

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS**

**BIANCA GOUVEA DAMASCENO**

ESTUDO DE DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DO 2,4D EM REATOR ANAERÓBIO HORIZONTAL DE LEITO FIXO (RAHLF) INOCULADO COM MICRORGANISMOS ENRIQUECIDOS PROVENIENTES DO SEDIMENTO DO RESERVATÓRIO DE ITAIPÚ-PR.

**Poços de Caldas/MG**

**2023**

**BIANCA GOUVEA DAMASCENO**

ESTUDO DE DEGRADAÇÃO ANAERÓBIA DO 2,4D EM REATOR ANAERÓBIO HORIZONTAL DE LEITO FIXO (RAHLF) INOCULADO COM MICRORGANISMOS ENRIQUECIDOS PROVENIENTES DO SEDIMENTO DO RESERVATÓRIO DE ITAIPÚ-PR.

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Tratamento de Efluentes.

Orientador: Prof. Dr. Gunther Brucha.  
Coorientador: Prof. Dr. Leonardo Henrique Soares Damasceno.

**Poços de Caldas/MG**

**2023**

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Campus Poços de Caldas

Damasceno, Bianca Gouvea.

Estudo de degradação anaeróbia do 2,4D em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) inoculado com microrganismos enriquecidos provenientes do sedimento do reservatório de Itaipú-PR. / Bianca Gouvea Damasceno. - Poços de Caldas, MG, 2023.

49 f. : il. -

Orientador(a): Gunther Brucha.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) -Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2023.

Bibliografia.

1. Biorremediação anaeróbia. 2. Herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético. 3. 2,4D. 4. Tratamento anaeróbio. 5. Reator anaeróbio horizontal de leito fixo. I. Brucha, Gunther, orient. II. Título.

## BIANCA GOUVEA DAMASCENO

### **Estudo de degradação anaeróbia do 2,4d em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) inoculado com microrganismos enriquecidos provenientes do sedimento do reservatório de Itaipú-PR**

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

**Aprovada em: 27 de janeiro de 2023.**

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

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

Profa. Dra. Flávia Talarico Saia  
Instituição: Universidade Federal de São Paulo



Documento assinado eletronicamente por **Rafael Brito de Moura, Professor do Magistério Superior**, em 10/02/2023, às 14:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gunther Brucha, Professor do Magistério Superior**, em 16/02/2023, às 11:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Flávia Talarico Saia, Usuário Externo**, em 19/02/2023, às 17:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orga\\_o\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orga_o_acesso_externo=0), informando o código verificador 0908617 e o código CRC EF47994C.

A Deus, em primeiro lugar pela minha vida, e por me sustentar em todos os obstáculos encontrados ao longo do curso.

Aos meus queridos pais, Elaine Cristina Gouvea Damasceno e Heler Rubens Alexandre Damasceno, que me motivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava a realização deste trabalho.

A minha irmã, Fabiana Gouvea Damasceno, que sempre me apoiou nessa etapa desafiadora da minha vida.

E ao meu noivo, Felipe Augusto Teixeira, por me motivar a finalizar este trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos professores, Dr. Gunther Brucha, Dr. Rafael Brito de Moura, Dra. Flávia Talarico e Dr. Leonardo Henrique Soares Damasceno, pelas correções e ensinamentos que me permitiram apresentar um melhor desempenho no meu processo de formação acadêmica e profissional.

À Itaipu pelo fornecimento das amostras de sedimento que foram utilizadas para realização deste projeto.

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

## RESUMO

Os agrotóxicos atuam com a finalidade de elevar a produção agrícola em níveis proporcionais a demanda por alimento, que cresceu exponencialmente nas últimas décadas devido ao aumento da população mundial, logo, seu uso se tornou desmedido e indiscriminado. Devido ao potencial tóxico destes produtos e sua utilização em enormes doses, se tornou recorrente fonte de contaminação nas matrizes ambientais no país. Com o propósito de recuperar os ambientes afetados e minimizar os impactos provenientes desses poluentes, o desenvolvimento de processos eficientes para o tratamento na erradicação desses elementos do meio ambiente é alvo de pesquisas. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o desempenho do biorreator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) na degradação do herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D), um dos agrotóxicos mais utilizados atualmente no mundo, em condições anaeróbias e a nível de oxidação metanogênica. A validação dos resultados se deu através da detecção do 2,4D e intermediários por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e confirmou o potencial do mesmo. O reator foi inoculado com sedimento do reservatório de Itaipu, previamente enriquecido sob condições metanogênicas na presença de 2,4D na concentração de 1mg/L, no período de 376 dias, com acompanhamento semanal do consumo da matéria orgânica via espectrometria, alcançando no 89º dia de incubação remoção de aproximadamente 97% de DQO. O decaimento acentuado e constante de DQO confirmou fortemente a presença de atividade biológica ativa e eficiente, fazendo-se necessário a alimentação com fontes decarbono (0,01 mg/L de Lactato de Sódio e 0,01 mg/L de Acetato de Potássio), periodicamente do meio. Após a inoculação, o reator foi operado com um TDH de 88 horas, durante 60 dias, atingindo estabilidade a partir do 27º dia de operação com uma média razoável de 63% de eficiência de remoção, tendo tido seu melhor desempenho no 38º dia com aproximadamente 96,52%, saindo da concentração inicial de 0,59 mg/L e chegando a 0,02 mg/L de 2,4D. Foi comprovado remoção eficiente do 2,4D em todas as amostras coletadas durante a operação do RAHLF, na ordem entre 14,79 a 96,52%. Também, no 34º dia, foi reconhecido a transformação completa do 2,4D, pois foram detectados, em concentrações-traços, todos os intermediários do 2,4D pertencentes a rota de degradação anaeróbia adotada nesse trabalho, com de 0,385 mg/L de 2,4D; 0,103 mg/L de 2,4DCP; 0,130 mg/L de 4CP e 0,052 mg/L de fenol na amostra efluente.

**Palavras-chave:** biorremediação anaeróbia; herbicida ácido 2,4-diclorofenoxiacético; 2,4D; tratamento anaeróbio; reator anaeróbio horizontal de leito fixo.

## ABSTRACT

Pesticides act with the purpose of increasing agricultural production at levels proportional to the demand for food, which has grown exponentially in recent decades due to the increase in world population. Due to the toxic potential of these products and their use in huge doses, they have become a recurrent source of contamination in the environmental matrices in the country. In order to recover the affected environments and minimize the impacts from these pollutants, the development of efficient processes for the treatment in the eradication of these elements from the environment is the target of research. The main objective of this work was to evaluate the performance of the horizontal anaerobic fixed bed bioreactor (RAHLF) in the degradation of the herbicide 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4D), one of the most used pesticides in the world today, under anaerobic conditions and at methanogenic oxidation level. The validation of the results was done through the detection of 2,4D and intermediates by high performance liquid chromatography (HPLC) and confirmed its potential. The reactor was inoculated with sediment from the Itaipu reservoir, previously enriched under methanogenic conditions in the presence of 2,4D at a concentration of 1mg/L, during 376 days, with weekly monitoring of the consumption of organic matter via spectrometry, reaching in the 89th day of incubation removal of approximately 97% of COD. The accentuated and constant decay of COD strongly confirmed the presence of active and efficient biological activity, making necessary the feeding of carbon sources (0.01 mg/L of Sodium Lactate and 0.01 mg/L of Potassium Acetate), periodically of the medium. After the inoculation, the reactor was operated with a TDH of 88 hours for 60 days, reaching stability from the 27th day of operation with a reasonable average of 63% of removal efficiency, having had its best performance on the 38th day with approximately 96.52%, leaving the initial concentration of 0.59 mg/L and reaching 0.02 mg/L of 2,4D. It was proven efficient removal of 2,4D in all samples collected during the RAHLF operation, in the order between 14.79 to 96.52%. Also, on the 34th day, the complete transformation of 2,4D was recognized, since all the intermediates of 2,4D belonging to the anaerobic degradation route adopted in this study were detected in trace concentrations, with 0.385mg/L of 2,4D; 0.103 mg/L of 2,4DCP; 0.130 mg/L of 4CP and 0.052 mg/L of phenol in the effluent sample.

**Keywords:** anaerobic bioremediation; dichlorophenoxyacetic acid herbicide; 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid herbicide; 2,4D; anaerobic treatment; fixed bed horizontal anaerobic reactor.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>09</b>
1.1	OBJETIVOS .....	10
1.1.1	Objetivo Geral.....	10
1.1.2	Objetivos Específicos .....	10
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>11</b>
2.1	AGROTÓXICOS.....	11
2.1.1	A história do 2,4-d .....	12
2.1.2	Mecanismos de ação.....	13
2.1.3	Caracterização química.....	13
2.1.4	Toxicidade.....	14
2.1.5	Comportamento ambiental do 2,4D .....	15
2.1.6	Biodegradação de ambientes contaminados com pesticidas .....	16
2.1.7	Degradação anaeróbia do 2,4D.....	16
2.2	REATOR ANAERÓBIO HORIZONTAL DE LEITO FIXO – RAHLF .....	18
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
3.1	SEDIMENTO.....	19
3.2	ENSAIOS DE ENRIQUECIMENTO.....	22
3.2.1	Composição do ensaio de enriquecimento .....	22
3.2.2	Ensaio de enriquecimento .....	24
3.3	REATOR ANAERÓBIO HORIZONTAL DE LEITO FIXO .....	26
3.3.1	Características do RAHLF .....	29
3.3.2	Inoculação do RAHLF.....	30
3.3.3	Ensaio no RAHLF .....	31
3.4	QUANTIFICAÇÃO DO 2,4D E SEUS INTERMEDIÁRIOS .....	31
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
4.1	ENRIQUECIMENTO – FASE 1 .....	33
4.2	ENRIQUECIMENTO – FASE 2.....	34
4.3	INOCULAÇÃO DO RAHLF .....	36
4.4	RESULTADOS RAHLF.....	37
4.4.1	Demanda Química de Oxigênio - DQO.....	37
4.4.2	Degradação 2,4D .....	38
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>44</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>43</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A agricultura é uma das maiores atividades constituintes do setor primário, representando dos segmentos de maiores impactos no âmbito da economia global, além de ser responsável por exercer o papel imprescindível de alimentar o mundo. Em vista disso, nos leva a uma segunda constatação: o acréscimo na demanda por alimentos ocasionada pelo crescimento exponencial contemporâneo da população mundial.

De acordo com o relatório anual do Produto Interno Bruto (PIB), calculado pelo Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada (CEPEA), da Esalq /USP, em parceria com a Confederação da Agricultura do Brasil (CNA), o setor agrícola brasileiro corresponde atualmente a 4,3% do PIB nacional, equivalente a movimentação de R\$ 48 bilhões, em volume de exportações anuais (CEPEA;CNA, 2021).

Devido ao cenário exposto, é empregado como estratégia o uso crescente de defensivos agrícolas nas plantações, visando potencializar a produtividade de alimentos e dos insumos advindos desta atividade, acerca de qualidade e quantidade, em curtos intervalos de tempo. Porém, o uso exagerado desses produtos apresentam características danosas aos seres humanos e ao meio ambiente, com efeitos adversos à saúde humana e aos ecossistemas, por isso é necessário que seja feito o monitoramento e a vigilância desses produtos em águas, solos, alimentos e ar.

Entre os agrotóxicos mais utilizados no Brasil, o ácido 2,4 diclorofenoxiacético conhecido comumente como 2,4D, alvo deste estudo, é o segundo agrotóxico mais comercializado nacionalmente desde de 2013, atingido a marca de 57.597,57 toneladas de ingrediente ativo vendido até Junho de 2021 (IBAMA, 2021). O solo é o destino final do 2,4D, assim como de outros produtos químicos usados na agricultura, sejam eles aplicados diretamente no solo ou na parte aérea das plantas. Ao entrarem em contato com o solo, os herbicidas estão sujeitos a processos físico-químicos que regulam seu destino no ambiente. Exemplos destes processos são a retenção, a lixiviação, a volatilização, a fotodegradação, a decomposição química e microbiológica, o escoamento superficial e absorção pelas plantas (BAILEY;WHITE,1970).

Com relação a avaliação do potencial de periculosidade ambiental, parâmetro este baseado nas características de bioacumulação, persistência, transporte, toxicidade, potenciais mutagênico, teratogênico e carcinogênico, o 2,4-D é considerado Classe III (produto perigoso ao meio ambiente). Possui tempo de meia-vida de 4,6 a 17,2 dias no solo e de 4,5 a 7 dias na água, sendo altamente transportável e muito tóxico para organismos aquáticos e pouco tóxico para organismos do solo, aves e abelhas (MACEDO NETO; FROEHNER; MACHADO, 2012).

Logo, estudos voltados ao entendimento da dinâmica de degradação do 2,4D tanto em ambientes aeróbios quanto anaeróbios é suma importância no âmbito ambiental e da saúde.

Neste trabalho amostra de sedimento do Reservatório de Itaipú/PR, foram enriquecidas para o desenvolvimento das comunidades microbianas metanogênicas na presença do 2,4-D, sob condições anaeróbias, visto que grande parte dos estudos existentes relacionados a este composto foram desenvolvidos sob condições aeróbias. Este projeto contribui para o entendimento da degradação do 2,4D sob condições anaeróbias, assim como a potencialidade do mesmo quando submetido ao tratamento em RAHLF (Reator anaeróbio Horizontal de Leito Fixo), com o intuito de que tais informações venham a servir posteriormente na implementação processos de biorremediação em campo.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

O presente projeto tem como objetivo geral a avaliação do potencial de degradação do herbicida 2,4D pelos microrganismos provenientes do sedimento do Reservatório de Itaipú-PR, inoculados em um Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar ensaios de enriquecimento com o 2,4D em condições metanogênicas do material proveniente no Sedimento;
- Realizar ensaio de degradação anaeróbia do 2,4-D no RAHLF;

Identificar e quantificar as concentrações em afluente e efluente de 2,4D e seus intermediários.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 AGROTÓXICOS

Os pesticidas podem ser classificados em diferentes categorias, onde a variação destas remetem ao tipo de pragas a que se destinam, como os herbicidas que combatem as ervas daninhas, os inseticidas contra insetos em geral, os fungicidas sob os fungos, entre outros (ALMEIDA *et al.*, 1985). Os herbicidas, referem-se a categoria destinada ao controle e/ou aniquilação de ervas daninhas, caracterizadas por obter facilmente os recursos naturais necessários como água, luz e nutrientes, tornando-as grandes competidoras em meio às culturas, que por sua vez, de acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), representam uma das principais pragas que atingem as lavouras (EMBRAPA, 2020), justificam o uso predominante de herbicidas na agricultura, indicado em dados estatísticos fornecidos pela Associação Nacional de Defensores Agrícola (ANDEF), onde o consumo do mesmo reflete em cerca de 85% do total de agrotóxicos consumidos (SILVA, 1999).

Agrotóxico, também conhecido como pesticida, defensor agrícola ou também como agrodefensor, é qualquer substância ou mistura química destinada a prevenir, destruir, repelir ou mitigar qualquer praga (EPA, 2020), sob a justificativa de controlar as doenças provocadas por esses vetores e de regular o crescimento da vegetação (INCA, 2019). Compreende-se como pragas, no âmbito da agricultura, qualquer população de organismos vivos, tais como: insetos, ervas daninhas, pássaros, bactérias, entre outros, aptos a causar danos às plantas e aos seus produtos. Portanto, o uso de agrotóxicos, em geral, têm como funções básicas elevar a produção agrícola em consequência do aumento de sua produtividade, assim como a melhoria da qualidade de seus produtos (COUTINHO *et al.*, 2005).

Devido a sua funcionalidade, nas últimas décadas, a sua utilização vêm sendo empregada demasiadamente no mundo inteiro. O Ministério do Desenvolvimento Agrário (MDA) e a Agência Nacional de Vigilância (ANVISA) constataram que o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo, desde 2008 (ANVISA, 2015), tendo consumido 899 milhões de litros de agrotóxicos em 2015 (PIGANATI *et al.*, 2017). No período de desenvolvimento deste trabalho, o país ainda ocupa a posição de maior consumidor mundial de agrotóxicos.

Com o objetivo de restringir o uso dos agrotóxicos, visando minimizar os impactos ambientais, para serem produzidos, exportados, importados, comercializados e utilizados devem ser previamente registrados, de acordo com as diretrizes e exigências dos órgãos federais

responsáveis pelos setores da saúde, do meio ambiente e da agricultura (MMA, 2020).

Pertencendo a ANVISA, a incumbência da regulamentação de tais diretrizes a despeito da aplicação e manuseio adequado dos pesticidas, em vigência desde 1989 (ANVISA, 2015) e ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) a concessão dos registros (MMA,2020).

Embora que o uso de agrotóxicos atinja efetivamente a sua finalidade, sua utilização indiscriminada na agricultura, de forma inadimplente as diretrizes mencionadas anteriormente, concedeu a esse grupo a maior representatividade dos poluentes encontrados no meio ambiente (CHOUDHURY *et al.*, 2008), fato este significativo, visto a toxicidade característica presente nesses compostos. Em razão disso, o meio ambiente e a biota sofrem efeitos adversos não razoáveis, como a degradação de recursos naturais devido aos desequilíbrios biológicos desencadeados mediante a contaminação por acúmulo do produto no solo e em águas subterrâneas. Além do potencial nocivo à saúde humana, podendo causar danos irreversíveis de forma direta ou indireta. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) são registrados 20 mil mortes por ano devido a exposição e ao consumo indireto de agrotóxicos por meio de alimentos (INCA, 2019).

### **2.1.1 A História do 2,4-D**

Na busca por compostos sintéticos para intensificar a produção agrícola, visto que o país sofria com a falta de alimentos durante a guerra, o 2,4D foi desenvolvido por pesquisadores independentes, e em 1942, Zimmerman e Hitchcock, demonstraram que o 2,4D tinha efeitos similares às auxinas (ZIMMERMAN; HITCHCOCK, 1942). Alguns anos após a sua descoberta, o 2,4D começa a ser comercializado e é o primeiro herbicida a ser utilizado na agricultura.

Ainda na década de 40, durante um programa militar no período da Segunda Guerra Mundial, o 2,4D foi utilizado em ampla escala, principalmente pelos EUA, juntamente com o 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), formando a substância química conhecida como “agente laranja”, com propósito funcional de desfolhante para fins bélicos (AMARANTE JUNIOR; SANTOS, 2002), tal substância anexou notoriedade ao 2,4D concedendo-o relevância histórica.

Nas últimas décadas, sua utilização vem sendo extensivamente aproveitada na agricultura como um herbicida seletivo, sistêmico de pós-emergência para aplicação no controle de plantas infestantes nas culturas de trigo, milho, soja, arroz (irrigado e de sequeiro), aveia, sorgo, cana-de-açúcar, café e pastagens de braquiária (NORTOX, 2018).

O herbicida ácido diclorofenoxiacético (2,4-D), representa um dos agrotóxicos mais antigos e difundidos do mundo ainda empregado em larga escala, devido ao seu ótimodesempenho no controle de ervas daninhas e seu custo relativamente baixo, quando comparado com outras opções de mercado. Disponível comercialmente há mais de 70 anos, atualmente possui registro em quase 100 países, sendo proibido apenas em Moçambique em virtude do risco ocupacional nas condições de uso locais (ANVISA, 2020).

### **2.1.2 Mecanismos de Ação**

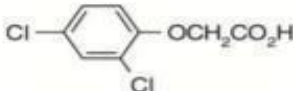
O 2,4D atua como um regulador hormonal com propriedades similares aos da auxina (hormônios vegetais responsáveis pelo auxílio do crescimento e desenvolvimento das plantas), pertencente ao grupo de mimetizadores de auxina (CHRISTOFFOLETI; LÓPEZ-OVEJERO, 2003).

Logo, o princípio de ação do 2,4-D se baseia no desequilíbrio hormonal da planta em consequência do acréscimo evidentemente de auxina sintética promovida mediante a sua aplicação, propiciando o acúmulo do mesmo no sistema metabólico da planta, desencadeando assim, a situação apresentada anteriormente e resultando levando na erradicação da erva daninhade interesse. O acúmulo de auxina no sistema desregula o metabolismo da planta, acarretando o crescimento desordenado da mesma, fenômeno este, conhecido como “epinastia”, caracterizado pelo encarquilhamento e a paralisação do crescimento das folhas terminais, e em consequência a alongação atinge o meristema secundário, ocorrendo assim rompimento dos tecidos de condução, interrompendo o fluxo de assimilados das folhas para as raízes (SOUZA,2016). Em vista disso, a interrupção da fonte de energia causa morte das raízes, desidratação e necrose dos tecidos. Em suma, a morte da planta ocorre pela ausência de fontes de energia e desidratação (OLIVEIRA, 2006).

### **2.1.3 Caracterização Química**

A identidade química e as propriedades físico-químicas presentes no 2,4-D estão expostas nas Tabelas 1 e 2, respectivamente:

**Tabela 1** - Identidade química de 2,4D

<b>Características</b>	<b>Informações</b>
Nome Comum <sup>1</sup>	2,4-D
Nome Químico <sup>1</sup>	ácido 2,4-diclorofenoxiacético
Grupo Químico <sup>1</sup>	ácido ariloxialcanóico
Número CAS <sup>1</sup>	94-75-7
Fórmula Molecular <sup>1</sup>	C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
Peso Molecular <sup>2</sup>	221,0 u
Fórmula Estrutural <sup>1</sup>	
Estado Físico <sup>3</sup>	pó cristalino fino
Cor <sup>3</sup>	branca
Odor <sup>3</sup>	sem odor

**Fonte:** Parecer técnico da Anvisa de reavaliação N°7 (2015).

**Tabela 2** - Propriedades físico-químicas do 2,4D

<b>Propriedade</b>	<b>Informações</b>	<b>Interpretação</b>
Pressão de Vapor a 25°C	1,87x10 <sup>-2</sup> mPa	Baixo potencial de volatilização.
Espectro Ultravioleta (UV) / Visível	Não mostra absorção UV significativa em 300 nm.	Baixo potencial de fototransformação.
Solubilidade em água a 25°C	569 mg/L	Bastante solúvel.
Coefficiente de partição octanol-água (log K <sub>ow</sub> ) a 25°C em pH 5	0,04-0,33	Bioacumulação improvável.
Constante de Dissociação (pKa)	2,8	Dissocia-se rapidamente a ânion em níveis de pH ambientais.

**Fonte:** Parecer técnico da Anvisa de reavaliação N°7 (2015).

### 2.1.4 Toxicidade

De acordo com o parecer técnico de reavaliação dos riscos à saúde humana devido ao uso do ingrediente ativo ácido 2,4-D em agrotóxicos, elaborado pela ANVISA em 2015, não constatou-se evidências significativas consistentes de que o produto possui potencial a ocasionar efeitos graves à saúde humana, por esse motivo, é mantido legitimidade do seu registro para utilização no Brasil.

A incapacidade de originar danos graves à saúde humana se deve a pouca tendência apresentada pelo produto de bioconcentração no tecido animal que é excretado geralmente sem ser metabolizado, através da urina à exceção de alguns dos ésteres de baixa volatilidade que bioacumularão na ausência de metabolização (HOWARD, 1991). Porém, quando administrado de forma aguda por via oral, dérmica ou inalatória é classificado com toxicidade mediana. No

entanto, produz severa irritação ocular aguda, o que o enquadra na classificação toxicológica I – Extremamente Tóxico, de acordo com a legislação vigente no Brasil (BRASIL, 1992), visto que a classificação é coerente com o pior efeito colateral verificado.

Todavia, em termos relativos à segurança ambiental, o produto é considerado classe III - Perigoso ao Meio Ambiente, devido a sua particularidade de alta mobilidade no solo, podendo atingir principalmente águas subterrâneas por meio da percolação (NORTOX, 2018), causando contaminação e efeitos adversos à biota do meio.

### **2.1.5 Comportamento Ambiental do 2,4D**

Conforme uma publicação referente a produtos agrotóxicos do Ministério Meio Ambiente (MMA), no geral, o comportamento de qualquer agrotóxico no ambiente é bastante complexo e essa complexidade se dá ao fato de que as substâncias constituintes sofrem processos físicos, químicos ou biológicos, nos quais podem modificar as suas propriedades químicas e influenciar no seu comportamento, inclusive com a formação de subprodutos com propriedades absolutamente distintas do produto inicial e cujos danos à saúde ou ao meio ambiente também são diferenciados.

Pesticidas altamente clorados são normalmente os mais resistentes a biodegradação no ambiente (MADIGAN, 2016). No entanto, mesmo o 2,4-D sendo um composto da classe dos organoclorados é significativamente degradado em apenas algumas semanas quando exposto a fatores ambientais propícios que influenciam diretamente na taxa de decomposição. Em ambientes aeróbios apresenta uma meia-vida relativamente curta de 2 a 6 dias. O oposto acontece quando esse produto se encontra em ambientes anóxicos, incluindo terras agrícolas saturadas e aquíferos, o 2,4-D passa a ter uma meia vida entre ‘persistente’ e ‘altamente persistente’ que varia de 41 a 333 dias (USEPA, 2005).

Existem formas naturais biológicas (biodegradação) e não biológicas do composto ter sua concentração diminuída, antes de atingir o lençol freático. Exemplos destes processos não biológicos são a lixiviação, a volatilização ou a decomposição química espontânea, além da absorção pelas plantas (BAILEY; WHITE, 1970).

Porém, a degradação do 2,4D por microrganismos é a principal via de dissipação desse produto químico (XIA *et al.*, 2017), e uma das rotas metabólicas eficientes para compostos clorados como 2,4 D, é desalogenação redutiva, juntamente com o processo de cometabolismo, muito eficiente para esse tipo de pesticida.



### 2.1.6 Biodegradação de ambientes contaminados com pesticidas

Pesticidas são compostos xenobióticos, isto é, não possuem origem natural e geralmente possuem estruturas químicas desconformes aquelas geralmente encontradas pelos organismos na natureza, e esse fator acarreta em uma biodegradação muito lenta, se degradados. Porém, como evidenciado no tópico anterior, alguns xenobióticos são estruturalmente relacionados com um ou mais compostos naturais, tornando-os passíveis de degradação por enzimas que normalmente degradam compostos naturais estruturalmente similares. Deve-se considerar também fatores ambientais, já mencionados previamente, pois influenciam diretamente na taxa de decomposição do pesticida (MADIGAN *et al.*, 2016).

Comumente, os microorganismos nativos podem desenvolver a capacidade de degradar alguns contaminantes xenobióticos após longo período de exposição. Normalmente, estes seres microscópicos se adaptam em baixas concentrações de contaminantes e conseguem utilizar o poluente como fontes de carbono e também aceptores de elétrons, exemplo dos clorados (ANDRADE *et al.*, 2010). Após décadas de pesquisa, felizmente, já foram identificadas diversas espécies de bactérias que apresentam resultados satisfatórios ao degradar esse tipo de composto em solo e/ou efluentes, como espécies de *Nocardia*, *Pseudomonas* e *Agrobactérias* (YANZEKONTCHOU *et al.*, 1994). Segundo Grady (1985), as comunidades microbianas envolvidas na degradação de compostos xenobióticos, em geral, atuam em um processo denominado cometabolismo, processo no qual as condições físico-químicas propiciadas pelo consumo biológico de outros compostos orgânicos, levam a degradação do composto alvo.

Além do cometabolismo, também foi identificada a ocorrência de uma segunda rota metabólica na degradação de compostos clorados, característica essa presente em muitos pesticidas, identificada como descloração redutiva. Tal processo pode ser descrito como uma forma de respiração anaeróbia em que os compostos orgânicos clorados, são aceptores terminais de elétrons, e quando reduzidos, liberam o cloreto (Cl<sup>-</sup>), uma substância não tóxica (MADIGAN *et al.*, 2016).

### 2.1.7 Degradação anaeróbia do 2,4D

Como mencionado precedentemente, o composto 2,4-D é passível a degradação tanto em meio aeróbio, quanto anaeróbio. Contudo, devido ao comportamento ambiental do mesmo se mostrar mais crítico em meio anóxico por ser um composto altamente persistente nesta condição, é de maior relevância o estudo das possíveis rotas de degradação sob essa

circunstância, por efeito do potencial risco ambiental. Assim, o desenvolvimento de tecnologias no âmbito da biorremediação que sejam eficientes em remediar ambientes anóxicos contaminados pelo 2,4-D é de extrema relevância a preservação ambiental e por conseguinte, a manutenção da saúde humana (BRUCHA *et al.*, 2021).

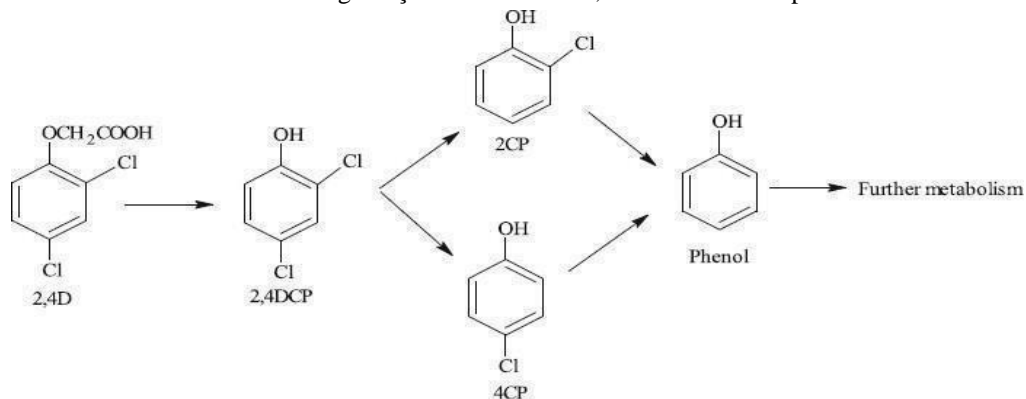
Em meio anaeróbico ou anóxico, que é o foco deste trabalho, o próprio poluente a ser degradado (2,4 D) é utilizado como fonte de carbono pelos microrganismos degradadores, e o processo de biodegradação é regido sob as condições de oxirredução presente. Estas por sua vez, determinam qual composto natural será utilizado como acceptor final de elétrons.

Em análise é possível identificar as rotas metabólicas sucedidas no meio anaeróbico com base nos intermediários detectados durante o processo de biotransformação do 2,4-D. Sendo constatados como produtos finais mais comuns dessa conversão, os clorofenóis (BRYANT,1992).

Ha e colaboradores (2018) analisaram a degradação anaeróbica do ácido 2,4-D pela cepa *Thauera sp. DKT*, utilizando nitrato como acceptor final de elétrons. Os autores relataram os intermediários gerados e as vias de biodegradação anaeróbica responsáveis pelos mesmos: em um primeiro momento constatou-se a conversão do composto 2,4-D em 2,4-DCP (2,4 - Diclorofenol). Posteriormente, ocorreu o processo de desalogenação reductiva, que converteu 2,4 - DCP em 2CP, 4CP (fenóis monoclorados) e fenol. Brucha e colaboradores (2021), estudando microrganismos provenientes do solo de Amazônia envolvidos na degradação anaeróbica do 2,4D, também encontraram o 2,4DCP, 4CP, 2CP e fenol, como intermediários na degradação do 2,4D. Os metabólitos (2,4DCP, 4CP e 2CP) formados durante a transformação anaeróbica de 2,4D - indicaram que o processo de degradação ocorreu por meio de desalogenação reductiva.

A partir desses resultados foi possível ilustrar a sequência da via de degradação completa, exposta na Figura 1, abaixo:

**Figura 1** - Vias constatadas de biodegradação anaeróbica de 2,4-D em *Thauera sp. DKT*



**Fonte:** Adaptado de Ha *et al* (2018).

Várias culturas já foram identificadas como capazes de realizar a transformação do 2,4- D como *Acinetobacter sp*, *Serratia marcescens*, *Stenothrophomonas matophilia*, *Flavobacterium sp* e *Penicillium sp*. (SILVA, 1999).

## 2.2 REATOR ANAERÓBIO HORIZONTAL DE LEITO FIXO – RAHLF

O reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF) é um equipamento da engenharia com potencial de ser aplicado ao tratamento de águas residuais contaminadas com compostos biodegradáveis. (ZAIAT, 2003). O mesmo foi desenvolvido originalmente com o propósito de atender ao tratamento de esgoto in situ no próprio sistema de tubulação, porém não houve sucesso nessa utilização, pois as tubulações sofriam entupimento devido a produção de polissacarídeos pelos microrganismos. É um biorreator do tipo tubular de seção constante, e como o próprio nome induz, de escoamento horizontal sob condições anaeróbias, onde ocorrem reações bioquímicas irreversíveis do tipo  $A \rightarrow B$ , realizadas por microrganismos retidos no leito fixo. Este por sua vez aplicado como suporte inerte para imobilização da biomassa, utilizando-se por exemplo, a espuma de poliuretano.

Suas propriedades geométricas e seu regime hidráulico de escoamento o referênciam como um reator próximo ao modelo ideal de fluxo pistonado (PFR), o qual segue conceitualmente, as seguintes características: alimentação contínua, volume constante, mistura na seção transversal ao longo do raio e não longitudinalmente, logo, em consequência a composição do meio varia ao longo do reator. (ZAIAT, 2003).

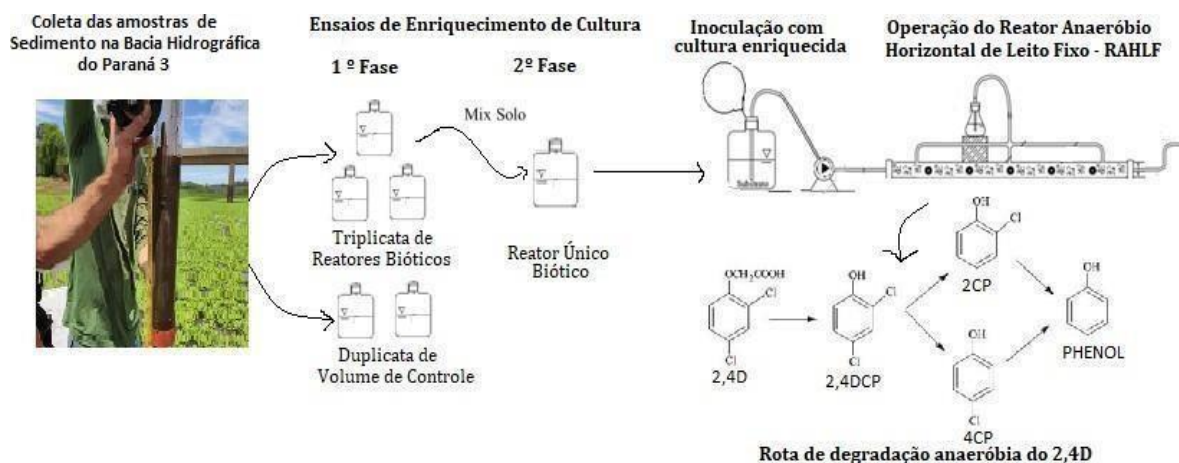
Esse reator foi utilizado no estudo de degradação anaeróbia de pesticidas, como o Aldicarbe (DAMASCENO, 2008) e o Pentaclorofenol (BRUCHA, 2007) e foi escolhido pelo presente trabalho para estudo de degradação do 2,4D, inoculado com sedimento do reservatório de Itaipú, previamente enriquecido em condições metanogênicas na presença do 2,4D.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste projeto foi realizado experimento em Reator Anaeróbico Horizontal de Leito Fixo (RAHLF), em escala de bancada, inoculado com biomassa autóctone oriunda do sedimento da Bacia Hidrográfica Paraná 3 (BHP3), previamente enriquecida com 2,4D. A presente pesquisa se propôs a aferir o potencial de biodegradação anaeróbica do herbicida ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4D), submetido a tratamento em reator do tipo RAHLF sob condições metanogênicas.

O trabalho foi realizado em duas etapas consecutivas, sendo elas, enriquecimento do sedimento sob condições metanogênicas com a finalidade de favorecer o desenvolvimento da cultura microbiana metanogênica autóctone na presença de 2,4D e posteriormente, a operação do reator RAHLF inoculado com o sedimento enriquecido. Conforme ilustrado no fluxograma a seguir, Figura 2:

**Figura 2** - Representação esquemática do arranjo experimental produzido no projeto



**Fonte:** Do autor.

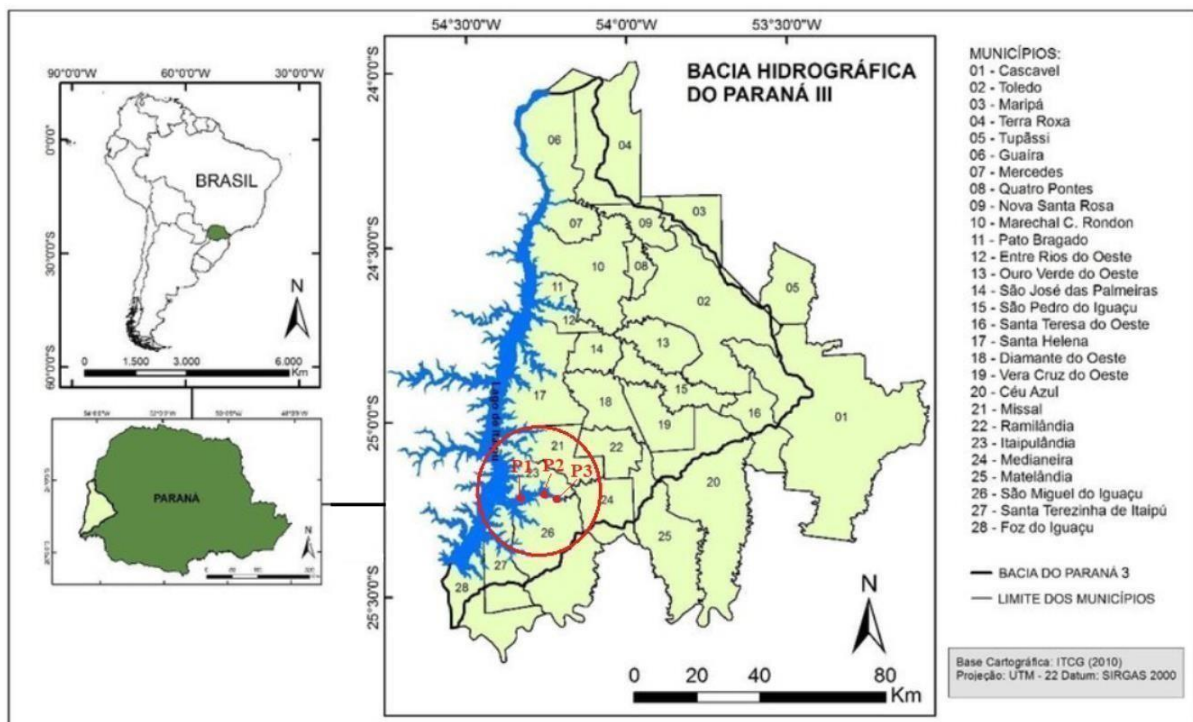
#### 3.1 SEDIMENTO

O emprego de sedimento pré-expostos ao composto de interesse como inóculo, se deve a característica dos mesmos apresentarem uma taxa de degradação acelerada em relação ao composto, justificado pela presença da cultura de microrganismos resistente e aptos a degradar o poluente, visto que os microrganismos presentes na matriz já se adaptaram a toxicidade do composto alvo. Sendo assim, há maior probabilidade de seleção de microrganismos degradadores quanto comparado a outros inóculos. Considerando esse fator,

a área de estudo para coleta das amostras de sedimento para compor o inóculo, foi escolhida em função da sua exposição ao 2,4D. Devido à extensão do plantio de milho e soja na região da Bacia Hidrográfica Paraná 3, a região apresenta uma taxa de ocupação agrícola de 80% a 90%, onde foi muito utilizado o herbicida o 2,4D (ITAIPU, 2016).

As amostras de sedimento que foram utilizadas como inóculo nos ensaios de enriquecimento foram coletadas no dia 18 de Novembro de 2020, em três diferentes pontos da sub Bacia Hidrográfica Sanga Memória, compreendida pela Bacia Hidrográfica Paraná 3, que desagua no reservatório de Itaipu-PR. A Bacia do Paraná 3 está localizada na mesorregião Oeste do Paraná, entre as latitudes 24° 01' S e 25° 35' S e as longitudes 53° 26' O e 54° 37' O, com área de aproximadamente de 8000km<sup>2</sup>, englobando 28 municípios, delimitada ao norte pela bacia do rio Piquiri e ao sul pela bacia do rio Iguazu (FEIDEN, 2019) (Figura 3).

**Figura 3** - Localizações dos P1, P2 e P3, referentes aos três pontos de coleta das amostras na Bacia Hidrográfica do Paraná III.



**Fonte:** Adaptado de ROCHA; NÓBREGA; CUNHA (2018)

As amostras foram coletadas de duas camadas de profundidade para cada ponto de amostragem, sob condições atmosféricas húmidas, em dia ensolarado, com temperaturas acima de 20°C. No ponto 1, localizado nas coordenadas 25°12'08.5''S e 54°18'21.1''W foi recolhido o sedimento nas profundidades de 16 cm, e posteriormente em 6 cm, de forma análoga, no ponto 2, situado em 25°13'33.1''S e 54°14'43.5''W, nas camadas de 18 cm e 10 cm, e por fim, ponto

3 posicionado em  $25^{\circ}13'49.2''\text{S}$  e  $54^{\circ}13'42.0''\text{W}$  nas camadas de 30 cm e 20 cm. (Figura 4):

**Figura 4** - Localização geográfica dos pontos de coleta das amostras de sedimento na Sub Bacia Hidrográfica SangaMemória.



Fonte: Autor

Para chegar aos pontos de coleta utilizou-se barco com motor, a distância aproximada percorrida em linha reta do ponto 1-2 foi de aproximadamente de 6,62 m e do ponto 2-3 de 1,78 m . A coleta foi realizada por duas pessoas com preparo técnico e aptas ao procedimento de coleta. Abaixo fotos retiradas durante o procedimento em campo, figuras 5 e 6:

**Figura 5** - Coleta de sedimento no ponto 3



Fonte: Autor

**Figura 6** - Amostra do sedimento coletada ponto 3



Fonte: Autor

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

### 3.2 ENSAIOS DE ENRIQUECIMENTO

O meio de enriquecimento foi estabelecido visando proporcionar condições favoráveis ao crescimento de microrganismos metanogênicos capazes de degradar o 2,4D, segundo o protocolo utilizado por Deursen (2016). De acordo com Deursen, para cada condição redox um meio é usado, pois cada tipo de microrganismo demanda requisitos distintos, logo, neste trabalho conduziu-se a realização desta etapa de acordo com a metodologia de Deursen para o enriquecimento de microrganismos sob condições metanogênicas.

#### 3.2.1 Composição do Ensaio de Enriquecimento

O volume líquido útil do frasco-reator do ensaio de enriquecimento deu-se basicamente por soluções-padrões que forneceram aos microrganismos presentes no sedimento usado como inóculo, macro nutrientes, vitaminas e fontes de carbono. No meio também foi adicionado 2,4D, em concentrações traços periodicamente (1mg/L), de modo a selecionar os possíveis biodegradadores do 2,4D e intermediários. Na Tabela 3 abaixo, segue listado a composição do meio de enriquecimento mencionado.

**Tabela 3** - Composição do meio de enriquecimento

<b>Meio Basal</b>	M1, M2, M3 em Água Anaeróbia
<b>Cold A</b>	M4, M5, M6, M7, M8 em Água Anaeróbia
<b>Cold B</b>	M10 em Água Anaeróbia
<b>Cold C</b>	M11
<b>Inóculo</b>	Sedimento Itaipú - 20%
<b>2,4D</b>	1 mg/L
<b>Acetato de Potássio</b>	0,01 mol/L
<b>Lactato de Sódio</b>	0,01 mol/L

**Fonte:** Do autor.

O volume de cada um dos itens acima é proporcional ao volume total de meio de

enriquecimento desejado. Para cada 100 ml de volume útil, é inserido 1,38ml de Cold A e Cold C, o volume do Cold B é o dobro dos Cold's A e C, ou seja, nesse exemplo, 2,76 ml. O volume do inóculo depende da porcentagem no volume total, neste trabalho foi usado 20%, já o volume a ser adicionado de 2,4D, Acetato de Potássio e Lactato de Sódio, dependem da concentração da solução-estoque disponível, mas na solução final foi estabelecida concentrações de 1mg/L, 1 mol e 1 mol, respectivamente. O meio basal é a diferença do total do volume subtraído do somatório dos outros itens. A cada 100ml é adicionado 2,10 ml de M1, 0,7 de M2 e 0,10 de M3, completado com Água Anaeróbia.

As soluções-estoques nomeadas por M's foram preparadas dissolvendo produtos químicos específicos em água anaeróbia, está por sua vez, preparada por aquecimento da água destilada até o ponto de ebulição e, posteriormente submetida a banho de resfriamento e fluxo contínuo de nitrogênio (N<sub>2</sub>), concomitantemente, por 20 minutos. A Tabela 4, discrimina as pesagens exatas dos elementos químicos e os respectivos volumes utilizados para o preparo das soluções.

**Tabela 4** - Soluções para compor os meios utilizados nos ensaios de enriquecimentos metanogênicos

(continua)

<b>MEIO METANOGENICO</b>				
<b>Solução-Estoque</b>	<b>Composto Químico</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Peso</b>	<b>Volume</b>
			<b>(g)</b>	<b>(L)</b>
<b>M1</b>	Fosfato dipotássico	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	17,418	0,5
<b>M2</b>	Fosfato de Sódio Dibásico	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	7,801	0,25
<b>M3</b>	Resazurina (Corante azul)	C <sub>12</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>4</sub>	0,025	0,05
<b>M4</b>	EDTA Tetrassódico	Agente Quelante Org.	0,25	0,5
	Cloreto Ferroso	FeCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1	
	Cloreto de Manganês	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,05	
	Cloreto de Cobalto II (hexa hidratado)	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,095	
	Cloreto de Zinco	ZnCl <sub>2</sub>	0,035	
	Cloreto de Cobre	CuCl <sub>2</sub>	0,001	
	Cloreto de Alumínio hexa hidratado	AlCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,005	
	Ácido Bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,003	
	Molibdato de Sódio dihidratado	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,018	
	Cloreto de Níquel hexa hidratado	NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,012	
	Ácido Clorídrico	1 ml conc. HCl	0,5 mL	
<b>VITAMINA A</b>				
<b>M5</b>	Biotina (Vit H ou Vit B7)	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S	0,025	0,5
	p-aminobenzoato (Sal de Sódio)	-	0,125	
	Pantotenato (Sal de Sódio)	-	0,025	
	Ácido Fólico dihidratado	-	0,01	
	Ácido Lipóico	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	0,025	
	Piridoxina (Vit B6)	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	0,05	
	Nicotinamina	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O	0,275	
<b>VITAMINA B</b>				
<b>M6</b>	Tiamina HCL (Vit B1)	-	0,01	0,1



**Tabela 4** - Soluções para compor os meios utilizados nos ensaios de enriquecimentos metanogênicos

				(conclusão)
<b>VITAMINA C</b>				
<b>M7</b>	Riboflavina (Vit B2)	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	0,005	0,1
<b>VITAMINA D</b>				
<b>M8</b>	Cianocobalamina	$C_{63}H_{88}CoN_{14}O_{14}P$	0,005	0,1
<b>M9</b>	Bicarbonato de Amônio	$NH_4HCO_3$	4,509	0,5
	Bicarbonato de Sódio	$NaHCO_3$	38,057	
<b>M10</b>	Sulfeto de Sódio Nonahidratado	$Na_2S \cdot 9H_2O$	12,01	0,05
<b>M11</b>	Cloreto de Cálcio dihidratado	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	2,205	0,5
	Cloreto de Magnésio hexahidratado	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	2,035	

**Fonte:** Do autor, adaptado do protocolo de Deursen (2016).

Todas soluções-estoques, com exceção das vitaminas, após o preparo foram esterilizadas em autoclave (por 20 minutos a 120°C) e, posteriormente armazenadas na geladeira. As soluções de vitaminas também foram esterilizadas, porém, pela técnica de filtração por membranas (porosidade de 0,22 µm) sob sistema de bombeamento a vácuo, revestidas com papel alumínio, para evitar fotodegradação, e igualmente armazenadas na geladeira. Todas as soluções, necessariamente foram armazenadas em frascos-reagentes, lacrados com tampa de borracha e tampa de rosca perfurada no centro, para possibilitar a retirada da solução através da perfuração da borracha pela agulha da seringa, esse cuidado é importante para não contaminar a solução.

No preparo das soluções-estoques de 2,4D e de M9, devido às propriedades químicas de seus reagentes, apresentaram dificuldade na solubilização, e neste caso, foi empregado o uso de agitador ultra-sônico. Outra alternativa para o auxílio no preparo de solução, caso seja necessário, é o uso do agitador magnético, contudo, atenção ao coeficiente de solubilidade em água de cada reagente e a temperatura máxima suportada sem que altere as propriedades do reagente.

Para o preparo das soluções, nomeadas Cold's, foram utilizados frascos de penicilina de 100 ml com boca de 20 mm, previamente esterilizados, lacrados com tampa de borracha e selo de alumínio crimpado. Com agulha e seringa inserir nos frascos as seguintes composições, para o Cold A, a cada 20 ml de água anaeróbia adicionar 1,0 ml de cada uma das seguintes soluções: M4, M5, M6, M7 e M8. No Cold B, 1 ml de M10 em 49,0 ml de M9 e no Cold C, puramente 25,0 ml de M11 (no preparo do Cold A e C, trocar o headspace para gás nitrogênio 100%). (DEURSEN, 2016)

### 3.2.2 Ensaio de Enriquecimento

O ensaio de enriquecimento dos microrganismos degradadores do 2,4D foi realizado em duas partes, a primeira consistiu em um ensaio com 5 frascos-reatores, sendo eles uma triplicata de meios bióticos (com

adição de 2,4D na concentração teórica inicial de 1mg/L) e uma duplicata para volume de controle (sem adição do 2,4D), para verificar a atividade microbiana. Para isso, foram usados frascos-reatores Duran® de Borossilicato de capacidade de 1L com volume reacional de 500 ml com volume reacional de 300 ml. Os frascos foram inoculados com sedimento coletado no Reservatório de Itaipu, como de cada ponto de amostragem foram coletados de duas profundidades, para inoculação, foi feito um mixdo sedimento por ponto. Abaixo, na Figura 7, apresenta o esquema, meramente ilustrativo:

**Figura 7** - Arranjo experimental da primeira fase de ensaios de enriquecimento



Fonte: Do autor

A Tabela 5, abaixo mostra os volumes exatos utilizados na composição dos ensaios da primeira parte do enriquecimento:

**Tabela 5** – Composição do Meio de Enriquecimento metanogênico usado na primeira fase

1º Fase Enriquecimento	Triplicata Bióticos (mL)	Duplicata Controle (mL)	
Meio Basal	M1	7,4	4,57
	M2	2,46	1,52
	M3	0,35	0,22
	Água Anaer.	342,19	211,13
Cold A	6,9	4,14	
Cold B	13,8	8,28	
Cold C	6,9	4,14	
Inóculo - 20%	100	60	
Acetato de Potássio - 1 mol	5	3	
Lactato de Sódio - 1 mol	5	3	
2,4D (50 mg/L)	10	-	
Volume Reacional Total	500	300	

Fonte: Do autor

A segunda parte do enriquecimento ocorreu durante 210 dias, por um ensaio em escala

maior comparado ao primeiro, com um único frasco-reator, apenas com meio biótico, inoculado com uma mistura homogênea do sedimento já enriquecido oriundo da triplicata da primeira fase, agora na concentração de 40%. Em um frasco-reator Duran ® de Borossilicato de capacidade de 5L com volume reacional de 3L, foram adicionados as seguintes dosagens (Tabela 6):

**Tabela 6** – Composição do Meio de Enriquecimento metanogênico usado na segunda fase

<b>2º Fase Enriquecimento</b>	<b>Reator Biótico (mL)</b>	
<b>Meio Basal</b>	<b>M1</b>	31,8
	<b>M2</b>	10,6
	<b>M3</b>	1,51
	<b>Água Anaer.</b>	1470,49
<b>Cold A</b>	41,4	
<b>Cold B</b>	82,8	
<b>Cold C</b>	41,4	
<b>Inóculo - 40%</b>	1200	
<b>Acetato de Potássio - 1 mol</b>	30	
<b>Lactato de Sódio - 1 mol</b>	30	
<b>2,4D (50 mg/L)</b>	60	
<b>Volume Reacional Total</b>	3000	

Fonte: Do autor

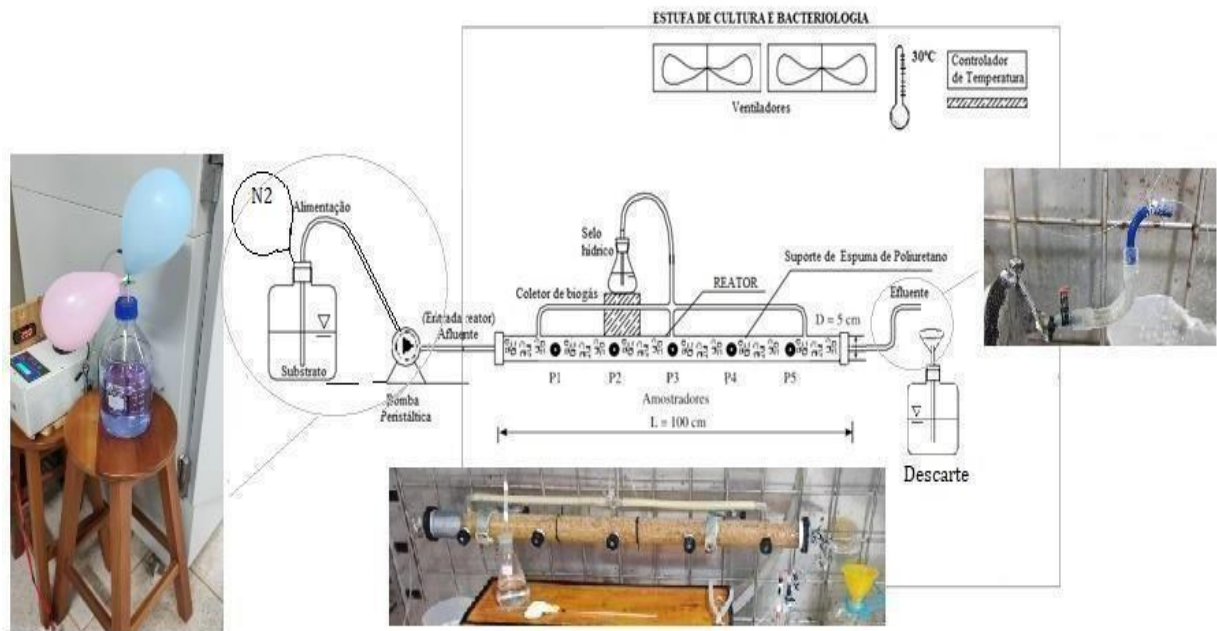
Para o monitoramento dos ensaios de enriquecimento, foi aplicado o método de espectrofotométrico (GODOI, 2021), no qual consiste na determinação da DQO (Demanda Química de Oxigênio) como parâmetro indireto da quantificação do consumo de matéria orgânica. Com essa análise foi possível mensurar a atividade microbiana associada com eficiência de degradação. Para tal análise, foi utilizado o espectrofotômetro visível (NANOCOLOR® VIS de MACHEREY-NAGEL) e o digestor (NANOCOLOR® VARIO 4 de MACHEREY-NAGEL) para a digestão das amostras.

A produção do metano também foi aferida pontualmente para constatar a produção de metano e certificar a presença de cultura metanogênica ativa, por meio da cromatografia gasosa (STEINBUSCH *et al.*, 2008).

### 3.3 REATOR ANAERÓBIO HORIZONTAL DE LEITO FIXO

O reator em escala de bancada empregado na biodegradação do 2,4D, foi estruturado conforme o RAHLF desenvolvido por Foresti *et al.*, (1995), ilustrado na Figura 8, com fotos embutidas do reator usado neste projeto.

**Figura 8** - Configuração do reator anaeróbio horizontal de leito fixo em escala de bancada no interior da câmara climática para controle de temperatura, com as fotos reais do projeto.



**Fonte:** Do autor, adaptado (OLIVEIRA, 2001).

A típica configuração do sistema é constituída por um reator com pontos intermediários em sua extensão longitudinal para retirada de amostragens, completamente preenchido com meio suporte inerte para imobilização da biomassa. O mesmo também possui uma mangueira acoplada na parte superior para escoamento e coleta do biogás gerado, com saída em um selo hídrico que exerce a função de despressurizar o sistema e simultaneamente bloquear a entrada do ar externo no reator, mantendo-o assim sob condições internas anaeróbias. O reator é mantido em funcionamento por fluxo de alimentação contínua por meio de bombeamento peristáltico.

Notas imprescindíveis: A altura do bocal de saída do reator precisa ser posicionada de acordo com o nível desejado do líquido dentro do reator, e é de extrema importância para o funcionamento hidráulico adequado do mesmo, essa altura define a cota de nível dentro do reator, e propicia que a mesma se estabeleça estável. Também, a escolha correta da peça acoplada na saída é essencial para que o reator não se esvazie, é fundamental evitar outros tipos de peças que configurem o comportamento de um “sifão”, nesse caso, o reator não se mantém cheio e sua vazão se torna instável, apesar do fluxo contínuo.

Em relação ao frasco de alimentação, conforme a bomba succiona o meio, conseqüentemente o nível do mesmo vai abaixar, nisso, pode ocorrer que a pressão interna se torne maior que a externa, e a bomba peristáltica por trabalhar em regime de vazão

significativamente baixa, não têm força pra retirar o meio do frasco e encaminhar ao reator, assim cortando o fluxo de alimentação. Por isso, é aconselhável uma válvula de escape para equilibrar a pressão interna com a externa. Nesse trabalho foram utilizados balões repletos de gás nitrogênio acoplados na tampa de borracha do frasco para que a medida que o nível do meio descesse, mediante ao bombeamento da bomba, o gás presente nos balões preenche o espaço vazio, outra hora ocupado pelo líquido, resultando na compensação da pressão, e paralelamente, garante que o *headspace* permaneça anaeróbico e estéril. A Figura 9, mostra o sistema adaptado para este fim, com uma agulha encaixada em um “tree way”. Ademais, o frasco também foi posicionado de tal forma que o mesmo tivesse disposto em uma altura maior que a altura do reator, tendo em vista, o auxílio do bombeamento por gravidade.

**Figura 9** - Sistema de compensação da pressão e manutenção da atmosfera anaeróbia



**Fonte:** Do autor

Durante o período de inoculação esse sistema de despressurização não se faz necessário, pois na inoculação o fluxo é sob recirculação fechada. Logo, o mesmo volume de líquido que sai, retorna sincronicamente, portanto, não há diferença de pressão externa e interna prejudicando o funcionamento de bombeamento. Outro diferencial entre as etapas de inoculação e a de alimentação propriamente dita do reator, é que enquanto no primeiro, obrigatoriamente o frasco necessita estar fixado dentro da câmara, pois o mesmo armazena o sedimento enriquecido, e a biomassa presente no mesmo carece de temperatura adequada para crescimento, no segundo, o frasco de alimentação deve ser mantido externamente a câmara climática, pois o mesmo comporta apenas meio basal e outras substâncias que fornecem fontes de carbono e nutrientes à biomassa aderida no reator. Em circunstâncias ideais até, o frasco de alimentação deveria estar em ambiente com temperaturas baixas, como qualquer outra solução-estoque, para

reduzir as chances de deteriorar. Porém, neste trabalho, foi mantido em temperatura ambiente.

### 3.3.1 Características do RAHLF

O reator utilizado neste trabalho é de volume total próximo a 1990 mL e volume útil de escoamento de 990 mL, a diferença de volume é dada pela adição de 40g de espuma seca de poliuretano como meio suporte em forma de cubos com arestas por volta de 3 a 5mm. O cilindro confeccionado em vidro de borossilicato têm comprimento de 100 cm e diâmetro interno de 5 cm, resultando na relação de comprimento por diâmetro (L/D) igual a 20, parâmetro este significativo para se obter escoamento próximo ao pistonado, onde quanto maior o valor de L/D, mais propício do reator apresentar comportamento hidrodinâmico de um reator tubular ideal. (ZAIAT, 2003). Para a coleta de amostras ao longo do reator, foi dotado 5 pontos espaçados aproximadamente em 16,67 cm entre si, derivando para cada ponto, respectivamente as seguintes relações de L:D, para P1=3,33; P2= 6,67; P3=10; P4=13,34 e P5=16,67.

Similar ao esquema ilustrado na Figura 7, o reator foi instalado dentro de uma estufa de cultura e bacteriologia (Estufa Especial Modelo 410/DRE, Ethiktechnology®), para controle da temperatura do ambiente interno, mantida em  $30\pm 1^\circ\text{C}$ , com o propósito de favorecer o crescimento de culturas microbianas específicas e a manutenção das mesmas. A alimentação do reator foi realizada através de uma bomba peristáltica (MS TecnoPON®, modelo BP-200D), instalada do lado externo da câmara. Abaixo segue a Figura 10, do reator pronto para ser inoculado com o sedimento enriquecido.

**Figura 10** - Sistema completo do Reator RAHLF em escala de bancada montado dentro da câmara de climatização, com o frasco-reator do sedimento enriquecido (inóculo) antes de começar a inoculação



**Fonte:** Do autor.

### 3.3.2 Inoculação do RAHLF

A inoculação do RAHLF foi realizada segundo metodologia descrita em Domingues (2001), utilizando-se como inóculo o meio enriquecido previamente na primeira etapa deste trabalho. O mesmo foi inserido no reator pelo processo de recirculação por um período de 14 dias a uma vazão de 0,187 ml/min, equivalente a um TDH de 88,23 horas. O TDH baixo se faz necessário devido o inóculo ser oriundo de amostras ambientais (SAIA, 2005), o que leva a imprescindibilidade de um maior aproveitamento da biomassa. Tal procedimento foi efetivado mediante ao bombeamento do meio de cultura após a conclusão da aclimatação no meio suporte, executado através do bombeamento de meio basal metanogênico em circuito aberto, este por sua vez com adição dos Cold's, Lactato de Sódio (0,01 mol/L) e Acetato de Potássio (0,01 mol/L) como fontes de carbono, e balão cheio de N<sub>2</sub> acoplado ao frasco de alimentação com a finalidade de manter a atmosfera interna do frasco sob condições anaeróbias. Este procedimento foi feito visando propiciar melhor aderência da biomassa na espuma de poliuretano, que por suavidade foi constatada pela ocorrência visual de biofilme na mesma, que pode ser visualizada na Figura 11, a seguir.

**Figura 11:** RAHLF após inoculação com formação de biofilme na coloração escura no suporte fixo.



Fonte: Autor

A quantificação da biomassa retida no sistema por aderência ao material suporte (espuma

de poliuretano) foi aferida pela diferença da biomassa contida no frasco de inoculação, expressa em Sólidos Suspensos Volatéis – SSV ( $\text{g.L}^{-1}$ ), imediatamente antes e após a inoculação.

### 3.3.3 Ensaios no RAHLF

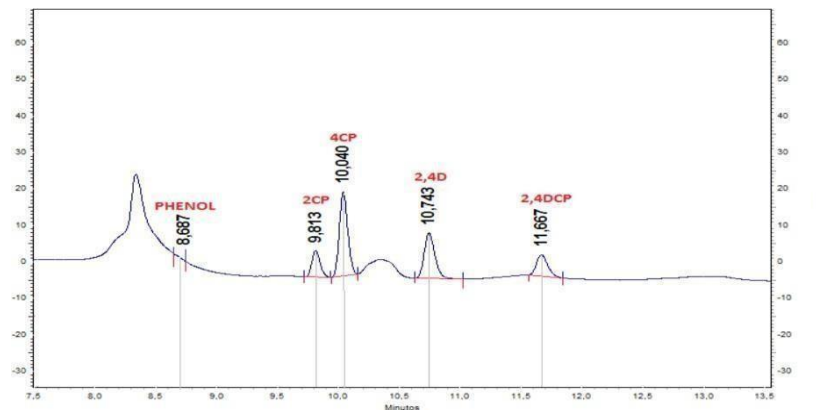
Após o processo de inoculação, o reator foi alimentado em fluxo contínuo com meio basal metanogênico sintético com adição de fontes de carbono (Lactato de Sódio e Acetato de Potássio, ambos na concentração de  $0,01 \text{ mol/L}$ ), o mesmo utilizado para a adaptação, sem adição de 2,4D até alcançar estabilidade e eficiência significativa na degradação de DQO. Após a confirmação da estabilidade do reator, após 08 dias de operação, relacionada a degradação biológica de DQO, foi iniciada a alimentação com adição de 2,4D no meio basal em concentrações de  $1 \text{ mg/L}$ . Nesse ponto deu-se início efetivamente a operação do reator, com a coleta de amostras em afluentes e efluentes para análises de degradação do 2,4D, por 60 dias.

## 3.4 QUANTIFICAÇÃO DO 2,4D E SEUS INTERMEDIÁRIOS

As amostras foram coletadas no RAHLF duas vezes por semana, a cada alimentação, e analisadas para detecção de 2,4D e intermediários, através da cromatografia líquida de alta eficiência (em inglês: High - Performance Liquid Chromatography – HPLC), pelo sistema integrado de alta qualidade LC Agilent 1220 Infinity, com a coluna cromatográfica do tipo Zorbax Eclipse XDB-C18  $4.6 \times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \mu\text{m}$ . Como solventes foram utilizados Ácido Fórmico  $0,1\%$  em água Mili-q (A) e Ácido Fórmico  $0,1\%$  em Acetonitrila (B) na proporção de 75:25. Com a metodologia desenvolvida, foi possível parametrizar os tempos de retenção do 2,4D e de seus intermediários, 2,4DCP, 4CP, 2CP e Fenol. Abaixo segue a Figura 12, com os tempos de retenção definidos para cada composto, segundo a metodologia proposta por Brucha *et al.*, (2021).



**Figura 12** - Tempos de retenção do 2,4D e seus intermediários pela técnica do HPLC



**Fonte:** Do autor.

As concentrações finais do poluente presentes nas amostras retiradas para análise, estabelecem a relação de eficiência de degradação, assim como a constatação dos intermediários metabólicos produzidos, elucidam quais reações bioquímicas ocorreram durante a conversão do 2,4-D, estabelecendo a rota de degradação.

O monitoramento de DQO, foi feito de forma análoga ao monitoramento deste parâmetro nos ensaios de enriquecimento (GODOI, 2021), para confirmar a atividade de degradação orgânica.

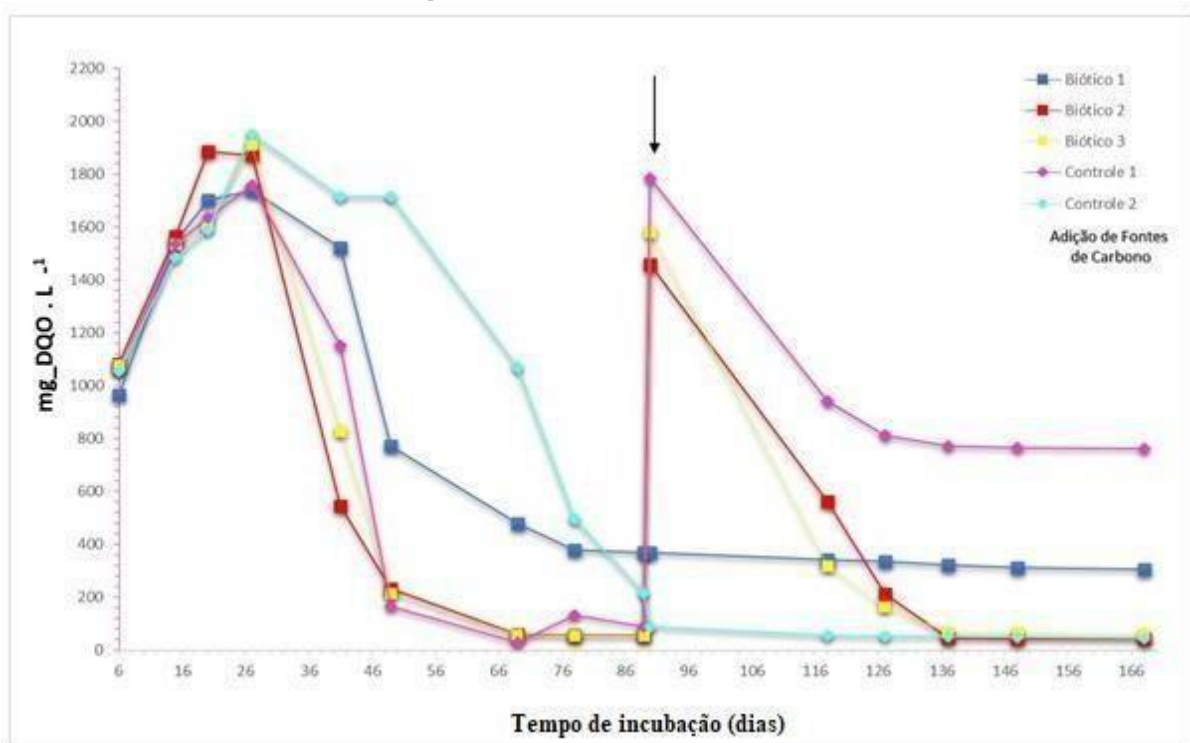
## 4. RESULTADOS

### 4.1 ENRIQUECIMENTO – FASE 1

O enriquecimento da comunidade microbiana anaeróbia metanogênica provenientes do sedimento do reservatório de Itaipu foi constatado, a partir do consumo da matéria orgânica (DQO) e da produção do metano ( $\text{CH}_4$ ), os quais refletem a presença de atividade biológica metanogênica ativa. Na primeira fase com duração de 166 dias de incubação, os reatores bióticos 2 e 3, alcançaram no 89º dia de operação, simultaneamente, remoção de DQO de aproximadamente 97%, fazendo necessário a manutenção do meio com adição de fontes de carbono, sendo elas, Lactato de Sódio (0,01 mg/L) e Acetato de Potássio (0,01 mg/L). Em contrapartida o reator biótico 1, não precisou de alimentação, pois manteve decaimento estável e mais lento comparado aos outros, atingindo no 166º dia, 82% em eficiência de remoção.

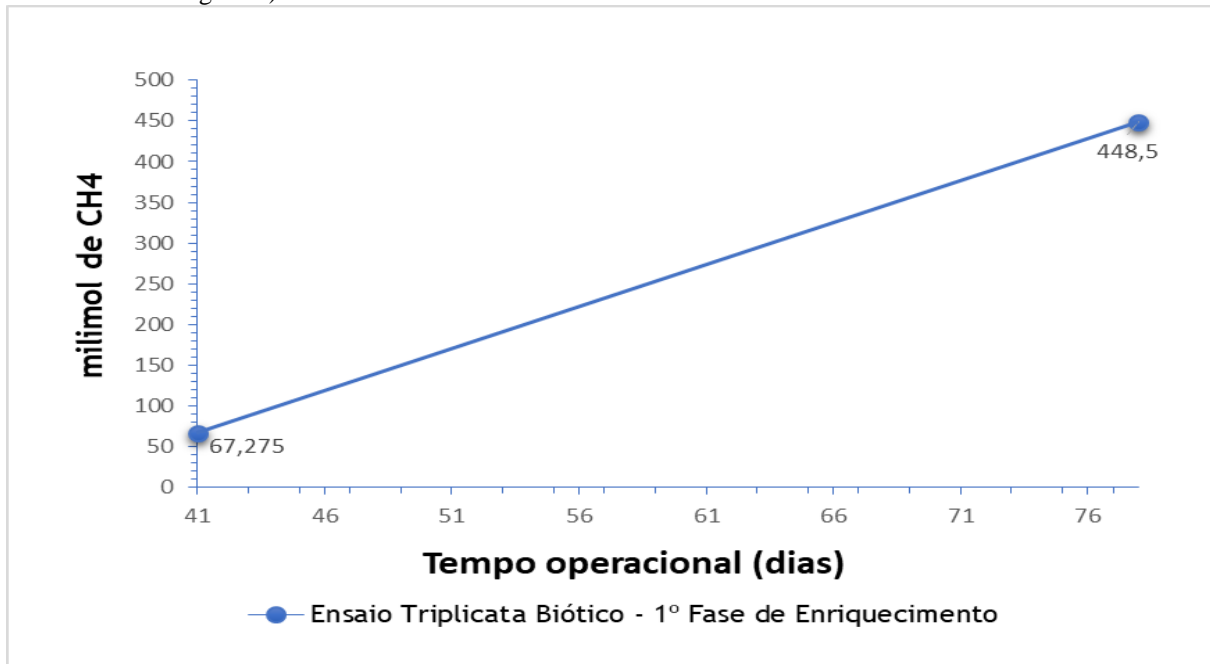
Abaixo, na Figura 13, é apresentado graficamente o decaimento de DQO durante o período de incubação referente a primeira fase de enriquecimento. Na figura 14, é exposta a quantificação do metano produzido nos primeiros 76 dias. Após esse período a produção se manteve contínua e crescente, extrapolando a capacidade máxima de conversão na curva de calibração, não sendo podendo ser mensurado.

**Figura 13** - Representação gráfica do decaimento da concentração dematériaorgânica (DQO) consumida em relação ao tempo em dias, durante a fase 1 de enriquecimento



Fonte: Autor.

**Figura 14.** Representação gráfica da média da variação volumétrica inicial e final da concentração de gás metano (CH<sub>4</sub>, produzido na 1ª Fase de Enriquecimento na triplicata de reatores bióticos sob condição metanogênica).



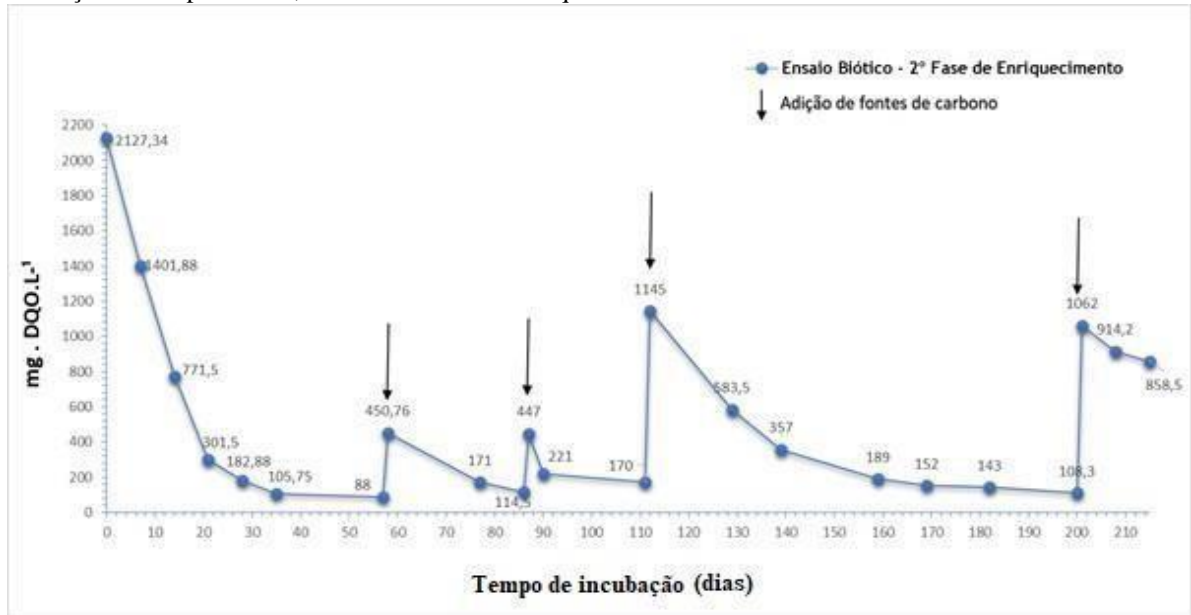
Fonte: Autor.

Estes resultados mostram a presença e o desenvolvimento dos microrganismos envolvidos no processo a partir do consumo das fontes de carbono fornecidas e pela presença do 2,4D. Através da cromatografia líquida, foi constatado 70 dias após o início da incubação, a degradação total do 2,4D e a produção de 0,22 mg/L de 4CP, um dos intermediários finais identificados na rota de degradação anaeróbia 2,4D. No 137º dia, o herbicida 2,4D e o seu intermediário 4CP não foram mais detectados.

## 4.2 ENRIQUECIMENTO – FASE 2

Na fase 2 de enriquecimento em um único reator biótico, que teve duração de 210 dias e mostrou-se igualmente eficiente na remoção da DQO, com decaimento acentuado e expressivo, necessitando de periódicas adições de fontes de carbono, de maneira idêntica ocorrida na fase 1. Na Figura 15, é apresentado o decaimento de DQO durante a segunda fase.

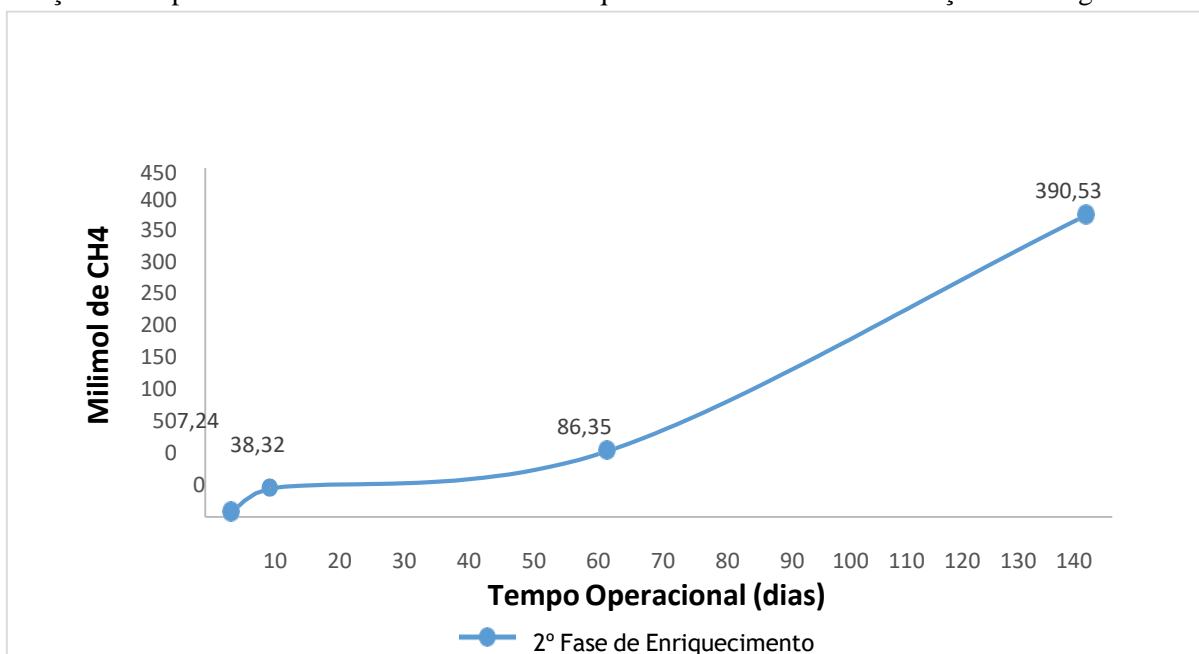
**Figura 15.** Representação gráfica do decaimento da concentração de matéria orgânica (DQO) consumida em relação ao tempo em dias, durante a fase 2 de enriquecimento.



Fonte: Autor.

Na figura 16, mostra o volume de CH<sub>4</sub> gerado durante o tempo de incubação da fase 2. De forma análoga ao ocorrido na fase 1, após o 105º dia, o volume produzido extrapolou o limite da curva. Porém, como o objetivo da análise de metano era confirmar a presença de microrganismos aptos a atividades metanogênicas e ativos, a produção crescente do mesmo foi uma resposta positiva ao esperado.

**Figura 16.** Representação gráfica da variação da concentração de gás metano (CH<sub>4</sub>) produzido em relação ao tempo em dias durante a 2ª Fase de Enriquecimento biótico sob condição metanogênica.



Fonte: Autor.

A produção de metano tanto na fase 1, quanto na fase 2, pode ser diretamente relacionada ao consumo de matéria orgânica apresentado nas Figuras 3 e 5, reafirmando a ocorrência de atividade microbiana metanogênica ativa e o sucesso do enriquecimento em propiciar o desenvolvimento de atividades biológicas das mesmas.

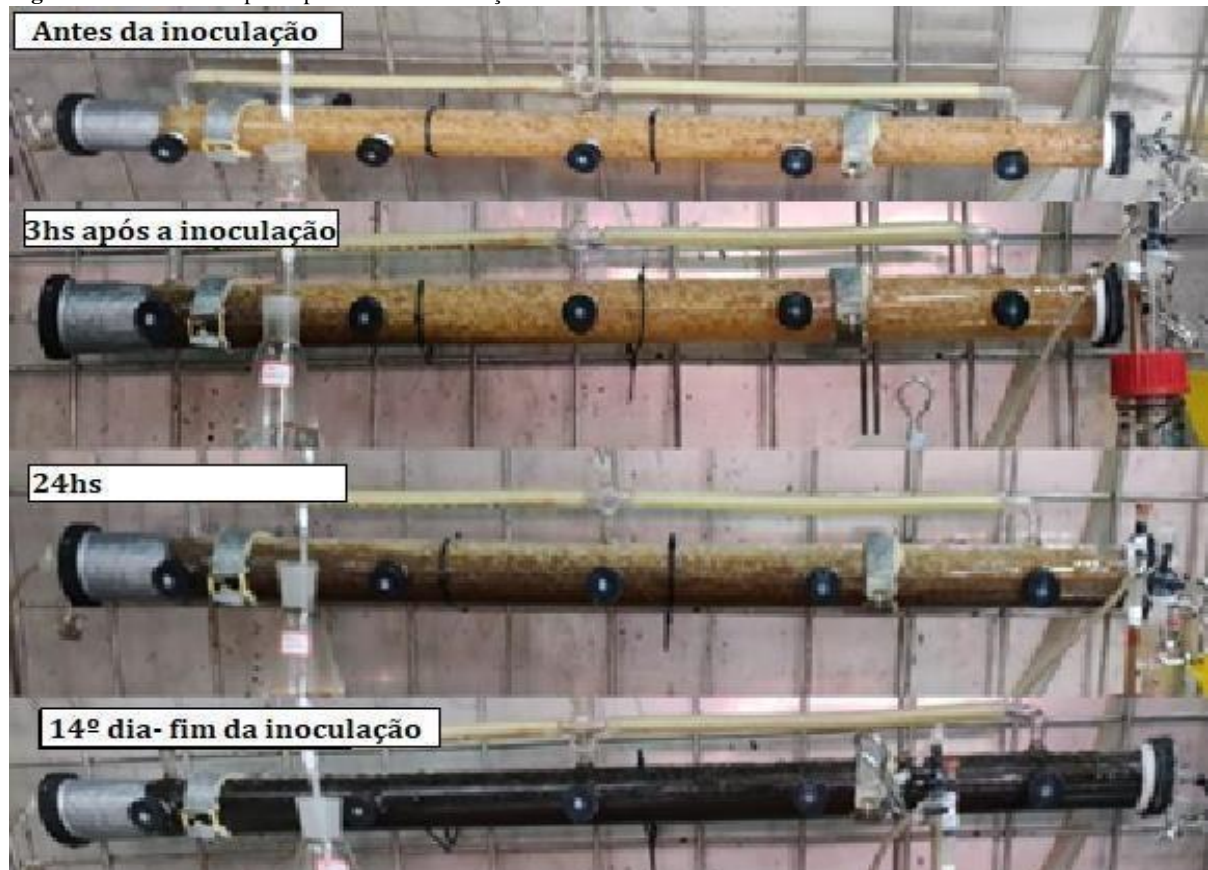
Similar ao comportamento na primeira fase, também através da cromatografia líquida foi detectado concentrações traços de 4 CP, proveniente da conversão do 2,4D. Na amostra coletada 3 dias após o preparo do meio de enriquecimento, foi quantificado a concentração de 0,32 mg/L de 2,4D e no 66º dia de operação, esse composto não foi mais detectado, logo, infere-se que o 2,4D foi consumido e convertido em 4C, composto este presente na concentração de 0,40 mg/L na mesma data.

Mostrando que a biomassa enriquecida ao longo dos 376 dias foi apta a degradar o 2,4D.

#### 4.3 INOCULAÇÃO DO RAHLF

A inoculação se mostrou efetiva devido ao aspecto visual significativo ressaltado pela formação de biofilme no leito fixo, como se vê na Figura 17:

**Figura 17:** Linha do tempo do processo de inoculação do RAHLF



Fonte: Autor

Pela análise de Sólidos Suspensos Voláteis – SSV, parâmetro esse utilizado como medida indireta de teor orgânico da amostra, também relacionado a biomassa presente, foi quantificado na entrada 0,64 g/L de biomassa, e na saída 0,36g/L, tendo ficado retido 0,28g/L no reator, equivalente a uma eficiência de 43,75% na aderência de microrganismos na espuma poliuretano.

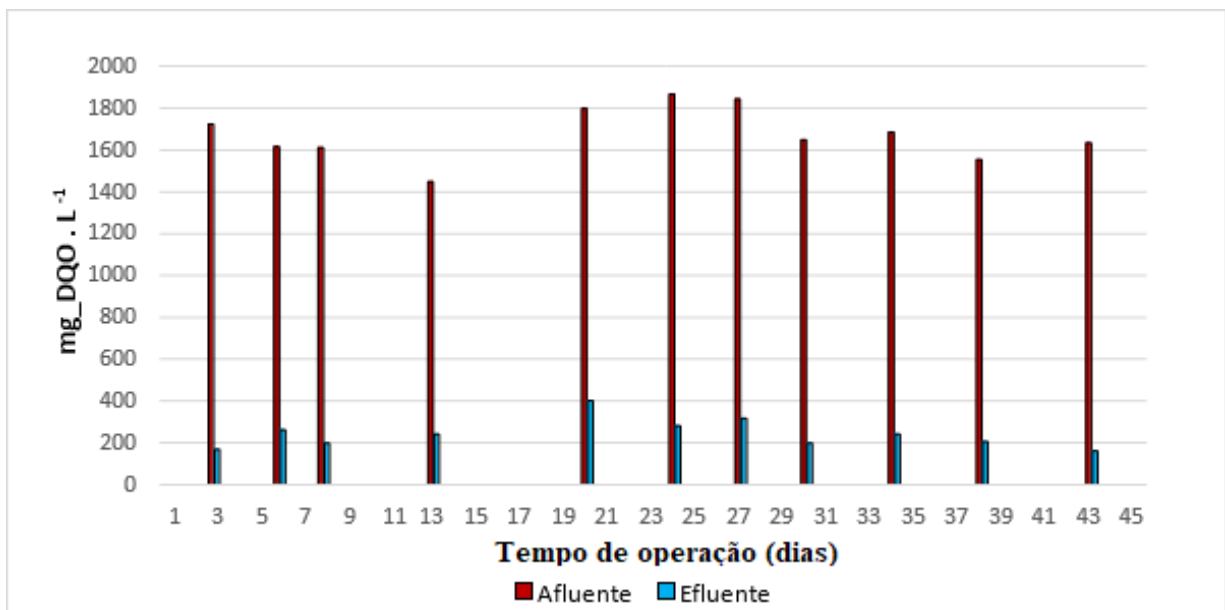
A diferença de coloração mostrada nos filtros na Figura 4, é justificada pelo alto teor de Sólidos Totais – ST, presentes no meio de enriquecimento, este com 2,69g/L na entrada e 1,07g/L na saída do reator. Portanto 66,05% de ST ficaram retidos no reator.

#### 4.4 RESULTADOS RAHLF

##### 4.4.1 Demanda Química de Oxigênio - DQO

Com relação ao decaimento de DQO, o reator obteve ótimo desempenho no que tange a degradação orgânica, com eficiência entre 77,30 - 90,98% em todo tempo de operação, que foram 50 dias. Isto é, a cultura microbiana presente no reator se manteve ativa independentemente da adição de 2,4D no meio de alimentação sintético. Na Figura 18 a seguir, é apresentada a discriminação temporal dos resultados obtidos de DQO nas amostras afluyente e efluente.

**FIGURA 18** - Representação gráfica do decaimento da concentração de matéria orgânica (DQO) consumida durante a operação do RAHLF.



Fonte: Autor

Nas três primeiras amostragens coletadas em afluyente e efluente do RAHLF,

considerando do dia zero ao 8º dia de operação, observou-se que a degrabilidade da matéria orgânica presente no meio sintético efetivada pelos microrganismos metanogênicos foi de aproximadamente, 90, 84 e 88% de eficiência, respectivamente, as quais reafirmaram a estabilidade do reator de imediato ao início da operação, até então, afim de primeiramente adaptar os microrganismos ao 2,4D, o mesmo não era adicionado ao meio. Porém, no vigésimo dia de operação, a eficiência de remoção decaiu para constatada para 77%. Apesar do decaimento, este resultado é satisfatório pois confere atividade microbiana ativa. Tal decaimento pode ter sido provocado decorrente ao intervalo maior, atípico, que houve para a realimentação do reator nesse período. Em consequência de problemas técnicos a alimentação foi suspensa por 7 dias.

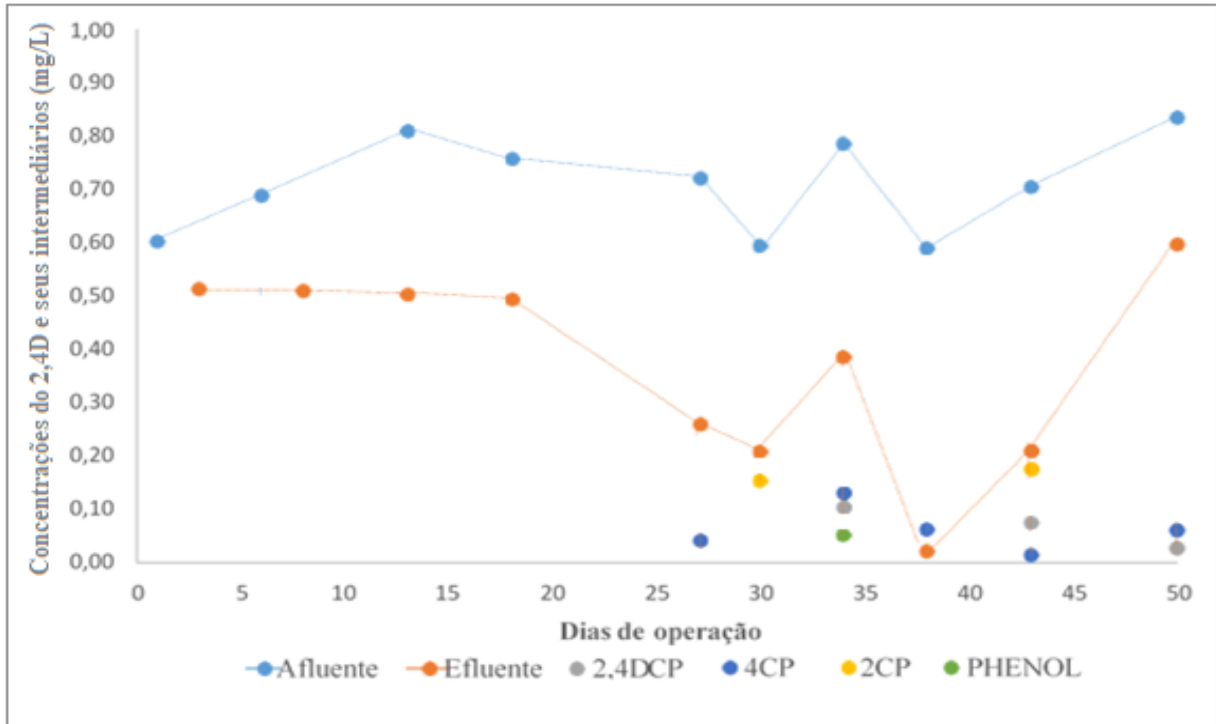
Todas as outras alimentações durante a operação do RAHLF, com exceção desta mencionada, foram de forma contínua com reposição do conteúdo do frasco de alimentação a cada 3-4 dias. Após o vigésimo dia de operação foi observado o pico de eficiência no 43º dia de operação, última amostra retirada para análise de DQO, com 91%, em oposição a menor eficiência medida neste período, no 27º dia, com 82%.

Em geral, desconsiderando o 20º dia, pois foi averiguada interferência significativa no resultado, o reator apresentou uma média na taxa de degrabilidade em torno a 86%. A constância e eficiência alta na degradação de DQO certificou a biodegradação da matéria orgânica, descartando a possibilidade de que a cultura microbiana não tivesse sido aderida ao suporte fixo do reator e/ou não tivesse desempenhando suas funções metabólicas pela inibição do 2,4D.

#### **4.4.2 Degradação 2,4D**

A respeito dos resultados obtidos mediante a cromatografia de alta eficiência das amostras coletadas do afluente e efluente do RAHLF com a finalidade de aferição das concentrações do 2,4D e seus intermediários, foi comprovado remoção eficiente do 2,4D em todas as amostras coletadas durante todo o período de operação do RAHLF, na ordem de 14,79 a 96,52% de eficiência de remoção. Também, foram detectados em algumas amostras a presença de concentrações traços dos intermediários 2,4DCP, 2CP, 4CPe fenol, confirmando a ocorrência da rota de degradação do 2,4D sob condições metanogênicas, pois houve transformação do 2,4D e formação de seus intermediários. Segue na Figura 19, o detalhamento dos resultados obtidos pelo método de análise HPLC.

**FIGURA 19:** Concentração de 2,4D e intermediários (2,4DCP, 2CP, 4CP e Fenol) das amostras afluentes e efluentes retiradas durante a operação RAHLF.



**Fonte:** Do autor.

Nitidamente exposto no gráfico acima, representado pela figura 19, em todas amostras analisadas verificou-se biodegradação do 2,4D. De forma esperada, logicamente, o resultado da primeira amostra coletada, no 3º dia de operação do reator, mostrou a menor depleção dentre todos os resultados, com eficiência de aproximadamente, 15%, que pode ser justificado pelo período de adaptação ao composto com início da adição no oitavo dia de operação. Outro fator que corrobora a este argumento, é o comportamento apresentado pelo reator nos posteriores resultados, os quais indicaram gradativo aumento da eficiência na remoção do composto 2,4D conforme o decorrer dos dias de operação. No 8º, 13º e 18º dias de operação a eficiência foi de 26, 38 e 35%, respectivamente, em média mais que o dobro daquela medida no 3º dia. A partir do 27º, o reator ficou estável e manteve uma média razoável de 63% de eficiência, tendo o seu pico máximo no 38º, com 97%, saindo da concentração inicial de 0,59 mg/L e chegando a 0,02 mg/L.

Tendo em consideração que os intermediários são produzidos a partir da transformação do 2,4D após processos químicos e biológicos, não se esperava detectar nenhum destes nas amostras em afluente, pois as amostras afluentes foram retiradas diretamente do meio basal sintético de alimentação com a adição tão somente do 2,4D. Porém, como foi apontado na figura 19, no sexto e trigésimo oitavo dia de operação, foram detectados concentrações traços de 4CP e 2CP, uma explicação coerente para tal eventualidade se refere as transformações do 2,4D em



seus intermediários por meio de reações químicas dentro do frasco de alimentação antes mesmo de meio basal passar pelo RAHLF. Contudo, o intuito deste trabalho se restringe a avaliar o potencial de conversão do 2,4D mediante apenas e exclusivamente por biodegradação. Logo, estes dados não serão discutidos mais.

No 27º dia de operação, assim como nos demais que o sucederam, em todas amostras efluentes foram detectados concentrações-traços dos intermediários 2,4DCP, 2CP, 4CP e fenol. O 4CP presente em todas amostras, com exceção da amostra do 30º dia, na qual foi detectado apenas o 2CP, que é a alternativa da rota após a transformação do 2,4DCP, mostrando a degradação biológica do 2,4D.

No 34º dia, foi reconhecido a transformação completa do 2,4D, pois foi detectado todos intermediários, fechando a rota completa em concentrações-traços de fenol. Neste vale ressaltar todas as concentrações em efluente, estas foram: 2,4D em 0,3853mg/L; 2,4DCP em 0,103 mg/L; 4CP em 0,130 e fenol em 0,052 mg/L.

No dia 43º, com exclusão do fenol, que realmente é de difícil detecção devido sua característica de alta volatilidade, assim como no 34º dia, foram constatados os demais intermediários, com 2,4D em 0,705 mg/L; 2,4DCP em 0,075 mg/L; 2CP em 0,174 e 4CP em 0,013 mg/L.

## 5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no decorrer deste trabalho comprovaram a efetividade da estratégia de enriquecimento de microrganismos autóctones, presentes no sedimento do Reservatório de Itaipú – PR, em condições metanogênicas e sua inoculação no Reator horizontal de Leito Fixo (RAHLF) para a degradação anaeróbia do 2,4D. A confirmação da hipótese deste projeto a respeito da potencialidade de degradação por culturas autóctones previamente expostas ao 2,4D, atesta a teoria de Deursen (2016), o qual afirmou em seu protocolo que o aproveitamento de solos e sedimentos pré-expostos a agrotóxicos, quando utilizados como inóculos, tendem a dispor de microrganismos aptos a degradar com maior eficiência o agrotóxico em questão. Vários outros estudos se beneficiaram dessa metodologia e tiveram êxito, como o de Araújo e Orlanda (2014), o qual aplicou como inóculo, linhagens de bactérias isoladas de solo oriundo de cultivo de feijão e de mandioca do cerrado Maranhense para degradação do 2,4D.

Nas amostras que foram submetidas a análise por cromatografia líquida, foram detectados concentrações traços de 2,4DCP, 4CP, 2CP e FENOL, enquanto em contrapartida, em relação ao composto em estudo, o 2,4D, houveram reduções significativas nas concentrações no efluente, concomitantemente com a produção dos metabólitos intermediários da degradação do 2,4D. Esses resultados apontam para que a existência dos intermediários se deram a partir da degradação do 2,4D, revalidando a rota metabólica da degradação anaeróbia do 2,4D apresentada por Ha *et al.*, (2018) e confirmada por Brucha *et al.*, (2021), onde propuseram que a transformação anaeróbia do 2,4D se dá pela formação de 2,4DCP, que por sua vez sofre desalogenação resultando nos monoclorofenóis 2CP e 4CP, que são convertidos em fenol, produto considerado final da rota, sendo posteriormente oxidado. Para Silva *et al.*, (2007), independente da rota de degradação e a condição ambiental (aeróbia ou anaeróbia), o 2,4-diclorofenol (2,4DCP) é o principal produto de degradação do 2,4D, sendo detectado em todas rotas de degradação já estudadas.

Para ser possível a comparação dos resultados obtidos em outros trabalhos de mesma temática, é fundamental a igualdade dos parâmetros e fatores aplicados, porém, como em sua grande maioria, os trabalhos nessa linha manipulam culturas autóctones diversificadas, e até então, pelo que se sabe, de acordo com outras literaturas existentes, o processo de degradação acontece em consequência de inúmeros fatores correlacionados, entre os quais é considerado a genética da cultura de microrganismos envolvidos, a composição química do meio de cultura, entre outros (LANDIS *et al.*, 2003; MACHADO, 2004; SILVA *et al.*, 2004; WALTERS, 2017),

logo, é limitado as comparações analíticas. Neste trabalho, empregamos como inóculo sedimento e coletado no Reservatório de Itaipu para compreender o potencial de degradação e biotransformação do 2,4-D sob condições anaeróbias. Outro trabalho, de Barros *et al.*, (2022), também utilizou como inóculo as mesmas amostras para o tratamento de 2.4-D, no entanto, o mesmo foi desenvolvido em ensaios de reatores em batelada diferentemente deste que consistiu no tratamento em RAHLF.

Confrontando os resultados obtidos nos dois trabalhos, considerando que ambos partiram do mesmo inóculo, meio basal e condições ambientais, assim como mesma concentração inicial de 2,4D no meio, enquanto nos ensaios bióticos sob condições metanogênicas nos ensaios em reatores em bateladas, a degradação parcial do 2,4D de aproximadamente 75%, ocorreu apenas no 20º dia (BARROS, 2022). Neste trabalho, no RAHLF, com tempo de detenção hidráulica de 88 horas, o equivalente a 3 dias e 16 horas, em média, obteve eficiência de remoção do 2,4D de 56,10%.

No que tange a eficiência do tratamento em RAHLF, estudos anteriores comprovaram a eficiência acentuada de degradação de compostos de difícil degradação, característica dos agrotóxicos (BRUCHA, 2007; DAMASCENO, 2008), constatado também, neste trabalho, além de evidenciar por meio do comparativo anterior, que como esperado, o RAHLF, é o tipo de reator mais adequado para tratamento desse tipo de composto.

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesse trabalho, mostraram êxito na estratégia de enriquecer comunidade microbiana autóctone provenientes do sedimento do Reservatório de Itaipú-PR degradadora do 2,4D e utilizá-la como inóculo no Reator anaeróbio de leito fixo para tratamento do 2,4D. Os microrganismos enriquecidos comprovaram-se adequados na biodegradação do composto em estudo, comprovando a hipótese de que culturas pré-exposta ao contaminante adquirem maior capacidade de remoção do mesmo.

A rota considerada para a degradação do 2,4D neste trabalho, foi a do 2,4DCP, 2CP, 4CP e por fim, fenol. Tendo como composto intermediário principal o 2,4DCP.

A escolha do tipo de reator foi fundamental para conseguir detectar os componentes intermediários, visto que reatores com regime hidráulico próximo ao pistonado apresentam maior eficiência ao tratamento de compostos tóxicos de difícil degradação.

## 7 RECOMENDAÇÕES

Como sugestões para trabalhos futuros, em conformidade com sendo uma ótima opção para trabalhos que queiram desenvolver nessa linha de tratamento e de composto seguem:

- Operar o reator com adições de 2,4D em concentrações gradativamente crescentes, com a intenção de conhecer as limitações de biorremediação desse composto;
- Coletar amostras nos pontos intermediários a entrada e saída, objetivando perfilar com maior precisão a rota de degradação do 2,4D;
- Extração e sequenciamento do RNA na intenção de caracterizar e identificar os microrganismos responsáveis pela biotransformação do 2,4D.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, Waldemar de; FIÚZA, José; MAGALHÃES, Cláudio Marques; JUNGER, Celso Merola. Agrotóxicos. **Cadernos de Saúde Pública**. 1985, v. 1, p. 220-249. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0102-311X1985000200008>. Acesso em: 01 dez. 2021.

AMARANTE JUNIOR, Ozelito Possidônio de; SANTOS, Teresa Cristina Rodrigues dos. **Avaliação do potencial de contaminação por herbicidas:** determinação do 2,4-D e do seu principal produto de degradação em solos de campos de cultivo de eucaliptos. 2002. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2002.

ANDRADE, Juliano de Almeida; AUGUSTO, Fabio; JARDIM, Isabel Cristina Sales Fontes. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética Química**. São Paulo, 2010, p. 17-43. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-46702010000300002>. Acesso em: 01 dez. 2021.

ANVISA: **Parecer Técnico de Reavaliação Nº 07, de 2015**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2015.

ANVISA. **Proposta de RDC:** reavaliação toxicológica do ingrediente ativo 2,4-d.[S. L.],2020. 20 slides, color. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/arquivos-noticias-anvisa/1943json-file-1>. Acesso em: 20 Jan. 2022.

APHA. **Standard Methods:** for the examination of water and wastewater. 23. ed. Washington: American Public Health Association, 2017. 1546 p. Disponível em: <https://doi.org/10.2105/SMWW.2882.216>

ARAÚJO, Lindomar Cordeiro Antunes de; ORLANDA, José Fábio França. BIODEGRADAÇÃO DO HERBICIDA 2,4-D UTILIZANDO BACTÉRIAS SELECIONADAS DO SOLO DO CERRADO MARANHENSE. **Pesticidas:** Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, [S.L.], v. 24, p. 0-12, 16 dez. 2014. Universidade Federal do Paraná. <http://dx.doi.org/10.5380/pes.v24i1.39011>.

BARROS, Gabriela Vaz Lobo; ZAMPIERI, Bruna del Busso; MATIAS, Tális Pereira; FRESCHI, Gian Paulo Giovanni; BARBOSA, Adriano; DAMASCENO, Leonardo Henrique Soares; BRUCHA, Gunther. Estudo da biodegradação anaeróbia do herbicida 2,4-d sob diferentes condições de oxirredução. **Research, Society and Development**, [S.L.], v. 11, n. 6, p. 1-12, 25 abr. 2022. Research, Society and Development. <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i6.28848>.

BAILEY, George W.; WHITE, Joe L. Factors influencing the adsorption, desorption, and movement of pesticides in soil. In: GUNTHER, Francis A.; GUNTHER, Jane Davies(ed.). **Single Pesticide Volume:** the triazine herbicides. Riverside, California: Springer-Verlag New York Inc., 1970. Cap. 4. p. 29-81. Volume 32. Disponível em:

<https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-1-4615-8464-3.pdf>. Acesso em: 03 dez. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 03, de 16 de janeiro de 1992. Ratifica os termos das "Diretrizes e orientações referentes à autorização de registros, renovação de registro e extensão de uso de produtos agrotóxicos e afins - no 1, de 9 de dezembro de 1991", publicadas no D.O.U. em 13 - 12 -91. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 17 jan 1992. p.16.

BRUCHA, Gunther; ALDAS-VARGAS, Andrea; ROSS, Zacchariah; PENG, Peng; ATASHGAHI, Siavash; SMIDT, Hauke; LANGENHOFF, Alette; SUTTON, Nora B. **2, 4 - Dichlorophenoxyacetic acid degradation in methanogenic mixed cultures obtained from Brazilian Amazonian soil samples. Biodegradation Journal**. 2021. Disponível em: 10.1007/s10532-021-09940-3. Acesso em: 01 dez. 2021.

BRUCHA, Gunther. **Influência dos nutrientes nitrogênio e fósforo na degradação anaeróbia do pentaclorofenol e na diversidade microbiana dos sedimentos enriquecidos do Estuário de Santos - São Vicente - Estado de São Paulo**. 2007. 239 f. Tese (Doutorado em Engenharia Civil) – Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2007.

BRYANT, Frank O. Biodegradation of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid by dichlorophenol-adapted microorganisms from freshwater, anaerobic sediments. **Microbiology and Biotechnology**, [S.I], p. 276–281, nov. 1992. Disponível em: DOI: 10.1007/BF00174483

CHOWDHURY, Ashim; PRADHAN, Saswati; MONIDIPTA, Saha; NILANJAN, Sanyal. Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. **Indian J Microbiol**, 2008. pp: 114-127. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582003000300020>. Acesso em: 01 dez. 2021.

CHRISTOFFOLETI, P.J; LÓPEZ-OVEJERO, R. Principais aspectos da resistência de plantas daninhas ao herbicida glyphosate. **Planta Daninha**. 2003, v. 21, n. 3 pp. 507- 515. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-83582003000300020>. Acesso em: 01 dez. 2021.

CNA, Confederação da Agricultura Pecuária do Brasil; CEPEA, Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. **PIB do Agronegócio**: pib do agronegócio alcança participação de 26,6% no pib brasileiro em 2020. [S. L.]: Cepea, 2021. 18 p. Disponível em:[https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/boletins/sut.pib\\_dez\\_2020.9mar2021.pdf](https://www.cnabrazil.org.br/assets/arquivos/boletins/sut.pib_dez_2020.9mar2021.pdf) f. Acesso em: 02 dez. 2021.

COUTINHO, Cláudia F. B.; TANIMOTO, Sonia T.; GALLI, Andressa; GARBELLINI, Gustavo S.; TAKAYAMA, Marisa; AMARAL, Raquel B. Do; MAZO, Luiz H.; AVACA, Luis A.; MACHADO, Sergio A. S. Pesticidas: Mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, [S.l.], v. 15, dez. 2005. Disponível em: [doi:http://dx.doi.org/10.5380/pes.v15i0.4469](http://dx.doi.org/10.5380/pes.v15i0.4469). Acesso em: 02 dez. 2021.

DAMASCENO, Leonardo. **Degradação do Aldicarbe em Biorreator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo**. 2008. 161 f. Tese (Doutorado em Engenharia Hidráulica e Saneamento) - Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2008.

DELLAGNEZZE, Bruna Martins; SOUZA, Gabriel Vasconcelos de; MARTINS, Laercio Lopes; Domingos, Daniela Ferreira; Limach e, Elmer E.G.; Vasconcellos, Suzan Pantaroto de; Cruz, Georgiana Feitosa da; Oliveira, Valéria Maia de. Bioremediation Potential of Microorganisms Derived from Petroleum Reservoirs. **Marine Pollution Bulletin**, Oxford. 2014. p. 191-200. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.003>

DEURSEN, Margo Van. **Biodegradation of a pesticide mixture under different redox conditions**. University of Wageningen: Sub-department of Environmental Technology, 2016. 60 p.

DOMINGUES, Mercia Regina. **Avaliação da metanogênese e sulfetogênese em reatores anaeróbios em batelada e leito fixo, sob condições termofílicas**. 164p. Dissertação (mestrado) – Departamento de Hidráulica e Saneamento/Escola de Engenharia de São Carlos/Universidade de São Paulo, São Carlos. (2001)

EMBRAPA. Empresa Brasileira De Pesquisa Agropecuária. **Plantas Daninhas**. [2020]. Disponível em: <https://www.embrapa.br/tema-plantas-daninhas/sobre-o-tema>. Acesso em: 01 dez. 2021.

EPA. Environmental Protection Agency. **A Citizen's Guide to Bioremediation, Soil Waste and Emergency Response** [2001]. Disponível em: <http://www.epa.gov/>. Acesso em nov. 2020.  
FEIDEN, Armin. O PLANO DA BACIA DO PARANÁ 3. Toledo: Armin Feiden, 2019. Disponível em [http://www.iat.pr.gov.br/sites/agua-terra/arquivos\\_restritos/files/documento/202005/bp3\\_apresentacao\\_plano-de-bacia\\_toledo.pdf](http://www.iat.pr.gov.br/sites/agua-terra/arquivos_restritos/files/documento/202005/bp3_apresentacao_plano-de-bacia_toledo.pdf)

FORESTI, E; ZAIA, Marcelo; CABRAL, A. K. A; NERY, V. Horizontal-flow anaerobic immobilized sludge (HAIS) reactor for paper industry wastewatertreatment. **Braz. J. Chem. Eng.**, V. 12, p. 157-163. 1995

GODOI, Leandro Augusto G. de; COSTA, Rachel Biancalana; GUERRERO, Renata de Bello Solcia; SANTOS, Carla Eloísa Diniz dos; MIRANDOIA, Carolina Ap. Sabatini; ADORNO, Maria Angela Tallarico. **Métodos Analíticos aplicados ao monitoramento de processos biológicos de tratamento de águas residuárias**. São Carlos: Eesc/Usp, 2021. 263 p.

GRADY, C. P. Leslie. Biodegradation: its measurement and microbiological basis. **Biotechnology & Bioengineering**, New York, v. 27, n. 5, p. 660-674, 1985.

HA, Duc Danh. Degradação anaeróbia do ácido 2,4-diclorofenoxiacético por *Thauera* sp. DKT. **Biodegradação**, [s. l], p. 499-510, 13 ago. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10532-018-9848-7>

HOWARD, Philip H. **Handbook of Environmental Fate and Exposure Data: for organic chemicals, volume iii pesticides**. Flórida: Lewis Publishers, 1991. 712 p.



IBAMA. **Os 10 ingredientes ativos mais vendidos: 2020**. [S. L.], 2021. Disponível em: [http://ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/2020/Os\\_10\\_I\\_As\\_vendidos\\_2020.xls](http://ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/2020/Os_10_I_As_vendidos_2020.xls). Acesso em: 20 jan. 2022.

INCA. Instituto Nacional de Câncer. **Agrotóxicos** [2019]. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/exposicao-no-trabalho-e-no-ambiente/agrotoxicos>. Acesso em: nov. 2020.

LANDIS, W.; SOFIELD, R.; YU, M.; LANDIS, W. G. **Introduction to Environmental Toxicology: Impacts of Chemicals Upon Ecological Systems**. 3ª Ed. Lewis Publisher, 2003. 512.

MACHADO, A. F. **Degradação do herbicida 2,4-D por processos oxidativos avançados**. 2004. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 2004.

MMA. Ministério do Meio Ambiente. **Produtos Agrotóxicos** [2019]. Disponível em: <http://www.epa.gov/>. Acesso em nov. 2020.

MACEDO NETO, D.; FROEHNER, S.; MACHADO, K. S. Avaliação do transporte do ácido 2,4-diclorofenoxiacético através de um lisímetro. **Quím. Nova**, v. 35, n.9, p. 1809- 1813, 2012.

NORTOX. **2,4-D Nortox - Bula**: registrado no ministério da agricultura, pecuária e abastecimento ∴ mapa sob nº 03009. Araçongas: Nortox S/A, 2018. 14 p.

OLIVEIRA, Amanda Cabral Corrêa de. **Metodologia de inoculação, variabilidade e controle de Rhizoctonia solani na cultura da cenoura**. 2006. 63 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Agronomia/Fitopatologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2006.

OLIVEIRA, Sonia Valle Walter Borges de. **Avaliação da Degradação e Toxicidade de Formaldeído em Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo**. 2001. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Hidráulica e Saneamento – EESC/USP, São Carlos, 2001.

PIGNATI, Wanderlei Antonio; FRANCCO, Antonio Neri de Souza; LARA, Lima Stephanie Sommerfeld de; CORREA, Marcia Leopoldina Montanari; BARBOSA, Jackson Rogério; LEÃO, Luís Henrique da Costa; PIGNATI, Marta Gislene. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: Estratégia de vigilância à saúde. **Ciência e saúde coletiva**, [S. L.], p. 3281-3293, 2017. Mensal. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1413-812320172210.17742017>.

ROCHA, Anderson Sandro da; NÓBREGA, Maria Teresa de; CUNHA, José Edézio da. As unidades de paisagem, as vertentes características e os sistemas pedológicos na bacia hidrográfica do Paraná 3. **Ateliê Geográfico**, [S.L.], v. 12, n. 1, p. 51-70, 3 ago. 2018. Universidade Federal de Goiás. <http://dx.doi.org/10.5216/ag.v12i1.44176>.

SAIA, Flávia Talarico. **Contribuição à exploração tecnológica dos estudos microbianos realizados no programa BIOTA FAPESP: Avaliação do potencial da degradação anaeróbia de pentaclorofenol (PCP) em reator anaeróbio horizontal de leito fixo (RAHLF)**. 2005. Tese

(Doutorado) – Departamento de Hidráulica e Saneamento, EESC- USP, São Paulo, 2005.

SILVA, S. C. Brasil é o quarto maior consumidor de agrotóxicos. **O Estado de São Paulo**, 18.jul.1999, p. A16, Geral Ambiente.

SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S.; FAY, E. F. Biotransformação de agrotóxicos e biorremediação. In. SILVA, C. M. M. de S.; FAY, E. F. (Ed.). **Agrotóxicos e ambiente**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 400 p.

SILVA, T. M.; STETS, M. I.; MAZZETTO, A. M.; D. ANDRADE, F.; PILEGGI, S. A. V.; FÁVERO, P. R.; CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; CARNEIRO, P. I. B.; PILEGGI, M. **Degradation of 2,4-D herbicide by microorganisms isolated from Brazilian contaminated soil**. Brazilian Journal of Microbiology, v. 38, n. 3, p. 522-525, 2007

SOUZA, Giovane Sebastião de. **Efeito do Herbicida 2,4-D em Indicadores Biológicos de Qualidade de Solo**. 2016. 40 f. TCC (Graduação) - Curso de Agronomia, Instituto Federal de Minas Gerais, São João Evangelista, 2016.

US EPA. United States Environmental Protection Agency. **Pesticide Ingredients** [2005]. Disponível em: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients>. Acesso em nov. 2020.

WALTERS, J. **Environmental Fate of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid. Environmental Monitoring and Pest Management**, Department of Pesticide Regulation, Sacramento. Disponível em: Acesso em: 23 set. 2022.

XIA, Zhen-Yuan; ZHANG, Long; ZHAO, Yan; YAN, Xin; LI Shun-Peng; GU, Tao.; JIANG, Jian-Dong. Biodegradation of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid by a new isolated strain of *Achromobacter* sp. LZ35. **Curr Microbiol**, [S. L.], p. 193-202, 2017. Disponível em: <https://doi:10.1007/s00284-016-1173-y>.

YANZE-KONTCHOU, C.; GSCHWIND, N. Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain.; **Environmental Microbiology**, Oxford, v. 60, n. 12, p. 4297-4302, Dec. 1994. Disponível em: [10.1128/aem.60.12.4297-4302.1994](https://doi:10.1128/aem.60.12.4297-4302.1994).

ZAIAT, Marcelo. **Desenvolvimento e Análise de Biorreatores Anaeróbios contendo células imobilizadas para tratamento de águas residuárias: Reator Anaeróbio Horizontal de Leito Fixo e Reator Anaeróbio Operado em Bateladas Sequenciais**. 2003. 135 f – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2003

ZIMMERMAN, P.W. ; HITCHCOK, E. A. 1942. Substituted phenoxy and benzoic acid growth substances and the relation of structure to physiological activity. **Coritr. Boyce Thompson Inst.**, 12, 33.