto biodegradado atribuído a reação rápida; k_R é a constante de velocidade de primeira ordem da reação rápida (1/t); $(1-f)$ representa a fração do composto biodegradado atribuído a reação lenta; e k_L é a constante de velocidade de primeira ordem da reação lenta (1/t).

Outros estudos têm revelado a ampla aplicação da equação logística quadrática (ELQ) em diversas áreas ambientais, tais como: na ecologia (principalmente na descrição de processos de crescimento populacional), em relações presa-predador, em interações competitivas, no gerenciamento de fontes renováveis, na evolução da resistência a pesticidas, no controle ecológico de pestes (EDELSTEIN-KESHET, 1988), e recentemente, dados sobre

a degradação de hipoclorito de sódio foram melhor ajustados utilizando também a equação logística (Equação 6) (LÓPES-GALINDO et al., 2010).

$$\frac{dC}{dt} = kC \left(1 - \frac{C}{K} \right) \quad (6)$$

A solução analítica da equação logística (equação 6) é dada por:

$$C(t) = \frac{C_0 K e^{kt}}{K + C_0 (e^{kt} - 1)} \quad (7)$$

Na qual, K representa a concentração final assintótica, ou seja, é a concentração em que a biodegradação do PBZ se estabiliza e este não é mais degradado, enquanto k é um pseudo-coeficiente de primeira ordem e por isso está relacionado com a taxa de degradação ($1/t$).

2.4 Paclobutrazol (PBZ)

Paclobutrazol (PBZ), [2RS, 3RS]-1-[4-clorofenil]-4,4-dimetil-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)pentan-3-ol] (Figura 3), é um composto regulador de crescimento vegetal utilizado em sistemas agrícolas com o propósito de controlar o crescimento vegetativo, aumentando a capacidade reprodutiva da planta. O grau de resposta no crescimento e floração varia com o método de aplicação do produto e com a concentração utilizada (SILVA; FAY, 1997).

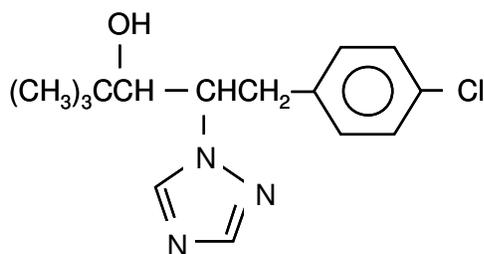


Figura 3 – Fórmula estrutural da molécula de Paclobutrazol.

Muitos estudos são desenvolvidos utilizando o PBZ numa ampla diversidade de culturas vegetais, tendo destaque a cultura de manga na Índia (SHARMA; AWASTHI, 2005; SINGH; BHATTACHERJEE, 2005). No Brasil, principalmente nos estados do Nordeste, muitos estudos também estão sendo realizados em cultivares de manga, em Mossoró-RN (MENDONÇA et al., 2001), na Bahia (MOUCO; ALBUQUERQUE, 2005) e em Petrolina (FONSECA et al., 2005). Na região Sudeste, em Jaboticabal-SP (SANTOS et al., 2004), e Viçosa-MG (SIQUEIRA et al., 2004), foram realizados estudos com Citrus e em Palma-MG, com morangueiro (DUARTE FILHO et al., 2004).

O primeiro efeito do PBZ é a paralisação do crescimento da planta, que afeta os fluxos vegetativos novos, reduzindo a extensão dos ramos. Esse efeito inibidor do PBZ sobre o crescimento varia em função do cultivar. Outro efeito do uso do PBZ é a antecipação do florescimento que, em alguns casos, quanto maior a dose usada, maior é a precocidade do florescimento comparada com plantas que não receberam o produto (FONSECA et al., 2005).

O paclobutrazol pode ser aplicado nas folhas ou diretamente no solo. É absorvido passivamente pelas raízes, caule e folhas e tem movimento acropétalo dentro da planta, movendo-se pelo xilema para folhas e brotos (SILVA et al., 2003a). A forma de aplicação mais eficiente é feita pela diluição do produto em um ou dois litros de água, que depois é despejado junto ao caule da planta ou na projeção da copa. É importante que essa área seja irrigada logo após a aplicação, pois é a água que conduz o produto até as raízes, para ser absorvido pelas plantas. O PBZ deve ser aplicado depois da emissão de, pelo menos, dois fluxos vegetativos, após a poda pós-colheita.

O composto ativo alcança os meristemas subapicais da planta inibindo a oxidação do kaureno para ácido kaurenóico, o qual é precursor do ácido giberélico. O resultado é a redução da divisão celular sem ocasionar citotoxicidade e a consequência morfológica direta é a redução do vigor vegetativo (SILVA et al., 2003c).

No Vale do São Francisco, na região do Semiárido do Nordeste do Brasil, está situado um dos mais importantes pólos brasileiros de agricultura irrigada, tendo a cultura da manga expressiva representatividade na pauta de exportação de frutos. Fazem parte do perímetro irrigado do São Francisco: o Pólo de Mandacaru, em Juazeiro-BA e o Pólo de Bebedouro, em Petrolina-PE, com área total de aproximadamente 45.000 ha. Ambos os pólos são grandes produtores de manga para exportação. De forma a suprir a demanda do fruto para a exportação, o paclobutrazol é o fito-regulador mais usado para a indução floral, garantindo a produção de frutos durante todo o ano. Esse composto é utilizado na cultura da manga para o controle do crescimento, redução da poda e manipulação do cultivo para a expansão da

produção (SILVA et al., 2003c). O paclobutrazol é geralmente aplicado anualmente no solo, na zona das raízes, ou no dossel arbóreo, porém a aplicação no solo tem apresentado melhor eficiência (SINGH, 2000). Apesar da vantagem associada à produtividade, esse regulador de crescimento permanece ativo no solo por muitos anos, podendo afetar severamente o crescimento e o desenvolvimento dos cultivos subseqüentes pela redução do vigor vegetativo (ATTYIA et al., 1983; HAMPTON, 1988).

Infelizmente, segundo dados da Embrapa Meio Ambiente (2004), para compensar perdas que ocorrem durante as aplicações, as dosagens de agroquímicos são exageradas. Em 1996, a Embrapa Meio Ambiente realizou ensaio de campo com pulverização aérea de herbicidas, comprovando que cerca de 47% dos produtos não atinge o alvo. O resultado disso é altos teores de resíduos na água e no solo, além de resistência biológica a essas substâncias. Especula-se que a superdosagem do paclobutrazol seja uma das causas da redução da floração da mangueira em algumas épocas do ano, acarretando prejuízos para os produtores; outro fator preocupante é o acúmulo de paclobutrazol no solo, tornando a região vulnerável à contaminação.

Segundo a EMBRAPA Semiárido, uma das decisões mais difíceis quanto ao uso do PBZ é a determinação da dosagem a aplicar. Em trabalhos experimentais são mencionadas doses sem especificar tamanho e condições de vigor das plantas, tipos de solo e irrigação, sendo recomendada a dose de um grama por metro linear de diâmetro de copa. Entretanto, o que se verifica é que esta recomendação embora se ajuste para plantas entre 3 e 5 m de diâmetro da copa, fica excessiva para plantas de diâmetro inferior e insuficiente para plantas maiores. Estudos têm demonstrado que, em algumas épocas do ano, a utilização do paclobutrazol não tem apresentado respostas favoráveis à floração da mangueira, acarretando prejuízos para os produtores (SILVA et al., 2003a).

Estudo recente, sobre o risco de contaminação das águas superficiais e subterrâneas da região do submédio do São Francisco, constatou a presença do paclobutrazol em águas subterrâneas, destacando essa substância como um contaminante em potencial para a região (FERRACINI et al., 2001; EMBRAPA MEIO AMBIENTE, 2004). Apesar da grande quantidade de paclobutrazol que é aplicada às culturas e do risco de contaminação dos aquíferos associados a essa molécula, seu destino no solo ainda não está claro e é pobremente documentado. Em particular, o conhecimento da capacidade desse produto de interagir com a fase sólida e a sua mobilidade em solos naturais, sobretudo os solos do Semiárido, é incipiente.

Estudos têm demonstrado que este composto permanece ativo no solo por muito tempo e que sua meia-vida varia com o tipo de solo e as condições climáticas. Na Índia, Sharma; Awasthi (2005) verificaram que mangueiras tratadas com paclobutrazol por três anos consecutivos, nas concentrações de 5 a 10 g de ingrediente ativo por árvore, não apresentaram resíduos de PBZ nos frutos maduros, porém, foi verificado um aumento progressivo das concentrações de PBZ no solo, indicando caráter cumulativo. O mesmo acúmulo no solo foi observado por Singh; Bhattacharjee (2005). Na cultura do morango, foi observado que os resíduos de paclobutrazol permaneciam ativos no solo por, pelo menos, onze meses após a última aplicação do produto (McARTHUR; EATON, 1987).

A figura 4 mostra um exemplo da redução do vigor vegetativo nas mangueiras tratadas com excesso de paclobutrazol. As duas plantas, apontadas com a seta em amarelo, possuem a mesma idade das outras mangueiras mostradas na figura, no entanto, os seus tamanhos são bem menores que as das outras.



Figura 4 – Aspecto da redução do vigor vegetativo após aplicação de paclobutrazol em excesso. Destaque para a mangueiras apontadas pela seta que possuem a mesma idade das outras mangueiras da foto.

Na água, a meia-vida do paclobutrazol é de 24 dias, enquanto que no solo não foi detectada dissipação até a amostragem aos 168 dias após a aplicação do produto. Corpos de

água superficial nas regiões próximas as culturas frutíferas são, portanto, suscetíveis à contaminação pelo paclobutrazol com o risco de promover efeitos adversos em organismos que habitam estes ambientes (JONSSON et al., 2002).

O paclobutrazol pode ser lixiviado em solos arenosos com baixo teor de matéria orgânica (COSTA et al., 2008) e não é fotodegradado após exposição à luz do sol por 10 dias. Trabalhos têm comprovado que ele é degradado aerobicamente no solo por um tempo de meia-vida em torno de 1-7 meses, dependendo do tipo de solo, e não se espera que sofra hidrólise quando depositado no meio ambiente (SILVA et al., 2003a).

Na falta de parâmetros experimentais, em geral, considera-se o tempo de meia-vida do paclobutrazol, no solo, em torno de 200 dias. O coeficiente de partição do paclobutrazol no carbono orgânico K_{OC} é em torno de 400 mL/g (VOGUE et al., 1994). Segundo Goss (1992), em solos orgânicos raramente ocorre perda de agroquímico por “escoamento superficial” e lixiviação, e agroquímicos com K_{OC} acima de 300 mL/g são fortemente sorvidos pela matéria orgânica.

A solubilidade do paclobutrazol em água é de 35 mg/L a 25° C. O produto tem alto potencial para ser lixiviado em solos com baixo teor de matéria orgânica e é levemente volátil (SILVA et al., 2003a).

A persistência também pode influenciar na atividade microbiana do solo. Silva et al. (2003c), em contagem de micro-organismos de amostra de solo onde o PBZ era aplicado frequentemente, mostraram uma redução de 58 % do total de micro-organismos no solo.

O paclobutrazol apresenta propriedades fungicidas. Jacobs; Berg (2000) verificaram o efeito inibidor deste composto sobre diversos fungos patogênicos da madeira, como: *Armillaria*, *Botryosphaeria*, *Ceratocystis*, *Fusarium*, *Ophiostoma*, *Sirococcus*, *Sphaeropsis* e *Verticilium*. Burpee (1998) estudou sua atividade contra o fungo *Rhizoctonia solani*. Também foi descrito como sendo inibidor do crescimento fúngico por Jackson et al. (1996), uma vez que é estruturalmente similar aos fungicidas do grupo triazol.

O paclobutrazol pode ser facilmente absorvido pelos organismos, pois possui baixa solubilidade em água e alta afinidade por gorduras. Quando essa absorção excede a velocidade de eliminação, ocorre seu acúmulo, isto é, a bioconcentração do composto (SPACIE; HAMELINK, 1985). Esse fenômeno é de grande importância, tanto na manifestação dos efeitos subletais de agroquímicos em organismos não-alvo, quanto na prevenção de contaminação de fontes protéicas de consumo humano (KANAZAWA, 1981).

Vergieva (1998) testou a exposição ao paclobutrazol em ratas Wistar nas concentrações de 50, 200 e 500 mg/kg, observando algumas más-formações fetais em decorrência da exposição única, principalmente na maior dose (500 mg/kg), não sendo observadas, porém, quaisquer alterações na dose de 50 mg/kg.

Um estudo realizado por Nielsen; Andersen (2001) permitiu avaliar a absorção pela pele humana, de três agroquímicos: methiocarb, pirimicarb e paclobutrazol, admitindo o uso e não-uso de luvas. Os autores observaram que o paclobutrazol foi mais rapidamente absorvido pela pele e essa absorção aumenta com o tempo de exposição e concentração do agroquímico, e que as luvas de nitrilo são as que mais protegem a pele no caso de contato prolongado.

Segundo Worthing; Hance (1994), o valor estimado da ingestão diária aceitável (IDA) para o paclobutrazol é de 0,1 mg/kg de peso corpóreo. A concentração máxima permitida do ingrediente ativo em corpos de água, para evitar efeitos adversos quanto ao consumo do peixe, seria equivalente a 0,2 mg/L. Este valor foi estimado considerando-se o peso de um indivíduo adulto de 70 kg que consumiria diariamente 500 g do peixe, sendo que essa concentração na água seria atingida pela aplicação direta da dose máxima recomendada do paclobutrazol (3,0 kg/ha de ingrediente ativo) sobre uma lâmina de água de 150 cm.

2.4.1 – Possíveis vias de biodegradação de paclobutrazol

Não se conhece muito a respeito do composto paclobutrazol e, portanto, as vias de metabolização deste composto ainda são desvendadas. No entanto, como na degradação de compostos conhecidos, pertencentes aos mesmos grupos funcionais contidos na molécula de paclobutrazol (cloro-benzeno e triazol), pode-se presumir que a via de degradação utilizada seja semelhante.

A Figura 5 apresenta a via utilizada por *Pseudomonas* spp. P51, JS150, RHO1, JS6 para a degradação do cloro-benzeno a 3-oxoadipato, e este último é um intermediário no metabolismo da fenilalanina, aminoácido formado a partir da via glicolítica (McLEISH; ESSENBERG, 2004).

As Figuras 6 e 7 apresentam três vias diferentes, utilizadas por vários micro-organismos para a degradação da atrazina a ácido cianúrico. Na Figura 6, os micro-organismos *Pseudomonas* sp. ADP, *Ralstonia* sp. M91-3, *Clavibacter* sp., *Agrobacterium* sp. J14a e *Alcaligenes* sp. SG1 degradam o composto triazol a ácido cianúrico, que entra no ciclo do ácido cianúrico onde se vai obter CO₂, H₂O e NH₃ como produtos finais (STEPHENS; KOTHARU, 2002a). Na Figura 7, é mostrada uma via metabólica utilizada por *Rhodococcus*

spp. NI86/21, *Pseudomonas* spp. 192, 194 e *Streptomyces* sp. PS1/5 e *Nocardia* sp. também utilizada para a degradação da atrazina, e essa via pode seguir duas rotas metabólicas diferentes. Uma dessas rotas, leva a produção de ácido cianúrico, por enzimas diferentes da via mostrada na Figura 6, porém esta também entra na via do ácido cianúrico como no processo anterior. O outro caminho leva a formação de 2-Cloro-4hidroxi-6-amino-1,3,5-triazina, como produto final (STEPHENS; KOTHARU, 2002b).

Smith et al. (2005) verificaram experimentalmente que a degradação da atrazina por *Nocardia* sp. e *Rhizobium* sp. seguiu a via de degradação mostrada na Figura 2.10, levando à formação de ácido cianúrico.

As vias de degradação dos dois grupos funcionais mais complexos, que formam o paclobutrazol, mostram que o gênero *Pseudomonas* participa ativamente de várias etapas, despertando interesse na investigação sobre a degradação de paclobutrazol utilizando-se este gênero bacteriano.

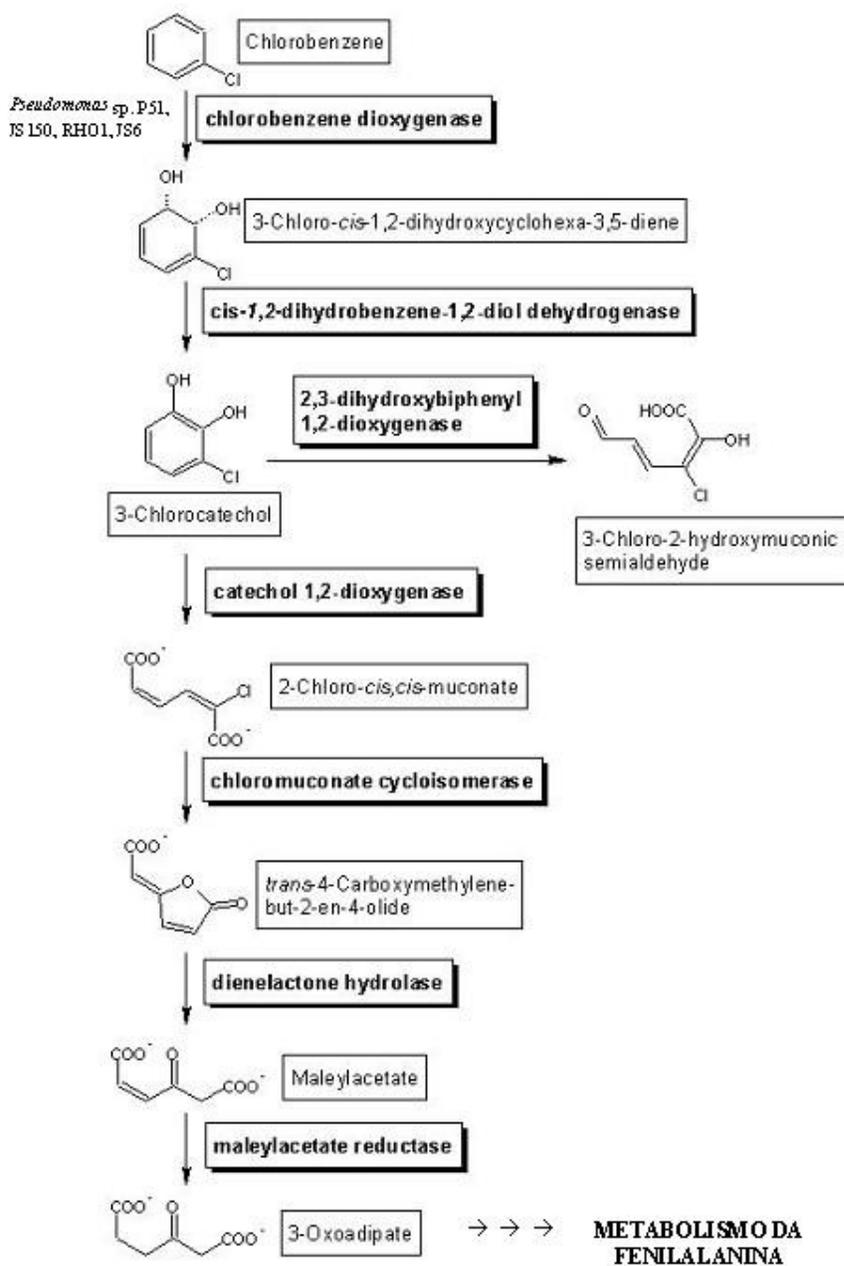


Figura 5 –Via metabólica de degradação do cloro-benzeno com *Pseudomonas* sp. P51, JS150, RHO1, JS6 (McLEISH; ESSENBERG, 2004).

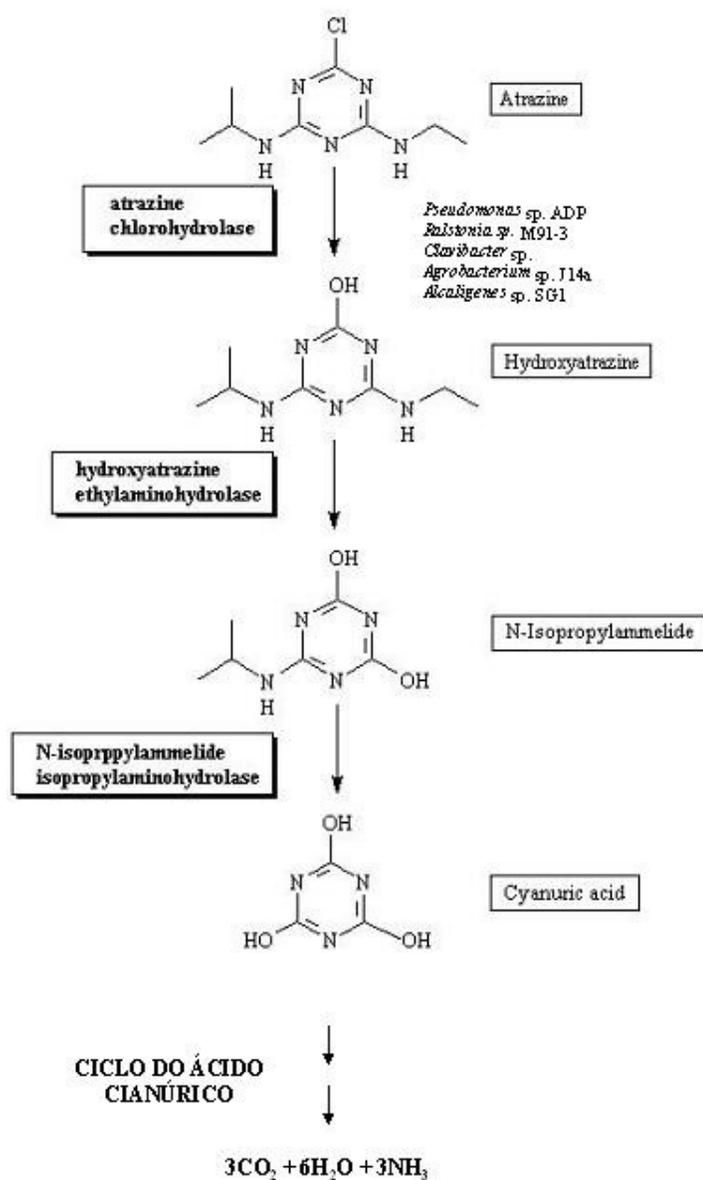


Figura 6 –Via metabólica de degradação da atrazina com *Pseudomonas* sp. ADP, *Ralstonia* sp. M91-3, *Clavibacter* sp., *Agrobacterium* sp. J14a, *Alcaligenes* sp. SG1 (STEPHENS; KOTHARU, 2002a).

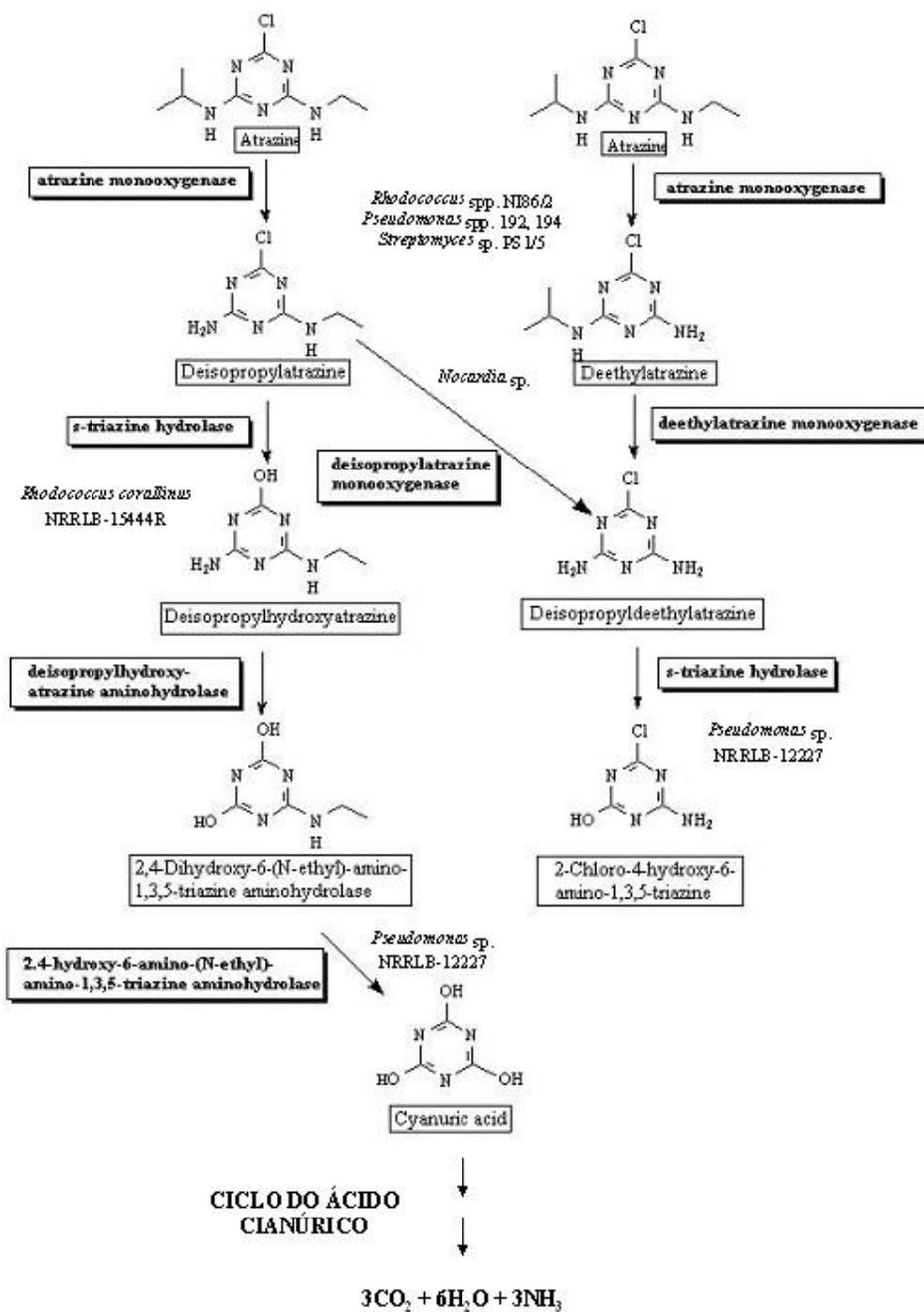


Figura 7 – Via metabólica de degradação da atrazina com *Rhodococcus* spp. NI86/2, *Pseudomonas* spp. 192, 194, *Streptomyces* sp. PS1/5 e *Nocardia* sp. (STEPHENS; KOTHARU, 2002b).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Solo

Os solos foram coletados de regiões com plantio de manga (*Mangifera indica* L. cv. Tommy Atkins) irrigada, sem histórico de aplicação de paclobutrazol, nas estações experimentais de Bebedouro - PE e de Mandacaru - BA, ambas pertencentes à EMBRAPA Semiárido, localizadas no Vale do São Francisco no Nordeste do Brasil. A Figura 8 mostra a localização dos pólos de Bebedouro e Mandacaru.

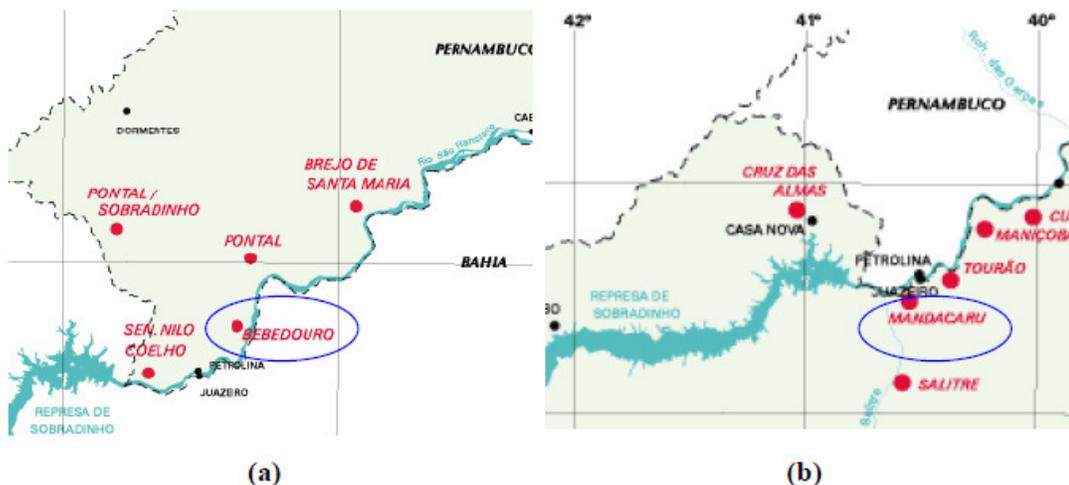


Figura 8 – Localização das amostras de solo; (a) Pólo de Bebedouro-PE (b) Pólo de Mandacaru-BA (MILFONT, 2006).

O clima da região é muito quente e semiárido, com temperatura média do ar de 26,2 ($\pm 0,9$) °C e uma precipitação pluviométrica anual de 535,8 ($\pm 180,3$) mm (AZEVEDO et al., 2003), concentrada em uma estação chuvosa entre os meses de janeiro e abril. Os solos foram classificados como Argissolo-Amarelo (pólo de Bebedouro) e Vertissolo (pólo de Mandacaru) (MILFONT, 2006). Características sobre a composição dos solos encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Características dos solos utilizados nos ensaios de biodegradação de Paclobutrazol (MILFONT, 2006)

Variável	Argissolo-Amarelo	Vertissolo
pH _{H2O} (1:2, 5)	6,75	7,3
Carbono orgânico (g/kg)	6,9 ± 0,1	6,4 ± 0,1
Nitrogênio (g/kg)	0,6	0,8
Argila (%)	7,0	48,1
Silte (%)	9,4	22,3
Areia (%)	83,6	29,6
CTC (cmol _c /kg)	3,38	19,86

CTC – Capacidade de troca catiônica

As amostras de solo foram coletadas da camada superficial (0 - 0,20 m) utilizando um trado. A coleta foi realizada em pontos aleatórios. Após a coleta, as amostras dos solos foram secas ao ar, destorroadas e passadas em peneiras de 2 mm e, em seguida, armazenadas a temperatura ambiente.

Para os experimentos em condições estéreis, os solos foram esterilizados utilizando radiação gama numa dose de 35 KGy. A fonte de radiação gama utilizada foi um irradiador de Cobalto-60, modelo Gamacell 220, localizado no Laboratório de Radiação Gama, no Departamento de Energia Nuclear da UFPE.

3.2 Paclobutrazol

Foi utilizado o Paclobutrazol na sua forma pura (Sigma) e na formulação comercial Cultar 250 SC (Syngenta), que apresenta uma concentração de 250 g/L de paclobutrazol e 750 g/L de ingredientes inertes. A tabela 2 apresenta alguns características do paclobutrazol.

Tabela 2 – Propriedades físico-químicas do paclobutrazol (SILVA et al., 2003a)

Nome IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry)	[2RS, 3RS]-1-[4-chlorophenyl]-4,4-dimethyl-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)pentan-3-ol
Grupo químico	Azol
Peso molecular	293,8
Fórmula molecular	C ₁₅ H ₂₀ ClN ₃ O
Forma	Sólidos cristalinos brancos
Ponto de ebulição	165-166 °C
Pressão de vapor (20 °C)	0,001 mPa
Solubilidade	26 mg/L em água (20 °C)
Destino no ambiente	Solo e água
T _{1/2} no solo	0,5-1,0 ano
T _{1/2} em solo franco-argiloso (pH 8,8; 14% M.O.)	< 42 dias
T _{1/2} em solo franco-arenoso (pH 6,8; 4% M.O.)	> 140 dias
Resistência à hidrólise	pH 4-9
Degradação pela luz U.V. (pH 7)	10 dias

3.3 Micro-organismos

Os micro-organismos utilizados foram isolados previamente por enriquecimento em pesquisas anteriores (VAZ, 2006), e pertencem à coleção do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. São micro-organismos com capacidade de degradação do paclobutrazol que foram isolados de solo da região do Vale do São Francisco, portanto, são micro-organismos adaptados às condições climáticas da região.

As bactérias foram identificadas como pertencentes ao gênero *Pseudomonas* utilizando os meios seletivos ágar Cetrimida, ágar D4 e meio King (VAZ, 2006). O meio Agar D4 foi descrito por Kado; Heskett (1970) como sendo seletivo para o gênero em questão. Além desse, foram utilizados os meios Agar Cetrimida (MERK) e o meio de King et al. (1954).

Foram utilizadas três linhagens de bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas* sp., denominadas *Pseudomonas* sp. MS09, *Pseudomonas* sp. MS23 e *Pseudomonas* sp. MS26. As bactérias do gênero *Pseudomonas* foram selecionadas devido à sua capacidade de degradar os mais diversos compostos.

3.4 Procedimento Experimental

Foram realizados dois experimentos de biodegradação de paclobutrazol, um com apenas PBZ como fonte de carbono e outro acrescentando o glicerol como fonte adicional de carbono.

3.4.1 Ensaio de biodegradação

O ensaio de biodegradação foi realizado em batelada sob condições estéreis e não-estéreis, segundo Martins; Mermoud (1998). Os experimentos foram realizados com duas concentrações de PBZ, 10 e 25 mg/L, para os dois tipos de solo e em triplicata. Essas duas concentrações foram escolhidas para se trabalhar dentro da faixa de solubilidade do paclobutrazol. Foi utilizado tanto o PBZ na sua forma pura (Sigma) como na sua formulação comercial Cultar 250 SC (Syngenta). Os experimentos utilizando fonte adicional de carbono foram realizados com duas concentrações de PBZ, 10 e 25 mg/L para os dois tipos de solo e em triplicata. O glicerol foi utilizado nas concentrações de 50 e 125 mg/L, quando a concentração de PBZ foi de 10 e de 25 mg/L, respectivamente, mantendo a proporção glicerol:PBZ (5:1) utilizada em estudos anteriores (VAZ, 2006). A Figura 9 apresenta o esquema de todos os ensaios de biodegradação realizados.

Foram utilizados 5 g de solo para um volume de 25 mL de solução, sendo este calculado subtraindo a umidade do solo. Os micro-organismos foram adicionados na concentração de aproximadamente 10^7 células/mL. Foi realizado um experimento controle sem adição desses micro-organismos. O desenho esquemático do experimento encontra-se na Figura 10.

Os experimentos foram conduzidos em mesa agitadora a 200 rpm (Figura 11), durante um período de aproximadamente 28 dias a 30 °C. Amostras foram retiradas para a quantificação de PBZ e medida do pH, a cada sete dias. Os micro-organismos foram quantificados em tempos alternados.

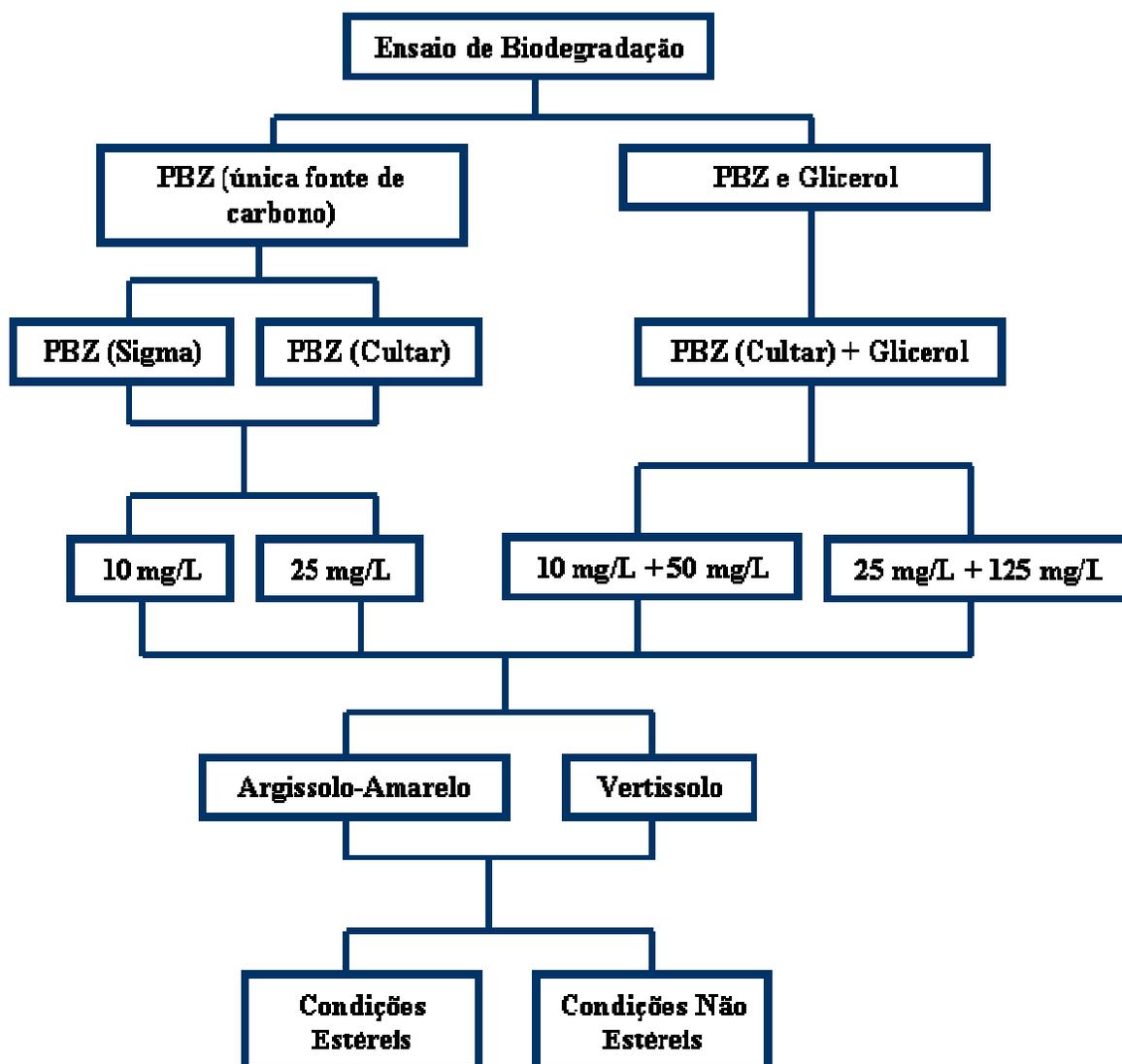


Figura 9 – Esquema dos ensaios de biodegradação.

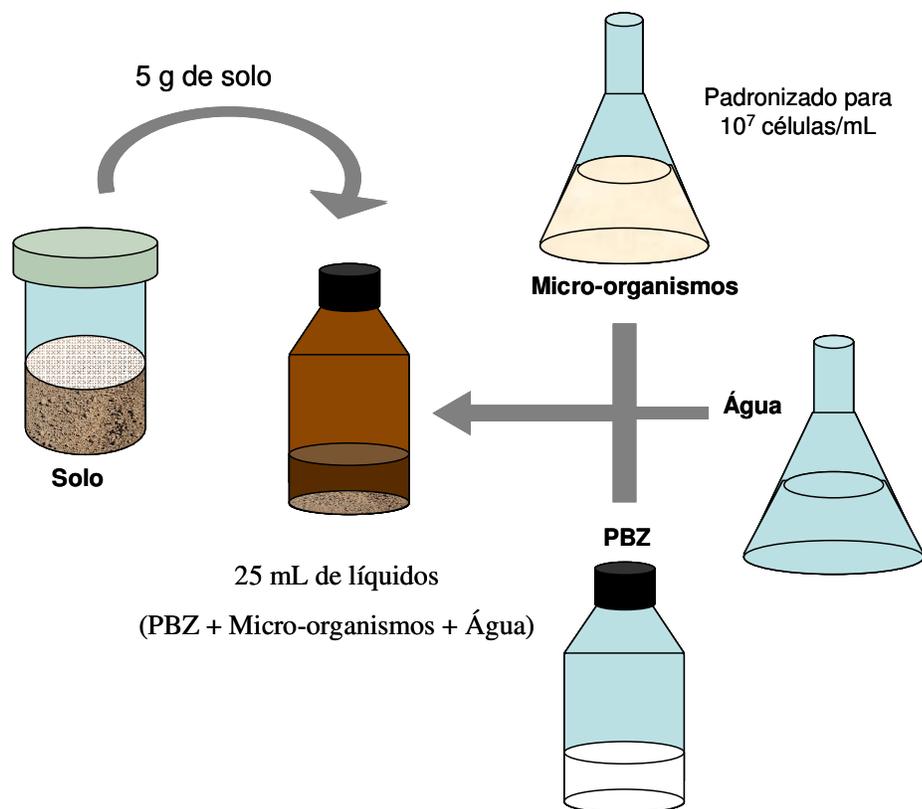


Figura 10 – Preparo no ensaio de biodegradação.



Figura 11 – Experimento conduzido em mesa agitadora.

3.5 Métodos analíticos

3.5.1 Quantificação do crescimento microbiano e monitoramento do pH

As bactérias foram quantificadas pela técnica de contagem de células viáveis em placas (Figura 12). A amostra contendo células bacterianas foi diluída serialmente em água estéril e essas diluições foram plaqueadas em placas de Petri com meio de cultura Ágar Triptona Soja (TSA) e incubadas por 24 horas em estufa a 30 °C para a contagem das colônias. O resultado é obtido em UFC (unidade formadora de colônia) / mL (TORTORA et al., 1998).

O pH da suspensão foi medido durante todos os experimentos para verificar a variação desse e a possível influência sobre o crescimento das bactérias e consequentemente na biodegradação do PBZ.

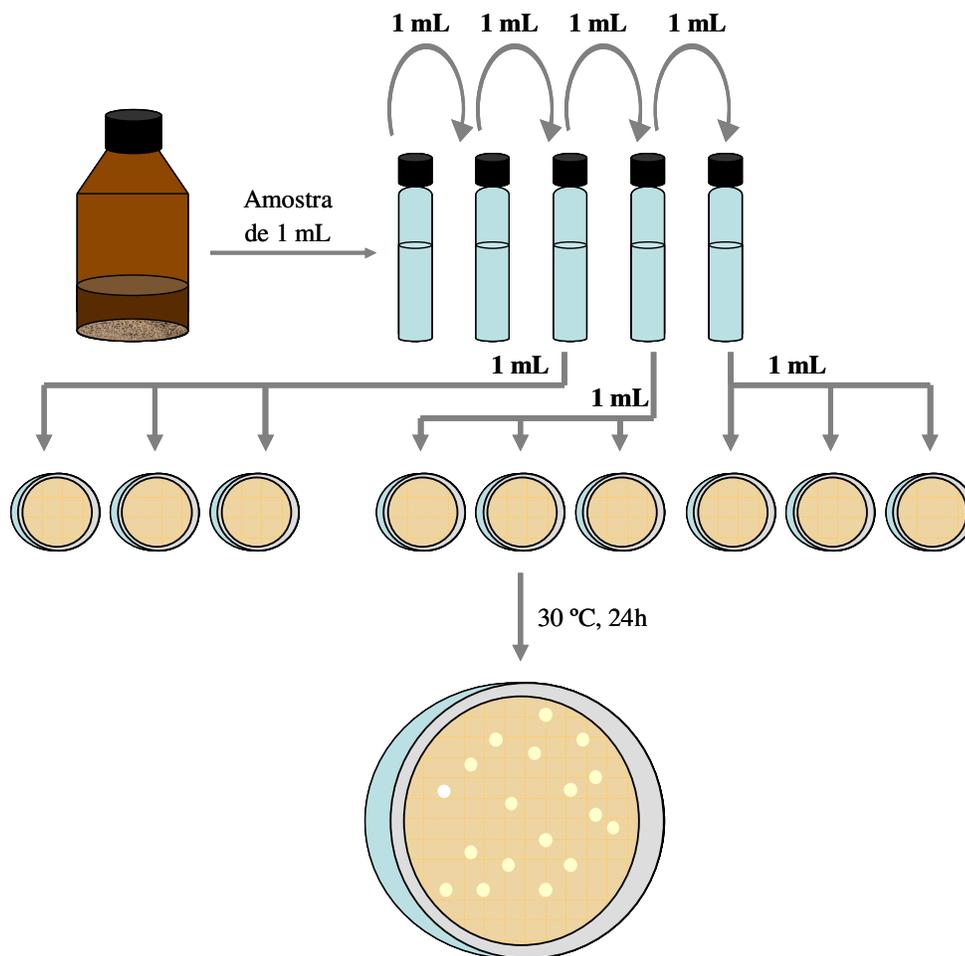


Figura 12 – Esquema para contagem de células viáveis em placa.

3.5.2 Quantificação do paclobutrazol

Amostras de 1 mL foram coletadas em intervalos de tempo predefinidos. De cada amostra foi extraído PBZ adicionando-se 9 mL de metanol, logo após centrifugou-se a 5000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,2 µm e injetado diretamente no cromatógrafo.

Para a quantificação de PBZ, inicialmente foi preparada uma curva padrão, utilizando soluções de PBZ nas seguintes concentrações: 0,1; 1,0; 3,0; 8,0; 16,0 e 20,0 mg/L.

A concentração de paclobutrazol foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) segundo Vaz et al. (2007) com modificações. Nesse caso, as condições de operação foram as seguintes: fase móvel de água e metanol na proporção de 10:90 (v/v) e a vazão de 0,7 mL/min. A coluna utilizada foi ODS, 4,6 x 250 mm x 5 µm (Beckman Ultrasphere).

A percentagem de biodegradação de paclobutrazol foi expressa pela equação 8.

$$\% \text{ Biodegradação de PBZ} = C/C_i \cdot 100 \quad (8)$$

Na qual, C é a concentração de PBZ encontrada (após quantificação das amostras por CLAE) e C_i é a concentração inicial de PBZ.

3.5.3 Quantificação do glicerol

Para a quantificação do glicerol, amostras de 5 mL foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi filtrado em membrana de 0,2 µm e injetado no cromatógrafo.

O glicerol foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). As condições de trabalho foram as seguintes: 50°C, 1 mL/min e uma coluna Shodex KS 802 (Lonpak – divisão da Millipore). Foram preparadas cinco soluções para a construção da curva padrão, nas seguintes concentrações: 5,0; 20,0; 60,0; 100,0 e 150,0 mg/L.

3.6 Modelagem da biodegradação de paclobutrazol

Os modelos de cinética de primeira ordem, de dupla cinética de primeira ordem e logístico, representados pelas equações de 1 a 7 descritas no item 2.3.3, foram aplicados aos resultados obtidos nos ensaios de biodegradação utilizando o programa Sigma Plot 11.0.

3.7 Análise estatística

Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para os resultados de biodegradação, para avaliar a significância estatística, utilizando o programa Excel (Office 2003).

Segundo a ANOVA, a variação total é igual a variação entre os tratamentos mais a variação dentro dos tratamentos (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

Quando há efeito diferencial entre tratamentos, a variação entre eles deve ser maior que a variação dentro do mesmo tratamento. Ou seja, a *Variância Entre* deve ser maior do que a *Variância Dentro*. Isso equivale a dizer que se houver diferença entre grupos, o resultado da divisão da *Variância Entre* pela *Variância Dentro* deve ser maior do que 1. Esse cálculo é chamado de razão F de variâncias e seu resultado é comparado com um valor tabelado.

Se não há diferença entre os tratamentos, então a Variância Entre deve ser igual à Variância Dentro e a razão F entre elas é 1. Para testar a significância do valor de F obtido no experimento, isto é, verificar se o valor de F calculado difere de 1 ao acaso ou por efeito dos tratamentos, compara-se este valor com um F tabelado. Este último estipula o limite para uma diferença aleatória entre as variâncias Entre e Dentro. Se F calculado for menor que F tabelado, conclui-se que não há diferença entre os tratamentos, já que a variação observada entre tratamentos é da mesma ordem daquela observada dentro dos tratamentos. Se F calculado for maior do que F tabelado, então há diferença significativa entre os tratamentos.

Para obter o $F_{\text{calculado}}$ utiliza-se a equação 9.

$$F_{\text{calculado}} = \frac{MQ_E}{MQ_D} \quad (9)$$

Na qual, MQ_E é a Média Quadrática Entre Grupos e MQ_D é a Média Quadrática Dentro dos Grupos.

A Tabela 3 apresenta todas as equações utilizadas para a análise de variância.

Tabela 3 – Equações utilizadas para a análise da variância (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

Causas de variação	SQ	GL	MQ	F_{calculado}	F_{tabelado}
Entre grupos (tratamentos)	$SQ_E = \sum_{i=1}^k n_i \left(\bar{X}_i - \bar{X} \right)^2$	$gl_E = k - 1$	$\frac{SQ_E}{k - 1}$	$\frac{MQ_E}{MQ_D}$	F_{α, gl_E, gl_D}
Dentro dos grupos (resíduo)	$SQ_D = \sum_{i=1}^k \left[\sum_{j=1}^{n_i} \left(X_{ij} - \bar{X}_i \right)^2 \right]$	$gl_D = \left(\sum n_i \right) - k$	$\frac{SQ_D}{\left(\sum n_i \right) - k}$		

SQ – Soma Quadrática, SQ_E – Soma Quadrática Entre Grupos, SQ_D – Soma Quadrática Dentro Grupos, GL – Graus de Liberdade, MQ – Média Quadrática, k – número total de grupos, n_i – número de observações em cada grupo, F_{α, gl_E, gl_D} – Valor do teste F tabelado, $F_{calculado}$ – Valor de F calculado, $F_{tabelado}$ – Valor de F tabelado.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaios utilizando apenas paclobutrazol como fonte de carbono

4.1.1 Crescimento microbiano

O crescimento microbiano para os ensaios em condições estéreis apresentou valores semelhantes, tanto para o PBZ (Sigma) quanto para o PBZ (Cultar), como pode ser observado na Figura 13. No tempo zero, para os ensaios em condições estéreis, a quantidade de células corresponde ao inóculo de micro-organismos adicionados ao experimento. Logo, esse valor foi semelhante para os dois tipos de PBZ (Sigma e Cultar), para os dois tipos de solo (Argissolo-Amarelo e Vertissolo) e para ambas as concentrações de PBZ (10 mg/L e 25 mg/L) utilizadas, sendo em média $9,4 \cdot 10^6$ UFC/mL.

Para os ensaios em condições não-estéreis, que o crescimento microbiano divergiu um pouco, quando comparado com o resultado obtido para os experimentos em condições estéreis. Nesse caso, a concentração inicial de células foi em média de $1,8 \cdot 10^7$ UFC/mL (Figura 13). Essa diferença pode ser atribuída aos micro-organismos presentes no solo não-estéril. O tempo zero é o tempo em que a quantidade de células corresponde ao inóculo de micro-organismos adicionados ao experimento juntamente com os micro-organismos presentes no solo.

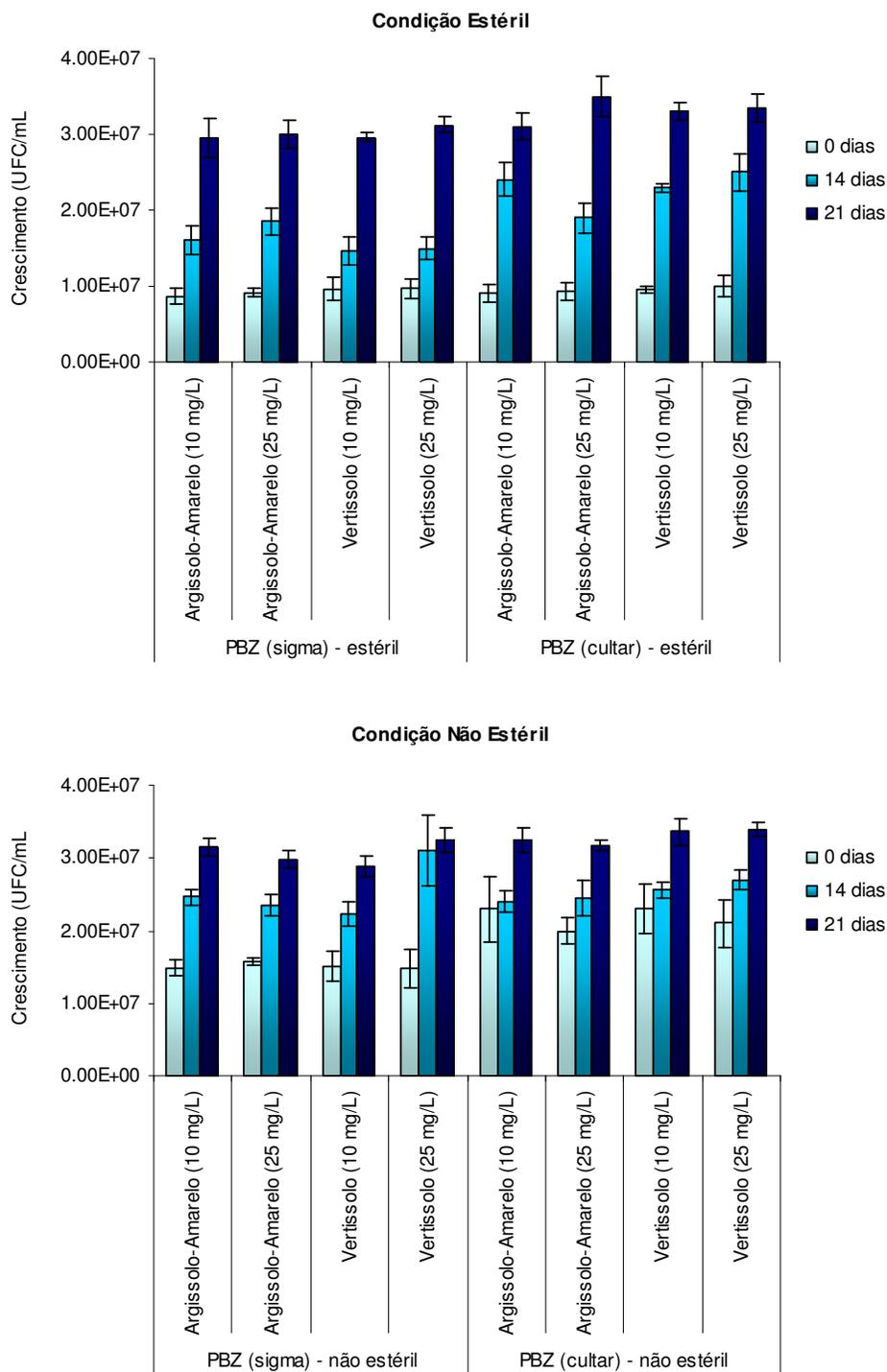


Figura 13 – Crescimento dos micro-organismos nos dois solos (Argissolo-Amarelo e Vertissolo), utilizando o PBZ (Sigma e Cultar), nos ensaios em condições estéreis e não-estéreis, nos tempos 0, 14 e 21 dias. Média de três réplicas.

Após 21 dias de experimento de biodegradação, para os ensaios em condições estéreis e não-estéreis, houve um pequeno crescimento microbiano. Tal crescimento foi semelhante também para os dois tipos de PBZ, para os dois tipos de solos e para as duas concentrações de PBZ utilizadas, ficando em média de $3,2 \cdot 10^7$ UFC/mL.

Não houve crescimento de micro-organismos no experimento controle em condições estéreis, visto que nesse ensaio não foram adicionados micro-organismos e o solo utilizado foi esterilizado. No experimento controle em condições não-estéreis, a quantidade de células iniciais foi em média de $1,5 \cdot 10^2$ UFC/mL, sendo esta a concentração de bactérias do solo não-estéril. Após 21 dias houve um pequeno crescimento no experimento controle, em média de $2,8 \cdot 10^2$ UFC/mL, onde este crescimento se deu provavelmente devido aos nutrientes contidos no solo.

4.1.2 Medições do pH

Não houve alteração do pH ao longo do tempo de experimentos (Figura 14). O pH ficou em torno de 5,3 para o Argissolo-Amarelo nas duas concentrações utilizadas (10 e 25 mg/L) e para os dois PBZ (Sigma e Cultar). O mesmo ocorreu para o Vertissolo, que teve o pH por volta de 6,8, em ambos os tipos de PBZ utilizados e em ambas as concentrações utilizadas. Essa variação se deve às características do solo, pois o Vertissolo estudado tem um pH em água maior que o Argissolo-Amarelo (MILFONT, 2006). A não variação do pH indica que não houve interferência desse fator e que a diferença de pH entre os dois tipos de solo também não afetou a biodegradação.

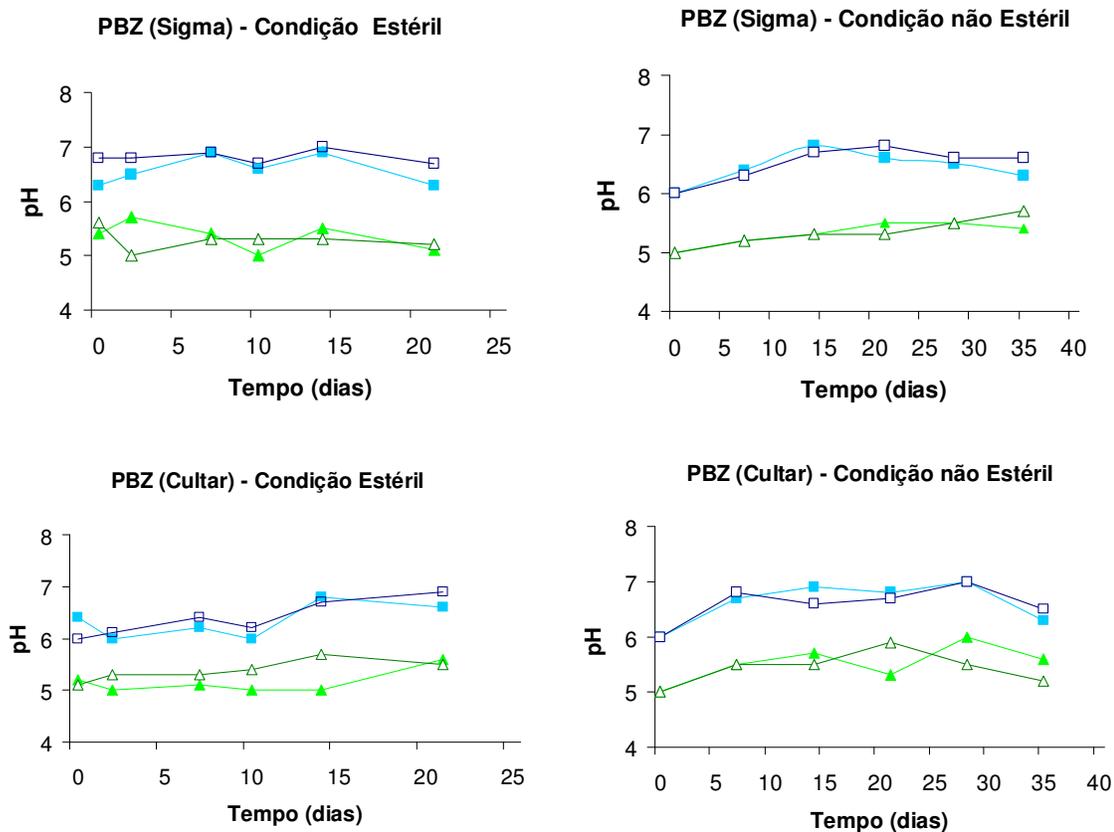


Figura 14 – Valores médios de pH ao longo do experimento de biodegradação realizado nos dois solos (Argissolo-Amarelo e Vertissolo) utilizando PBZ (Sigma e Cultar) em duas concentrações (10 e 25 mg/L) nos ensaios em condições estéreis e não-estéreis. Média de três réplicas; ▲ – Argissolo-Amarelo 10 mg/L; △ – Argissolo-Amarelo 25 mg/L; ■ – Vertissolo 10 mg/L; □ – Vertissolo 25 mg/L.

4.1.3 Biodegradação de paclobutrazol

No ensaio em que a concentração inicial de PBZ foi de 10 mg/L, a biodegradação de PBZ após 21 dias foi de aproximadamente 43% para os dois solos e para os dois PBZ (Sigma) e (Cultar), tanto para a condição estéril quanto para a não-estéril (Figura 15).

Os ensaios que utilizaram a concentração de 25 mg/L de PBZ apresentou em média 41% de biodegradação de paclobutrazol nos experimentos em condições estéreis e 39% nos experimentos em condições não-estéreis (Figura 16).

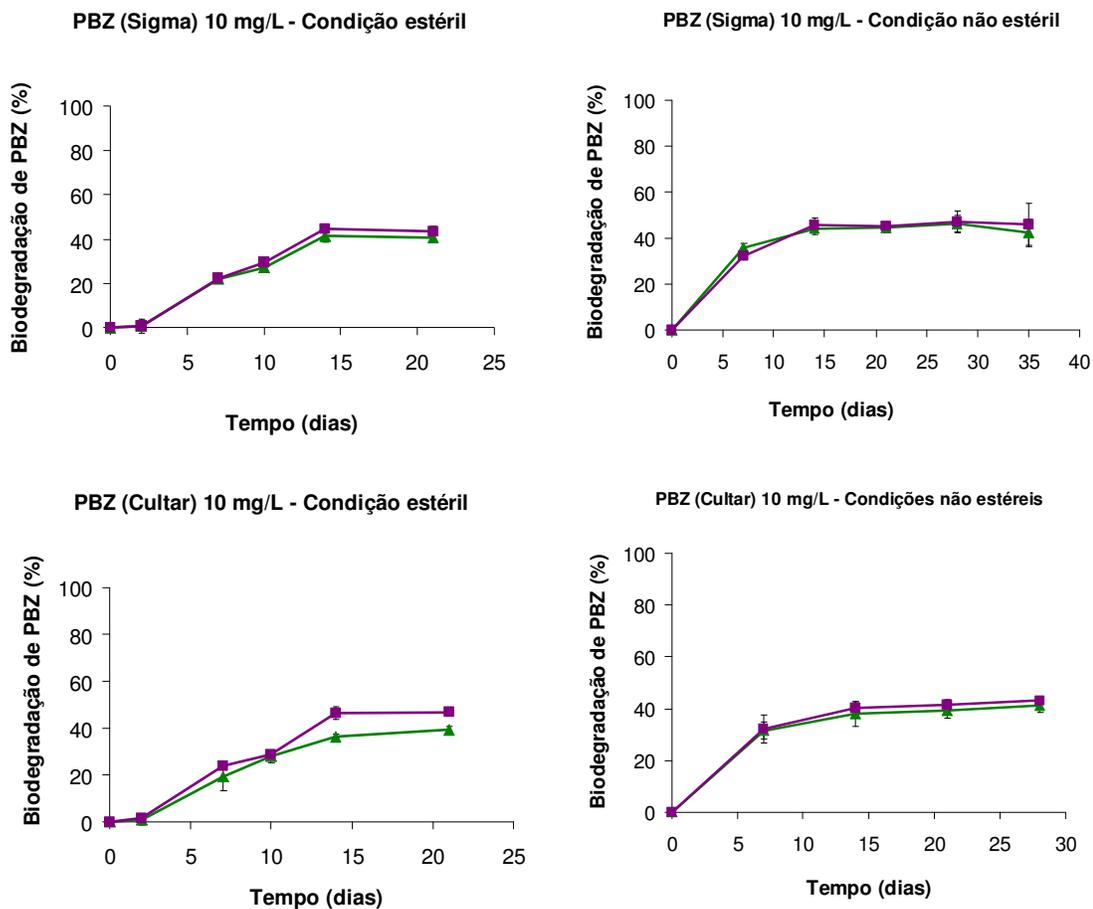


Figura 15 – Biodegradação de paclobutrazol em dois solos (Argissolo-Amarelo e Vertissolo) em condição estéril e não-estéril utilizando PBZ (Sigma e Cultar) na concentração de 10 mg/L. Média de três réplicas; ▲ – Argissolo-Amarelo; ■ – Vertissolo.

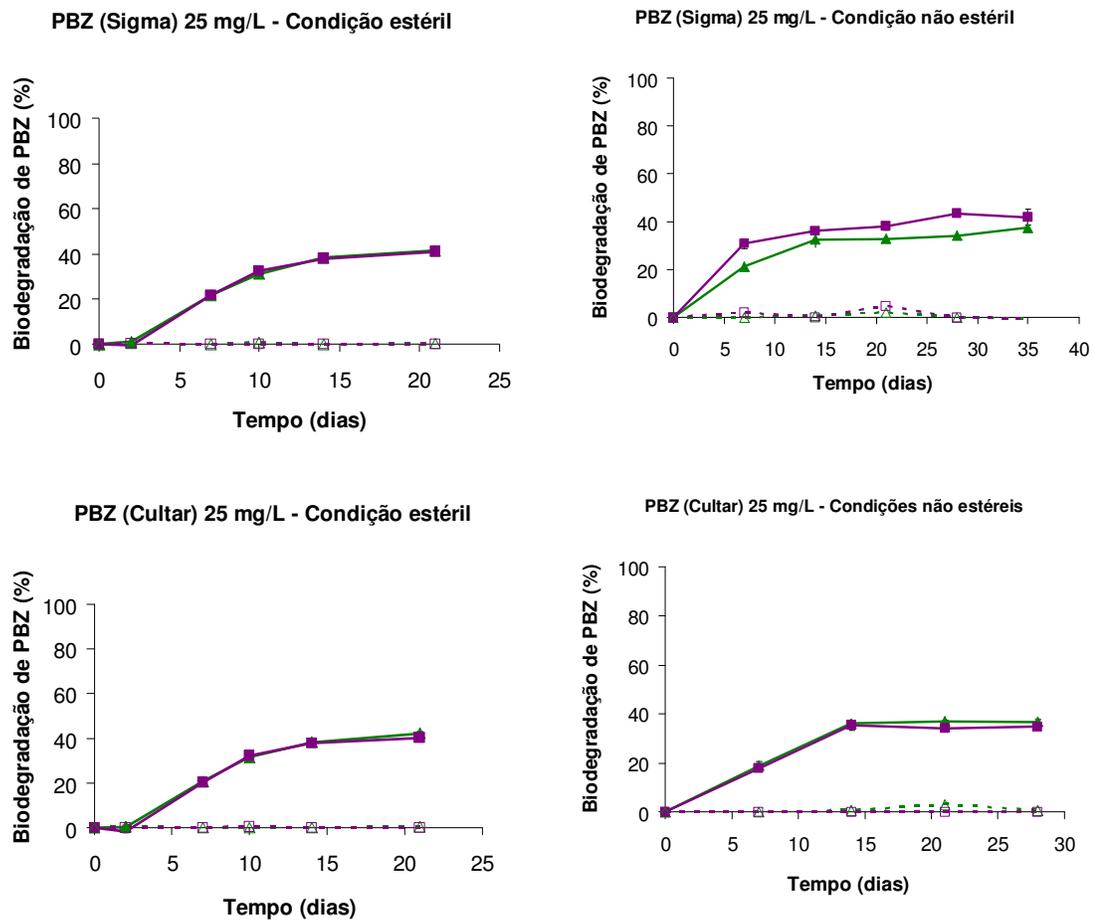


Figura 16 – Biodegradação de paclobutrazol em dois solos (Argissolo-Amarelo e Vertissolo) em condição estéril e não-estéril utilizando PBZ (Sigma e Cultar) na concentração de 25 mg/L. Média de três réplicas; ▲ – Argissolo-Amarelo; ■ – Vertissolo; △ – Argissolo-Amarelo controle; □ – Vertissolo controle.

Analisando a ANOVA com 95% de confiança observou-se que não houve diferença significativa entre os dois solos, Argissolo-Amarelo e Vertissolo, estudados, bem como para os PBZ (sigma) e PBZ (cultar) utilizados e nem para as duas concentrações de PBZ estudadas (10 e 25 mg/L). Houve uma pequena diferença significativa entre os experimentos utilizando PBZ (sigma) e PBZ (cultar) em condições estéreis, no entanto, essa diferença não foi verificada nos experimentos com condições não-estéreis. A não divergência entre os experimentos realizados em condições estéreis e não-estéreis revela que não há participação na biodegradação do PBZ das bactérias presentes no solo não-estéril, ou estas se encontram em pequena quantidade.

Apesar dessas bactérias terem sido isoladas do próprio solo, e por isso esperar-se que a biodegradação em solo não-estéril fosse um pouco maior que a do solo estéril, tal fato não foi observado. Isto não ocorreu pois, provavelmente, as bactérias com capacidade de degradar PBZ presentes no solo estivessem em pequena quantidade e por isso a presença delas não influenciou no resultado.

Não era esperado que a biodegradação do PBZ fosse semelhante para os dois solos estudados, pois estes diferem muito entre si, sendo o Vertissolo um solo com maior teor de argila que o Argissolo-Amarelo. Milfont et al. (2008) estudaram o transporte de paclobutrazol nos mesmo solos utilizados no presente trabalho. Estes autores verificaram que o PBZ é transportado mais rapidamente no Vertissolo que no Argissolo-Amarelo, pois o último tem mais matéria orgânica o que contribuiu para a maior sorção do PBZ. No entanto, a não divergência dos resultados, entre os solos estudados, pode ser atribuída aos ensaios realizados em condições de saturação.

Para os dois solos (Argissolo-Amarelo e Vertissolo), para as duas fontes de PBZ (Sigma e Cultar) e para as duas concentrações de PBZ utilizadas (10 e 25 mg/L) nos experimentos em condições estéreis, houve um pequeno período de fase lag (período em que praticamente não houve biodegradação) de aproximadamente 2 dias (Figuras 15 e 16). Não foi verificada a presença de fase lag nos ensaios em condições não-estéreis, visto que a primeira amostra foi retirada apenas com sete dias de ensaio, mas provavelmente essa fase lag também esteve presente como nos experimentos em condições estéreis.

Em todos os experimentos, tanto em condições estéreis como em condições não-estéreis, a biodegradação praticamente não se alterou após 14 dias de cultivo (Figuras 15 e 16). Em um estudo anteriormente realizado, em meio de cultura líquido com apenas PBZ como fonte de carbono na concentração de 1 g/L e com a cultura mista utilizada no presente trabalho, a biodegradação cessou com 20 dias de cultivo, chegando a aproximadamente 47 %

(VAZ, 2006). Nesse caso, foi utilizada uma concentração muito maior de PBZ, e, portanto, o consumo de PBZ pelos micro-organismos foi bem maior. Esse fato se deu, provavelmente, devido ao meio de cultivo mineral, que era rico em nutrientes que possibilitou o aumento do crescimento dos micro-organismos, e, conseqüentemente, aumentou a biodegradação. Alguns trabalhos sobre a biodegradação de PBZ também apresentaram essa estabilização na degradação após um período do experimento (JACKSON et al., 1996; SILVA et al., 2003c).

4.2 Ensaio de biodegradação utilizando paclobutrazol como fonte de carbono e glicerol como fonte de carbono adicional

4.2.1 Crescimento microbiano

Nos experimentos em condições estéreis a contagem de micro-organismos apresentou resultados semelhantes tanto para o Argissolo-Amarelo quanto para o Vertissolo. No tempo zero, a quantidade de células foi em média $4,13 \cdot 10^7$ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL), o que corresponde ao número de células do inóculo, visto que se trata de um experimento em condições estéreis. Portanto, esse valor foi semelhante para os dois tipos de solo e para as duas concentrações de PBZ (10 e 25 mg/L).

Após 35 dias de ensaio, os resultados obtidos apresentaram valores também semelhantes para os dois solos, no entanto, diferiram com relação à concentração de PBZ. Quando foi utilizado PBZ na concentração de 10 mg/L o crescimento foi em média de $3,7 \cdot 10^8$ UFC/mL, enquanto com a concentração de 25 mg/L o crescimento foi de $4,9 \cdot 10^8$ UFC/mL (Figura 17). Essa diferença pode ser atribuída à concentração de glicerol que foi maior quando utilizada a concentração de 25 mg/L de PBZ.

Nos experimentos em condições não-estéreis a quantidade de células iniciais foi maior que nos ensaios em condições estéreis, diferença esta que pode ser atribuída aos micro-organismos presentes no solo não-estéril. Nesse caso a concentração inicial de células foi em média $4,0 \cdot 10^8$ UFC/mL. Vale ressaltar que em condições não-estéreis, o tempo zero é a quantidade de células correspondente ao inóculo juntamente com os micro-organismos presentes no solo. Também após 35 dias, os resultados apresentaram diferenças quando comparados aos obtidos no experimento estéril. Em média foram contabilizadas $4,2 \cdot 10^9$ UFC/mL para ambos os solos, quando utilizadas as concentrações de PBZ com 10 mg/L e

glicerol de 50 mg/L e $8,7 \cdot 10^9$ UFC/mL em média também para ambos os solos, quando utilizadas as concentrações de PBZ com 25 mg/L e glicerol de 125 mg/L (Figura 17).

Quando comparados o crescimento microbiano nos experimentos com apenas PBZ e com PBZ e glicerol, este último apresentou valores maiores, pois o glicerol, neste caso funcionou como um fonte adicional de carbono que favoreceu a ocorrência de um maior crescimento microbiano.

Não houve crescimento de micro-organismos no experimento controle realizado em condições estéreis, visto que nesse ensaio não foram adicionados micro-organismos e o solo utilizado foi esterilizado. Este fato indica que a biodegradação foi realizada somente pelas *Pseudomonas* que foram adicionadas.

Nos experimentos em condições não-estéreis, a quantidade de células iniciais no ensaio controle foi de aproximadamente $1,36 \cdot 10^2$ UFC/mL, sendo esta a concentração de bactérias do solo não-estéril. No tempo de 35 dias houve crescimento no experimento controle para $2,1 \cdot 10^4$ UFC/mL, atribuído ao consumo de glicerol e aos nutrientes contidos no solo.

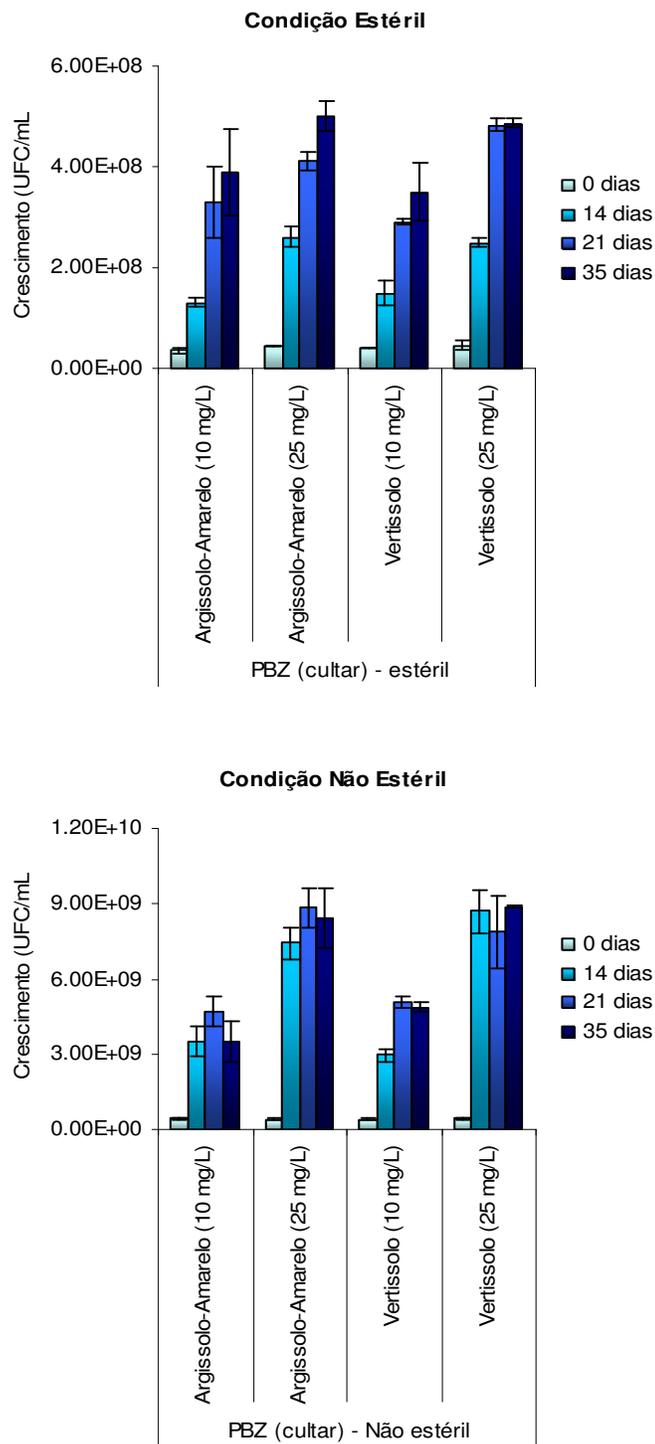


Figura 17 – Crescimento de micro-organismos em dois solos (Argissolo-Amarelo e Vertissolo), em condição estéril e não-estéril, utilizando o PBZ (Cultar) e o glicerol como fonte adicional de carbono. Média de três réplicas.

4.2.2 Medições do pH

O pH, ao longo dos experimentos, praticamente não se alterou tanto nos ensaios em condições estéreis, quanto em condições não-estéreis (Figura 18). O pH ficou em torno de 5,0 para o Argissolo-Amarelo e de 6,8 para o Vertissolo, para ambas as concentrações estudadas, como nos resultados obtidos quando se utilizou apenas o PBZ como fonte de carbono.

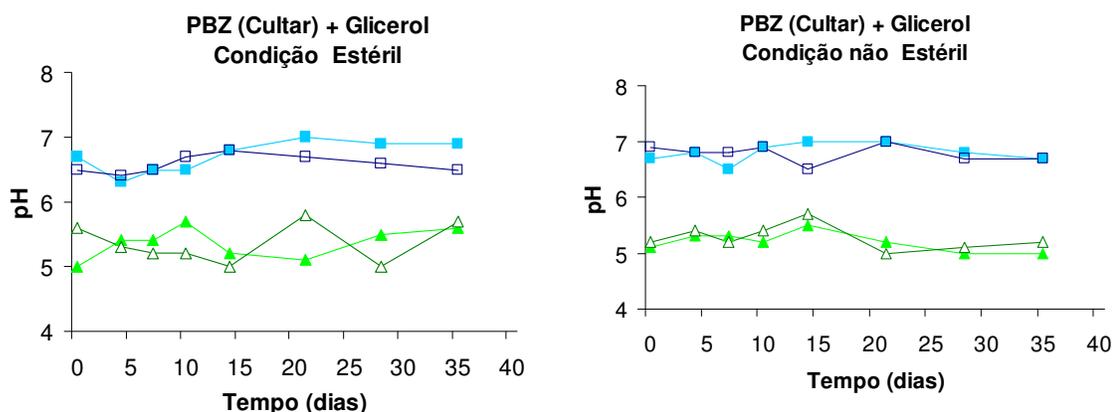


Figura 18 – Valores médios de pH ao longo do experimento de biodegradação realizado nos dois solos (Argissolo-Amarelo e Vertissolo) utilizando PBZ (Cultar) em duas concentrações (10 e 25 mg/L) e glicerol na duas concentrações (50 e 125 mg/L) nos ensaios em condições estéreis e não-estéreis. Média de três réplicas; ▲ – Argissolo-Amarelo 10 mg/L; △ – Argissolo-Amarelo 25 mg/L; ■ – Vertissolo 10 mg/L; □ – Vertissolo 25 mg/L.

4.2.3 Biodegradação de paclobutrazol

No ensaio em que foi utilizada a concentração inicial de PBZ de 10 mg/L e de glicerol de 50 mg/L, a biodegradação de PBZ após 35 dias de experimento foi de aproximadamente 70% para os dois solos e para as condições estéril e não-estéril (Figura 19). Aproximadamente o mesmo valor, 69% de biodegradação foi obtido nos experimentos em que foi utilizada a concentração de PBZ de 25 mg/L e de glicerol de 125 mg/L, para ambos os solos e para as duas condições estudadas (Figura 20).

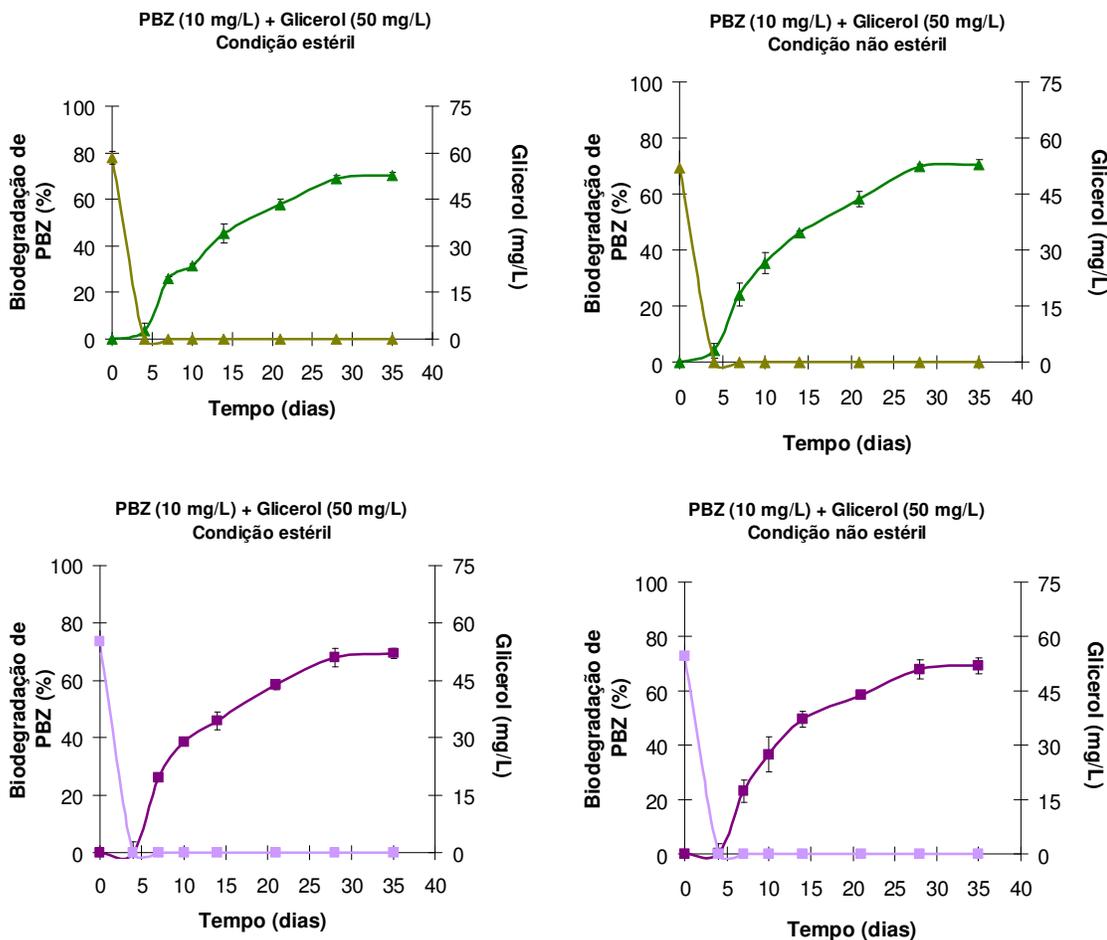


Figura 19 – Biodegradação de paclobutrazol em dois solos (Argissolo-Amarelo e Vertissolo) em condição estéril e não-estéril utilizando 10 mg/L de PBZ e 50 mg/L de glicerol. Média de três replicatas; ▲ – Argissolo-Amarelo; ■ – Vertissolo; ▲ – Glicerol (Argissolo-Amarelo); ■ Glicerol (Vertissolo).

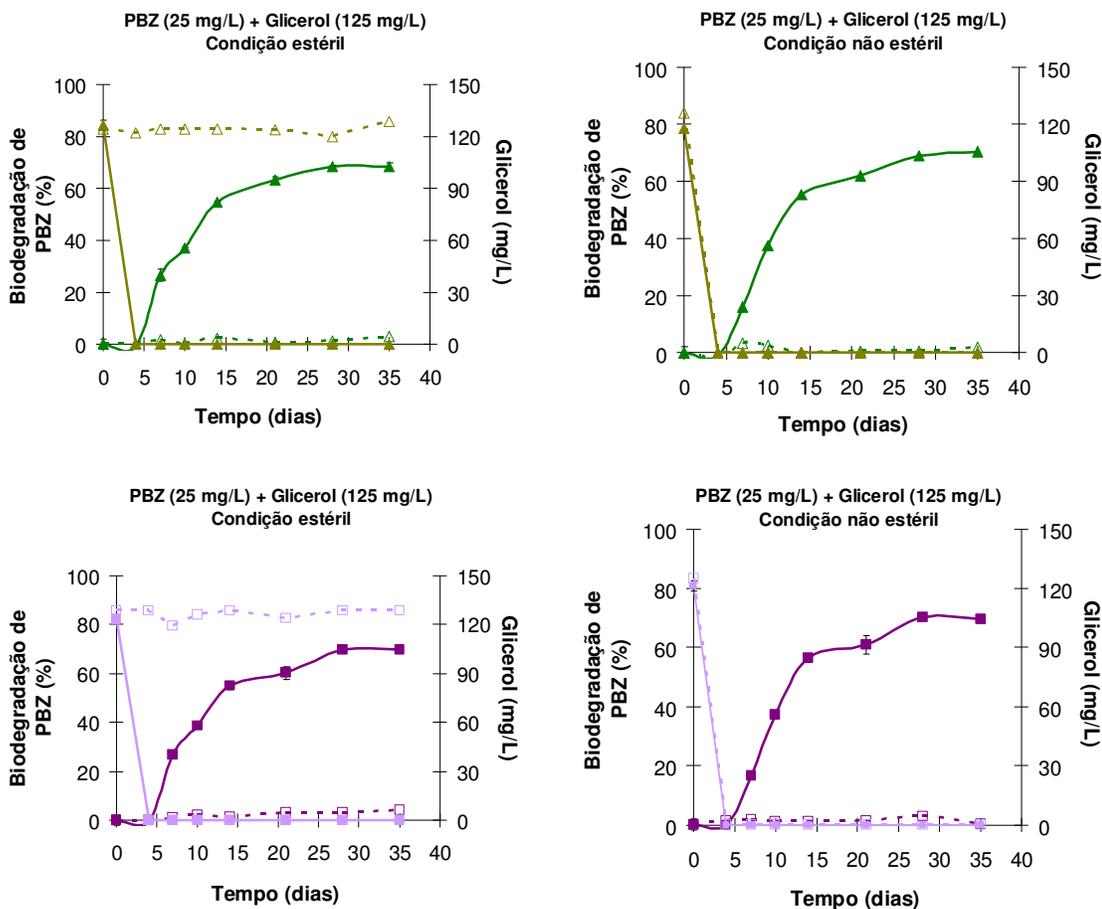


Figura 20 – Biodegradação de paclobutrazol em dois solos (Argissolo-Amarelo e Vertissolo) em condição estéril e não-estéril utilizando 25 mg/L de PBZ e 125 mg/L de glicerol. Média de três réplicas; ▲ – Argissolo-Amarelo; ■ – Vertissolo; ▲ – Glicerol (Argissolo-Amarelo); ■ Glicerol (Vertissolo); Δ – Argissolo-Amarelo controle; □ – Vertissolo controle; Δ – Glicerol (Argissolo-Amarelo) controle; □ – Glicerol (Vertissolo) controle.

Não houve diferença significativa entre os dois solos estudados (Argissolo-Amarelo e Vertissolo) e entre as duas condições estudadas (estéril e não-estéril), isto implica que não há participação das bactérias presentes no solo não-estéril na biodegradação. Diante desse resultado, a biodegradação de PBZ obtida pode ser atribuída exclusivamente às bactérias *Pseudomonas* adicionadas no experimento.

Segundo a análise estatística (ANOVA), foi bem significativa a diferença entre os experimentos com apenas PBZ e os experimentos com PBZ e glicerol, que no caso deste último aumentou a biodegradação do PBZ de cerca de 40% para 70%.

Diferentemente do que se possa pensar, o aumento no crescimento microbiano atribuído ao glicerol não é de todo responsável pelo aumento da biodegradação, pois experimentos anteriores realizados por Vaz (2006) utilizando a glicose como fonte de carbono adicional, contribuiu para o crescimento dos micro-organismos, no entanto inibiu a biodegradação do PBZ. Essa inibição da biodegradação, na presença de outra fonte de carbono pode ser atribuída a uma repressão catabólica. Na repressão catabólica, a presença de uma fonte de carbono que reprime a expressão de certos genes e óperons, que são responsáveis pela utilização de fontes alternativas de carbono, pode resultar numa baixa ou nenhuma taxa de biodegradação, havendo apenas o consumo da fonte de carbono preferencial (BRÜCKNER; TITGEMEYER, 2002). A diferença entre os experimentos sem e com glicerol como fonte adicional de carbono se deve provavelmente a um processo cometabólico, em que enzimas utilizadas na degradação do glicerol, também devem ter contribuído com a biodegradação do PBZ.

Por outro lado, em inúmeros trabalhos sobre biodegradação, diferentes autores verificaram o benefício de uma fonte de carbono adicional. Em trabalhos mais recentes, Passos et al. (2009) observaram uma diminuição de 62 horas na biodegradação de fenol por *Aspergillus* sp. quando havia presença de glicose no meio e Ho et al. (2009) utilizaram o acetato como fonte de carbono secundária na degradação de fenol, verificando uma maior eficiência da biodegradação do composto citado.

Para os dois solos e para as duas concentrações do PBZ utilizado, nas condições estéril e não-estéril, houve um pequeno período de fase lag, período em que praticamente não há biodegradação, de aproximadamente 4 dias. Este período está relacionado com a fase de adaptação dos micro-organismos ao meio, e também coincidiu com o período em que continha glicerol no meio, pois não há mais glicerol após 4 dias de ensaio (Figuras 19 e 20), e por isso, pode-se concluir que houve um crescimento diáuxico, ou seja, o segundo substrato (PBZ) só foi degradado quando houve o término do primeiro (Glicerol).

Nos experimentos utilizando o PBZ como única fonte de carbono, a biodegradação cessou com 14 dias de cultivo, porém só chegou a aproximadamente 42%, enquanto nos ensaios com PBZ e glicerol a biodegradação cessou com 28 dias e alcançou cerca de 70%. Diante disso, pode-se atribuir ao glicerol a grande capacidade de estimular as *Pseudomonas* estudadas para a biodegradação do PBZ.

Vaz (2006) apresentou resultados semelhantes aos encontrados no presente trabalho utilizando o glicerol como fonte de carbono adicional na biodegradação de PBZ. O valor de biodegradação, obtido por esse autor, foi de aproximadamente 75%, no entanto, em apenas dez dias de experimento. O menor tempo e a maior biodegradação podem ser atribuídos aos experimentos, que nesse caso, foram realizados em meio mineral líquido, sem a presença de solo. Portanto, os resultados encontrados no presente trabalho, em sistemas de solo saturado, simulam mais precisamente as condições ambientais onde o agroquímico é encontrado.

4.3 Modelagem da biodegradação

4.3.1 Modelos matemáticos aplicados a biodegradação de paclobutrazol

Os dados experimentais obtidos foram ajustados a três modelos cinéticos (primeira ordem, dupla cinética de primeira ordem e logístico).

O coeficiente de correlação (R) mostrou que o modelo de primeira ordem não se ajustou bem aos dados experimentais (Tabela 4). Isso se deu, principalmente, porque a biodegradação de paclobutrazol ocorreu em duas etapas distintas, uma mais rápida e outra mais lenta, tendendo para a estabilização da biodegradação. Isso ocorre, provavelmente, devido à complexidade da molécula de paclobutrazol que é formada por um anel triazol e um anel cloro-benzeno e possui ainda uma cadeia carbônica aberta.

O coeficiente de correlação (R) mostrou que foi obtido um ótimo ajuste das equações de dupla cinética de primeira ordem e logística com os dados obtidos em laboratório para os dois solos estudados (Argissolo-Amarelo e Vertissolo), bem como para as duas concentrações de PBZ utilizadas (10 e 25 mg/L), tanto nos experimentos com apenas PBZ, como nos experimentos com PBZ e glicerol (Figuras 21 e 22).

Tabela 4 – Constantes e parâmetros cinéticos da biodegradação de paclobutrazol.

			Primeira ordem			Dupla cinética de primeira ordem				Logística				
			$C(t) = C_0 e^{-k_1 t}$			$C(t) = C_0 \{f \cdot e^{-k_R t} + (1-f) \cdot e^{-k_L t}\}$				$C(t) = \frac{C_0 K e^{kt}}{K + C_0 (e^{kt} - 1)}$				
			C_0	k	R	C_0	k_R	k_L	f	R	C_0	K	k	R
PBZ	10 mg/L	Argissolo-Amarelo	9,176	0,0197	0,868	10,414	0,1921	0,0037	0,3973	0,940	10,419	5,5157	0,0995	0,938
		Vertissolo	9,032	0,0205	0,872	10,270	0,1857	0,0026	0,4196	0,950	10,276	5,3879	0,1013	0,947
	25 mg/L	Argissolo-Amarelo	22,101	0,0146	0,834	25,220	0,1830	0,0012	0,363	0,950	25,217	15,3368	0,1182	0,986
		Vertissolo	22,056	0,0169	0,848	25,317	0,1800	0,0012	0,4011	0,990	25,320	14,3439	0,1101	0,988
PBZ +	10 mg/L	Argissolo-Amarelo	9,535	0,0452	0,980	10,250	0,2027	0,0272	0,345	0,995	10,244	0,7221	0,0066	0,996
		Vertissolo	9,298	0,0454	0,972	10,134	0,1910	0,0219	0,4256	0,994	10,138	1,5340	0,0176	0,994
Glicerol	25 mg/L	Argissolo-Amarelo	22,859	0,0502	0,953	25,392	0,1446	0,0031	0,683	0,994	25,453	4,8230	0,0296	0,998
		Vertissolo	22,905	0,0494	0,951	25,507	0,1609	0,0084	0,6233	0,994	25,554	5,1993	0,0325	0,997

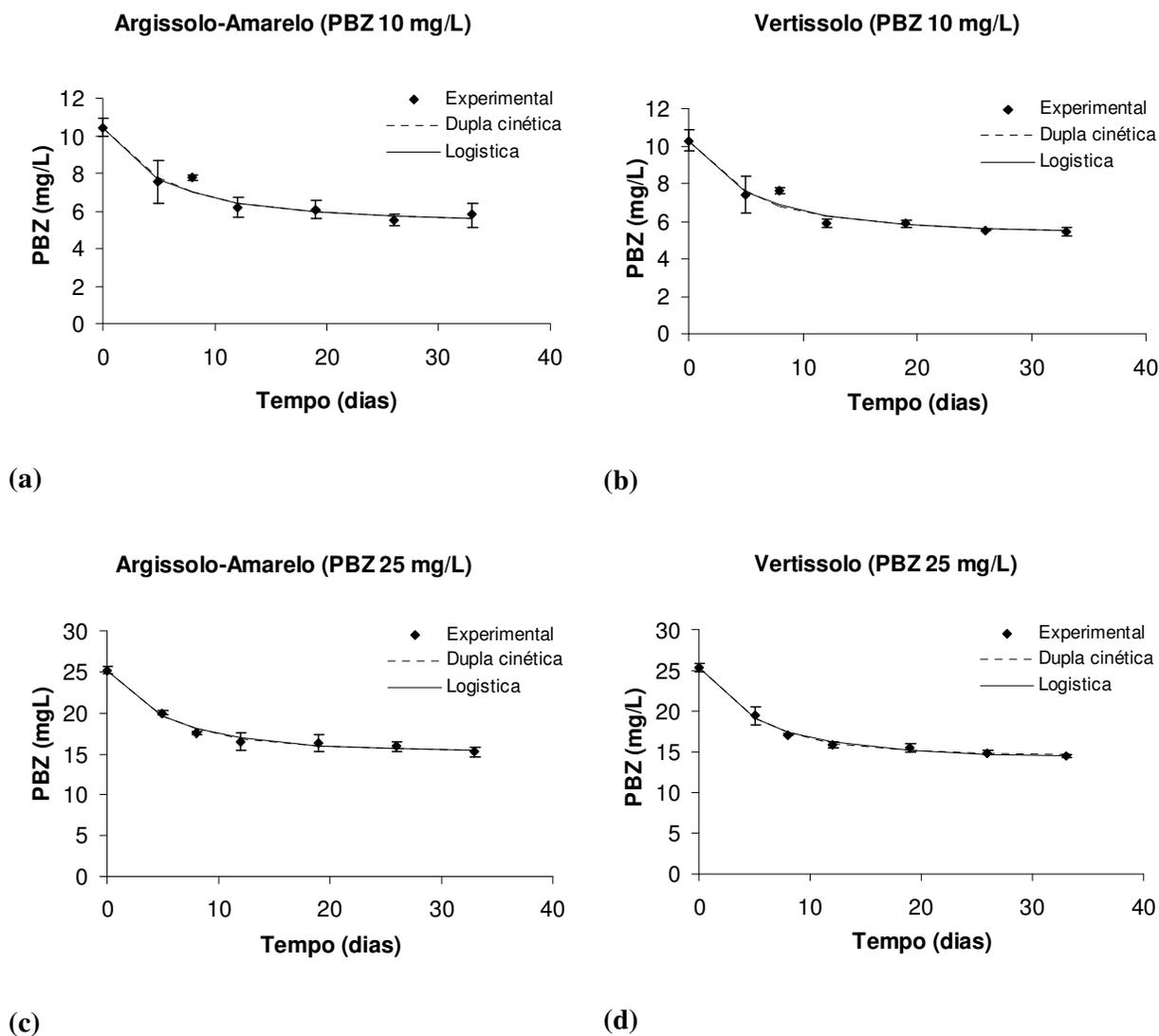


Figura 21 – Modelagens de dupla cinética de primeira ordem e logística aplicadas aos dados experimentais de biodegradação de paclobutrazol utilizando o mesmo como única fonte de carbono; (a) Argissolo-Amarelo – PBZ 10 mg/L; (b) Vertissolo – PBZ 10 mg/L; (c) Argissolo-Amarelo – PBZ 25 mg/L; (d) Vertissolo – PBZ 25 mg/L. Média de doze réplicas.

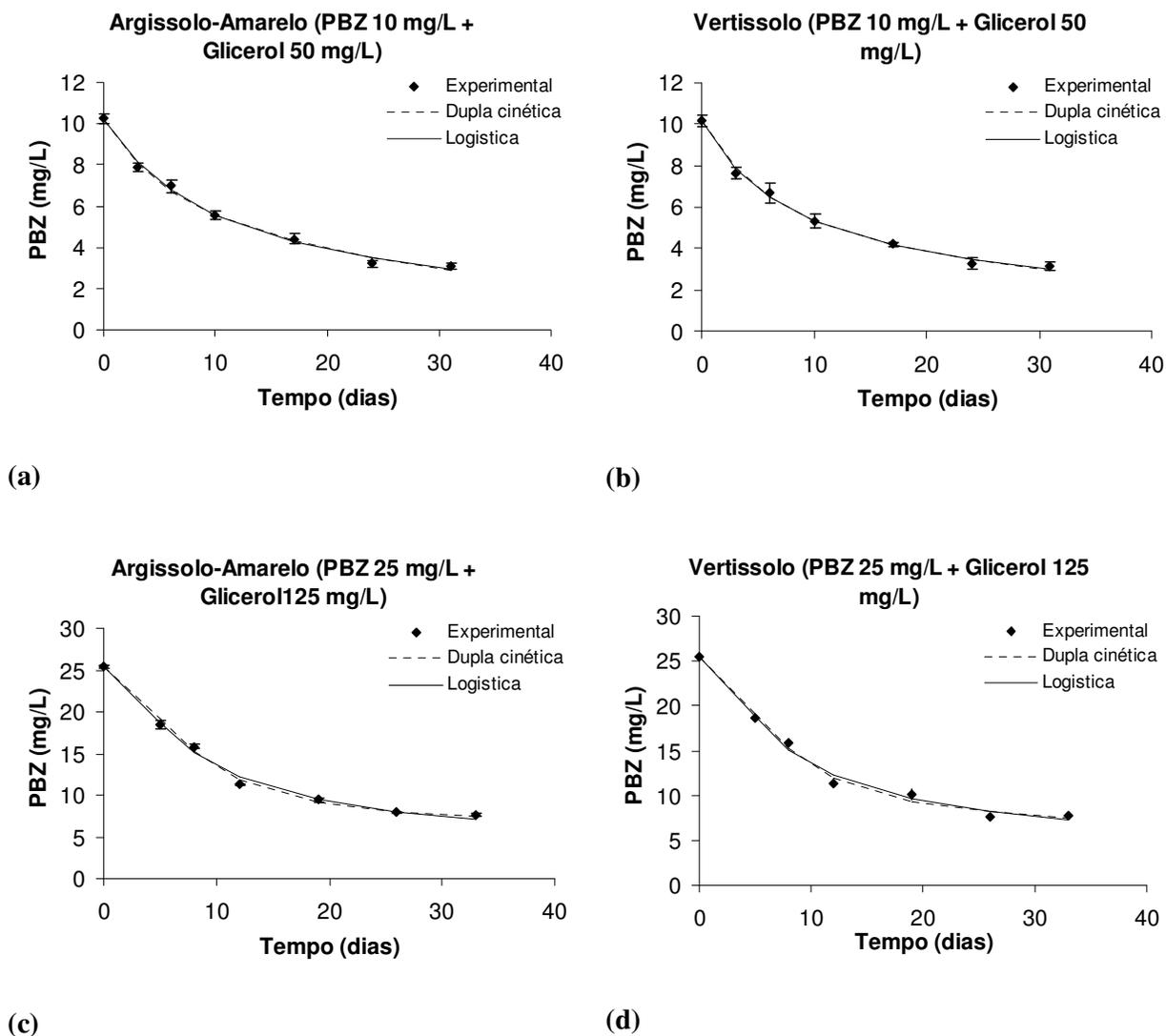


Figura 22 – Modelagens dupla cinética de primeira ordem e logística aplicadas aos dados experimentais de biodegradação de paclobutrazol utilizando PBZ adicionado de glicerol como fontes de carbono; (a) Argissolo-Amarelo – PBZ 10 mg/L e Glicerol 50 mg/L; (b) Vertissolo – PBZ 10 mg/L e Glicerol 50 mg/L; (c) Argissolo-Amarelo – PBZ 25 mg/L e Glicerol 125 mg/L; (d) Vertissolo – PBZ 25 mg/L e Glicerol 125 mg/L. Média de seis réplicas.

López-Galindo et al. (2010) utilizaram vários modelos para descrever a degradação de hipoclorito de sódio e de uma amina alifática (alquilamina). Dentre os modelos analisados por estes autores, os de maior êxito foram os de dupla cinética de primeira ordem e o logístico e o modelo que menos se ajustou foi o de cinética de primeira ordem, como no presente trabalho. Para estes autores, o modelo escolhido para melhor se ajustar a uma degradação, depende de como se sucede o processo degradativo do composto orgânico estudado.

Poucos são os trabalhos na literatura que descrevam a biodegradação de paclobutrazol, e menos ainda trabalhos sobre a modelagem desse processo. Silva et al. (2003c) fizeram um estudo de biodegradação desse composto diretamente no solo, sem adição de micro-organismos, ou seja, apenas como a participação dos micro-organismos presentes naturalmente no solo, e alcançaram 45,13% de biodegradação em 60 dias, no entanto, com 120 dias, a biodegradação era de apenas 49,79%. Esses dados mostram que em um primeiro momento o PBZ é degradado mais rápido e posteriormente, essa degradação segue bem lenta, o mesmo ocorreu nos ensaios realizados para este trabalho. Estes mesmos autores também utilizaram um modelo de cinética de primeira ordem, no entanto, o ajuste obtido por eles não foi tão bom.

Esse perfil observado na biodegradação do PBZ, em que a mesma é mais rápida no começo e praticamente cessa ao longo do tempo, foi o que fez com que não se obtivesse um bom ajuste com uma cinética de primeira ordem no presente trabalho. Entretanto, esse mesmo perfil foi o responsável pelo ótimo ajuste obtido quando se utilizou as equações de dupla cinética de primeira ordem e logística. Esse decréscimo característico, também foi observado em ensaios de biodegradação realizados em outros experimentos (SILVA et al., 2003c; VAZ, 2006).

Possivelmente, a biodegradação natural desse composto no solo pode levar mais tempo que os observados em laboratório, porém, através de uma sucessão ecológica microbiana essa biodegradação poderá chegar a 100%.

O coeficiente f obtido através do modelo de dupla cinética de primeira ordem, que corresponde a fração de PBZ que foi biodegradada durante a reação rápida, sendo de $0,392 \pm 0,032$ nos experimentos que utilizaram apenas PBZ como fonte de carbono (Figura 21) e nos experimentos com PBZ (10 mg/L) e glicerol (50 mg/L) (Figuras 22a e 22b). Isso significa que aproximadamente 40% da biodegradação de PBZ foi realizada mais rapidamente, numa taxa k_R que ficou em torno de $0,189 \pm 0,008 \text{ h}^{-1}$. Enquanto que 60% da biodegradação ocorreu numa taxa mais lenta k_L . Já nos experimentos utilizando as concentrações de 25 mg/L de PBZ e 125 mg/L glicerol, o coeficiente f foi de 0,683 e 0,623,

para os solos Argissolo-Amarelo e Vertissolo, respectivamente (Figuras 22c e 22d). De acordo com este resultado, 68% da biodegradação de PBZ em Argissolo-Amarelo ocorreu na fase rápida e 62% da biodegradação em Vertissolo correspondeu a esta mesma fase.

Através do modelo de dupla cinética de primeira ordem pode-se estimar quando a biodegradação total poderá ser alcançada. Consequentemente, por esse modelo também é possível calcular o tempo necessário para uma dada concentração inicial de PBZ se reduzir a metade (T_{50}).

Para os ensaios em que foi utilizado apenas o PBZ como fonte de carbono na concentração inicial de 10 mg/L, o T_{50} foi estimado em 50,7 dias para o Argissolo-Amarelo e 57,5 dias para o Vertissolo. Já para a concentração de PBZ de 25 mg/L, o T_{50} calculado aumentou para 200 e 150,6 dias, para o Argissolo-Amarelo e o Vertissolo, respectivamente. Na literatura considera-se o T_{50} do paclobutrazol no solo em torno de 0,5 dias a 1 ano (WORTHING; HANCE, 1994).

Os T_{50} estimados para os experimentos em que o glicerol foi utilizado como fonte adicional de carbono ao PBZ, apresentaram menores valores se comparados aos experimentos em que foi utilizado apenas PBZ como fonte de carbono. Para o Argissolo-Amarelo o T_{50} ficou em torno de 12,1 dias e para o Vertissolo 11,2 dias, quando o PBZ foi utilizado na concentração inicial de 10 mg/L. Nos experimentos em que a concentração inicial de PBZ foi de 25 mg/L, o T_{50} foi de aproximadamente 8,8 dias para o Argissolo-Amarelo e 8,9 dias para o Vertissolo. Esses resultados revelam que o glicerol, quando usado como fonte adicional de carbono, contribui para diminuir o T_{50} do PBZ. Para maiores concentrações de glicerol, o T_{50} diminui ainda mais.

Alguns trabalhos têm demonstrado esta habilidade do glicerol de aumentar a biodegradação de PBZ. Foi verificado, em outros experimentos, que a degradação de PBZ por *Pseudomonas aeruginosa* BB2-572, aumentou significativamente quando, além deste composto, os meios continham glicerol como fonte de carbono adicional (FIGUEIREDO et al., 2004; GONDIM et al., 2004). Em estudos com bactérias isoladas do solo, foi observada a degradação de 75% do paclobutrazol quando foi adicionado glicerol ao meio, contra apenas 47% de biodegradação sem a adição de glicerol (VAZ, 2006).

Vale ressaltar, que o T_{50} só foi obtido experimentalmente nos ensaios com PBZ adicionado de glicerol, nas duas concentrações e para os dois solos. Nos ensaios com apenas PBZ como fonte de carbono, os T_{50} foram estimados através do modelo de dupla cinética (modelo que melhor representou os dados experimentais). Os T_{50} obtidos tanto experimentalmente, quanto através do modelo de dupla cinética, para os experimentos com

PBZ e glicerol foram correspondentes. De acordo com esta observação, é possível crer que os T_{50} estimados por este mesmo modelo, para as outras situações estudadas neste trabalho, estejam provavelmente próximos do que seria observado.

Ao contrário do modelo de dupla cinética de primeira ordem, o modelo logístico não permite a estimativa do tempo de biodegradação total, nem do T_{50} , quando estes dados não foram determinados experimentalmente, pois o mesmo tende a uma curva assintótica não chegando a valores menores que o coeficiente K (concentração final) encontrado. Estes dados são de grande importância do ponto de vista ambiental, uma vez que se a biodegradação de PBZ seguir o proposto pelo modelo logístico o decaimento total e, em alguns casos, nem o decaimento a metade serão alcançados, ficando assim um residual acumulado no solo.

5 CONCLUSÕES

- A fonte de paclobutrazol utilizada (Sigma ou Cultar), o solo estudado (Argissolo-Amarelo ou Vertissolo), a concentração do produto (10 ou 25 mg/L) ou a realização do experimento em condições estéreis e não-estéreis não afetaram significativamente a biodegradação desse composto.
- A presença do glicerol como fonte de carbono adicional aumentou significativamente a biodegradação do PBZ em aproximadamente 20%.
- Nos experimentos em que foi utilizado o PBZ como única fonte de carbono, a biodegradação chegou a aproximadamente 43%, em 14 dias de experimento.
- Nos experimentos em que foram utilizados PBZ e glicerol como fonte adicional de carbono, os valores de biodegradação encontrados foram bastante satisfatórios, chegando a aproximadamente 70%, em 28 dias de experimento.
- Os modelos de cinética de dupla primeira ordem e logístico se ajustaram bem aos dados experimentais. Por meio do modelo cinético de dupla primeira ordem foi possível estimar o T_{50} para a biodegradação de PBZ. O T_{50} do PBZ foi de aproximadamente 55 dias quando este foi utilizado na concentração de PBZ de 10 mg/L e 170 dias quando a concentração foi de 25 mg/L, ambos com PBZ como única fonte de carbono. Quando foi utilizado o PBZ acrescido de glicerol, o tempo de meia-vida caiu para aproximadamente 10 dias, para ambas as concentrações de PBZ.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXANDER, M. Microbial Communities and Interactions: a Prelude. In: HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; MCINERNEY, M. J.; STETZENBACH, L. D.; WALTER, M. V. **Manual of Environmental Microbiology**. Ed. ASM Press, Washington, D. C., 1997. p. 5-13.

ARAÚJO, A. S. F. **Biodegradação, extração e análise de glifosato em dois tipos de solos**. 2002. 72 p. (Mestrado em Agronomia), Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 2002.

ARAÚJO, A. S. F.; MONTEIRO, R. T. R.; ABARKELI, R. B. Effect of glyphosate on the microbial activity of two Brazilian soils. **Chemosphere**, v. 52, p. 799-804, 2003.

ATTIYA, H. J.; FIELD, R. J.; HILL, G. D. Effects of PP333 and TIBA growth regulators on development and yield components of spring sown field beans (*Vicia faba* L.). **Proceedings of the Agronomy Society of New Zealand**, v. 13, p. 81-87, 1983.

AZEVEDO, P. V.; BERNARDO-SILVA, B. S.; SILVA, V. P. R. Water requirements of irrigated mango orchards in northeast Brazil. **Agricultural Water Management**, v. 58, p. 241-254, 2003.

BAKER, K. H. Bioremediation of surface and subsurface soils. In: BAKER, K. H & HERSON, D. S. **Bioremediation**. McGraw-Hill, Inc. New York, cap. 6, 1994, p. 203-249.

BAKER, K. H.; HERSON, D. S. Microbiology and biodegradation. In: _____. **Bioremediation**. McGraw-Hill, Inc. New York, cap. 1, 1994, p. 09-59.

BARRIUSO, E., CALVET, R., SCHIVANO, M.; G. SOULAS. Les pesticides et les polluants organiques des sols. Transformations et dissipation. **Études et Gestion des Sols**, v. 3, p. 279-296, 1996.

BELLINASO, M. L. **Estudo sobre a Biodegradação do Herbicida Trifluarina por Bactérias Isoladas de Solo Agrícola e Proposta Metodológica para o Ensino de Biodegradação**. Porto Alegre, 2002. 133p. Tese (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2002.

BESSE-HOGGAN, P.; ALEKSEEVA, T.; SANCELME, M.; DELORT, A. M.; FORANO, C. Atrazine biodegradation modulated by clays and clay/humic acid complexes. **Environmental Pollution**, v. 157, p. 2837-2844, 2009.

BRÜCKNER, R.; TITGEMEYER, F. Carbon catabolite repression in bacteria: choice of the carbon source and autoregulatory limitation of sugar utilization. **FEMS Microbiology Letters**, v. 209, p. 141-148, 2002.

BURPEE, L. L.; Effects of plant growth regulators and fungicides in *Rhizoctonia* blight of tall fescue. **Crop Protection**, v. 17, n. 6, p. 503-507, 1998.

CALDWELL, D. E.; WOLFAARDT, G. M.; KORBER, D. R.; LAWRENCE, J. R. Cultivation of Microbial Consortia and Communities. In: HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; MCINERNEY, M. J.; STETZENBACH, L. D.; WALTER, M. V. **Manual of Environmental Microbiology**, Ed. ASM Press, Washington, D. C., 1997. p.5-13.

CALLEGARI-JACQUES, S. M.; **Bioestatística**. Ed. Artmed, 2003, p. 153-157.

CALVET, R. Evaluation des coefficients d'adsorption et prediction de la mobilité des pesticides dans les sols. **Methodological aspects of the study of pesticides behaviour in soil**. INRA Versailles, França, 1988. p. 111-116.

CALVET, R.; TERCE, M.; ARVIEU, J.C. Adsorption des pesticides par les sols et leurs constituants. **Annales Agronomiques**, 31, p. 125-162, 1980.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915-929, 2002.

COSTA, M. A.; TORNISIELO, V. L.; REGITANO, J. B. Mobilidade do paclobutrazol em um solo franco-arenoso cultivado com manga no nordeste brasileiro. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, n. 5, p. 2177-2182, 2008.

DYKAAR, B. B.; KITANIDIS, P. K. Macrotransport of a biologically reacting solute through porous media. **Water Resources Research**, v. 32, n. 2, p. 307-320, 1996.

DUARTE FILHO, J.; ANTUNES, L. E. C.; PÁDUA, J. G. GA₃ e Paclobutrazol no florescimento e na produção de frutos em duas cultivares de morangueiro. **Horticultura Brasileira**, v. 22, n. 2, p. 202-205, 2004

EDELSTEIN-KESHET, L. **Mathematical Models in Biology**. Ed. Random House, New York, USA, 1988.

EMBRAPA MEIO AMBIENTE. Análise de risco de contaminação de águas superficiais e subterrâneas pelas características dos agrotóxicos aplicados em manga e uva. 2004. Disponível em: http://www.cnpma.embrapa.br/projetos/prod_int/result9.html. Acesso: março de 2010.

FAO STATISTICS. Disponível em: <http://faostat.fao.org/faostat/collections?subset=agriculture>, 2005. Acesso : março de 2010.

FERRACINI, V. L.; PESSOA, M. C. Y. P; SILVA, A. S.; SPADOTTO, C. A. Análise de risco de contaminação das águas subterrâneas e superficiais da região de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA). **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 11, p. 1-16, 2001.

FIGUEIREDO, C. M.; GONDIM, M. V. S.; GOUVEIA, E. R. Biodegradação de paclobutrazol e sua relação com a produção de biossurfactante. In: Congresso Nacional de Meio Ambiente, 3, 2004, Salvador. **Anais**, 2004.

FLETCHER, A., GILLEY, A.; SANKHLA, N.; DAVIES, T. Triazoles as plant growth regulators and stress protectants. **Horticultural Reviews**, v. 24, p. 55-138, 2000.

FONSECA, N.; NETO, M. T. C.; LEDO, C. A. S. Paclobutrazol e estresse hídrico no florescimento e produção da mangueira (*Mangifera indica*) 'Tommy Atkins'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 27, n. 1, p. 21-24, 2005.

FOSTER, L. J.; KWAN, B. H.; VANCOV, T. Microbial Degradation of Organophosphate Pesticide, Ethion. **FEMS Microbiology Letters**, v. 240, p. 49-53, 2004.

FUJISAWA, T.; ICHISE, K.; FUKUSHIMA, M.; KATAGI, T.; TAKIMOTO, Y. Improved Uptake Models of Nonionized Pesticides to Foliage and Seed of Crops. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 532–537, 2002.

GANG, D. C.; CLEVINGER, T. E.; BANERJI, S. K. Modeling Chlorine Decay in Surface Water. **Journal of Environmental Informatics**, v. 1, p. 21- 27, 2003.

GHAZALI, F. M.; RAHMAN, R. N. Z. A.; SALLEH, A. B.; BASRI, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 54, p. 61-67, 2004.

GONDIM, M. V. S.; FIGUEIREDO, C. M.; GOUVEIA, E. R. Aumento da degradação de paclobutrazol por *Pseudomonas aeruginosa*. In: Congresso Nacional de Meio Ambiente, 3, 2004, Salvador. **Anais**, 2004.

GOSS, D. W. Screening procedure for soils and pesticides for potential water quality impacts. **Weed Technology**, v. 6, n. 3, p. 701-708, 1992.

GREEN. R. E.; KARICKHOFF, S. W. Sorption estimates for modeling. **Pesticides in the soil environment: Processes, Impacts and Modeling**. H. H. Cheng (ed). Soil Science Society of America Book Series USA (Number 2), 1990. 530 p.

HAMPTON J. G. Effect of growth retardant soil residues on succeeding agricultural crops. **New Zealand Journal of Experimental Agriculture**, v. 16, p. 167-172, 1988.

HARVEY, R. W. In situ and laboratory methods to study subsurface microbial transport. In: HURST, C. J.; KNUDSEN, G. R.; MCINERNEY, M. J.; STETZENBACH, L. D.; WALTER, M. V. **Manual of Environmental Microbiology**, Ed. ASM Press, Washington, D. C., 1997. p. 5-13.

HILLEL, D. **Environmental Soil Physics**. New York: Academic Press, 1998. 771 p.

HO, K. L.; LIN, B.; CHEN, Y. Y.; LEE, D. J. Biodegradation of phenol using *Corynebacterium* sp. DJ1 aerobic granules. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5051-5055, 2009.

JACKSON, M. J.; LINE, M. A.; HASAN, O. Microbial degradation of a recalcitrant plant growth retardant – paclobutrazol (PP333). **Soil Biology & Biochemistry**, v. 28, n. 9, p. 1265-1267, 1996.

JACOBS, K. A.; BERG, L. C. Inhibition of fungal pathogens of woody plants by the plant growth regulator paclobutrazol. **Pest Management Science**, v. 56, p. 407-412, 2000.

JAVOREKOVÁ, S.; STEVLÍKOVÁ, T.; LABUDA, R.; ONDRISÍK, P. Influence of xenobiotics on the biological soil activity. **Journal Central European Agriculture**, v.2, n. 3-4, p. 191-198, 2001.

JONSSON, C. M.; FERRACINI, V. L.; PARAÍBA, L. C.; RANCEL, M.; AGUIAR, S. R. Alterações Bioquímicas e Acúmulo em Pacus (*Metynnis argenteus*) expostos ao paclobutrazol. **Scientia Agricola**, v. 59, n. 3, p. 441-446, 2002.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective Media for Isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas*, and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v. 60, p. 969-976, 1970.

KANAZAWA, J. Measurement of the bioconcentration factors of pesticides by freshwater fish and their correlation with physicochemical properties or acute toxicities. **Pesticide Science**, v. 12, p. 417-424, 1981.

KARGI, F.; EKER, S. Kinetics of 2,4-diclorofenol Degradation by *Pseudomonas putida* CPI in Batch Culture. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 55, nº. 1, p. 25-28, 2005.

KARPOUZAS, D. G.; WALKER, A. Factors influencing the ability of *Pseudomonas putida* epI to degrade ethoprophos in soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 32, p. 1753-1762, 2000.

KING, E. O., WARD, M. K. E RANEY, D. E. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 44, p. 301-307, 1954.

LAPAT-POLASKO, L. T.; MCCARTY, P. L.; ZEHNDER, A. J. B. Secondary substrate utilization of methylene chloride by an isolated strain *Pseudomonas* sp. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 825-830, 1984.

LEE, K. PARK, J. W., AHN, I. S. Effect of additional carbon source on naphthalene biodegradation by *Pseudomonas putida* G7. **Journal of Hazardous Materials**, p. 157-167, 2003.

LÓPEZ-GALINDO, C.; GARRIDO, M. C.; CASANUEVA, J. F.; NEBOT, E. Degradation models and ecotoxicity in marine waters of two antifouling compounds: Sodium hypochlorite and an alkylamine surfactant. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 1779–1785, 2010.

MARTINS, J. **Les aspects hydrodynamiques, physico-chimiques et biologiques du devenir des pesticides dans les sols: application au transfert du pentachlorophenol en colonnes**. 1993. 307 p. (Doutorado) – Université Joseph Fourier, Grenoble I, França, 1993.

MARTINS, J. M. F.; MERMOUD, A. Sorption and biodegradation of four nitroaromatic herbicides in mono and multi-solute saturated/unsaturated soil batch systems. **Journal of Contaminant Hydrology**. v. 33, p. 187-210, 1998.

MCARTHUR, D. A. J.; EATON, G. W. Effect of fertilizer, paclobutrazol and chlormequat on strawberry. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v. 112, n. 2, p. 241-246, 1987.

MCLEISH, R.; ESSENBERG, C. **Chlorobenzene Graphical Pathway Map.**, 2004. Disponível em: <http://umbbd.ahc.umn.edu/cb/cb_image_map.html>. Acesso em: 11 nov. 2005.

MELO, I. S. Bactérias Aceleram Processo de Biodegradação de Agrotóxicos Agrícolas. 2006. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/.../Itamar_bacteriasID-ddTrRTzgZV.pdf> Acesso em: 05 de Abril de 2010.

MENDONÇA, V.; NETO, S. E. A.; HAFLE, O. M.; MENEZES, J. B.; RAMOS, J. D. Florescimento e frutificação de mangueira com uso de paclobutrazol, ethephon e nitrato de cálcio. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 23, n. 2, p. 265-269, 2001.

MILFONT, M. L. **Transporte de Sorção do Agroquímico Paclobutrazol em Solos Irrigados Cultivados com Manga**. 2006. 127p. (Doutorado em Tecnologias Energéticas e Nucleares) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2006.

MILFONT, M. L.; ANTONINO, A. C. D.; MARTINS, J. M. F.; NETTO, A. M.; GOUVEIA, E. R.; CORREA, M. M. Transporte do Paclobutrazol em Colunas de Solo. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 32, p. 2165-2175, 2008.

MONTEIRO, R. T. Degradação de Pesticidas. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**, Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 1997. p. 107-124.

MONTEIRO, R. T. R. Biodegradação de pesticidas em solos brasileiros. In: MELO, I. S.; SOUZA, C. M. M.; SCRAMIN, S.; SPESSOTO, A. **Biodegradação**. Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2001. p. 1-14.

MOREELS, D.; BASTIAENS, L.; OLLEVIER, F.; MERCKX, R.; DIELS, L.; SPRINGAEL, D. Evaluation of the intrinsic methyl tert-butyl ether (MTBE) biodegradation potential of hydrocarbon contaminated subsurface soils in batch microcosm systems. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 49, p. 121-128, 2004.

MOUCO, M. A. C.; ALBUQUERQUE, J. A. S. Efeito do paclobutrazol em duas épocas de produção da mangueira. **Bragantia**, v. 64, n. 2, p. 219-225, 2005.

MUSUMECI, M. R. Defensivos agrícolas e sua interação com a microbiota do solo. In: CARDOSO, E. J. B. N.; TSAI, S. M.; NEVES, M. C. P. **Microbiologia do Solo**, Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. p. 341-356.

NIELSEN, J.B.; ANDERSEN, H.R. Dermal in vitrol penetration of methiocarb, paclobutrazol, and pirimicarb: effect of nonylphenoethoxylate and protective gloves. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. 2, 2001.

PACHECO, P. Brasil lidera uso mundial de agrotóxicos. **Estadão**, 2009. Disponível em: <<http://www.estadao.com.br>>. Acesso em: 01 abr. 2010.

PAMUKOGLU, M. Y.; KARGI, F. Biodegradation kinetics of 2,4,6-trichlorophenol by *Rhodococcus rhodochrous* in batch culture. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 43-47, 2008.

PASSOS, C. T.; BURKERT, J. F. M.; KALI, S. J.; BURKERT, C. A. V. Biodegradação de Fenol por uma Nova Linhagem de *Aspergillus* sp. Isolada de um Solo Contaminado do Sul

do Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 950-954, 2009.

RIBEIRO, M. L.; LOURENCETTI, C.; PEREIRA, S. Y.; MARCHI, M. R. R. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p.688-694, 2007.

RIGITANO, R. L. O.; ALVES, A. D.; SOUZA, J. C.; FRANCO, A. A. Degradação do inseticida- nematicida Aldicarb em solos sob vegetação nativa e sob cultura do cafeeiro. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, p. 1295-1300, 2001.

SANTOS, C. H.; KLAR, A. E.; FILHO, H. G.; RODRIGUES, J. D.; PIERRE, F. C. Indução do florescimento e crescimento de tangerineira 'Poncã' (*Citrus reticulata* Blanco) em função da irrigação e da aplicação de paclobutrazol. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 1, p. 08-12, 2004.

SCHMIDT, S. K.; SCOW, K. M.; ALEXANDER, M. Kinetics of paranitrophenol mineralization by a *Pseudomonas* sp.: Effects of second substrates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 2617-2623, 1987.

SCORZA JÚNIOR, R. P.; RIGITANO, R. L. O. Comportamento Ambiental do Inseticida Thiamethoxam em um Latossolo Vermelho Distroférico de Dourados, MS. **Boletim de pesquisa e desenvolvimento – EMBRAPA**, v. 49, p. 01-22, 2009.

SHARMA, D.; AWASTHI, M. D. Uptake of soil applied paclobutrazol in mango (*Mangifera indica* L.) and its persistence in fruit in soil. **Chemosphere**, v. 60, p. 164-169, 2005.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. Persistência e biomagnificação de moléculas xenobióticas. In: MELO, I. S.; AZEVEDO, J. L. **Microbiologia Ambiental**, Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 1997. p. 67-105.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; CASTRO, V. L. Xenobióticos e seus Impactos Ambientais. In: SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. **Impacto Ambiental do Regulador de Crescimento Vegetal Paclobutrazol**, Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2003b. p. 15-35.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; JONSSON, C. M. Paclobutrazol – Regulador de crescimento vegetal. In: SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. **Impacto Ambiental do Regulador de Crescimento Vegetal Paclobutrazol**, Jaguariúna: EMBRAPA Meio Ambiente, 2003a. p. 09-14.

SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; VIEIRA, R. F. Degradação de paclobutrazol em solos tropicais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 10, 2003c. p. 1223-1227.

SINGH, Z. Effect of (2RS, 3RS) paclobutrazol on tree vigour, flowering, fruit set and yield in mango, **Acta Horticulturae**, v. 525, p. 459–462, 2000.

SINGH, B. K.; WALKER, A.; MORGAN, J. A. W.; WRIGHT, D. J. Effects of soil pH on the biodegradation of Chlorpyrifos and Isolation of a Chlorpyrifos-Degrading Bacterium. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n.9, p. 5198-5206, 2003.

SINGH, V. K.; BHATTACHERJEE, A. K. Genotypic response of mango yield to persistence of paclobutrazol in soil. **Scientia Horticulturae**, v. 101, n. 1, p. 53-59, 2005.

SIQUEIRA, D. P.; BARCENA, J. L. G.; ESPOSTI, M. D. D. Florescimento de tangerineiras satsuma ‘Owari’ tratadas com paclobutrazol, anelamento do caule e baixa temperatura. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 26, n. 3, p. 406-409, 2004.

SMITH, D.; ALVEY, S.; CROWLEY, D. E. Cooperative Catabolic Pathways within an Atrazine-Degrading Enrichment Culture Isolated from Soil. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 53, nº. 2, p. 265-273, 2005.

SOARES, W. L.; PORTO, M. F. Atividade agrícola e externalidade ambiental: uma análise a partir do uso de agrotóxicos no cerrado brasileiro. **Ciências e Saúde Coletiva**, v.12, n.01, 131-143, 2007.

SPACIE, A.; HAMELINK, J. L. Bioaccumulation. In: RAND, G. R.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology**. Hemisphere Publishing Corporation, New York, 1985. p. 495-525.

SPOSITO, G. **The surface chemistry in soils**. New York: Oxford University Press, 1989. 234p.

STEPHENS, S.; KOTHARU, P. Atrazine **Degradation Graphical Pathway Map 1**. 2002a. Disponível em: <http://umbbd.ahc.umn.edu/atr/atr_image_map1.html> Acesso em: 11 de Novembro de 2005.

STEPHENS, S.; KOTHARU, P. Atrazine **Degradation Graphical Pathway Map 2**. 2002b. Disponível em: <http://umbbd.ahc.umn.edu/atr/atr_image_map2.html> Acesso em: 11 de Novembro de 2005.

TEIXEIRA, A. Xenobióticos X Orgânicos: Aditivos alimentares e produtos livres de agrotóxicos contêm pontos positivos e negativos em relação às suas propriedades nutricionais **Revista Nutrir**, out, p. 46-51, 2009.

TORTORA, G.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Crescimento Microbiano. **Microbiologia**, ed. 6ª, Ed. Artmed S. A., Cap. 6, 1998. p.154-180.

TRAPP, S.; RASMUSSEN, D.; SAMSØE-PETERSEN, L. Fruit tree model for uptake of organic compounds from soil. **Sar and Qsar in Environmental Research**, v. 14, n. 1, p. 17-26, 2003.

UETA, J. PEREIRA, N. L.; SHUHAMA, I. K.; CERDEIRA, A. L. **Biodegradação de herbicidas e biorremediação - Micro-organismos degradadores do herbicida Atrazina**. 17 de novembro de 2002. Disponível em: <<http://www.herbario.com.br/bot/toxicologia/biodegre.htm>>. Acesso em: 02 out. 2007.

VAZ, F. L. **Avaliação sobre a biodegradação de paclobutrazol utilizando culturas mistas de bactérias**. 2006. 83p. (Mestrado em biotecnologia de produtos bioativos) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2006.

VAZ, F. L.; MILFONT, M. L. B.; SOUTO-MAIOR, A. M.; GOUVEIA, E. R.; Determinação de Paclobutrazol em Amostras Aquosas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. **Química Nova**. v. 30, p. 281-283, 2007.

VERGIEVA, T. Single day treatment - a feasible tool in revealing not dependent on maternal toxicity teratogenic potential. **Advanced Experimental Medical Biology**, v. 444, p. 191-199, 1998.

VOGUE, P. A.; KERLE, E. A.; JENKINS, J. J. **OSU extension pesticides properties database**, 1994. Disponível em: <http://npic.orst.edu/ppdmove.htm>. Acesso em: 02 out. 2007.

WALKER A. A simulation model for prediction of herbicide persistence. **Journal of Environmental Quality**, v. 3, p. 396-401, 1974.

WHYTE, L.; BOURBONNIÈRE, L.; GREER, C. W. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychotropic *Pseudomonas* strains processing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 9, p. 3719-3723, 1997.

WORTHING, C. R.; HANCE, R. H. **The pesticide manual**, 11 ed. Farnham: The British Crop protection council, 1994. p. 765-766.

ANEXO A - Médias dos crescimentos dos micro-organismos em UFC/mL nos ensaios com paclobutrazol como única fonte de carbono.

		0 dias	14 dias	21 dias
PBZ (Sigma) estéril	Argissolo-Amarelo (10 mg/L)	8,70.10 ⁶	1,60.10 ⁷	2,95.10 ⁷
	Argissolo-Amarelo (25 mg/L)	9,10.10 ⁶	1,85.10 ⁷	3,00.10 ⁷
	Vertissolo (10 mg/L)	9,60.10 ⁶	1,46.10 ⁷	2,96.10 ⁷
	Vertissolo (25 mg/L)	9,70.10 ⁶	1,50.10 ⁷	3,12.10 ⁷
	Argissolo-Amarelo (controle)	0	0	0
	Vertissolo (controle)	0	0	0
PBZ (Cultar) estéril	Argissolo-Amarelo (10 mg/L)	9,10.10 ⁶	2,40.10 ⁷	3,10.10 ⁷
	Argissolo-Amarelo (25 mg/L)	9,30.10 ⁶	1,90.10 ⁷	3,50.10 ⁷
	Vertissolo (10 mg/L)	9,50.10 ⁶	2,30.10 ⁷	3,30.10 ⁷
	Vertissolo (25 mg/L)	9,90.10 ⁶	2,50.10 ⁷	3,34.10 ⁷
	Argissolo-Amarelo (controle)	0	0	0
	Vertissolo (controle)	0	0	0
PBZ (sigma) não-estéril	Argissolo-Amarelo (10 mg/L)	1,49.10 ⁷	2,47.10 ⁷	3,15.10 ⁷
	Argissolo-Amarelo (25 mg/L)	1,58.10 ⁷	2,35.10 ⁷	2,98.10 ⁷
	Vertissolo (10 mg/L)	1,51.10 ⁷	2,23.10 ⁷	2,89.10 ⁷
	Vertissolo (25 mg/L)	1,47.10 ⁷	3,10.10 ⁷	3,25.10 ⁷
	Argissolo-Amarelo (controle)	1,40.10 ²	2,10.10 ²	2,90.10 ²
	Vertissolo (controle)	1,50.10 ²	2,00.10 ²	2,80.10 ²
PBZ (cultar) não-estéril	Argissolo-Amarelo (10 mg/L)	2,30.10 ⁷	2,40.10 ⁷	3,25.10 ⁷
	Argissolo-Amarelo (25 mg/L)	2,00.10 ⁷	2,45.10 ⁷	3,18.10 ⁷
	Vertissolo (10 mg/L)	2,30.10 ⁷	2,56.10 ⁷	3,36.10 ⁷
	Vertissolo (25 mg/L)	2,10.10 ⁷	2,70.10 ⁷	3,40.10 ⁷
	Argissolo-Amarelo (controle)	1,50.10 ²	2,30.10 ²	2,70.10 ²
	Vertissolo (controle)	1,52.10 ²	2,23.10 ²	2,80.10 ²

Média de três replicatas

ANEXO B - Médias dos crescimentos dos micro-organismos em UFC/mL nos ensaios com paclobutrazol e glicerol (fonte adicional de carbono).

	Solo	[PBZ]	Tempo			
			0 dias	14 dias	21 dias	35 dias
Condição estéril	Argissolo-Amarelo	10 mg/L	$3,57.10^7$	$1,30.10^8$	$3,30.10^8$	$3,90.10^8$
		25 mg/L	$4,36.10^7$	$2,60.10^8$	$4,11.10^8$	$5,00.10^8$
	Vertissolo	10 mg/L	$4,05.10^7$	$1,50.10^8$	$2,89.10^8$	$3,50.10^8$
		25 mg/L	$4,53.10^7$	$2,50.10^8$	$4,83.10^8$	$4,86.10^8$
	Argissolo-Amarelo controle	25 mg/L	0	0	0	0
	Vertissolo controle	25 mg/L	0	0	0	0
Condição não-estéril	Argissolo-Amarelo	10 mg/L	$4,22.10^8$	$3,50.10^9$	$4,70.10^9$	$3,50.10^9$
		25 mg/L	$3,87.10^8$	$7,45.10^9$	$8,85.10^9$	$8,45.10^9$
	Vertissolo	10 mg/L	$3,99.10^8$	$2,96.10^9$	$5,06.10^9$	$4,88.10^9$
		25 mg/L	$4,10.10^8$	$8,70.10^9$	$7,87.10^9$	$8,88.10^9$
	Argissolo-Amarelo controle	25 mg/L	$1,30.10^2$	$4,00.10^3$	$5,20.10^3$	$2,30.10^4$
	Vertissolo controle	25 mg/L	$1,42.10^2$	$3,86.10^3$	$6,95.10^3$	$1,90.10^4$

ANEXO C - Análise estatísticas dos dados de biodegradação.

PBZ (Sigma) x PBZ (Cultar) estéril e não-estéril					
Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Entre grupos	332.1884	15	22.1459	1.435	1.992
Dentro dos grupos	291.0376	32	9.0949		
PBZ (Sigma) x PBZ (Cultar) estéril					
Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Entre grupos	61.9028	7	8.8433	2.768	2.657
Dentro dos grupos	51.1271	16	3.1954		
PBZ (Sigma) x PBZ (Cultar) não-estéril					
Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Entre grupos	251.7384	7	35.9626	2.398	2.657
Dentro dos grupos	239.9105	16	14.9944		
PBZ (Cultar) x PBZ (Cultar) + Glicerol estéril e não-estéril					
Fonte de variação	Soma Quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	F _{tabelado}
Entre grupos	10664.1986	15	710.9466	176.344	1.992
Dentro dos grupos	129.0109	32	4.0316		