



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA
E RECURSOS NATURAIS



**BIOTRANSFORMAÇÃO DO PESTICIDA METIL PARATION POR FUNGOS
ISOLADOS DA ASCÍDIA *DIDEMNUM LIGULUM***

GISELE NUNES RODRIGUES

São Carlos

2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA
E RECURSOS NATURAIS



**BIOTRANSFORMAÇÃO DO PESTICIDA METIL PARATION POR FUNGOS
ISOLADOS DA ASCÍDIA *DIDEMNUM LIGULUM***

GISELE NUNES RODRIGUES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim

São Carlos

2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

R696bp Rodrigues, Gisele Nunes.
Biotransformação do pesticida metil paration por fungos
isolados da ascídia *Didemnum ligulum* / Gisele Nunes
Rodrigues. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
103 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2013.

1. Microbiologia. 2. Biodegradação. 3. Pesticidas. 4.
Fungos marinhos. I. Título.

CDD: 576 (20^a)

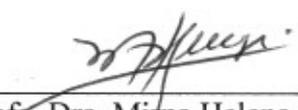
Gisele Nunes Rodrigues

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em 29 de julho de 2013

BANCA EXAMINADORA

Presidente



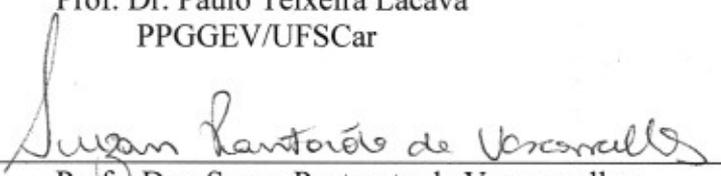
Prof. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim
(Orientadora)

1º Examinador



Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava
PPGGEV/UFSCar

2º Examinador



Prof. Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcelos
UNIFESP-SP

À minha família, que sempre apoiou meus estudos e me deu condições para realizá-los.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Mirna Helena Regali Seleglim, pela oportunidade de realizar este mestrado, pela confiança depositada em mim e pela orientação ao longo desses dois anos.

À todos os colegas do Laboratório de Ecologia de Micro-organismos Aquáticos (LEMA – UFSCar), pelos constantes ensinamentos, apoio e força que me forneceram durante a realização deste trabalho

À Darci, pelos ensinamentos, auxílio em várias etapas do trabalho e “puxões de orelha”, quando necessário.

Ao Prof. André Meleiro Porto, pela parceria firmada, fornecendo-me toda a estrutura necessária para realizar grande parte desta pesquisa e pela orientação e ensinamentos proporcionados.

Aos colegas do Laboratório de Química Orgânica e Biocatálise (IQSC – USP), especialmente Natália, Willian, João e Marília, por todo tempo dedicado para me ensinar e ajudar na realização de algumas etapas deste projeto.

À Profa. Suzan Pantaroto de Vasconcellos, por gentilmente me receber em seu laboratório, disponibilizando-me toda estrutura necessária para o cumprimento de uma parte importante deste trabalho, além de pessoalmente me auxiliar no dia-a-dia do laboratório.

Ao Michel, pelos ensinamentos, paciência, dedicação e insistência para a obtenção de sucesso nas etapas finais deste projeto.

À meus pais, pelo incondicional apoio e respeito às minhas decisões sobre o caminho a seguir.

Ao meu namorado, em breve marido, Pedro, pela paciência, carinho, apoio e incentivo prestados durante os momentos de dificuldade.

Ao CNPq, pelo auxílio financeiro fornecido (Processo: 136202/2011-0).

A todos, que de alguma maneira, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Os pesticidas são compostos, potencialmente tóxicos ao homem e demais seres vivos, que hoje são indispensáveis na remoção de pragas na agricultura mundial. O resultado do seu uso excessivo é a inevitável contaminação dos ecossistemas aquáticos e terrestres. A necessidade da degradação destes compostos tem sido fonte de diversos estudos. A biodegradação enzimática de pesticidas sintéticos por micro-organismos representa uma importante estratégia para a remoção desses poluentes do meio ambiente. Uma excelente fonte de compostos bioativos altamente oxigenados, com enorme potencial bioenzimático a ser explorado na biotransformação de xenobióticos, como os pesticidas, são os fungos marinhos. Sendo assim, o objetivo deste projeto foi estudar a biotransformação do pesticida organofosforado metil paration utilizando-se de fungos de origem marinha isolados da ascídia *Didemnum ligulum*. Inicialmente, 17 linhagens de fungos passaram por uma triagem em meio de cultura sólido contendo diferentes concentrações (120 mg/L, 240 mg/L e 360 mg/L) de pesticida, e as que apresentaram o melhor desenvolvimento nesse meio, de acordo com observação por diâmetro de crescimento da colônia, foram submetidas a um cultivo em meio líquido para quantificar a possível degradação do metil paration. Três linhagens foram selecionadas para essa segunda etapa, na qual a eficiência de degradação foi monitorada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O metil paration foi completamente degradado em 20 dias, porém não houve significativa diferença entre as reações com as linhagens de fungos e o controle abiótico. Os micro-organismos, no entanto, se mostraram capazes de metabolizar o *p*-nitrofenol, principal produto de degradação do pesticida metil paration. Assim, esses três fungos marinhos, identificados como duas linhagens de *Penicillium citrinum* e uma de *Fusarium proliferatum*, demonstraram ser importantes fontes para estudos de biotransformação de xenobióticos.

Palavras-chave: organofosforados • xenobióticos • fungos marinhos • biodegradação

ABSTRACT

Pesticides are potentially toxic compounds to humans and other living beings, which are indispensable for pests removal in agriculture worldwide. The result of their overuse is the inevitable contamination of aquatic and terrestrial ecosystems. The need for degradation of these compounds has been subject of several studies. The enzymatic biodegradation of synthetic pesticides by microorganisms is an important strategy for removing these pollutants from the environment. Marine fungi are an excellent source of highly oxygenated bioactive compounds with huge potential to biotransform xenobiotics such as pesticides. Thus, the objective of this project was to study the biotransformation of the organophosphate pesticide methyl parathion using fungi of marine origin isolated from the ascidian *Didemnum ligulum*. Initially, 17 fungi strains have undergone screening on agar culture medium containing different pesticide concentrations (120 mg/L, 240 mg/L and 360 mg/L), and the three strains that showed the greatest growth diameter of the colony, were subjected to culture in a liquid medium to quantify the possible degradation of the methyl parathion. For these strains, the efficiency of degradation was monitored by high performance liquid chromatography (HPLC). Methyl parathion was almost completely degraded in 20 days, but there was no significant difference between the reactions with the fungi strains and the abiotic control. The microorganisms, however, showed ability to metabolize *p*-nitrophenol, the main degradation product of methyl parathion. In conclusion, these three marine fungi, identified as two strains of *Penicillium citrinum* and one strain of *Fusarium proliferatum*, have proven to be important sources to study xenobiotic biotransformation.

Keywords: organophosphorous • xenobiotics • marine fungi • biodegradation

SIGLAS, ABREVIACOES E SMBOLOS

| | |
|----------------|---|
| ANDA | Associação Nacional para Difuso de Adubos |
| ANVISA | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| ASW | gua do mar artificial (Artificial Sea Water) |
| ATSDR | Agência de Registro de Substâncias Txicas e Doenças (“Agency for Toxic Substances and Disease Registry”) |
| CEBIMar | Centro de Biologia Marinha |
| CLAE | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência |
| CONAMA | Conselho Nacional do Meio Ambiente |
| CYP | Enzima Monooxigenase Citocromo P450 |
| DDD | Diclorodifeniltricloroetano |
| DMF | Dimetilfosfato |
| DMTF | Dimetiltiofosfato |
| EPA | Agência de Proteção Ambiental (“Environmental Protection Agency”) |
| FDA | Foods and Drug Administration |
| HPLC | Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (“High Performance Liquid Chromatography”) |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IPCS | Programa Internacional De Segurança Química (“International Program of Chemical Safety”) |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MMA | Ministério do Meio Ambiente |
| MP | Metil Paration |
| MPH | Metil Paration Hidrolase |
| MS | Ministério da Saúde |
| OPAA | Organofosfato Anidrolase cida |
| OPAS | Organização Pan-Americana da Saúde |
| OPH | Organofosforado hidrolase |
| OPs | Pesticidas Organofosforados |
| PAHS | Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos |
| PCBs | Bifenilas policlorinadas |
| PND | Plano Nacional de Desenvolvimento |
| PNF | <i>p</i> -nitrofenol |
| SINDAG | Sindicato Nacional da Indústria de produtos para Defesa Agrícola |
| SVS | Secretaria de Vigilância Sanitária |
| UFPR | Universidade Federal do Paraná |
| UNIFESP | Universidade Federal de São Paulo |
| USP | Universidade de São Paulo |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 - Taxa de crescimento de vendas no mercado de agrotóxicos no Brasil e no mundo entre 2000 e 2010 (Fonte: ANVISA – UFPR, 2012). | 17 |
| Figura 2 - Produção agrícola e consumo de agrotóxicos e fertilizantes químicos nas lavouras do Brasil, de 2002 a 2011. (Fonte: Carneiro <i>et al.</i> , 2012. Elaborado a partir de SINDAG, 2009 e 2011; ANDA, 2011; IBGE/SIDRA, 2012; MAPA, 2010). | 18 |
| Figura 3 - Estrutura geral dos pesticidas OPs (modificado de Porto <i>et al.</i> , 2011). | 19 |
| Figura 4 - Exemplos de pesticidas OPs mais comercializados (Fonte: Porto <i>et al.</i> , 2011). | 20 |
| Figura 5 - Reações da fase I e II do metabolismo de xenobióticos nas células do fígado humano (Fonte: Costa <i>et al.</i> , 2004). | 21 |
| Figura 6 – Estrutura química do pesticida metil paration..... | 22 |
| Figura 7 - Metabolismo do metil paration em mamíferos mostrando os potenciais bioprodutos gerados (Fonte: Barr <i>et al.</i> , 2002). | 23 |
| Figura 8 - Diagrama de dispersão do metil paration em diversos compartimentos do meio ambiente (Fonte: Araújo, 2006). | 25 |
| Figura 9 - Diferentes caminhos de degradação do metil paration por micro-organismos (Fonte: Singh e Walker, 2006). | 30 |
| Figura 10 - Distribuição dos novos compostos encontrados em fungos de origem marinha em função da fonte de origem dos fungos (Fonte: Bugni e Ireland, 2004). | 33 |
| Figura 11 - Fluxograma da metodologia aplicada à triagem dos fungos em meio de cultura sólido. | 41 |
| Figura 12 - Fluxograma dos passos relativos ao cultivo dos fungos em meio líquido e posterior extração. | 44 |
| Figura 13 - Fluxograma da metodologia relativa à etapa de extração do meio de cultivo líquido..... | 45 |
| Figura 14 - Cromatogramas mostrando os tempos de retenção, em minutos, do metil paration (A) e <i>p</i> -nitrofenol (B). | 47 |
| Figura 15 - Placas de Petri mostrando o crescimento, após 15 dias, da linhagem DL9M3 em meio enriquecido de malte 3%, sendo M0) placa controle, M1) 120 mg/L, M2) 240 mg/L e M3) 360 mg/L. | 58 |
| Figura 16 - Placas de Petri mostrando o crescimento, após 15 dias, da linhagem DL4M3 em meio enriquecido de malte 3%, sendo M0) placa controle, M1) 120 mg/L, M2) 240 mg/L e M3) 360 mg/L. | 59 |

| | |
|--|----|
| Figura 17 - Placas de Petri mostrando o crescimento, após 15 dias, da linhagem DL11A em meio enriquecido de malte 3%, sendo M0) placa controle, M1) 120 mg/L, M2) 240 mg/L e M3) 360 mg/L | 60 |
| Figura 18 - Placas de Petri mostrando o crescimento, após 15 dias, da linhagem DL4M3 em meio mínimo, sendo A0) placa controle, A1) 120 mg/L, A2) 240 mg/L e A3) 360 mg/L. | 64 |
| Figura 19 - Placas de Petri mostrando o crescimento, após 15 dias, da linhagem DL11A em meio mínimo, sendo A0) placa controle, A1) 120 mg/L, A2) 240 mg/L e A3) 360 mg/L. | 65 |
| Figura 20 - Curvas analíticas do metil paration (a) e do <i>p</i> -nitrofenol (b)..... | 67 |
| Figura 21 – Porcentagem de metil paration degradada no controle abiótico em 10, 20 e 30 dias de reação..... | 69 |
| Figura 22 – Porcentagem de metil paration degradada pela linhagem DL4M3 e no controle abiótico em 10, 20 e 30 dias. | 71 |
| Figura 23 – Porcentagem de metil paration degradada pela linhagem DL11A e no controle abiótico em 10, 20 e 30 dias. | 72 |
| Figura 24 – Porcentagem de metil paration degradada pela linhagem DL9M3 e no controle abiótico em 10, 20 e 30 dias. | 72 |
| Figura 25 - Porcentagem de <i>p</i> -nitrofenol presente no controle abiótico como resultado da degradação do metil paration, em 10, 20 e 30 dias..... | 75 |
| Figura 26 – Porcentagem de <i>p</i> -nitrofenol presente na reação com a linhagem DL11A em 10, 20 e 30 dias. | 76 |
| Figura 27 – Porcentagem de <i>p</i> -nitrofenol presente na reação com a linhagem DL4M3 em 10, 20 e 30 dias. | 77 |
| Figura 28 – Porcentagem de <i>p</i> -nitrofenol presente na reação com a linhagem DL9M3 em 10, 20 e 30 dias. | 77 |
| Figura 29 – Deagração do <i>p</i> -nitrofenol pela linhagem DL11A e no controle abiótico. | 79 |
| Figura 30 – Árvore filogenética indicando as espécies similares a DL11A, DL4M3 e DL9M3. | 83 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Propriedades físicas e químicas do metil paration | 24 |
| Tabela 2 - Halo de crescimento médio ^a (em cm) da linhagem DL6G no meio de cultura malte 3% e respectivas porcentagens (%) de redução do halo em relação à placa controle em 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação na placa controle e nas três concentrações de pesticida. | 52 |
| Tabela 3 - Halo de crescimento médio ^b (em cm) da linhagem DL5B no meio de cultura malte 3% e respectivas porcentagens (%) de redução do halo em relação à placa controle em 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação na placa controle e nas três concentrações de pesticida. | 52 |
| Tabela 4 - Halo de crescimento médio ^c (em cm) da linhagem DL2M2 no meio de cultura malte 3% e respectivas porcentagens (%) de redução do halo em relação à placa controle em 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação na placa controle e nas três concentrações de pesticida. | 53 |
| Tabela 5 - Halo de crescimento médio ^d (em cm) da linhagem DL6A no meio de cultura malte 3% e respectivas porcentagens (%) de redução do halo em relação à placa controle em 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação na placa controle e nas três concentrações de pesticida. | 54 |
| Tabela 6 - Halo de crescimento médio ^e (em cm) da linhagem DL5A no meio de cultura malte 3% e respectivas porcentagens (%) de redução do halo em relação à placa controle em 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação na placa controle e nas três concentrações de pesticida. | 54 |
| Tabela 7 - Halo de crescimento médio ^f (em cm) da linhagem DL4B no meio de cultura malte 3% e respectivas porcentagens (%) de redução do halo em relação à placa controle em 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação na placa controle e nas três concentrações de pesticida. | 55 |
| Tabela 8 - Halo de crescimento médio ^g (em cm) da linhagem DL9M3 no meio de cultura malte 3% e respectivas porcentagens (%) de redução do halo em relação à placa controle em 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação na placa controle e nas três concentrações de pesticida. | 56 |
| Tabela 9 - Halo de crescimento médio ^h (em cm) da linhagem DL4M3 no meio de cultura malte 3% e respectivas porcentagens (%) de redução do halo em relação à placa controle em 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação na placa controle e nas três concentrações de pesticida. | 56 |
| Tabela 10 - Halo de crescimento médio ⁱ (em cm) da linhagem DL11A no meio de cultura malte 3% e respectivas porcentagens (%) de redução do halo em relação à placa controle em 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação na placa controle e nas três concentrações de pesticida. | 57 |

Tabela 11 – Halo de crescimento médio (em cm) das linhagens DL11A e DL4M3 no meio de cultura mínimo mineral (ASW) após 15 dias de incubação na placa controle e nas três concentrações de pesticida. 63

Tabela 12 - Espécies encontradas, seus respectivos códigos e resultados obtidos..... 84

APÊNDICES

Figura 1 - Cromatogramas evidenciando a degradação do metil paration e formação de *p*-nitrofenol pela linhagem DL9M3 em (A) 10 dias, (B) 20 dias e (C) 30 dias.....99

Figura 2 - Cromatogramas evidenciando a degradação do metil paration e formação de *p*-nitrofenol pela linhagem DL4M3 em (A) 10 dias, (B) 20 dias e (C) 30 dias.....100

Figura 3 - Cromatogramas evidenciando a degradação do metil paration e formação de *p*-nitrofenol pela linhagem DL11A em (A) 10 dias, (B) 20 dias e (C) 30 dias.....101

Figura 4 – Cromatogramas evidenciando a degradação do metil paration e formação de *p*-nitrofenol no controle abiótico em (A) 10 dias, (B) 20 dias e (C) 30 dias.....102

Figura 5 – Cromatogramas mostrando os picos das substâncias presentes no meio de cultura malte 3% puro, sem nenhum inóculo de fungo e sem pesticida, em (A) 10 dias, (B) 20 dias e (C) 30 dias.....103

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 Pesticidas | 15 |
| 1.1.1 Pesticidas no Brasil | 16 |
| 1.1.2 Pesticidas da classe dos organofosforados | 19 |
| 1.1.3 Metil paration | 22 |
| 1.2 Biodegradação de pesticidas | 26 |
| 1.2.1 Biodegradação do pesticida metil paration | 29 |
| 1.3 Fungos marinhos | 32 |
| 2 OBJETIVOS | 36 |
| 2.1 Objetivo geral | 36 |
| 2.2 Objetivos específicos | 36 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 37 |
| 3.1 Pesticida, solventes e meio de cultura | 37 |
| 3.1.1 Origem e pureza | 37 |
| 3.1.2 Determinação da real concentração de metil paration na formulação comercial | 37 |
| 3.2 Coleta e isolamento dos fungos marinhos | 38 |
| 3.3 Cultivo dos micro-organismos | 39 |
| 3.3 Seleção dos fungos resistentes ao pesticida metil paration em meio de cultura sólido..... | 39 |
| 3.4 Ensaio em meio líquido | 42 |
| 3.4.1 Ensaio controles | 42 |
| 3.5 Extração do pesticida metil paration do meio de cultivo | 43 |
| 3.6 Métodos analíticos para a quantificação da degradação do pesticida metil paration e da presença de <i>p</i> -nitrofenol | 46 |
| 3.6.1 Condições cromatográficas | 46 |
| 3.6.2 Curvas analíticas para quantificação do metil paration e <i>p</i> -nitrofenol..... | 47 |
| 3.7 Biodegradação do <i>p</i> -nitrofenol pela linhagem DL11A..... | 48 |
| 3.7.1 Cultivo da linhagem DL11A em meio líquido para quantificar a biodegradação de <i>p</i> -nitrofenol..... | 49 |
| 3.7.2 Extração do <i>p</i> -nitrofenol do meio de cultivo e métodos analíticos para a quantificação da biodegradação de <i>p</i> -nitrofenol pela linhagem DL11A..... | 49 |

| | |
|---|-----------|
| 3.8 Identificação das linhagens que mostraram bons resultados quanto à biotransformação do pesticida metil paration e do <i>p</i> -nitrofenol | 49 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 51 |
| 4.1 Seleção dos fungos resistentes ao pesticida metil paration em meio sólido | 51 |
| 4.1.1 Meio de cultura malte 3% com metil paration | 51 |
| 4.1.2 Meio de cultura mínimo mineral (ASW) | 62 |
| 4.2 Curvas analíticas para a quantificação do metil paration e <i>p</i> -nitrofenol..... | 66 |
| 4.3 Determinação da real concentração do metil paration na formulação comercial . | 68 |
| 4.4 Cultivo dos micro-organismos em meio líquido para quantificação da degradação do metil paration e formação do <i>p</i> -nitrofenol | 68 |
| 4.4.1 Degradação do metil paration | 69 |
| 4.4.2 Presença de <i>p</i> -nitrofenol nas reações com as linhagens DL11A, DL4M3 e DL9M3 e no controle abiótico | 74 |
| 4.5 Degradação do <i>p</i> -nitrofenol pela linhagem DL11A | 79 |
| 4.6 Identificação das linhagens DL11A, DL4M3 e DL9M3 | 81 |
| 5 CONCLUSÃO..... | 85 |
| 6 REFERÊNCIAS | 87 |
| APÊNDICES | 99 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pesticidas

Segundo classifica a Lei dos Agrotóxicos (Brasil, 1989) e o decreto que regulamenta essa lei (Brasil, 2002), os agrotóxicos são definidos como:

[...] os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos [...] substâncias e produtos empregados como desfolhantes, desseccantes, estimuladores e inibidores de crescimento.

Assim, agrotóxico é todo produto químico que possui determinado efeito – atração, repulsão, prevenção, eliminação – sobre seres biológicos: ervas daninhas, micróbios, insetos, ácaros, entre outros, que são nocivos às culturas agrícolas e seus produtos. Existem diversos termos que podem ser empregados para se referir aos agrotóxicos: pesticidas, biocidas, praguicidas, defensivos agrícolas e produtos fitossanitários (Terra, 2008). No presente trabalho, foi adotado o termo pesticida.

Os pesticidas são compostos estranhos ao meio no qual se encontram. Por esse motivo, são considerados como substâncias xenobióticas, ou seja, compostos químicos sintetizados pelo homem, incluindo plásticos, solventes, lubrificantes, detergentes,

agrotóxicos, bem como uma grande variedade de subprodutos da indústria química, que de algum modo estão presentes no meio natural (Silva *et al.*, 2004). Os pesticidas são um dos contaminantes mais perigosos ao meio ambiente, não apenas por sua toxicidade, mas também porque podem se bioacumular, além de participar de processos químicos, físicos e biológicos (Kouzayha *et al.*, 2012).

A classificação dessas substâncias obedece a dois critérios principais: classe química e organismo alvo (Gavrilescu, 2005). De acordo com o organismo alvo, podem ser, por exemplo: inseticidas, acaricidas, fungicidas ou herbicidas (Ribeiro *et al.*, 2008). Em relação à estrutura química, eles podem pertencer à classe dos organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides, entre outros (Barnard *et al.*, 1997).

1.1.1 Pesticidas no Brasil

O uso intensivo de agrotóxicos para o controle de pragas e doenças das lavouras existe há pouco mais de meio século. Ele teve origem após as grandes guerras mundiais, quando a indústria química fabricante de venenos, então usados como armas químicas, encontrou na agricultura um novo mercado para os seus produtos (Londres, 2011). No Brasil, foram primeiramente utilizados em programas de saúde pública, no combate a vetores e no controle de parasitas, e depois, a partir da década de 70, na agricultura, tendo incentivo do Plano Nacional de Desenvolvimento (PND) (Dams, 2006). Desde então, os pesticidas têm sido amplamente utilizados na agricultura, e o Brasil é um dos maiores consumidores desses produtos (Dams, 2006).

Entre 2001 e 2008 a venda de venenos agrícolas no Brasil saltou de US\$ 2 bilhões para mais de US\$ 7 bilhões, correspondendo a 986,5 mil toneladas de agrotóxicos aplicados, levando o país a atingir a posição de maior consumidor mundial

de venenos. Em 2009 o consumo foi ampliado ainda mais, ultrapassando a marca de 1 milhão de toneladas (Londres, 2011). Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e do Observatório da Indústria dos Agrotóxicos da Universidade Federal do Paraná (UFPR), entre 2000 e 2010 o mercado brasileiro de agrotóxicos cresceu 190% enquanto o mercado mundial cresceu 93% (Carneiro *et al.*, 2012) (Figura 1).

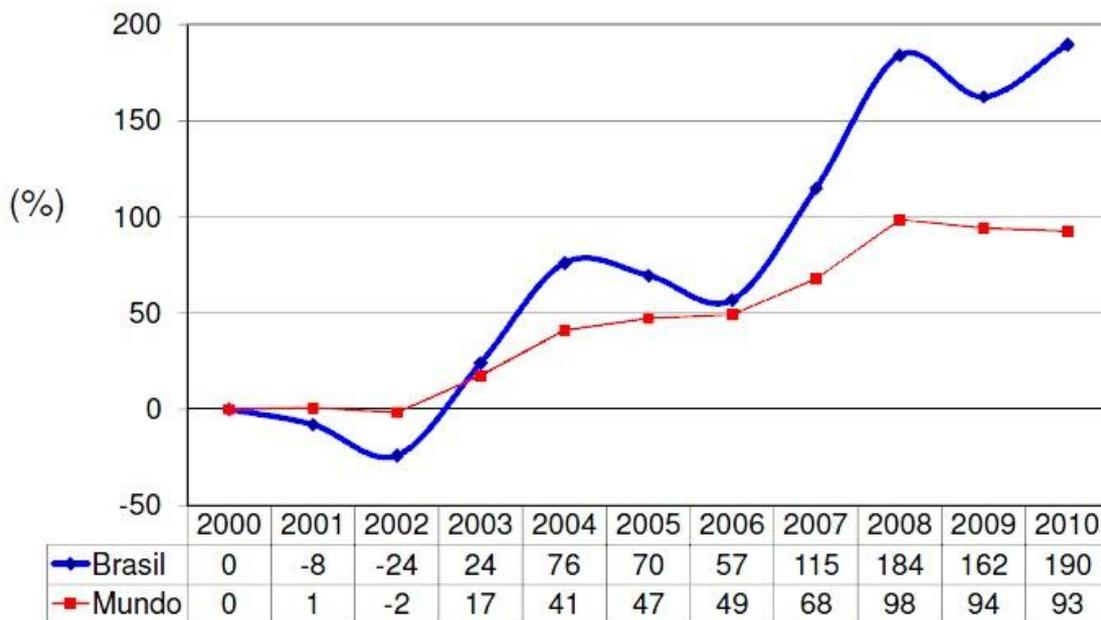


Figura 1 - Taxa de crescimento de vendas no mercado de agrotóxicos no Brasil e no mundo entre 2000 e 2010 (Fonte: ANVISA – UFPR, 2012).

A Figura 2 mostra o aumento do consumo médio de agrotóxicos em relação à área plantada, entre os anos 2002 e 2011. Podemos observar que o aumento do consumo desses venenos agrícolas foi superior ao da área plantada. Tal aumento está relacionado a vários fatores: a expansão do plantio da soja transgênica que amplia o consumo de glifosato; a crescente resistência das ervas daninhas, dos fungos e dos insetos, demandando maior consumo de agrotóxicos, e o aumento de doenças nas lavouras,

como a ferrugem asiática na soja que aumenta o consumo de fungicidas (Carneiro *et al.*, 2012).

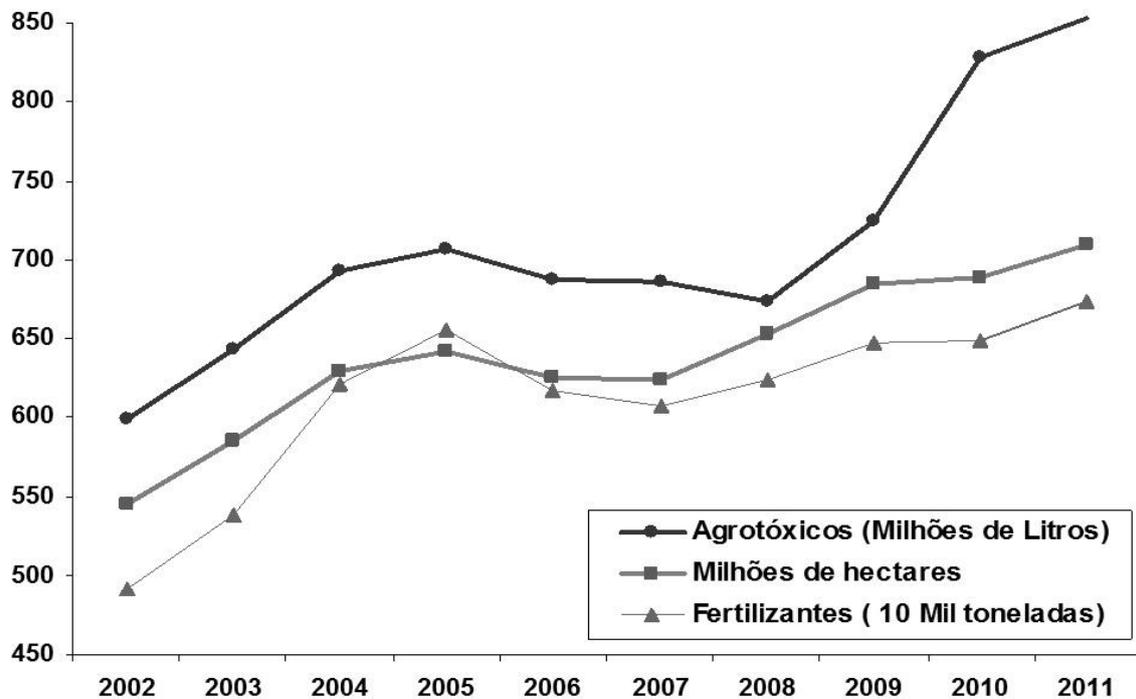


Figura 2 - Produção agrícola e consumo de agrotóxicos e fertilizantes químicos nas lavouras do Brasil, de 2002 a 2011. (Fonte: Carneiro *et al.*, 2012. Elaborado a partir de SINDAG, 2009 e 2011; ANDA, 2011; IBGE/SIDRA, 2012; MAPA, 2010).

Em 2011, conforme relatado por Londres (2011), existiam cerca de 370 ingredientes ativos registrados no Brasil para uso agrícola, pertencentes a mais de 200 grupos químicos diferentes, dando origem a 1.458 produtos formulados para venda no mercado. Já em 2012, segundo Carneiro *et al.* (2012), esse número aumentou, correspondendo a cerca de 434 ingredientes ativos e 2.400 formulações de agrotóxicos registrados no MS, MAPA e MMA, os quais são permitidos no Brasil de acordo com os critérios de uso e indicação estabelecidos em suas monografias. O Brasil tem se tornado ainda refúgio de agroquímicos proibidos em outras partes do mundo. Dos 50 pesticidas

mais utilizados nas lavouras de nosso país, 22 são proibidos na União Européia (Carneiro *et al.*, 2012).

1.1.2 Pesticidas da classe dos organofosforados

A partir da década de 70, houve certa restrição ao uso de pesticidas organoclorados, por serem altamente persistentes no meio ambiente, comprovada tendência a se bioacumular e potencial toxicidade a organismos não-alvo (Singh e Walker, 2006). Os pesticidas organofosforados, considerados menos persistentes e mais efetivos, passaram, então, a ter maior utilização (Pope, 1999). Atualmente, esta classe de pesticidas corresponde a mais de 36% do mercado mundial de agroquímicos (Porto *et al.*, 2011).

Os pesticidas organofosforados (OPs) são ésteres derivados do ácido fosfórico, também chamados de organofosfatos, os quais incluem derivados alifáticos, aromáticos e heterocíclicos (Kanekar *et al.*, 2004) (Figura 3). Sendo ésteres, essas moléculas têm muitas posições suscetíveis à hidrólise. As principais reações envolvendo os OPs incluem hidrólise, oxidação, alquilação e dealquilação (Singh *et al.*, 1999).

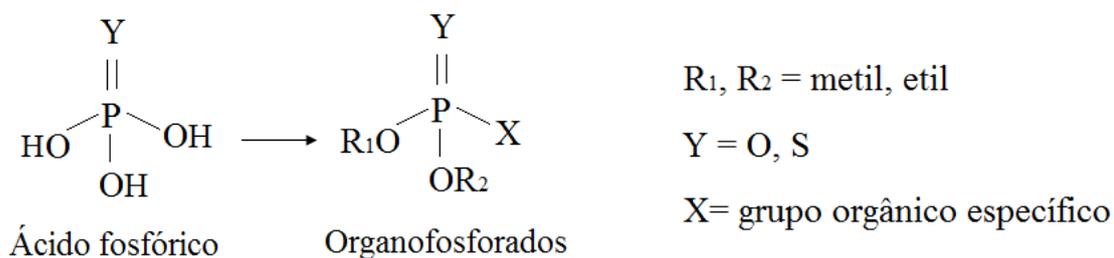


Figura 3 - Estrutura geral dos pesticidas OPs (modificado de Porto *et al.*, 2011).

Os principais pesticidas OPs comercializados pelas companhias agroquímicas são o paration, metil paration, clorpirifos, malation, monocrotofos, diazinon, fenitroion e dimetoato (Porto *et al.*, 2011) (Figura 4).

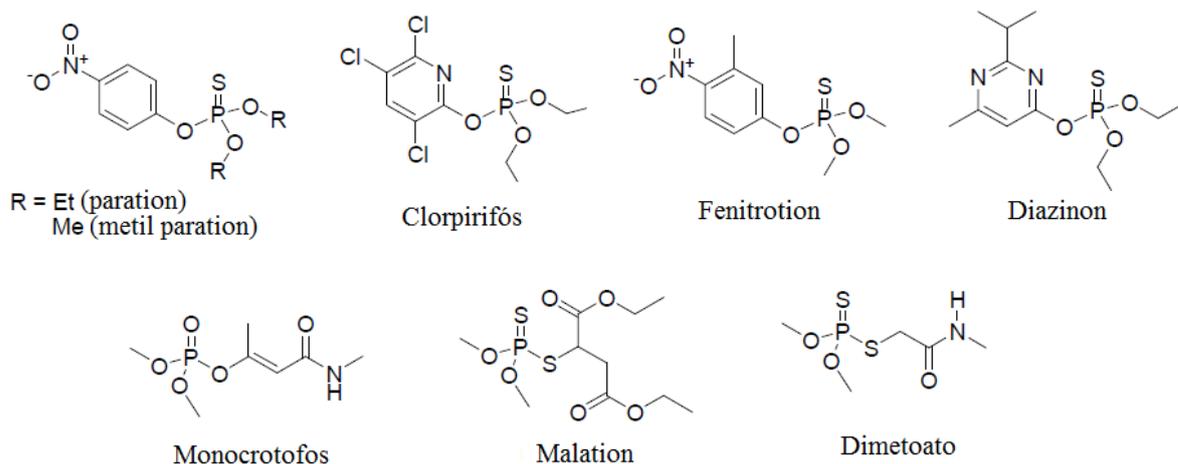


Figura 4 - Exemplos de pesticidas OPs mais comercializados (Fonte: Porto *et al.*, 2011).

Quanto ao organismo-alvo, os organofosforados são inseticidas, mas também podem ser absorvidos e causar efeitos em mamíferos. Essa classe de pesticidas é responsável pelo maior número de intoxicações e mortes no Brasil (MS/SVS/OPAS, 1997). Eles afetam o sistema nervoso de insetos e de seres humanos, causando inibição prolongada da enzima acetilcolinesterase, a qual é responsável pela propagação do neurotransmissor acetilcolina, promovendo, então, uma série de danos neurológicos (Kanekar *et al.*, 2004; Mileson *et al.*, 1998).

Pesticidas organofosforados possuem elevada lipossolubilidade, sendo absorvidos pelo organismo humano por via respiratória, dérmica, membranas mucosas e trato intestinal. Concentram-se, após absorção, nos tecidos adiposos, fígado, rins, glândulas salivares, tireóide, pâncreas, pulmões, sistema nervoso central, músculos,

paredes do estômago e do intestino. Sua toxicidade aumenta quando ocorrem reações de dessulfuração, transformando a ligação P=S em P=O (Almeida, 2010).

Geralmente, o processo de metabolização de xenobióticos em seres humanos acontece no fígado e inclui as chamadas reações de fase I e II (Figura 5). As reações de fase I são responsáveis pela transformação do xenobiótico lipofílico em uma forma mais solúvel em água, por meio de reações de oxidação, redução e hidrólise. As reações da fase II são desintoxicantes e responsáveis pela conjugação dos xenobióticos a substratos endógenos como glicina, glutatona ou glucoronato. As principais enzimas envolvidas na fase I são as monooxigenases do complexo citocromo P450 (CYP) (Monteiro, 2006).

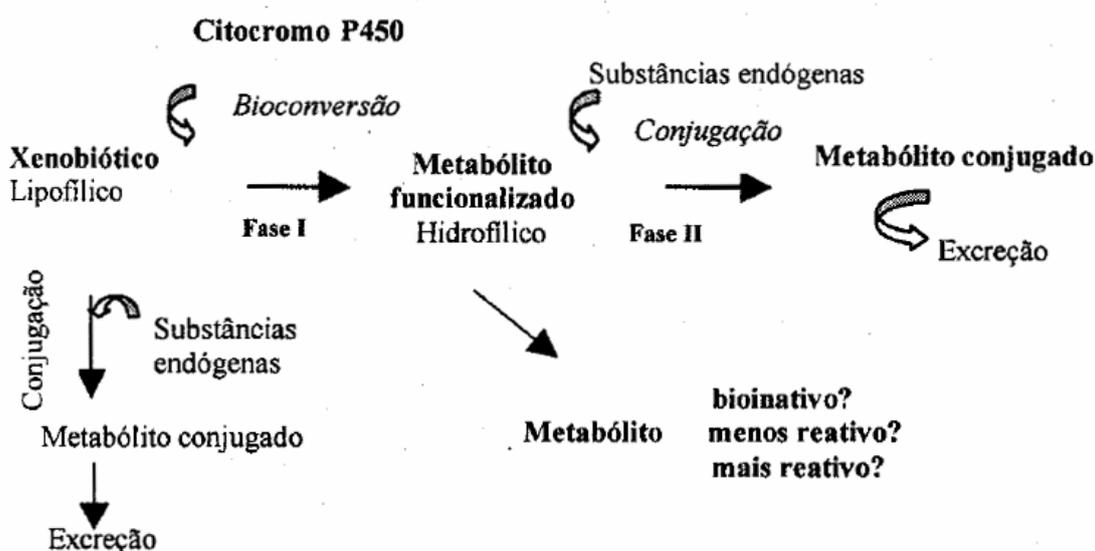


Figura 5 - Reações da fase I e II do metabolismo de xenobióticos nas células do fígado humano (Fonte: Costa *et al.*, 2004).

No ambiente, os pesticidas organofosforados podem ser degradados por diversos fatores, como fotólise, hidrólise química ou biodegradação por micro-organismos. Embora sejam menos tóxicos que os organoclorados, esses pesticidas podem deixar resíduos e produtos secundários que permanecem em níveis relativamente tóxicos aos

organismos (Silva *et al.*, 1999; Ragnarsdottir, 2000). Portanto o uso excessivo de pesticidas organofosforados na agricultura também tem causado sérios problemas aos seres vivos (Colosio *et al.*, 2009; Jokanovic e Prostran, 2009).

1.1.3 Metil paration

Metil paration (*O,O*-dimetil-*O*-(*p*-nitro-fenilfosforotioato) (Figura 6) é um dos pesticidas organofosforados mais usados em todo o mundo, especialmente no cultivo de frutas e hortaliças. Essa substância começou a ser produzida nos Estados Unidos em 1952 e tem sido utilizada para matar insetos em vários tipos de culturas desde então. No Brasil, é comercializado com as seguintes denominações: Folidol 600 (Bayer®) e Folisuper 600 BR (Agripec®).

O metil paration (MP), assim como os outros organofosforados, é prejudicial ao homem, e por isso, seu modo de uso e aplicação foi restringido pela EPA (Environmental Protection Agency) (ATSDR, 2001). A quantidade máxima de resíduo de metil paration permitida pela FDA (Food and Drug Administration) e EPA nos cultivos destinados à alimentação é 0.1–1 mg/L (ATSDR, 2001).

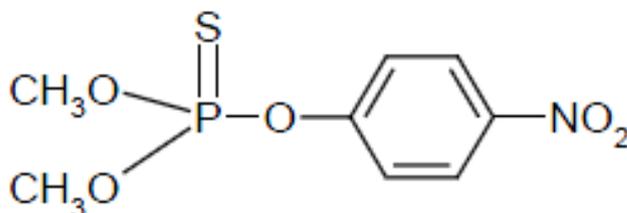


Figura 6 – Estrutura química do pesticida metil paration (Fonte: ATSDR, 2001).

O mecanismo de ação do metil paration, como o de todos os organofosforados, envolve a inibição da enzima acetilcolinesterase. Após a exposição e subsequente absorção deste pesticida pelo organismo humano, o MP é rapidamente metabolizado à sua forma mais ativa, o metil paraoxon (Barr *et al.*, 2002). A continuação do caminho metabólico pode resultar na formação de dimetiltiofosfato (DMTF), dimetilfosfato (DMF) e *p*-nitrofenol (PNF), tanto na forma de um fenol livre quanto conjugado com glucoronato ou ester de sulfato (Figura 7). A formação de DMTF, DMF e PNF corresponde à fase I do metabolismo, enquanto a conjugação do PNF corresponde à fase II.

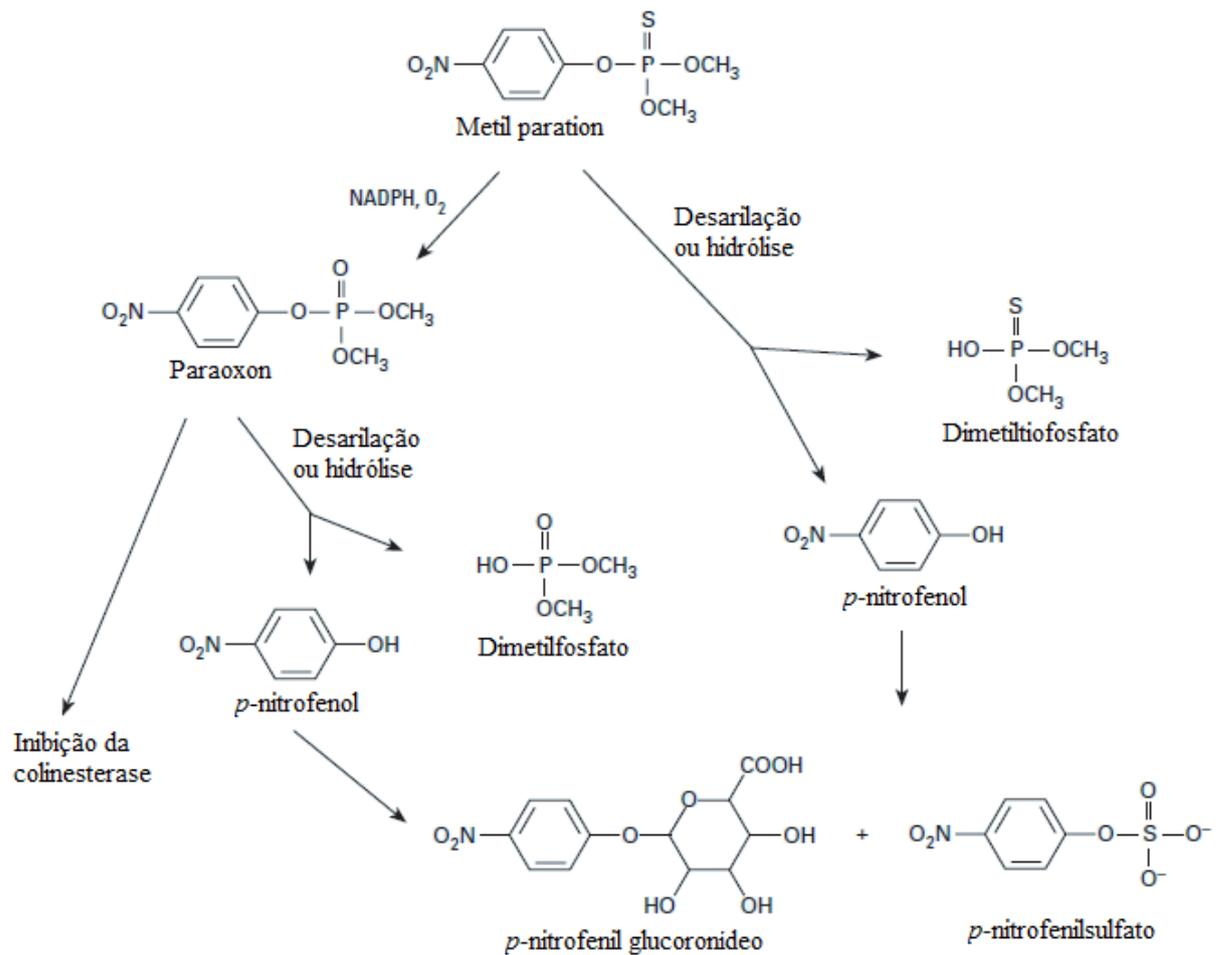


Figura 7 - Metabolismo do metil paration em mamíferos mostrando os potenciais bioproductos gerados (Fonte: Barr *et al.*, 2002).

A Tabela 1 mostra algumas propriedades físicas e químicas deste pesticida.

Tabela 1 - Propriedades físicas e químicas do metil paration

| Propriedade | Informação | Referência |
|----------------------------------|--|----------------------------|
| Peso molecular | 263.23 | Maynard, 1996 |
| Ponto de fusão | 37-38 °C | Maynard, 1996 |
| Ponto de ebulição | 154 °C a 136 Pa Decompõe-se acima de 50 °C Decompõe-se violentamente a 120 °C | ASTDR, 2001 |
| Densidade a 20°C | 1,358 g/L | Maynard, 1996 |
| Solubilidade | | |
| Água a 25°C | 50 mg/L | Maynard, 1996 |
| Solventes orgânicos | Solúvel em etanol, clorofórmio e solventes aromáticos e alifáticos Muito solúvel em acetona | ASTDR, 2001 ASTDR, 2001 |
| Pressão de vapor a 20°C | 9.7x10 ⁻⁶ mm Hg | ASTDR, 2001 |
| Constante da Lei de Henry | 6.2x10 ⁻⁶ atm·m ³ /mol | ASTDR, 2001 |

O metil paration é uma substância termicamente instável e decompõe-se rapidamente em ambiente com valores de pH maiores de 8. Em pH de 1 a 5 e a 20 °C, seu tempo de meia-vida é de 175 dias (Hertel, 1993). Quando grandes concentrações de metil paration atingem o solo, a degradação ocorre apenas após muitos anos (Wauchope, 1992).

Araújo (2006) expôs em seu trabalho um diagrama de dispersão (Figura 8) evidenciando o destino do metil paration nos compartimentos do meio ambiente (água, ar, solo e sedimentos). De acordo com o diagrama, a maior porção de metil paration lançada pelo homem na natureza se encontra no compartimento aquático, o que, de acordo com o autor, deve-se a alta solubilidade deste pesticida em água.

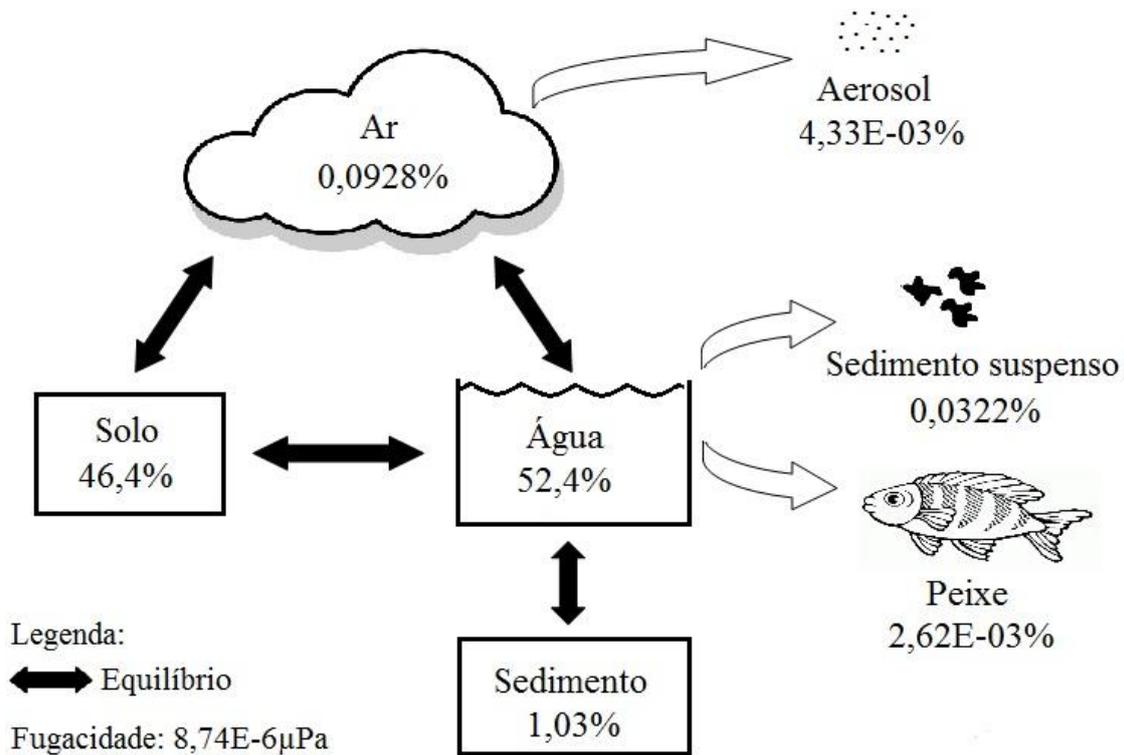


Figura 8 - Diagrama de dispersão do metil paration em diversos compartimentos do meio ambiente (Fonte: Araújo, 2006).

O metil paration atinge o ar principalmente através da aplicação aérea nos cultivos agrícolas. Apenas pouca volatilização já foi observada a partir de plantas e do solo, e sempre no período subsequente à aplicação aérea (ATSDR, 2001). De modo geral, a volatilização desse composto é considerada baixa. Sua pressão de vapor ($9,7 \times 10^{-6}$ mmHg) é relativamente baixa, assim como sua constante da Lei de Henry ($6,2 \times 10^{-6}$ atm·m³/mol) (ATSDR, 2001). A Lei de Henry defende que a solubilidade de um gás em um líquido é diretamente proporcional à pressão parcial que o gás exerce sobre o líquido. A constante da Lei de Henry considera o peso molecular, a solubilidade e a pressão de vapor, e indica o grau de volatilidade de um composto químico em uma solução (Silva *et al.*, 2005).

Na água, essa substância pode chegar através do escoamento decorrente de tempestades em campos pulverizados, deposição atmosférica após a aplicação aérea (deposição úmida da chuva e da água de neblina), lançamentos de águas residuais provenientes das etapas de formulação, fabricação ou das instalações de processamento, e ainda derrames acidentais. E no solo, o metil paration provém, em sua maioria, de gotículas resultantes da pulverização do produto, ou através de manuseio inadequado, levando a derramamentos (ATSDR, 2001).

Uma vez introduzido nos cultivos agrícolas, o metil paration pode mover-se para outras áreas, não muito distantes do local onde foi aplicado. Não é uma substância persistente, permanecendo no ambiente apenas de poucos dias a alguns meses, ao contrário dos organoclorados que podem persistir por anos. Este pesticida pode ser degradado a outros compostos químicos pela ação da água, luz solar ou micro-organismos presentes no solo ou na água, sendo a biodegradação o processo predominante (ATSDR, 2001). Estudos mostraram que algumas bactérias apresentam boa capacidade para degradar o metil paration (Liu *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2005).

1.2 Biodegradação de pesticidas

Muitos micro-organismos tem a habilidade de metabolizar xenobióticos, podendo transformá-los em outros compostos, às vezes menos tóxicos que aqueles de origem, ou até mesmo promover sua completa degradação (mineralização). A utilização de micro-organismos na remediação de ambientes contaminados por substâncias tóxicas é chamada de biorremediação, e compreende os processos conhecidos como biodegradação (degradação de um composto tóxico do meio ambiente) e biotransformação (conversão do xenobiótico em outro composto) (Parales *et al.*, 2002).

A biodegradação de pesticidas tem sido extensivamente estudada e vem se mostrando como um dos métodos mais promissores para reduzir os efeitos adversos desses xenobióticos sobre o meio ambiente (Gavrilescu, 2005). Este processo vem se destacando, pois elimina os pesticidas em locais contaminados de difícil remoção, atuando de maneira altamente sustentável, devido às condições brandas em que ocorre a biodegradação (Finley *et al.*, 2010). Além disso, é tipicamente mais econômico que os métodos tradicionais, como incineração, destruição catalítica, uso de adsorventes e remoção física seguida de destruição dos poluentes (Kumar *et al.*, 2011).

Os micro-organismos podem se adaptar e crescer em condições extremas de temperatura, salinidade, disponibilidade de oxigênio, entre outras, no meio ambiente (Kumar *et al.*, 2011). Assim sendo, eles conseguem sobreviver e se desenvolver em ambientes que são tóxicos a outros seres vivos, como aqueles contaminados com os pesticidas pulverizados na agricultura. Alguns micro-organismos degradam os pesticidas e os utilizam diretamente como fonte de carbono e energia, enquanto outros degradam os xenobióticos apenas na presença de outras fontes de alimento (Gavrilescu, 2005). Muitos micro-organismos nativos adaptam-se e desenvolvem caminhos metabólicos complexos e eficazes que permitem a biodegradação de substâncias tóxicas lançadas no ambiente pelo homem (Porto *et al.*, 2011). O exato mecanismo de adaptação aos pesticidas ainda não é conhecido. Os micro-organismos talvez adquiram material genético para codificar os mecanismos bioquímicos necessários para lidar com o potencial substrato (Gavrilescu, 2005).

Outra explicação para essa capacidade dos micro-organismos em degradar poluentes, segundo Silva *et al.* (2004), é que já existem numerosos compostos orgânicos no solo e muitos xenobióticos são análogos a esses compostos naturais, sugerindo um ponto de partida para a biodegradação. Todos os compostos naturais podem ser

metabolizados sob condições ambientais oportunas. As enzimas envolvidas nesse metabolismo têm baixa especificidade de substrato e assim podem também atacar os análogos xenobióticos. Um trabalho desenvolvido por Bumpus *et al.* (1985) mostrou que o fungo *Phanerochaete chrysosporium*, cujo substrato natural é a madeira, tem um sistema degradador de lignina não específico, podendo também degradar uma variedade de poluentes, como inseticidas clorados, bifenilas policloradas, preservantes de madeira e resíduos de explosivos.

Diferentes grupos de micro-organismos podem promover essa degradação dos pesticidas. No solo, os mais abundantes são as bactérias, porém, considerando o pequeno tamanho da célula bacteriana, os fungos correspondem a maior porção do protoplasma microbiano total na maioria dos solos cultivados (Bollag, 1972). Alguns estudos (Chaudhry *et al.*, 1988; Withford *et al.*, 1995; Ocampo *et al.*, 2011), já revelaram que um consórcio de micro-organismos geralmente está relacionado aos processos de biodegradação. Vários grupos de bactérias, incluindo os gêneros *Alcaligenes*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* e *Rhodococcus*, já foram reconhecidos por sua habilidade em metabolizar pesticidas (Gavrilescu, 2005). Em relação aos fungos, *Pleurotus* spp., *Trametes versicolor*, *Lentinula edodes*, *Phlebia radiata*, *Phanerochaete chrysosporium* (Silva *et al.*, 2004), *Trametes hirsutus*, *Phanerochaete sordida* e *Cyathus bulleri* (Singh e Walker, 2006) são alguns dos que também já demonstraram essa capacidade.

A biodegradação de um dado pesticida é um processo complexo e seu resultado é dependente da interação de diversos fatores, como a estrutura química do composto e suas propriedades físicas e químicas, condições ambientais, organismos presentes e suas quantidades, adsorção e solubilidade do composto ao meio no qual se encontra, biodisponibilidade geral do composto e suas interações com outros compostos presentes

no ambiente, processos co-metabólicos, entre outros (Gavrilescu, 2005). Um importante fator a ser considerado sobre a biodegradação dos pesticidas é o resultado desse processo. Já que os pesticidas são tóxicos, é necessário saber se os produtos de degradação são tóxicos também e se eles serão posteriormente degradados a metabólitos menos agressores aos seres vivos (Kanekar *et al.*, 2004).

1.2.1 Biodegradação do pesticida metil paration

Várias bactérias com a capacidade de degradar o pesticida metil paration já foram identificadas. Entre elas estão: *Pseudomonas* sp. (Chaudry *et al.*, 1988), *Bacillus* sp. (Sharmila *et al.*, 1989), *Pseudomonas putida* (Rani e Lalithakumari, 1994), *Flavobacterium balustinum* (Somara e Siddavattam, 1995) e *Plesiomonas* sp. (Zhongli *et al.*, 2001). Além de bactérias, outros organismos também já foram relatados, em menor abundância, quanto à sua habilidade em degradar esse pesticida. Megharaj *et al.* (1994) reportou a capacidade de microalgas e cianobactérias em degradar o MP, e Fioravante *et al.* (2009) demonstrou que uma cianobactéria da espécie *Microcystis novacekii*, muito comum nos lagos brasileiros, é capaz de metabolizar esse pesticida.

Singh e Walker (2006) elaboraram um esquema com as possíveis rotas de biodegradação do metil paration por micro-organismos (Figura 9).

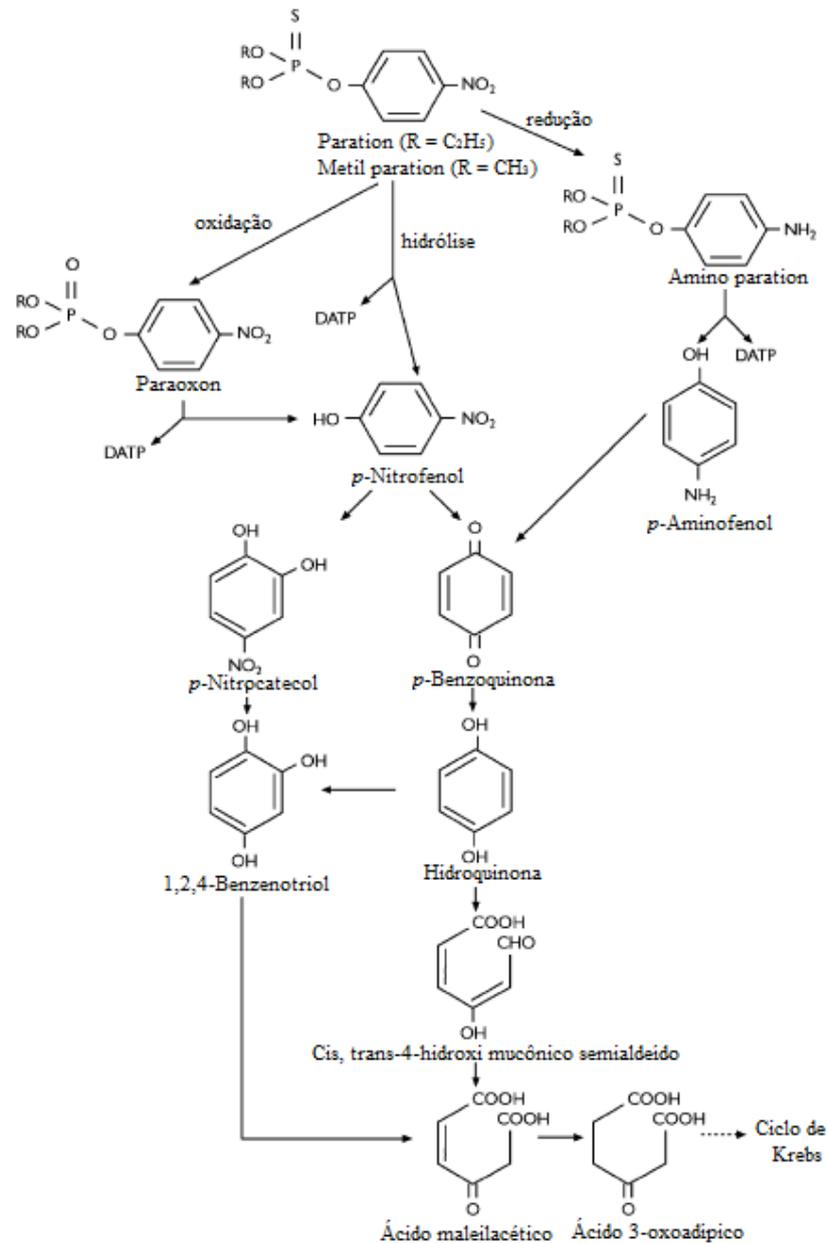


Figura 9 - Diferentes caminhos de degradação do metil paration por micro-organismos (Fonte: Singh e Walker, 2006).

Na degradação do metil paration, o primeiro passo pode ser a hidrólise, gerando ácido dietiltiofosfórico e *p*-nitrofenol. Outra possibilidade é a oxidação do metil paration a paraoxon, sua forma mais tóxica, e posterior hidrólise a *p*-nitrofenol. Em condições de pouco oxigênio o metil paration é reduzido a *p*-aminoparation e depois

hidrolisado a *p*-aminofenol (Munnecke e Hsieh, 1974). Dessas três possibilidades, no entanto, a hidrólise do metil paration levando à formação de *p*-nitrofenol parece ser a de maior ocorrência (Kanekar *et al.*, 2004).

Entre as enzimas envolvidas nesses processos de biodegradação estão as fosfotriesterases, que atuam não apenas na degradação do metil paration, mas de vários pesticidas organofosforados. Há três diferentes tipos dessas enzimas que já foram bem caracterizados: organofosforado hidrolase (OPH), organofosforado ácido anidrolase (OPAA) e metil paration hidrolase (MPH) (Singh *et al.*, 2009).

A OPH pode hidrolisar uma grande variedade de organofosforados, porém a efetividade de hidrólise para cada pesticida dessa classe varia bastante. O metil paration, por exemplo, é hidrolisado por essa enzima de 30 a 1000 vezes mais lento em relação à ação da mesma sob o paraoxon (Cho *et al.*, 2002). A OPH tem uma grande variedade de especificidade de substrato, hidrolizando ligações P-O, P-F e P-S. A ligação P-S, é a de menor especificidade dessa enzima (Singh e Walker, 2006).

A metil paration hidrolase (MPH) está presente em uma série de bactérias não relacionadas filogeneticamente, e interage com uma gama menor de substratos, sendo mais específica para o pesticida metil paration (Singh *et al.*, 2009). Essa enzima já foi isolada da bactéria *Pleisiomonas* sp. M6 (Zhongli *et al.*, 2001), e verificou-se que o gene relacionado à sua síntese (gene *mpd*) é diferente daquele referente à OPH (gene *opd*).

A OPAA, que não tem similaridade de ação ou genética com as duas enzimas acima, já foi relatada como responsável pela hidrólise do metil paration efetuada por *Pseudomonas putida* (Rani e Lalithakumari, 1994). A enzima anidrase ácida dessa bactéria hidrolisou o metil paration a *p*-nitrofenol, o qual foi posteriormente degradado

a hidroquinona e 1,2,4-benzenotriol. Este, por sua vez, foi clivado, pela enzima benzeno triol oxigenase, a maleil acetato.

Embora existam muito relatos sobre a degradação do metil paration por bactérias, bem como sobre as enzimas envolvidas nesse processo, pouco é conhecido sobre a capacidade de fungos em degradar esse pesticida. Já em relação a outros organofosforados, a atividade de degradação promovida por fungos é mais bem conhecida. Alguns exemplos são: *Phanerochaete chrysosporium* capaz de degradar clorpirifós, fonofós e terbufos (Bumpus *et al.*, 1993); *Caldariomyces fumago* capaz de degradar metil azinfós, clorpirifós, diclorofention, dimetoato, paration e terbufos (Hernandez *et al.*, 1998); *Aspergillus sp.* L8 capaz de degradar o dimetoato, malation, metamidofós e paration (Liu *et al.*, 1998); *Aspergillus sydowii*, *A. niger*, *A. flavus* e *Fusarium oxysporium* capazes de degradar o dimetoato (Li e Zhong, 1999); *Aspergillus sp.* Z₅₈, isolado do solo ao redor de uma fábrica de pesticidas, capaz de degradar o dimetoato (Liu e Zhong, 2000).

1.3 Fungos marinhos

Os fungos marinhos podem ser divididos em dois grupos quanto à sua habilidade de crescer e se reproduzir na água do mar. Fungos marinhos obrigatórios são aqueles que crescem e esporulam exclusivamente no ambiente marinho, enquanto os fungos marinhos facultativos são aqueles de ambiente terrestre ou de água doce que são capazes de crescer, e possivelmente se reproduzir, em ambientes marinhos (Kohlmeyer e Kohlmeyer, 1979). Estimativas do número total de fungos marinhos estão entre 7000 a 10000 espécies, no entanto, apenas 537 espécies já foram descritas (Jones, 2011). Esses

micro-organismos são, então, um campo de estudo muito abrangente e interessante, ainda pouco explorado.

O interesse em fungos marinhos e nos metabólitos produzidos por eles é antigo. Giuseppe Brotzu, em 1945, isolou um fungo, *Cephalosporium acremonium* (atualmente chamado de *Acremonium chrysogenum*), de uma amostra de água do mar, o qual exibiu atividade antimicrobiana (Bugni e Ireland, 2004). No entanto, maior atenção aos fungos marinhos apenas surgiu a partir de 1990. Em geral, a pesquisa sobre fungos derivados de ambientes marinhos conduziu à descoberta de 272 novos produtos naturais, muitos dos quais têm novos esqueletos de carbono, fornecendo, assim, evidência de que eles têm potencial de ser uma fonte rica de produtos farmacêuticos (Bugni e Ireland, 2004).

Os fungos podem ser isolados de diversos organismos marinhos, como algas, esponjas, cnidários, tunicados, corais, moluscos, ou até mesmo a partir de sedimentos (Figura 10). E os metabólitos produzidos por eles têm várias aplicações: antibacteriana, citotóxica, inibidoras de quinase, entre outras (Bugni e Ireland, 2004).

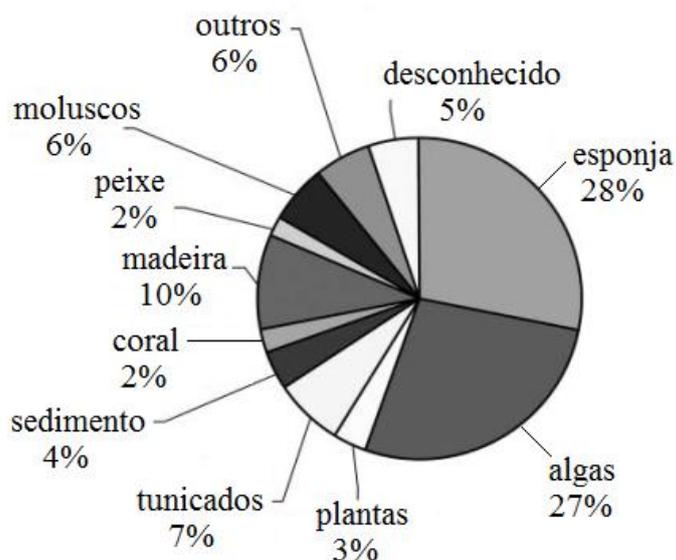


Figura 10 - Distribuição dos novos compostos encontrados em fungos de origem marinha em função da fonte de origem dos fungos (Fonte: Bugni e Ireland, 2004).

Os micro-organismos marinhos também são fontes interessantes de novas enzimas. Eles catalisam a hidroxilação, hidrogenação, desidro-halogenação e quebra de ligações C-C, apresentando, portanto, diversas aplicações em biotransformações (Synder, 2000). Recentemente, Martins *et al.* (2013) promoveram a hidroxilação de sesquiterpenos utilizando várias linhagens de fungos de ambiente marinho (*A. sydowii* CBMAI 934, *Xylaria* sp. CBMAI 1195, *Eutypella* sp. CBMAI 1196 and *Botryosphaeria* sp. CBMAI 1197). A hidroxilação desses terpenos comprova a presença de enzimas do CYP-450 que são responsáveis pelas hidroxilações enzimáticas em produtos naturais (Martins *et al.* 2013).

A atividade catalítica em xenobióticos, também pelas enzimas do tipo citocromo P450, foi encontrada em organismos marinhos. Neste caso, a enzima mais estudada é a CYP1A1, uma vez que catalisa biotransformações de dioxinas, hidrocarbonetos e policíclicos aromáticos (PAHS, PCBs), bem como outros xenobióticos comumente encontrados neste ambiente (Synder, 2000). Esse mesmo grupo de enzimas já foi relacionado à degradação de pesticidas organofosforados por fungos terrestres (Jauregui *et al.*, 2003; Marinho *et al.*, 2011).

Um trabalho desenvolvido por Ortega *et al.* (2011), demonstrou a capacidade de fungos de origem marinha em degradar um pesticida organoclorado, o DDD (Dicloro DifenilDicloetano). Neste trabalho, sete fungos foram isolados da esponja *Geodia corticostylifera*. Destes, três mostraram bons resultados quanto ao desenvolvimento em placas de Petri contendo meio de cultura suplementado com 5 mg (1.56×10^{-2} mmol) de DDD. Foram eles: *A. sydowii* Gc12, *Trichoderma* sp. Gc1 e *P. miczynskii* Gc5. Em maiores concentrações de DDD, *Trichoderma* sp. Gc1 mostrou o melhor desempenho na degradação desse pesticida.

Os micro-organismos marinhos, por pertencerem a ambientes ainda pouco explorados, transformaram-se em uma importante fonte de estudos para a descoberta de novas drogas, ou novos compostos bioativos (Passarini, 2008). Os fungos marinhos, além da produção de metabólitos bioativos, que podem ser utilizados para diversos fins, têm se mostrado também promissores na síntese de enzimas relacionadas a diversos processos metabólicos com interesse industrial, bem como na remediação de áreas degradadas, atuando na biotransformação de xenobióticos. No presente trabalho, portanto, foi explorado o potencial de algumas linhagens de fungos de origem marinha, isolados da ascídia ¹ *Didemnum ligulum*, na biotransformação do pesticida organofosforado metil paration.

¹ Ascídia é um invertebrado marinho, pertencente ao Filo Chordata (subgrupo Hemichordata) e Subfilo Tunicata, com aspecto similar ao de uma esponja, porém seu desenvolvimento e estrutura corporal são mais complexos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo estudar a biodegradação do pesticida organofosforado metil paration utilizando o sistema enzimático de fungos marinhos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar uma triagem entre os fungos marinhos isolados avaliando quais deles são resistentes ao efeito tóxico e possivelmente têm a capacidade de degradar o pesticida metil paration;
- ✓ Comprovar a biodegradação do pesticida através da formação de *p*-nitrofenol, principal produto de degradação do metil paration;
- ✓ Quantificar, através de técnicas cromatográficas, a degradação do pesticida ao longo do tempo até esse processo ser concluído;
- ✓ Conhecer espécies de fungos marinhos capazes de atuar em processos de biotransformação de pesticidas organofosforados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pesticida, solventes e meio de cultura

3.1.1 Origem e pureza

O pesticida comercial contendo metil paration (60% do ingrediente ativo), utilizado nos testes de degradação, foi obtido da Agripec® com o nome de Folisuper 600 Br. Este pesticida foi doado pelo professor Marcos R. de V. Lanza (Instituto de Química de São Carlos - USP). Os padrões analíticos do metil paration (grau de pureza 99,7%) e do *p*-nitrofenol (grau de pureza 99,9%), utilizados para preparar a curva de calibração, foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich, Brasil. Sais utilizados na preparação de água do mar e solventes (metanol e acetato de etila) foram adquiridos das empresas Synth e Vetec. Os ingredientes para o meios de cultura utilizados (extrato de malte e peptona) foram da marca Acumedia.

3.1.2 Determinação da real concentração de metil paration na formulação comercial

Em um balão volumétrico de 10 mL foram solubilizados 5 µL do pesticida comercial metil paration em metanol grau cromatográfico, até completar o volume de 10 mL. Uma alíquota de 1 mL foi transferida para um frasco (vial) e analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Este procedimento foi feito em duplicata.

3.2 Coleta e isolamento dos fungos marinhos

Foram utilizadas 17 linhagens de fungos marinhos isoladas da ascídia *Didemnum ligulum* (códigos: DL1M3, DL4M3, DL6M3, DL7M3, DL8M3, DL9M3, DL2M2, DL3M2, DL6G, DL5F, DL2B, DL4B, DL5B, DL5A, DL6A, DL9A e DL11A). A coleta da ascídia *D. ligulum* foi realizada no litoral norte do estado de São Paulo, em São Sebastião, sob a coordenação do Prof. Dr. Roberto G. de S. Berlinck (Instituto de Química de São Carlos - USP). Amostras de *Didemnum ligulum* foram coletadas em sacos plásticos estéreis e imediatamente transportadas para o Centro de Biologia Marinha (CEBIMar) da Universidade de São Paulo, também localizado em São Sebastião.

No laboratório, as amostras da ascidia passaram por lavagens com solução de HgCl₂ em etanol (1 mg/mL) durante 1 minuto, e três lavagens com água do mar estéril. Após essa assepsia da superfície, fragmentos de aproximadamente 1 cm³ da porção interna da amostra foram inoculados em placas de Petri, com diversos meios de cultura, todos preparados com base de água do mar artificial (ASW): Agar malte 2%, Agar malte 3%, Agar tubaki, Agar cenoura-batata, Agar fubá, Agar aveia, Agar extrato de levedura, peptona e glicose (GPY) e Agar celulose (Kossuga *et al.*, 2012).

As placas foram, então, regularmente examinadas para verificar a presença de fungos filamentosos. Colônias puras de fungos, obtidas através de sucessivas purificações pelo método de estrias, foram fotografadas, descritas morfológicamente e depositadas no Laboratório de Ecologia de Micro-organismos Aquáticos da UFSCar, São Carlos, Brasil. A metodologia detalhada de coleta da ascídia, isolamento e preservação das linhagens fúngicas, bem como as receitas dos meios de cultura utilizados foram descritos por Kossuga *et al.* (2012).

3.3 Cultivo dos micro-organismos

O cultivo dos micro-organismos foi realizado em placas de Petri com meio de cultura sólido (malte 3%) feito com base de água do mar artificial.

Composição da água do mar artificial (Menezes *et al.* 2010): água destilada (1L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,36g), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (9,68g), KCl (0,61g), NaCl (30,0g), Na_2HPO_4 (0,014mg), Na_2SO_4 (3,47g), NaHCO_3 (0,17g), KBr (0,10g), $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,04g) e H_3BO_3 (0,03g).

Composição do meio de cultura sólido para 1L de água do mar artificial (Kossuga *et al.*, 2012): extrato de malte (30,0 g), peptona de farinha de soja (3,0 g) e ágar (20,0 g).

O pH do meio foi ajustado para 8 (Kossuga *et al.*, 2012) com solução de KOH ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$), semelhante ao pH encontrado na água do mar. As culturas foram mantidas sob refrigeração ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) para posteriores repiques de inóculos para meios de cultura sólidos e líquidos.

3.3 Seleção dos fungos resistentes ao pesticida metil paration em meio de cultura sólido

Uma primeira triagem com as 17 linhagens fúngicas foi realizada em placas de Petri com meio de cultura sólido, contendo diferentes concentrações do pesticida metil paration: 120 mg/L, 240 mg/L e 360 mg/L. Essas concentrações utilizadas são bastante altas em relação às encontradas no meio ambiente. No entanto, a intenção dessa etapa do trabalho era de realizar uma triagem rigorosa sobre os micro-organismos, selecionando aqueles resistentes ao pesticida, que poderiam ser utilizados nas próximas

etapas do trabalho, nas quais o objetivo seria a avaliação da possibilidade de degradação do mesmo.

Foram feitos meios de cultura enriquecidos (malte 3%) e meios de cultura mínimos (contendo apenas os sais da água do mar artificial). Nestes últimos, o pesticida foi introduzido com o intuito de ser a única fonte de carbono e nitrogênio para o crescimento do fungo.

O meio de cultura contendo ágar, após esterilização em autoclave (120 °C, 1 atm, 20 minutos), foi resfriado à temperatura de aproximadamente 40 °C e em seguida foi adicionado o pesticida, nas diferentes concentrações citadas acima, para evitar degradação térmica, uma vez que o metil paration é um composto termicamente instável (IPCS, 1993). Esta mistura foi homogeneizada e transferida para as placas de Petri. Com o meio sólido resfriado à temperatura ambiente foram realizados os repiques dos fungos.

Os micélios foram transferidos de culturas puras com auxílio de uma agulha de platina, com a qual foi feita um ponto de inserção no centro da placa, esperando-se um crescimento radial da colônia. Os fungos foram incubados a 27 °C por 15 dias e seu desenvolvimento foi observado aferindo-se o halo de crescimento na superfície das placas de 3 em 3 dias. Todos os experimentos em meio sólido foram realizados em triplicata.

A Figura 11 mostra resumidamente as etapas descritas acima através de um fluxograma.

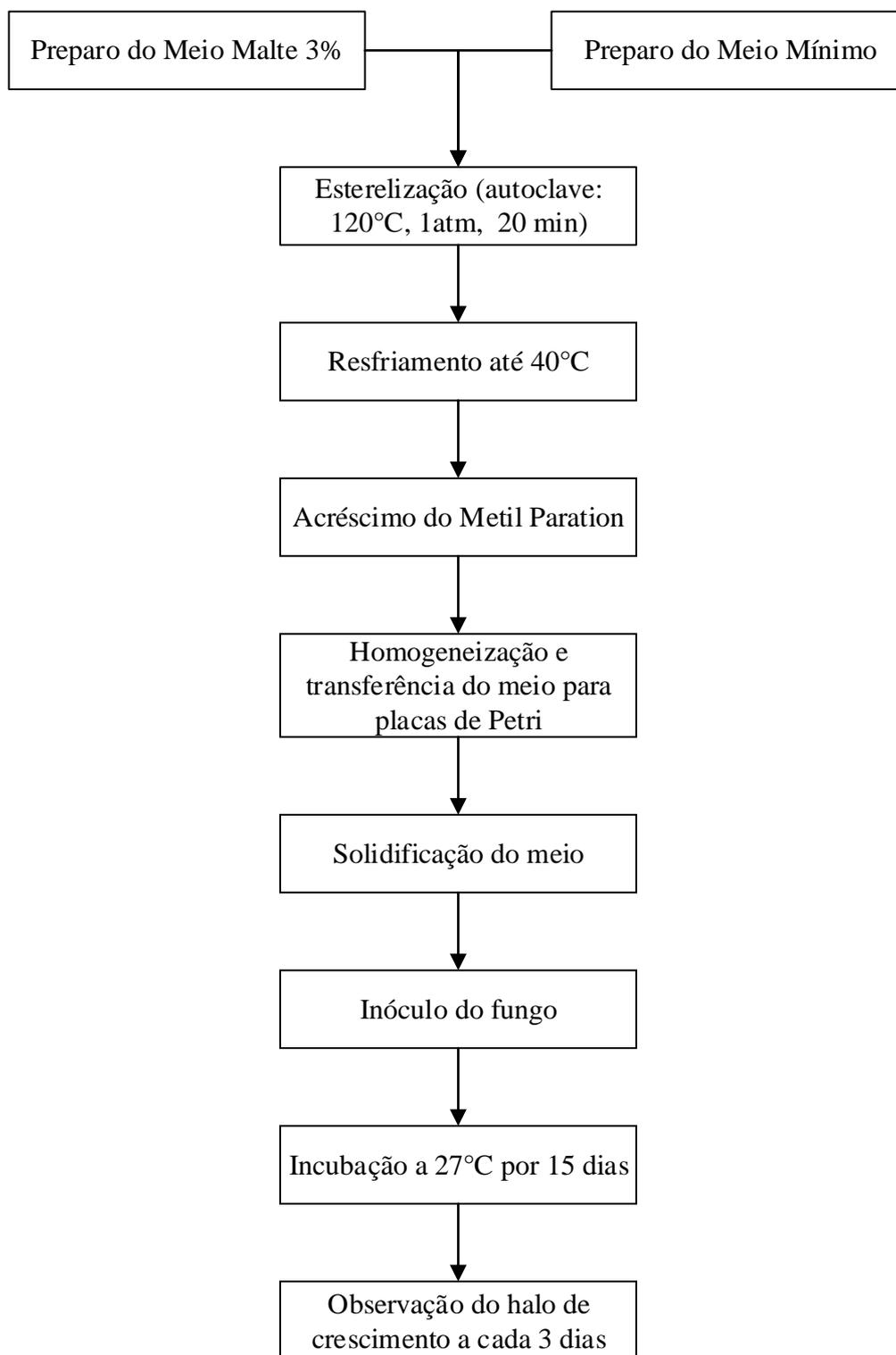


Figura 11 - Fluxograma da metodologia aplicada à triagem dos fungos em meio de cultura sólido.

3.4 Ensaios em meio líquido

Os fungos que apresentaram bom crescimento em meio sólido de malte 3% com pesticida foram cultivados em meio líquido para quantificar a biodegradação do metil paration e possível formação do *p*-nitrofenol, principal produto de degradação conhecido desse pesticida. Os micro-organismos selecionados foram cultivados por aproximadamente 5 dias em placas de Petri com meio de cultura malte 3% acrescido de metil paration na concentração de 120 mg/L (essa etapa de pré-cultivo foi feita para a indução da produção das enzimas que atuam na degradação do pesticida). Posteriormente foram repicados para o meio líquido pela transferência de um pequeno disco de 4 mm de diâmetro de micélio da parte externa da colônia para frascos Erlenmeyer de 250 mL. Estes frascos continham 100 mL de meio de cultura líquido composto por malte 3% com uma concentração de 30 mg/L de metil paration. Esses frascos foram incubados em agitação a 130 rpm e 32 °C por períodos de 10, 20 e 30 dias. Todos os experimentos em meio líquido foram realizados em duplicata.

Foi utilizada uma concentração menor (30 mg/L) no cultivo em meio líquido, em relação ao cultivo em meio sólido (120, 240 e 360 mg/L), porque o desenvolvimento do micro-organismo é mais difícil em meio líquido e não havia a necessidade de verificar a capacidade de degradação de uma concentração tão alta de pesticida, que não é encontrada no meio ambiente.

3.4.1 Ensaios controles

Foram feitos dois tipos de ensaios controle:

- a) *Sem pesticida*: os fungos foram inoculados em frascos Erlenmeyer contendo meio de cultura malte 3% sem o acréscimo do pesticida, para verificar os metabólitos naturalmente produzidos pelos micro-organismos;
- b) *Controle abiótico*: frascos Erlenmeyer contendo meio de cultura malte 3% e metil paration na concentração de 30 mg/L, nos quais não houve inoculo de nenhuma linhagem, para avaliar a degradação abiótica do pesticida.

Os ensaios controle foram feitos utilizando-se os mesmos procedimentos descritos acima, sendo consideradas as particularidades (ausência de pesticida e ausência de micro-organismos, respectivamente) de cada um.

3.5 Extração do pesticida metil paration do meio de cultivo

A análise da degradação do pesticida, pelos micro-organismos e no controle abiótico, em meio líquido foi efetuada após 10, 20 e 30 dias de incubação. Após cada um desses períodos, o micélio formado foi filtrado a vácuo usando um funil de Büchner. O caldo resultante dessa filtração foi reservado e a massa de micélio retida no papel filtro foi transferida para um frasco béquer de 50 mL, no qual foram adicionados 10 mL de água destilada e 10 mL de acetato de etila. Esta mistura bifásica foi colocada em agitação magnética por 30 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi feita uma nova filtração do micélio em um aparato de Büchner e o caldo resultante foi adicionado àquele obtido previamente na primeira filtração.

O caldo final foi extraído três vezes com acetato de etila (3 x 25 mL). À fase orgânica foi adicionado Na_2SO_4 anidro e esse sistema foi incubado por 5 minutos em

temperatura ambiente. O passo seguinte foi uma filtração simples e evaporação do solvente orgânico sob pressão reduzida. O extrato foi resuspendido em metanol² e em seguida foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Para evitar o aumento de resíduos após a ressuspensão da amostra, esta não foi solubilizada em metanol até o volume inicial da reação (100 mL), e sim em 10 mL, indicando uma concentração em 10 vezes da amostra inicial.

As Figuras 12 e 13 mostram resumidamente, através de fluxogramas, as etapas de cultivo em meio líquido e extração, respectivamente, descritas acima.

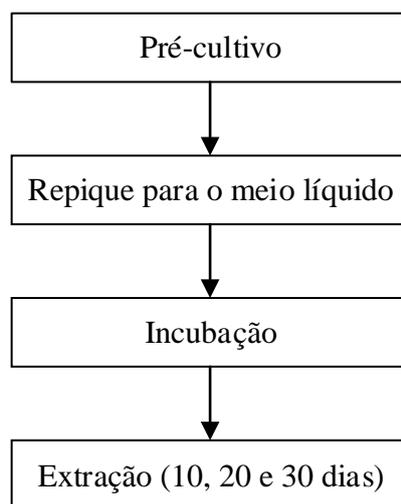


Figura 12 - Fluxograma dos passos relativos ao cultivo dos fungos em meio líquido e posterior extração.

² De acordo com as especificações da coluna C18, utilizada no equipamento de CLAE (ver item 3.6.1), a fase estacionária desta não é adequada ao solvente acetato de etila

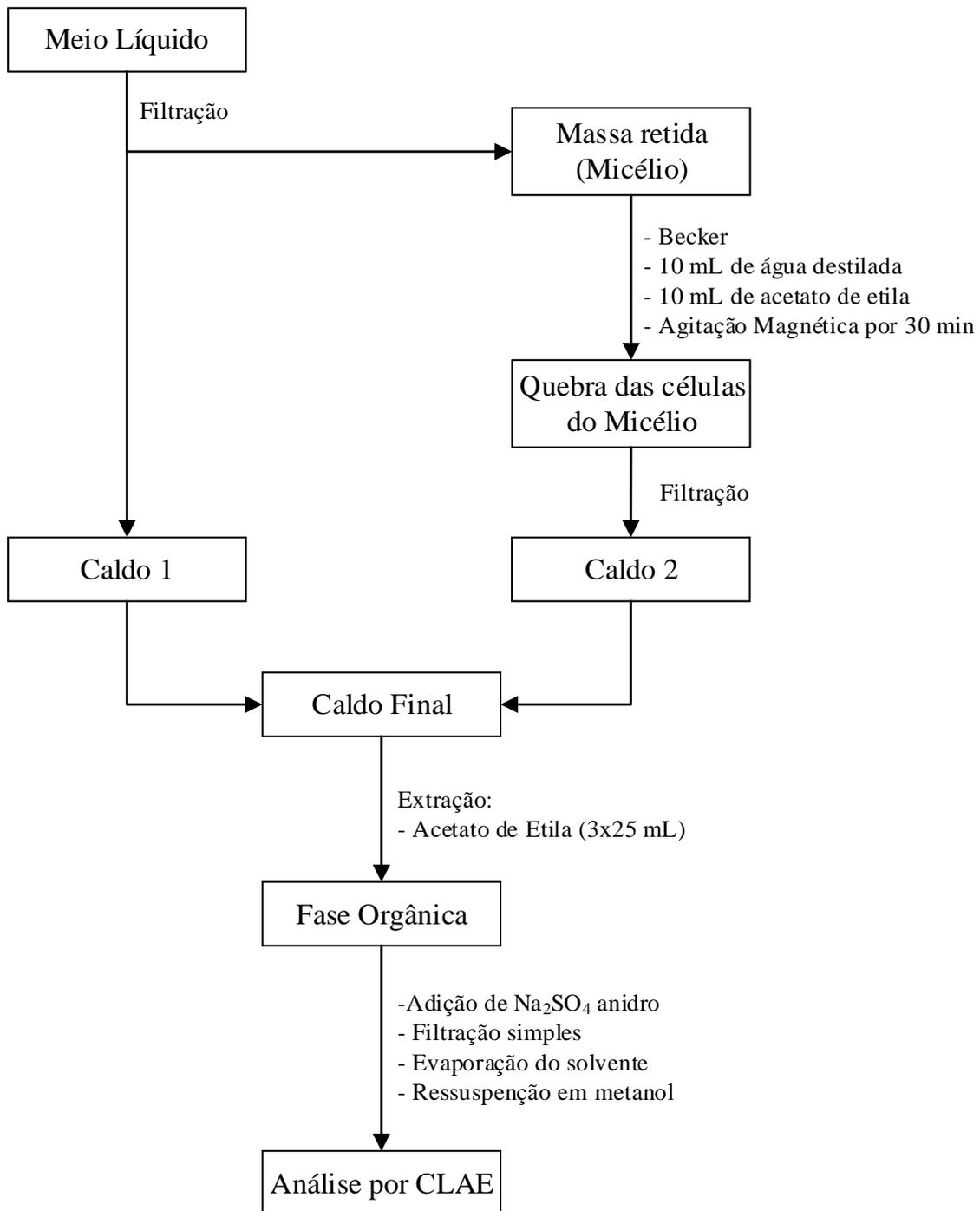


Figura 13 - Fluxograma da metodologia relativa à etapa de extração do meio de cultivo líquido.

3.6 Métodos analíticos para a quantificação da degradação do pesticida metil paration e da presença de *p*-nitrofenol

3.6.1 Condições cromatográficas

Todos os extratos obtidos foram analisados por CLAE para quantificar a porcentagem de metil paration degradada e a de *p*-nitrofenol presente no meio. As análises foram feitas em um equipamento da marca Shimadzu (LC-10ATVP, Shimadzu Co., Japan) com detector de UV (278 nm) conectado a uma coluna C18 CLC-ODS(M) OD-H (0.46 x 25 cm). A fase móvel foi 50% (v/v) de uma solução de acetonitrila-água com fluxo de 0,8 mL.min⁻¹ e a temperatura do forno mantida a 40°C.

Utilizando as condições descritas acima, o tempo de retenção para o metil paration e o *p*-nitrofenol foi de 19,2 e 5,7 min, respectivamente (Figura 14). Desse modo, o tempo de análise para o estudo de degradação do metil paration foi ajustado para 25 minutos.

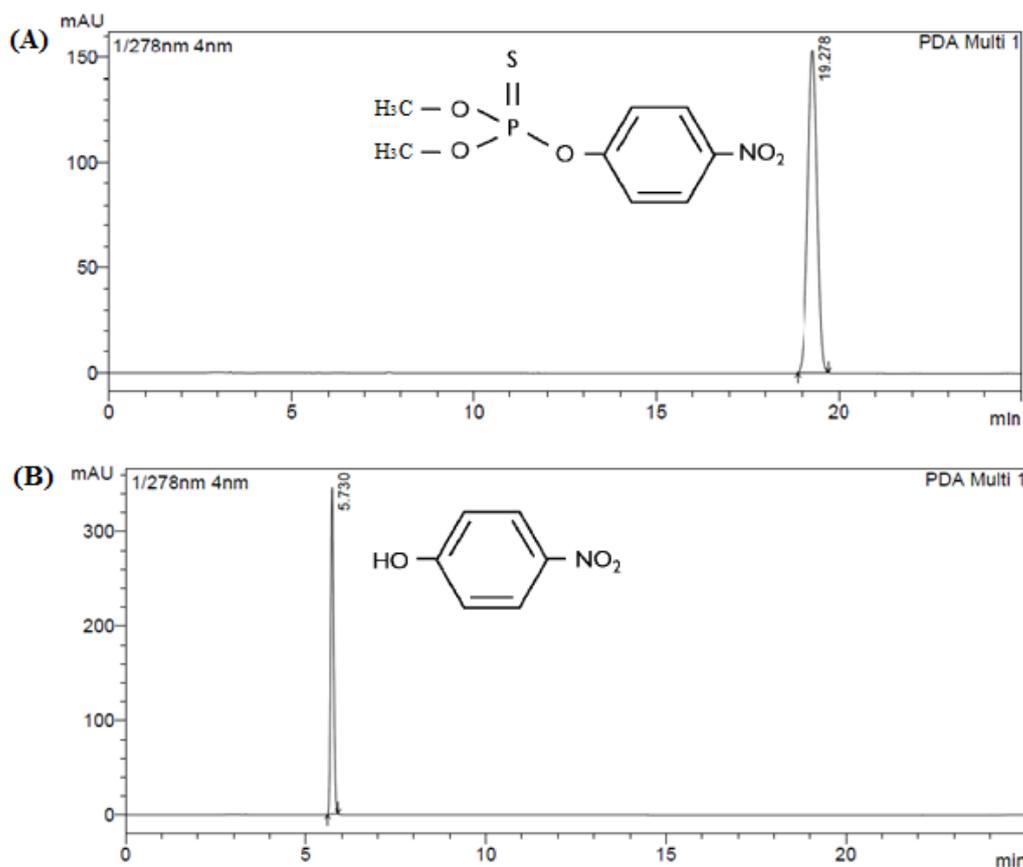


Figura 14 - Cromatogramas mostrando os tempos de retenção, em minutos, do metil paration (A) e *p*-nitrofenol (B).

3.6.2 Curvas analíticas para quantificação do metil paration e *p*-nitrofenol

Foram elaboradas duas curvas analíticas, uma para o metil paration e outra para o *p*-nitrofenol. Em balões volumétricos de 10 mL, foram preparadas duas soluções estoque: uma de metil paration e outra de *p*-nitrofenol, ambas com concentração igual a 5000 mg/L. Para cada uma dessas soluções, foram solubilizados, em metanol grau cromatográfico, 50 mg (19 mmol) de padrão analítico de metil paration e 50 mg (35,94 mmol) de padrão analítico de *p*-nitrofenol, respectivamente.

Alíquotas dessas soluções estoque foram utilizadas para montar as soluções de trabalho de metil paration e de *p*-nitrofenol. Estas foram preparadas, também em balões

volumétricos de 10 mL, nas seguintes concentrações: 5, 50, 100, 200, 300, 450, 500, 550, 600 e 650 mg/L. Cada solução de trabalho foi analisada em triplicata: foram retiradas 3 alíquotas de 1 mL e transferidas para 3 vials, respectivamente. As soluções de trabalho foram analisadas por CLAE.

A curva analítica é uma reta linear, neste caso representada pela relação matemática entre a área do pico obtido por CLAE e as concentrações conhecidas do analito. A linearidade da curva pode ser determinada através da regressão linear, que irá fornecer uma equação da reta e um coeficiente de correlação. Este coeficiente é um parâmetro que permite estimar a qualidade da curva obtida, sendo que valores mais próximos de 1 demonstram uma menor dispersão do conjunto de pontos experimentais (Ribani *et al.*, 2004).

As curvas para o metil paration e *p*-nitrofenol foram preparadas através da técnica de padronização externa, ou seja, foi feita a comparação da área dos analitos na amostra com áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas, preparadas a partir de um padrão analítico adequado. Através dos gráficos plotados, foram obtidas as equações das retas para serem utilizadas na quantificação das reações de biodegradação. A equação da reta é expressa em $y = ax + b$, onde a = coeficiente angular, b = coeficiente linear, x = concentração do analito e y = área do analito.

3.7 Biodegradação do *p*-nitrofenol pela linhagem DL11A

A linhagem DL11A, particularmente, foi selecionada para um teste de degradação do *p*-nitrofenol.

3.7.1 Cultivo da linhagem DL11A em meio líquido para quantificar a biodegradação de *p*-nitrofenol

O micro-organismo foi cultivado em placa de Petri com meio de cultura malte 3% e concentração de 120 mg/L de *p*-nitrofenol (padrão analítico) por aproximadamente 5 dias para posteriormente ser repicado para o meio líquido. O repique foi feito pela transferência de um pequeno disco de 4 mm de diâmetro para frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio de cultura líquido composto por malte 3% e 30 mg/L de *p*-nitrofenol. Esses frascos foram incubados em agitação a 130 rpm e 32 °C. Também foram preparados frascos controle da degradação abiótica do *p*-nitrofenol, sem inoculo do micro-organismo. Esse experimento foi conduzido em duplicata e a degradação avaliada após 10, 20 e 30 dias do início da reação.

3.7.2 Extração do *p*-nitrofenol do meio de cultivo e métodos analíticos para a quantificação da biodegradação de *p*-nitrofenol pela linhagem DL11A

O método de extração foi idêntico ao realizado para o metil paration (item 3.5). Todas as extrações obtidas nas reações foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência para quantificar a porcentagem de *p*-nitrofenol degradada. As condições cromatográficas foram as mesmas descritas no item 3.6.1.

3.8 Identificação das linhagens que mostraram bons resultados quanto à biotransformação do pesticida metil paration e do *p*-nitrofenol

As linhagens que mostraram bons resultados quanto à biotransformação dos pesticidas metil paration e do *p*-nitrofenol, foram caracterizadas por técnicas moleculares baseadas na identificação dos genes RNAr ITS1 e ITS4. Estas análises

foram realizadas sob a supervisão da Profa. Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcelos e colaboração do Dr. Michel R. Zambrano Passarini, na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Campus Diadema.

Após o cultivo dos fungos em meio de cultura líquido malte 3%, o DNA genômico de cada cultura foi extraído utilizando protocolo descrito por Da Silva *et al.* (2008). A seguir, foram realizadas reações de polimerase em cadeia (PCR) para a amplificação dos fragmentos de DNAr do genes ITS1 (5'-CCG TAG GTG AAC CTG CGG-3') e ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') (O'Donnell, 1993). A amplificação foi realizada como descrito por Bonugli-Santos *et al.* (2010) com uma desnaturação inicial por 5 minutos a 94 °C, 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C e 1 minuto a 72 °C, 10 minutos a 72 °C, e, por fim, resfriamento a 4 °C. O produtos de PCR dos DNA amplificados foram encaminhados à sequenciamento Sanger, através de serviço terceirizado pela empresa Helixxa (Campinas, SP).

Após o recebimento dos dados relativos ao sequenciamento das linhagens, foram realizadas análises comparativas com linhagens de referência, disponíveis nas bases de dados públicas Genbank, bem como coleções de culturas internacionais (ATCC e DSMZ). As sequências foram alinhadas usando o programa CLUSTAL X (Thompson *et al.*, 1994) e analisadas usando PAUP (versão 4.0 beta 10) (Swofford, 1998). As distâncias evolutivas foram obtidas a partir das dissimilaridades de pares de sequências calculadas com o pacote PAUP, usando o modelo de substituição de DNA de Kimura (Kimura, 1980). A reconstrução filogenética foi realizada utilizando o algoritmo de neighbor-joining (NJ), com valores de bootstrap calculados a partir de 1000 replicatas, usando as rotinas implementadas no software PAUP.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção dos fungos resistentes ao pesticida metil paration em meio sólido

O potencial de resistência dos fungos ao pesticida foi avaliado pelo diâmetro do halo de crescimento nas placas de Petri, em meio malte 3% e meio mínimo, com as diferentes concentrações (120, 240 e 360 mg/L) de metil paration em comparação com o diâmetro do halo de crescimento dos micro-organismos obtido na placa controle (ausência de pesticida).

4.1.1 Meio de cultura malte 3% com metil paration

Para a primeira triagem foram utilizadas 17 linhagens de fungos. Dessas, apenas 9 cresceram nas placas de Petri com meio de cultura malte 3% nas três concentrações de pesticida. Foram elas: DL11A, DL4M3, DL9M3, DL2M2, DL5A, DL6A, DL4B, DL5B e DL6G. As Tabelas 2 a 10 mostram os valores médios (em centímetros – cm), entre as três réplicas, do diâmetro do halo de crescimento dessas nove linhagens, bem como a porcentagem de redução do halo de crescimento em relação à placa controle, em 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação.

As linhagens DL6G e DL5B (Tabelas 2 e 3, respectivamente) apresentaram um desenvolvimento muito ruim nas placas de malte 3% acrescido de pesticida. Durante todo o desenvolvimento dessas linhagens ao longo dos 15 dias de observação, os índices de redução do halo de crescimento, já na menor concentração de pesticida utilizada (120 mg/L), foram altos, sempre acima de 80%.

Tabela 2 - Halo de crescimento médio^a (em cm) da linhagem DL6G no meio de cultura malte 3% e respectivas porcentagens (%) de redução do halo em relação à placa controle em 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação na placa controle e nas três concentrações de pesticida.

| Dias | Controle | 120 mg/L | | 240 mg/L | | 360 mg/L | |
|------|----------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| | cm | cm | (%) | cm | (%) | cm | (%) |
| 3 | 1,27 | - | - | - | - | - | - |
| 6 | 2,63 | 0,20 | (92,41) | - | - | - | - |
| 9 | 3,93 | 0,27 | (93,22) | 0,13 | (96,61) | 0,10 | (97,46) |
| 12 | 5,47 | 0,37 | (93,29) | 0,23 | (95,73) | 0,10 | (98,17) |
| 15 | 6,93 | 0,53 | (92,31) | 0,33 | (95,19) | 0,10 | (98,56) |

^aDesvio padrão mínimo de 0,06 e máximo de 0,15.

Tabela 3 - Halo de crescimento médio^b (em cm) da linhagem DL5B no meio de cultura malte 3% e respectivas porcentagens (%) de redução do halo em relação à placa controle em 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação na placa controle e nas três concentrações de pesticida.

| Dias | Controle | 120 mg/L | | 240 mg/L | | 360 mg/L | |
|------|----------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| | cm | Cm | (%) | cm | (%) | cm | (%) |
| 3 | 0,97 | - | - | - | - | - | - |
| 6 | 2,07 | 0,23 | (88,71) | 0,20 | (90,32) | 0,25 | (87,90) |
| 9 | 3,13 | 0,43 | (86,17) | 0,40 | (87,23) | 0,30 | (90,43) |
| 12 | 5,10 | 0,67 | (86,93) | 0,50 | (90,20) | 0,33 | (93,46) |
| 15 | 6,70 | 1,10 | (83,58) | 0,70 | (89,55) | 0,50 | (92,54) |

^bDesvio padrão mínimo de 0,06 e máximo de 0,25.

As demais linhagens mostraram um padrão de crescimento interessante ao longo dos 15 dias. A porcentagem de redução do halo de crescimento foi bastante alta nos primeiros dias de observação e depois foi progressivamente sendo reduzida durante o tempo do experimento. Isso sugere que os fungos precisaram de um tempo de adaptação à presença do pesticida, e só a partir de então, foram capazes de elaborar uma estratégia para que seu desenvolvimento fosse melhor.

Ainda assim, ao final de 15 dias, as linhagens DL2M2, DL6A, DL5A e DL4B (tabelas 4, 5, 6 e 7, respectivamente) mostraram um desenvolvimento mediano nas placas de Petri com meio de cultura acrescido de metil paration. Já na menor concentração utilizada (120 mg/L), as linhagens DL2M2, DL6A e DL5A apresentaram um halo de crescimento 60% menor em relação ao halo exibido na placa controle (sem pesticida), e a linhagem DL4B mostrou uma redução acima de 70%.

Tabela 4 - Halo de crescimento médio^c (em cm) da linhagem DL2M2 no meio de cultura malte 3% e respectivas porcentagens (%) de redução do halo em relação à placa controle em 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação na placa controle e nas três concentrações de pesticida.

| Dias | Controle | | 120 mg/L | | 240 mg/L | | 360 mg/L | |
|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|--|
| | cm | Cm | (%) | cm | (%) | cm | (%) | |
| 3 | 1,20 | 0,33 | (72,22) | 0,30 | (75,00) | 0,23 | (80,56) | |
| 6 | 2,77 | 0,67 | (75,90) | 0,60 | (78,31) | 0,53 | (80,72) | |
| 9 | 4,30 | 1,20 | (72,09) | 1,07 | (75,19) | 0,87 | (79,84) | |
| 12 | 4,83 | 1,53 | (68,28) | 1,17 | (75,86) | 1,00 | (79,31) | |
| 15 | 5,27 | 1,97 | (62,66) | 1,43 | (72,78) | 1,23 | (76,58) | |

^cDesvio padrão mínimo de 0,06 e máximo de 0,5.

Tabela 5 - Halo de crescimento médio^d (em cm) da linhagem DL6A no meio de cultura malte 3% e respectivas porcentagens (%) de redução do halo em relação à placa controle em 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação na placa controle e nas três concentrações de pesticida.

| Dias | Controle | 120 mg/L | | 240 mg/L | | 360 mg/L | |
|------|----------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| | cm | cm | (%) | cm | (%) | cm | (%) |
| 3 | 1,27 | - | - | - | - | - | - |
| 6 | 2,60 | 0,47 | (82,05) | 0,40 | (84,62) | 0,30 | (88,46) |
| 9 | 3,77 | 0,90 | (76,11) | 0,57 | (84,96) | 0,47 | (87,61) |
| 12 | 4,57 | 1,27 | (72,26) | 0,83 | (81,75) | 0,60 | (86,86) |
| 15 | 5,17 | 1,80 | (65,16) | 1,00 | (80,65) | 0,70 | (86,45) |

^dDesvio padrão mínimo de 0,06 e máximo de 1,02.

Tabela 6 - Halo de crescimento médio^e (em cm) da linhagem DL5A no meio de cultura malte 3% e respectivas porcentagens (%) de redução do halo em relação à placa controle em 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação na placa controle e nas três concentrações de pesticida.

| Dias | Controle | 120 mg/L | | 240 mg/L | | 360 mg/L | |
|------|----------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| | cm | cm | (%) | cm | (%) | cm | (%) |
| 3 | 1,20 | 0,20 | (83,33) | 0,25 | (79,17) | - | - |
| 6 | 2,73 | 0,70 | (74,39) | 0,63 | (76,83) | 0,53 | (80,49) |
| 9 | 4,10 | 1,20 | (70,73) | 0,97 | (76,42) | 0,80 | (80,49) |
| 12 | 5,37 | 1,77 | (67,08) | 1,33 | (75,16) | 1,00 | (81,37) |
| 15 | 6,47 | 2,40 | (62,89) | 1,67 | (74,23) | 1,33 | (79,38) |

^eDesvio padrão mínimo de 0 e máximo de 0,23.

Tabela 7 - Halo de crescimento médio^f (em cm) da linhagem DL4B no meio de cultura malte 3% e respectivas porcentagens (%) de redução do halo em relação à placa controle em 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação na placa controle e nas três concentrações de pesticida.

| Dias | Controle | | 120 mg/L | | 240 mg/L | | 360 mg/L | |
|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|--|
| | cm | Cm | (%) | cm | (%) | cm | (%) | |
| 3 | 1,40 | 0,20 | (85,71) | - | - | - | - | |
| 6 | 2,23 | 0,30 | (86,57) | 0,23 | (89,55) | 0,20 | (91,04) | |
| 9 | 3,63 | 0,70 | (80,73) | 0,40 | (88,99) | 0,33 | (90,83) | |
| 12 | 4,77 | 1,17 | (75,52) | 0,57 | (88,11) | 0,40 | (91,61) | |
| 15 | 6,30 | 1,47 | (76,72) | 0,77 | (87,83) | 0,57 | (91,01) | |

^fDesvio padrão mínimo de 0,06 e máximo de 0,61.

As linhagens DL9M3, DL4M3 e DL11A (Tabelas 8, 9 e 10, respectivamente) foram as que mostraram melhor desempenho quanto à resistência ao pesticida metil paration. Ao término de 15 dias, a porcentagem de redução do halo para essas três linhagens foi abaixo de 40%, considerando a diferença entre a placa controle e a menor concentração de pesticida utilizada (120 mg/L).

Tabela 8 - Halo de crescimento médio^g (em cm) da linhagem DL9M3 no meio de cultura malte 3% e respectivas porcentagens (%) de redução do halo em relação à placa controle em 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação na placa controle e nas três concentrações de pesticida.

| Dias | Controle | | 120 mg/L | | 240 mg/L | | 360 mg/L | |
|------|----------|------|----------|-------|----------|-------|----------|--|
| | cm | Cm | (%) | cm | (%) | cm | (%) | |
| 3 | 1,00 | 0,67 | (33,33) | 0,33 | (66,67) | 0,30 | (70,00) | |
| 6 | 2,37 | 1,00 | (57,75) | 0,57 | (76,06) | 0,43 | (81,69) | |
| 9 | 3,37 | 1,60 | (52,48) | 1,05* | (68,81) | 0,77* | (77,23) | |
| 12 | 4,20 | 2,60 | (38,10) | 1,80* | (57,14) | 1,20* | (71,43) | |
| 15 | 4,90 | 3,80 | (22,45) | 2,75* | (43,88) | 1,85* | (62,24) | |

*medidas estimadas, devido ao crescimento irregular da colônia.

^gDesvio padrão mínimo de 0,06 e máximo de 0,44.

Tabela 9 - Halo de crescimento médio^h (em cm) da linhagem DL4M3 no meio de cultura malte 3% e respectivas porcentagens (%) de redução do halo em relação à placa controle em 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação na placa controle e nas três concentrações de pesticida.

| Dias | Controle | | 120 mg/L | | 240 mg/L | | 360 mg/L | |
|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|--|
| | cm | Cm | (%) | cm | (%) | cm | (%) | |
| 3 | 1,40 | 0,50 | (64,29) | 0,40 | (71,43) | 0,33 | (76,19) | |
| 6 | 2,77 | 1,23 | (55,42) | 0,90 | (67,47) | 0,70 | (74,70) | |
| 9 | 4,90 | 2,33 | (52,38) | 1,87 | (61,90) | 1,37 | (72,11) | |
| 12 | 6,17 | 3,27 | (47,03) | 2,53 | (58,92) | 1,93 | (68,65) | |
| 15 | 6,63 | 4,27 | (35,68) | 3,13 | (52,76) | 2,57 | (61,31) | |

^hDesvio padrão mínimo de 0,06 e máximo de 0,35.

Tabela 10 - Halo de crescimento médioⁱ (em cm) da linhagem DL11A no meio de cultura malte 3% e respectivas porcentagens (%) de redução do halo em relação à placa controle em 3, 6, 9, 12 e 15 dias de incubação na placa controle e nas três concentrações de pesticida.

| Dias | Controle | 120 mg/L | | 240 mg/L | | 360 mg/L | |
|------|----------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| | cm | cm | (%) | cm | (%) | cm | (%) |
| 3 | 2,73 | 1,00 | (63,41) | 0,80 | (70,73) | 0,57 | (79,27) |
| 6 | 6,37 | 2,70 | (57,59) | 3,57 | (43,98) | 1,77 | (72,25) |
| 9 | 9,30 | 4,57 | (50,90) | 3,90 | (58,06) | 3,07 | (67,03) |
| 12 | 9,30 | 6,33 | (31,90) | 5,33 | (42,65) | 4,40 | (52,69) |
| 15 | 9,30 | 7,93 | (14,70) | 6,57 | (29,39) | 5,27 | (43,37) |

ⁱDesvio padrão mínimo de 0 e máximo de 2,2.

As figuras 15, 16 e 17 mostram a diferença no halo de crescimento entre as placas controle (sem pesticida) e as placas com as diferentes concentrações de metil paration para essas três linhagens, DL9M3, DL4M3 e DL11A.

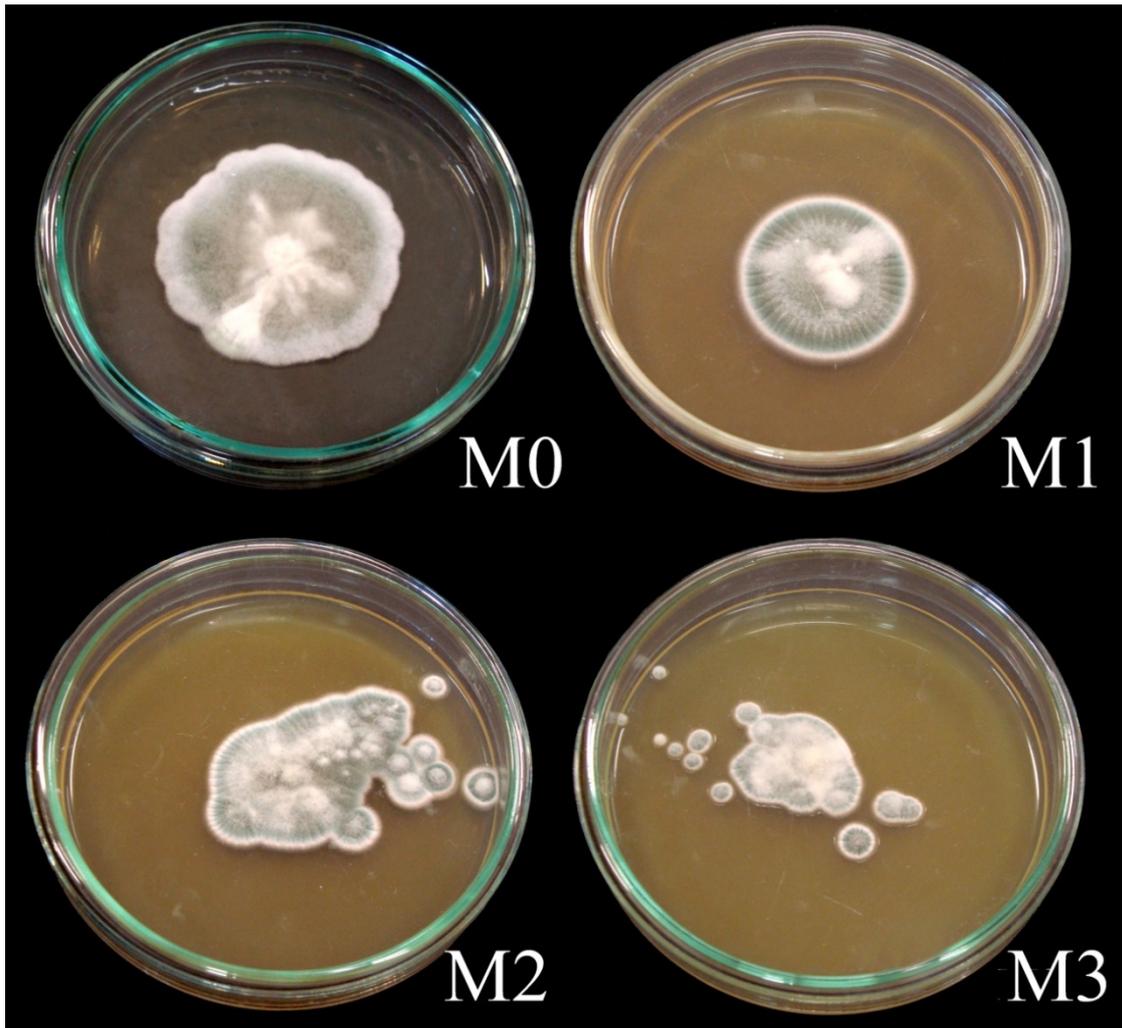


Figura 15 - Placas de Petri mostrando o crescimento, após 15 dias, da linhagem DL9M3 em meio enriquecido de malte 3%, sendo M0) placa controle, M1) 120 mg/L, M2) 240 mg/L e M3) 360 mg/L.

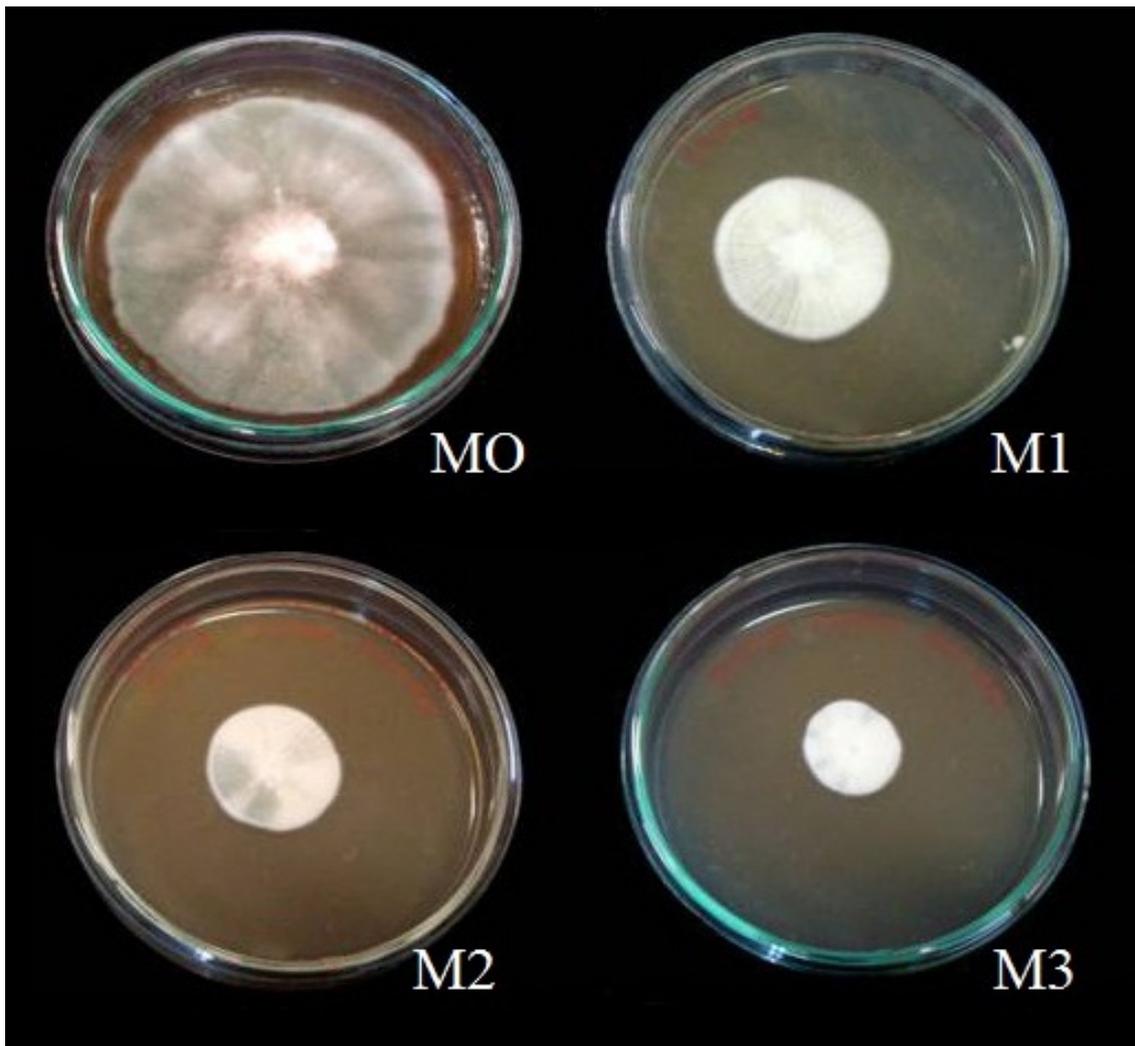


Figura 16 - Placas de Petri mostrando o crescimento, após 15 dias, da linhagem DL4M3 em meio enriquecido de malte 3%, sendo M0) placa controle, M1) 120 mg/L, M2) 240 mg/L e M3) 360 mg/L.

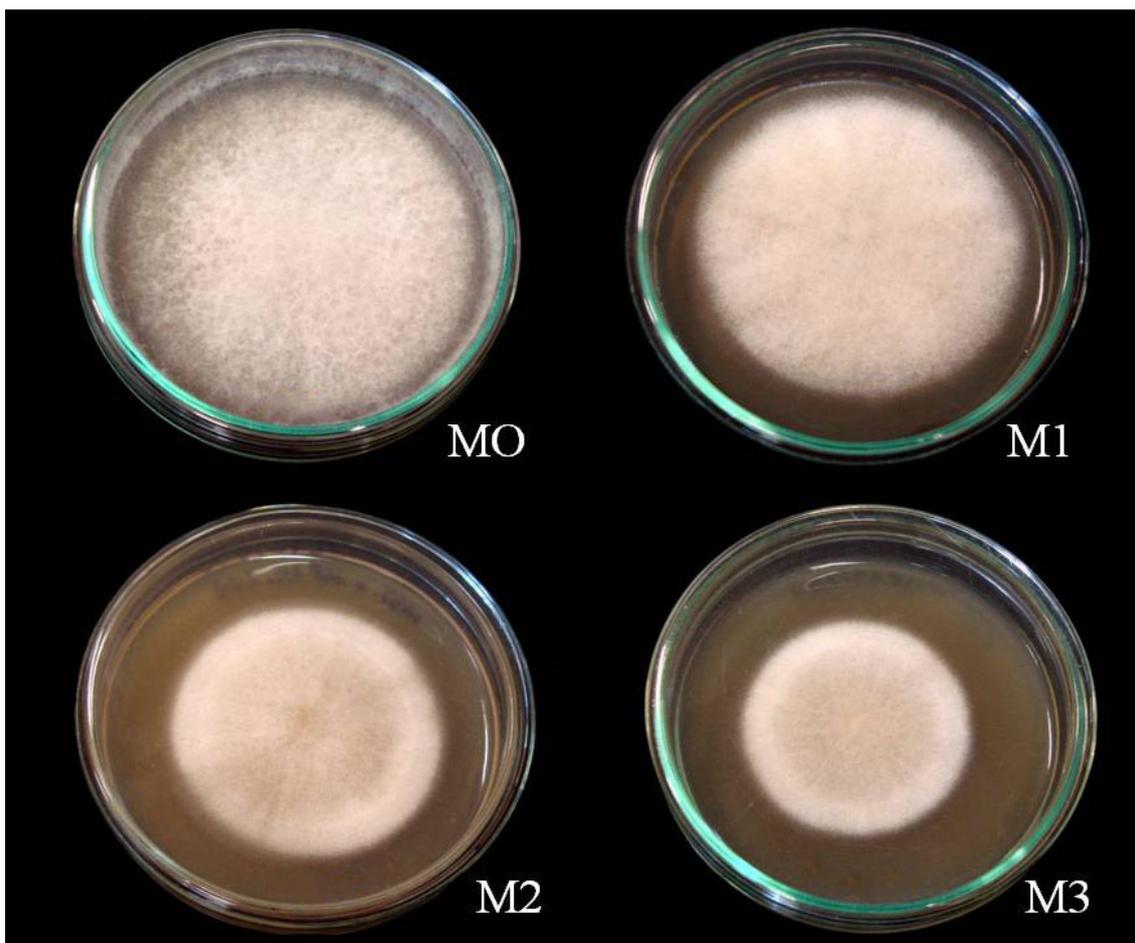


Figura 17 - Placas de Petri mostrando o crescimento, após 15 dias, da linhagem DL11A em meio enriquecido de malte 3%, sendo M0) placa controle, M1) 120 mg/L, M2) 240 mg/L e M3) 360 mg/L

Fungos, em sua maioria, têm necessidades nutricionais simples. Entre os macronutrientes necessários estão carbono, nitrogênio, oxigênio, enxofre, fósforo, potássio e magnésio, e, entre os micronutrientes, estão cálcio, cobre, ferro, manganês e zinco (Walker e White, 2011). O meio de cultura de malte 3% preparado com água do mar artificial contém todos esses elementos essenciais ao crescimento dos fungos, sendo, portanto, um bom substrato para o seu desenvolvimento. Nesse meio rico em nutrientes, o pesticida pode ter representado apenas o papel de um contaminante para a

maioria das linhagens, sendo tóxico ao micro-organismo, e não utilizado por ele como fonte de alimento.

O metil paration, embora pertença à classe de inseticidas (ATSDR, 2001) mostrou-se bastante tóxico aos fungos utilizados neste estudo, uma vez que inibiu por completo o crescimento de metade das linhagens utilizadas nas três concentrações testadas. Além disso, na maioria das linhagens que conseguiram se desenvolver nessas condições, o pesticida provocou redução na taxa de crescimento com o aumento de suas concentrações no meio. Resultado semelhante foi encontrado por Omar (1998), que observou a redução da população das bactérias de uma porção de solo após este passar por tratamento com os pesticidas organofosforados cyolan, malation e dursban.

Essa inibição de crescimento em algumas linhagens pode ter ocorrido devido ao fato de os fungos utilizados serem originários de um ambiente sem histórico prévio de contaminação pelo pesticida. Em outros trabalhos, como Pakala *et al.* (2007) e Pino e Peñuela (2011), que analisaram a capacidade de biodegradação de pesticidas por bactérias isoladas de solos previamente contaminados com xenobióticos, todos os micro-organismos foram capazes de utilizar completamente o metil paration como fonte de carbono e nitrogênio. Segundo Kumar *et al.* (2011), os micro-organismos são adaptáveis a condições adversas de sobrevivência e encontram maneiras de se desenvolver mesmo em ambientes inóspitos. Assim sendo, os organismos que previamente estiveram em contato com substâncias tóxicas possivelmente já estão mais aptos a se desenvolver na presença dos xenobióticos.

Outro ponto interessante a ser considerado é a respeito das concentrações de metil paration utilizadas nesse experimento, que foram bastante altas. No Brasil, a Resolução CONAMA N° 357 de 17 de março de 2005 estabelece um máximo de 0,04 µg/L (0,04 ppb) de metil paration em efluentes, para que possam ser lançados em um

corpo de água doce. No entanto, segundo o IPCS (International Program on Chemical Safety) (1993), os micro-organismos podem utilizar metil paration como fonte de carbono e estudos em comunidades naturais mostraram que concentrações de até 5mg/L (5 mg/L) aumentaram a biomassa e a atividade reprodutiva.

Outros estudos, de avaliação da capacidade de biodegradação do metil paration por micro-organismos, utilizando concentrações maiores desse pesticida já foram realizados com êxito. Liu *et al.* (2007) mostraram a degradação de até 1200 mg/L de metil paration pela bactéria *Acinetobacter radioresistens* USTB-04., e Marinho *et al.* (2011) mostraram que um fungo da espécie *Aspergillus niger* foi capaz de crescer em placas de Petri com doses de MP de até 60 mg/L, em 96h de experimento.

No presente trabalho, mesmo que essa inibição no crescimento tenha sido observada, alguns fungos conseguiram se desenvolver nas placas de malte 3% em todas as concentrações de pesticida, até o máximo de 360 mg/L. Isso comprova a alta capacidade desses micro-organismos em se adaptar a condições adversas e se desenvolver utilizando os nutrientes disponíveis no ambiente em que se encontram, metabolizando de alguma maneira um composto, inconveniente ao seu crescimento, que esteja presente nesse meio.

4.1.2 Meio de cultura mínimo mineral (ASW)

Apenas duas linhagens, DL11A e DL4M3, conseguiram se desenvolver nas placas de meio mínimo com pesticida, nas quais o metil paration representava a única fonte de carbono e nitrogênio. A Tabela 11 mostra a medida média, entre as três réplicas, do diâmetro do halo de crescimento dessas duas linhagens que conseguiram se desenvolver no meio de cultura mínimo (ASW) nas diferentes concentrações de

pesticida utilizadas após 15 dias de incubação. Os valores de desvio padrão entre as réplicas foram baixos para as duas linhagens, sendo mínimo de 0 e máximo de 0,87 em DL11A e mínimo de 0 e máximo de 0,46 em DL4M3.

Tabela 11 – Halo de crescimento médio (em cm) das linhagens DL11A e DL4M3 no meio de cultura mínimo mineral (ASW) após 15 dias de incubação na placa controle e nas três concentrações de pesticida.

| Linhagem | Meio | Controle | 120 mg/L | 240 mg/L | 360 mg/L |
|----------|------|----------|----------|----------|----------|
| DL11A | ASW | 0,00 | 0,53 | 1,07 | 1,27 |
| DL4M3 | ASW | 0,00 | 0,1 | 0,27 | 0 |

O crescimento nas placas de meio mínimo com pesticida foi pequeno, não atingindo grandes medidas de diâmetro de colônia, provavelmente devido à insuficiência de formas lábeis de carbono e nitrogênio nesse meio, o qual é constituído simplesmente por água do mar artificial e ágar. Pode-se observar a ausência total de crescimento de uma colônia fúngica nas placas de Petri contendo apenas o meio mínimo (placas controle), demonstrando que somente os elementos da água do mar artificial e do ágar não bastam para o desenvolvimento dos fungos marinhos.

Pelo crescimento da linhagem DL11A nessas condições, vemos que, quando o pesticida é introduzido no meio, ocorre certo desenvolvimento da colônia. E conforme a concentração de pesticida no meio vai aumentando, também é maior o desenvolvimento do fungo, representando pelo aumento no diâmetro do halo de crescimento. Isso é um indício de que pesticida, nesse caso, está sendo utilizado como fonte nutritiva. A linhagem DL4M3 também foi capaz de se desenvolver quando o metil paration foi

acrescentado ao meio de ASW, porém mostrou um desenvolvimento menor em relação à DL11A, e não conseguiu se desenvolver na concentração de 360 mg/L. Essa linhagem, portanto, é mais sensível à toxicidade do metil paration, mostrando um limite para a metabolização deste pesticida.

As Figuras 18 e 19 mostram a diferença no diâmetro da colônia entre as placas controle (sem pesticida) e as placas com as diferentes concentrações de metil paration para essas duas linhagens. As setas e linhas pontilhadas na figura indicam a posição da colônia.

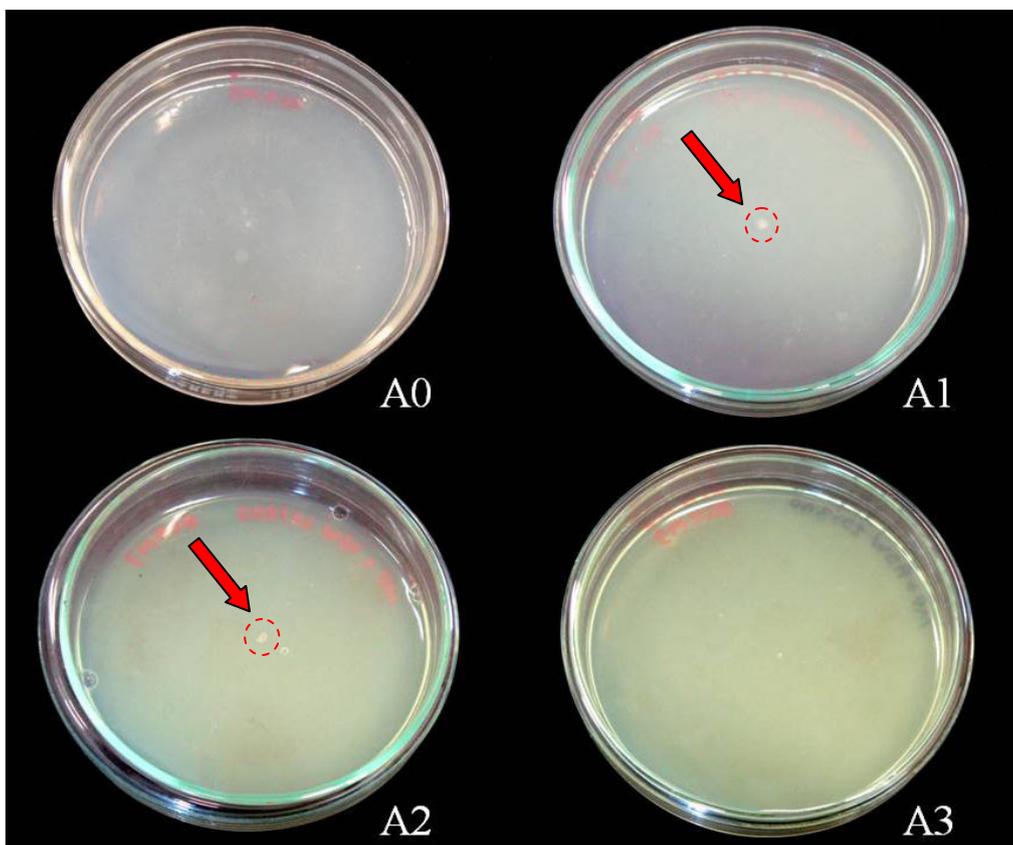


Figura 18 - Placas de Petri mostrando o crescimento, após 15 dias, da linhagem DL4M3 em meio mínimo, sendo A0) placa controle, A1) 120 mg/L, A2) 240 mg/L e A3) 360 mg/L.

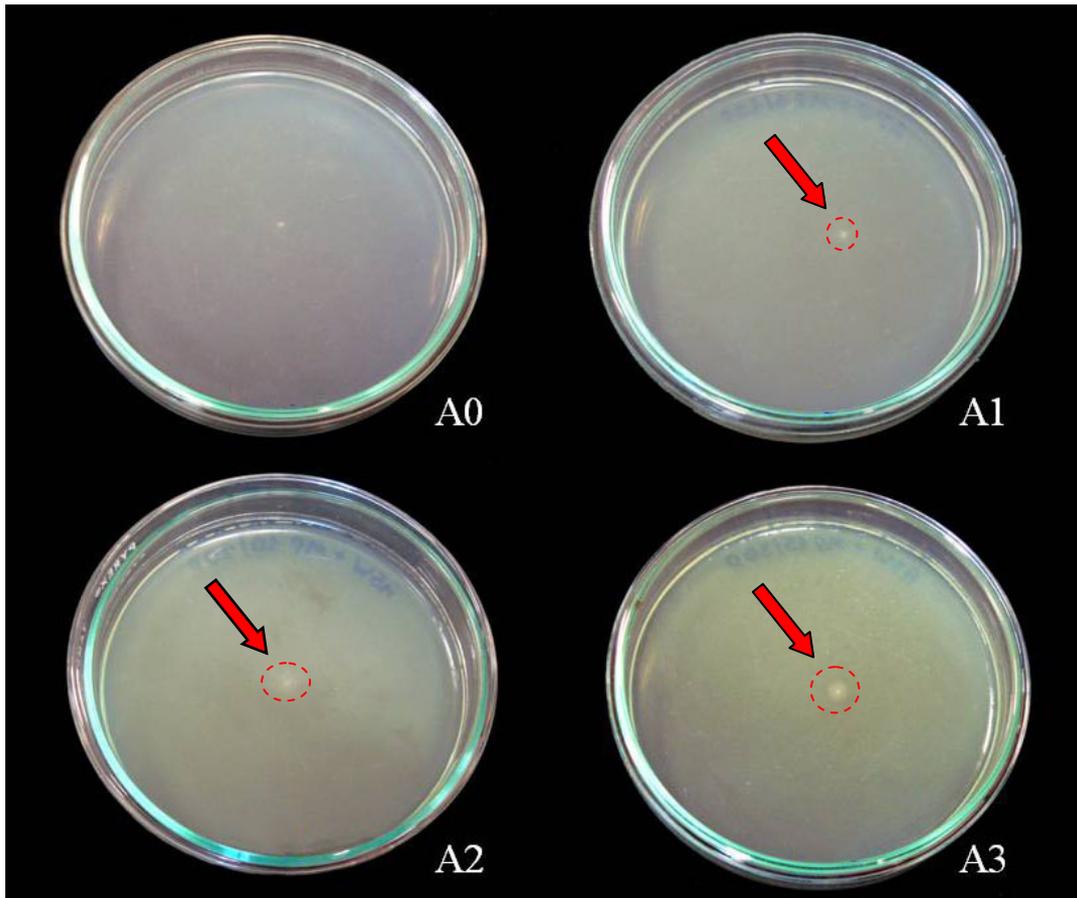


Figura 19 - Placas de Petri mostrando o crescimento, após 15 dias, da linhagem DL11A em meio mínimo, sendo A0) placa controle, A1) 120 mg/L, A2) 240 mg/L e A3) 360 mg/L.

As linhagens DL11A e DL4M3 se mostraram, portanto, promissoras na degradação do metil paration uma vez que, além de se desenvolverem nas placas de malte 3% com pesticida, também cresceram no meio mínimo com pesticida. As medidas do diâmetro do halo de crescimento neste meio mínimo foram bastante baixas, mostrando que os organismos tiveram dificuldade em se desenvolver nestas condições. No entanto, pode-se observar que o halo de crescimento aumenta de acordo com o acréscimo na concentração de metil paration, indicando que estes micro-organismos

provavelmente estão quebrando a molécula do pesticida e utilizando-a como fonte de carbono e nitrogênio.

4.2 Curvas analíticas para a quantificação do metil paration e *p*-nitrofenol

Como relatado anteriormente, a reação de hidrólise do metil paration, levando à formação de *p*-nitrofenol é o evento mais recorrente na degradação desse pesticida promovida por micro-organismos. Assim sendo, no presente trabalho foi monitorado o decaimento de metil paration bem como o aparecimento de *p*-nitrofenol ao longo da reação promovida pelo crescimento dos fungos em meio de cultivo líquido acrescido de MP, o que comprovaria que a degradação do metil paration.

A curva analítica do metil paration e do *p*-nitrofenol englobou as concentrações de 5, 50, 100, 200, 300, 450, 500, 550, 600 e 650 mg/L. A equação de reta obtida para a curva do MP (Figura 20a) foi $y = 27275,11x - 62198,76$, com coeficiente de correlação $r = 0,9965$. A equação de reta obtida para a curva do PNF (Figura 20b) foi $y = 22138,56x + 103097,59$, com coeficiente de correlação $r = 0,9975$.

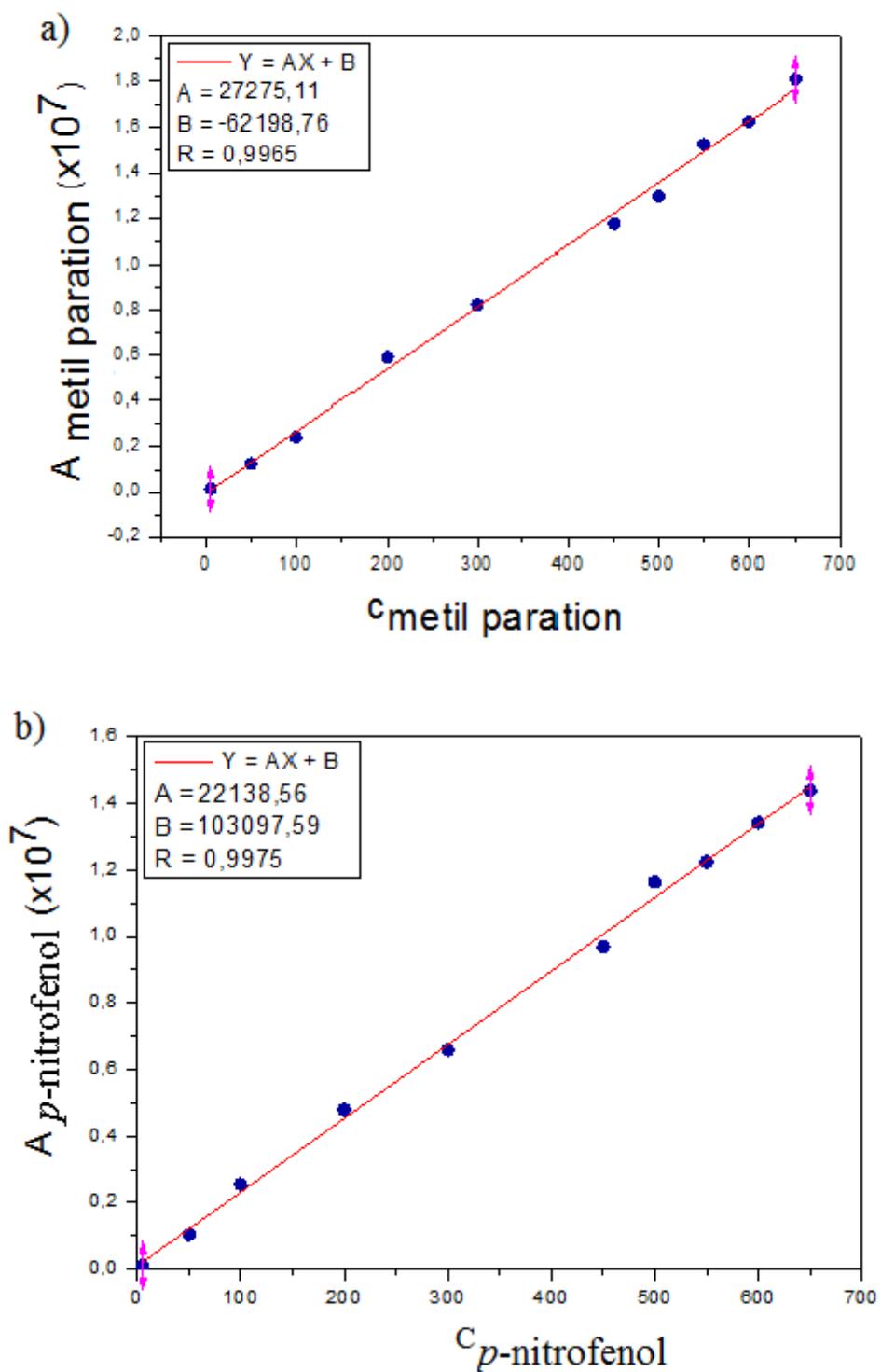


Figura 20 - Curvas analíticas do metil paration (a) e do *p*-nitrofenol (b).

4.3 Determinação da real concentração do metil paration na formulação comercial

A composição dos ingredientes ativos do pesticida Folisuper 600 BR, de acordo com Agripec®, é:

Metil paration: 600 g/L (60% m/v)

Ingredientes Inertes³: 528 g/L (52,8% m/v)

Na amostra do pesticida comercial utilizada neste trabalho foi verificada uma concentração de 567,42 g/L do ingrediente ativo metil paration. Araújo (2006) também constatou concentração menor (585 g/L) deste pesticida na amostra comercial utilizada em seu trabalho, divergindo do valor mencionado no rótulo do produto. Porém, por se tratar de uma amostra de trabalho e não um padrão analítico, vários fatores podem ter influenciado nesta concentração, como temperatura de estocagem, embalagem, tipo de dispersante utilizado, etc.

4.4 Cultivo dos micro-organismos em meio líquido para quantificação da degradação do metil paration e formação do *p*-nitrofenol

As linhagens DL11A, DL4M3 e DL9M3, que apresentaram os melhores resultados na triagem em meio sólido, foram selecionadas para dar continuidade ao experimento, seguindo para a etapa de cultivo em meio líquido e quantificação da degradação.

³ Não foram encontradas informações a respeito de quais compostos incluem estes componentes inertes.

4.4.1 Degradação do metil paration

4.4.1.1 Controle abiótico

O controle abiótico, composto por meio de cultura malte 3% com base de água do mar artificial e concentração de 30 mg/L de metil paration, mostrou altos índices de degradação do pesticida ao longo dos dias de análise da reação, conforme mostra o gráfico abaixo (Figura 21). Em 10 dias, o metil paration sofreu uma degradação na faixa de 60%, aumentando para 85% em 20 dias e 90% em 30 dias.

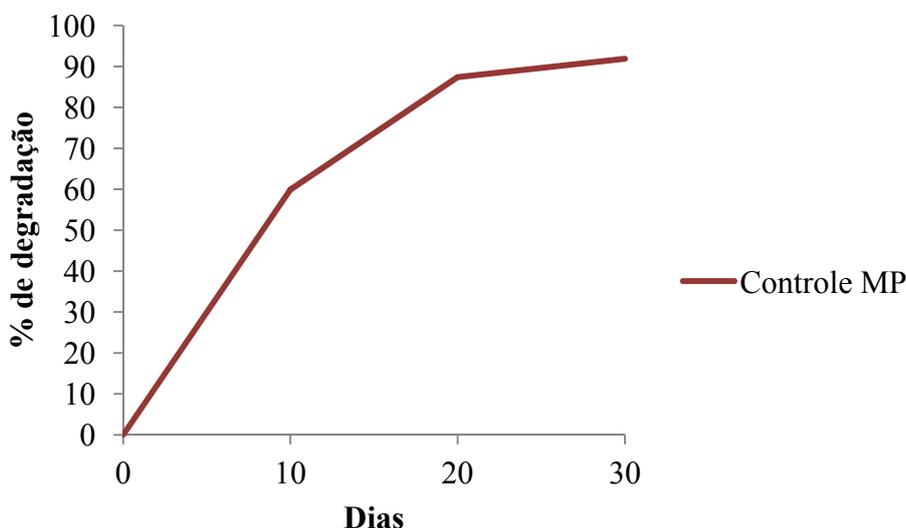


Figura 21 – Porcentagem de metil paration degradada no controle abiótico em 10, 20 e 30 dias de reação.

O metil paration é relativamente solúvel em água (50 a 60 mg/L em pH =7) (IPCS, 1993) e sua degradação ocorre principalmente por hidrólise. Outros autores (Órtiz-Hernandez *et al.*, 2001; Jauregui *et al.*, 2003; Singh e Walker, 2006; Marinho *et al.*, 2011) já relataram a baixa persistência desse composto no meio ambiente, uma vez

que é rapidamente degradado assim que entra em contato com o solo ou a água. Além disso, os pesticidas organofosforados são mais suscetíveis à hidrólise alcalina (Pehkonen e Zhang 2002; Almeida, 2010), como é o caso do presente estudo no qual o meio de cultura foi mantido a um pH igual a 8.

Silva (2013) avaliou a hidrólise espontânea do metil paration em condições muito similares às utilizadas no presente trabalho. O metil paration foi adicionado a um meio de cultura malte 2% (composição similar ao meio de malte 3%, exceto pela ausência de peptona e quantidade de malte utilizada) preparado com base de água do mar artificial (igual composição da ASW utilizada no presente trabalho), e esse sistema foi incubado a 32 °C e 130 rpm por 30 dias. A grande diferença entre os dois trabalhos foi o valor de pH, que Silva (2013) manteve igual a 7. Essa divergência levou a uma degradação consideravelmente menor do metil paration, correspondendo a cerca de apenas 50% ao final de 30 dias.

De acordo com um perfil toxicológico do metil paration traçado pela Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças (ATSDR, 2001), a taxa de hidrólise química do metil paration depende do pH e da temperatura do meio no qual essa substância se encontra. O tempo de meia vida estimado para metil paration em soluções aquosas é de 72 a 89 dias em temperatura igual a 25 °C e pH < 8, enquanto que à 40 °C e pH=8, esse tempo de meia vida é reduzido a 4 dias (EPA, 1978). Desse modo, as condições abióticas (pH e temperatura) utilizadas no presente trabalho provavelmente contribuíram para uma degradação mais rápida do pesticida.

4.4.1.2 Biodegradação do pesticida metil paration pelas linhagens DL11A, DL4M3 e DL9M3

As análises por CLAE revelaram índices acima de 45% de degradação nas reações em meio líquido com o pesticida mediadas pela linhagem DL4M3 e acima de 70% nas reações com as linhagens DL11A e DL9M3. As porcentagens de metil paration degradadas por essas linhagens comparativamente ao que foi degradado no controle abiótico estão demonstradas nas Figuras 22, 23 e 24.

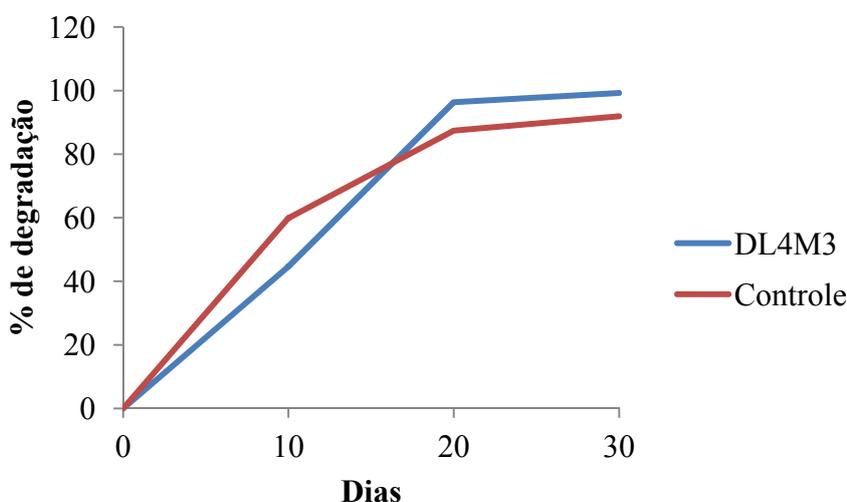


Figura 22 – Porcentagem de metil paration degradada pela linhagem DL4M3 e no controle abiótico em 10, 20 e 30 dias.

A linhagem DL4M3 foi capaz de degradar aproximadamente 45% do metil paration em 10 dias, índice que ficou abaixo da degradação exibida no controle abiótico. Entretanto, em 20 e 30 dias, a degradação obtida por essa linhagem foi superior à observada no controle abiótico. Em 20 dias, a degradação do metil paration por esse fungo estava praticamente completa.

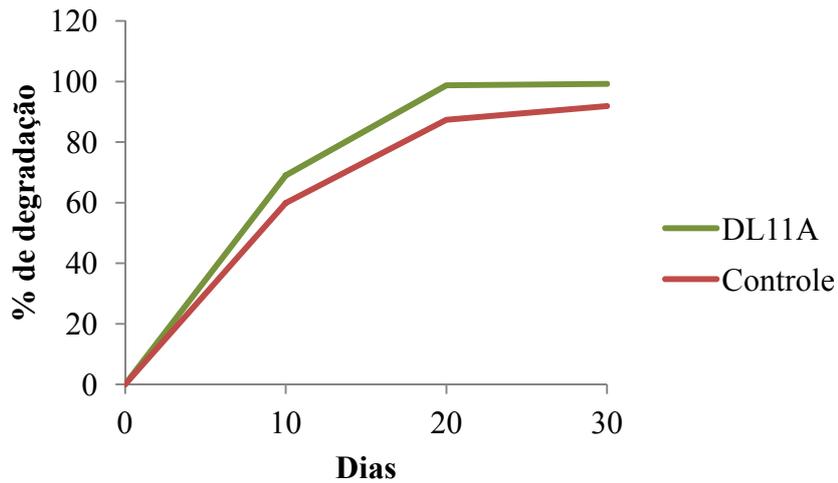


Figura 23 – Porcentagem de metil paration degradada pela linhagem DL11A e no controle abiótico em 10, 20 e 30 dias.

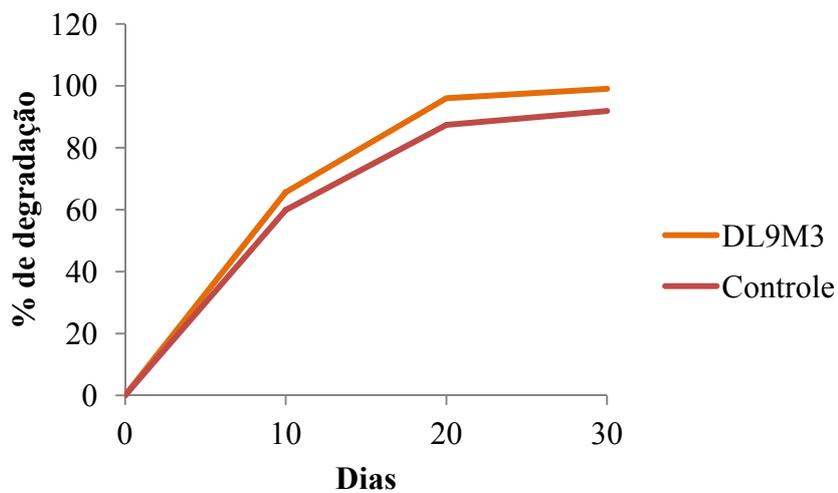


Figura 24 – Porcentagem de metil paration degradada pela linhagem DL9M3 e no controle abiótico em 10, 20 e 30 dias.

As linhagens DL11A e DL9M3 mostraram uma degradação do MP sempre superior à observada no controle abiótico, em todos os dias de observação. Ambas

degradaram cerca de 70% do pesticida em 10 dias, e após 20 dias, como também foi observado para a linhagem DL4M3, a degradação do metil paration estava praticamente completa.

As taxas de degradação do pesticida foram maiores nas reações com as linhagens de fungos em comparação com o controle abiótico. No entanto, essa diferença não foi superior a 10%, ou seja, não houve uma diferença significativa entre a degradação do pesticida por hidrólise química (controle abiótico) e por hidrólise enzimática (reações com as linhagens). Por esses dados, então, não foi possível afirmar se os micro-organismos estão tendo papel fundamental na degradação do metil paration.

Devido à ausência de dados sobre a biodegradação desse pesticida por fungos, especialmente fungos marinhos, os valores de pH (pH=8) e temperatura (32°C) escolhidos para o presente trabalho foram baseados nas condições de melhor atividade enzimática relatadas em estudos anteriores realizados com bactérias. Munnecke (1979) observou melhor atividade da enzima paration hidrolase com temperatura por volta de 35-36 °C e pH de 8,5 a 9,5. Chaudhry *et al.* (1988), em estudo com a enzima metil paration hidrolase constatou atividade ótima em pH de 7,5 a 9,5 e temperatura de 35°C a 40°C. Rowland *et al.* (1991), observou maior atividade da enzima paration hidrolase em pH na faixa de 7,5 a 10,5 e temperatura ótima de 45 °C em pH =8,5.

O pH com valor igual a 8 também foi adotado por ser similar ao pH da água do mar, sendo esse um fator importante uma vez que os fungos utilizados neste trabalho têm origem marinha. E ainda, durante todo o procedimento de isolamento e conservação desses micro-organismos, foi mantido um pH = 8, por ser um valor próximo ao encontrado no ambiente marinho (Kossuga *et al.*, 2012). No entanto, um valor menor de pH talvez pudesse ter sido mais eficiente na estimulação da atividade enzimática desses fungos marinhos. Recentemente Krause (2013), em um estudo sobre a acidificação dos

oceanos, realizado em microcosmos compostos por água do mar natural, mostrou que a formação de colônias de fungos foi maior em valores de pH na faixa de 7,67 a 7,82.

4.4.2 Presença de *p*-nitrofenol nas reações com as linhagens DL11A, DL4M3 e DL9M3 e no controle abiótico

Foi constatada a presença de *p*-nitrofenol nas reações entre as linhagens de fungos e o metil paration, bem como no controle abiótico.

4.4.2.1 Controle abiótico

No controle abiótico, a degradação espontânea, por hidrólise química, do metil paration levou ao aparecimento de *p*-nitrofenol. Esse evento já foi previamente relatado em ambientes aquosos no geral (Farran, 1988; ASTDR, 2001; Araújo, 2006). Um fato interessante que pôde ser observado no presente trabalho foi a taxa, sempre baixa, em que o *p*-nitrofenol foi medido ao longo dos dias de experimento (Figura 25). A quantidade de PNF presente é muito inferior à quantidade de metil paration que foi degradada no controle abiótico (item 4.4.1.1).

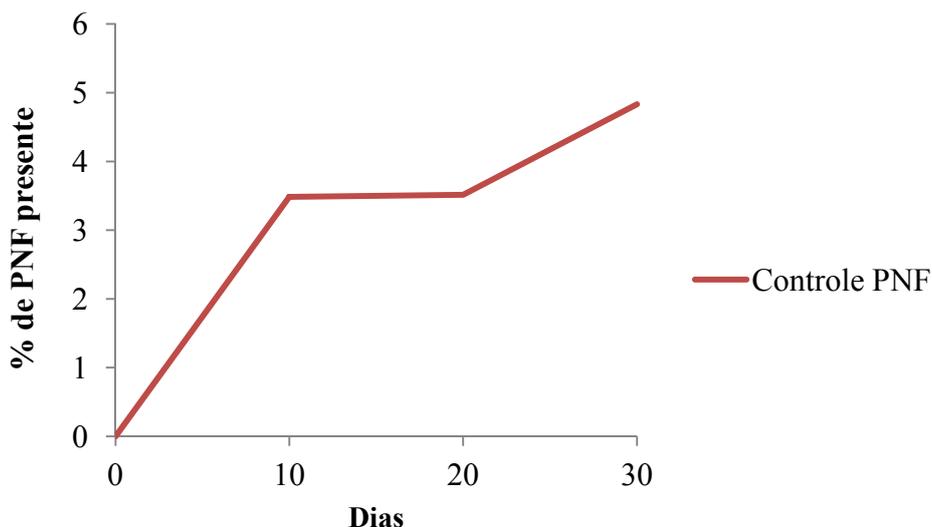


Figura 25 - Porcentagem de *p*-nitrofenol presente no controle abiótico como resultado da degradação do metil paration, em 10, 20 e 30 dias.

O *p*-nitrofenol é moderadamente solúvel em água fria (Maynard, 1996) e é comumente degradado no ambiente aquático por processos de fotólise e biodegradação (ATSDR, 1992). A meia-vida estimada é de 1 a 8 dias na água doce e 13 a 21 dias na água do mar (ATSDR, 1992). A volatilização desse composto é considerada insignificante. Não há relatos de hidrólise química do PNF promovida por fatores abióticos. Desse modo, era esperado que no controle abiótico o *p*-nitrofenol se mantivesse estável, estando presente no meio na mesma proporção em que o metil paration foi degradado.

As baixas taxas de *p*-nitrofenol encontradas no controle abiótico podem ter sido ocasionadas por um aumento da solubilidade do PNF na água. Os nitrofenóis podem ser convertidos à sua forma mais solúvel pela ação de hidróxidos alcalinos (ATSDR, 1992; Maynard, 1996), existentes no meio de cultura utilizado no presente estudo (sais da água do mar artificial dissolvidos). Considerando que isso tenha acontecido, o método

de extração utilizado (extração líquido-líquido com acetato de etila) provavelmente não foi eficaz na recuperação do *p*-nitrofenol. A extração com acetato de etila é recomendada para procedimentos que envolvam pesticidas com características mais polares e que comumente se dissolvem em água, como os organofosforados (Prestes *et al.*, 2009). No entanto, a solubilidade do PNF parece ter sido muito elevada e a sua recuperação com o acetato de etila tornou-se mais difícil.

4.4.1.2 Reações com as linhagens DL11A, DL4M3 e DL9M3

Nas reações de degradação do metil paration pelas linhagens DL11A, DL4M3 e DL9M3 também foi observada a presença de *p*-nitrofenol (figuras 26, 27 e 28, respectivamente).

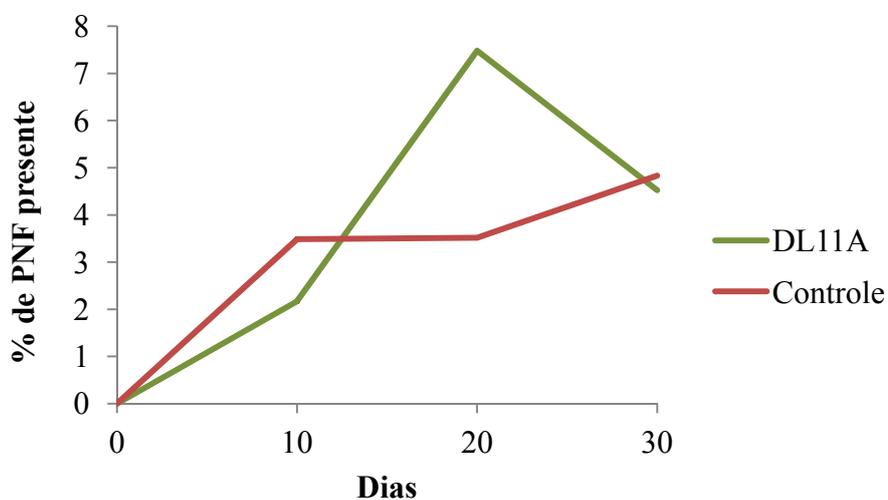


Figura 26 – Porcentagem de *p*-nitrofenol presente na reação com a linhagem DL11A em 10, 20 e 30 dias.

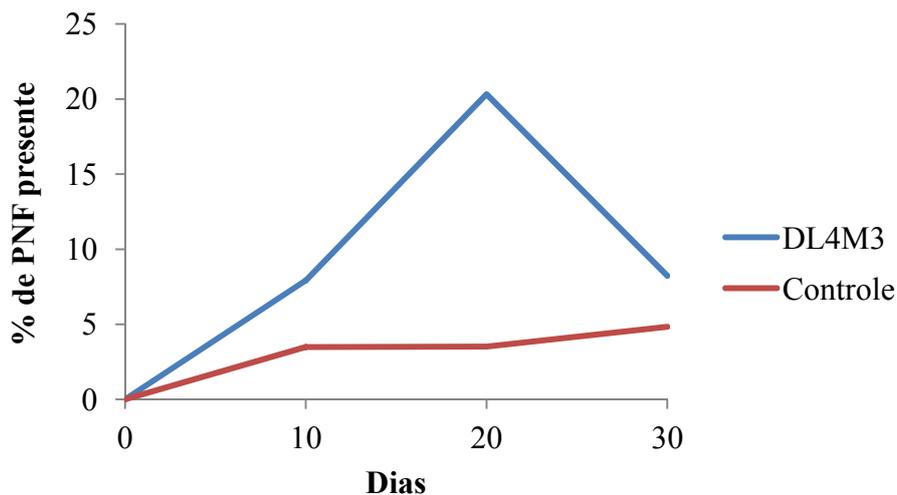


Figura 27 – Porcentagem de *p*-nitrofenol presente na reação com a linhagem DL4M3 em 10, 20 e 30 dias.

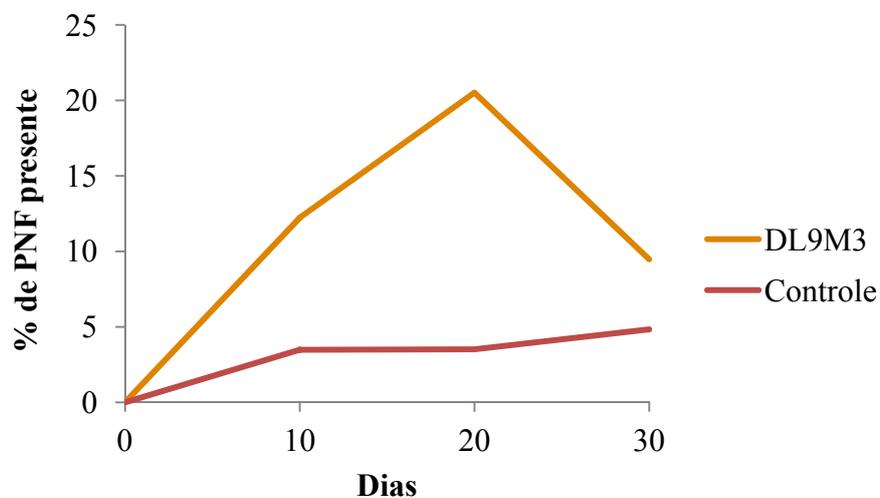


Figura 28 – Porcentagem de *p*-nitrofenol presente na reação com a linhagem DL9M3 em 10, 20 e 30 dias.

Na reação com a linhagem DL11A foi detectado um baixo índice de *p*-nitrofenol, apenas pouco superior ao observado no controle abiótico. Nas reações com

as linhagens DL4M3 e DL9M3 havia índices mais altos de presença desse composto, mas nunca equivalentes à taxa de metil paration degradada. Como já relatado acima para o controle abiótico, o *p*-nitrofenol neste experimento parece ter tido alta solubilidade em água e, por isso, sua recuperação com a extração feita pelo acetato de etila pode não ter sido tão eficiente.

No entanto, nas reações com as linhagens de fungos, especialmente com DL4M3 e DL9M3, o *p*-nitrofenol foi melhor recuperado, uma vez que foram observados maiores valores de concentração desse composto. Uma possível explicação para isso é que o PNF pode sofrer conjugação com outras moléculas, como já descrito anteriormente (Barr *et al.*, 2002; Monteiro, 2006). Assim sendo, parte do *p*-nitrofenol presente no meio pode ter se conjugado a moléculas mais apolares, como lipídeos e ceras produzidos pelos fungos, as quais normalmente passam para a fase de acetato de etila durante a extração (Prestes *et al.*, 2009).

As reações de conjugação são sempre catalisadas por enzimas e são comuns nos processos de biotransformação de xenobióticos, normalmente promovendo a ligação de compostos tóxicos pouco polares a moléculas mais polares, facilitando, desse modo, a excreção do composto (Costa *et al.*, 2004). Nesse estudo, entretanto, o *p*-nitrofenol, pelo menos em parte, parece ter se ligado a moléculas mais apolares, tendo, dessa maneira, passado para a fase de acetato de etila durante a extração. As reações de conjugação do *p*-nitrofenol precisam ser melhor estudadas.

Nas reações envolvendo todas as linhagens observa-se um aumento na quantidade de *p*-nitrofenol no meio até o 20º dia de reação, seguido de uma diminuição desse composto no período entre 20 e 30 dias. Essa diminuição equivale ao período no qual não havia mais metil paration no meio de cultura (o MP foi totalmente degradado em 20 dias), e mesmo assim os micro-organismos continuaram se desenvolvendo. Isso

sugere que o PNF pode ter sido utilizado como fonte de nutrientes pelos fungos, sendo degradado por estes micro-organismos. Isso seria interessante, uma vez que o *p*-nitrofenol é um composto com toxicidade elevada (EPA, 1980) e sua remoção do meio é bastante conveniente.

4.5 Degradação do *p*-nitrofenol pela linhagem DL11A

Uma das linhagens, a DL11A, foi selecionada para um experimento de degradação do *p*-nitrofenol. A Figura 29 mostra a porcentagem de degradação do PNF por essa linhagem, bem como no controle abiótico, em 10, 20 e 30 dias de reação.

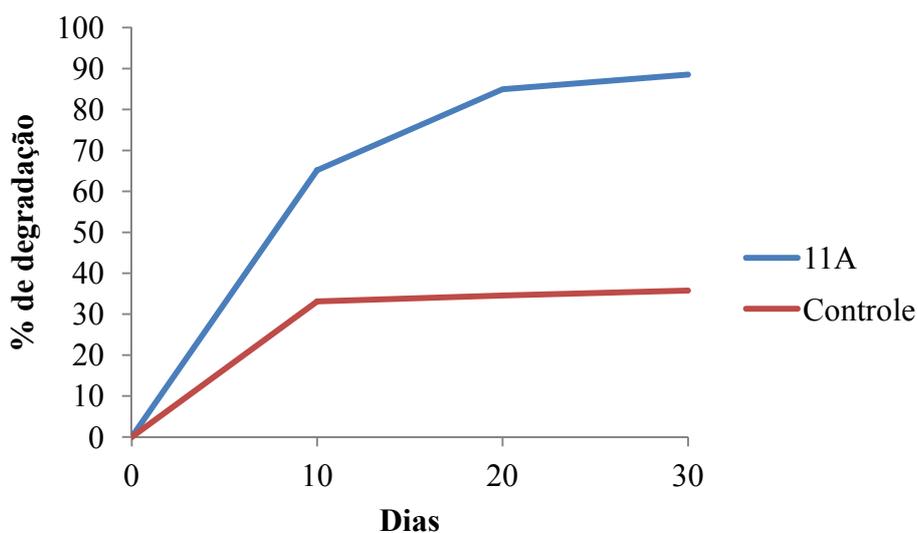


Figura 29 – Degradação do *p*-nitrofenol pela linhagem DL11A e no controle abiótico.

O *p*-nitrofenol sofreu uma degradação de apenas 30% no controle abiótico ao longo de 30 dias. Neste experimento, o PNF foi diretamente adicionado ao meio de cultura, não sendo a sua presença ocasionada pela quebra de outra substância, como o

pesticida metil paration. Desse modo, sua taxa de recuperação pela técnica de extração líquido-líquido utilizando acetato de etila pôde ser mais eficiente devido à ausência de outras substâncias interferentes.

Já na reação envolvendo a linhagem DL11A houve uma degradação de 65% em 10 dias, subindo para 85% em 20 dias e 90% em 30 dias. Isso mostra que o fungo foi capaz de degradar o PNF, provavelmente utilizando-o como fonte de energia para o seu desenvolvimento. Teramoto *et al.* (2004) relatou a degradação do *p*-nitrofenol pelo fungo *Phanerochaete chrysosporium*, e segundo o autor, até o momento em que seu trabalho foi elaborado, não haviam registros anteriores de degradação de nitrofenóis por fungos.

O *p*-nitrofenol é amplamente conhecido por sua participação na formulação de organopesticidas e normalmente se acumula no solo pela quebra do paration e do metil paration (Teramoto *et al.*, 2004). Porém esse composto também é utilizado na fabricação de explosivos e de fármacos, sendo os acidentes industriais sempre um risco de contaminação do meio ambiente pelo PNF (Ju e Parales, 2010). Além disso, já foi relatada a produção de *p*-nitrofenol pela irradiação de água do mar contendo fenol (Calza *et al.*, 2008).

O PNF é o mais importante entre os mononitrofenóis em termos de quantidades utilizadas e potencial para contaminação ambiental, sendo classificado pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) dos Estados Unidos como um poluente prioritário, e sua concentração em águas naturais deve ser restrita a <10 ng/L (EPA, 1980). Segundo Donolon *et al.* (1996), o *p*-nitrofenol é um risco à saúde e ao meio ambiente, devido à sua toxicidade a muitos organismos vivos e possibilidade de se acumular na cadeia alimentar. Desse modo, o desenvolvimento de métodos de biorremediação de *p*-nitrofenol do meio ambiente deve ser levada em consideração.

4.6 Identificação das linhagens DL11A, DL4M3 e DL9M3

As linhagens DL4M3 e DL9M3 mostraram similaridade acima de 99% com *Penicillium citrinum* (Figura 30), podendo ser, portanto, duas linhagens distintas da mesma espécie. No experimento em meio líquido, ambas comportaram-se similarmente quanto à biotransformação do metil paration. Já no meio sólido, DL4M3 foi capaz de se desenvolver em meio mínimo contendo o pesticida, o que a linhagem DL9M3 não foi capaz de fazer. Essa diferença, que mostra uma possível capacidade de degradação do metil paration pela linhagem DL4M3, reforça a ideia de serem linhagens distintas, embora pertençam a mesma espécie.

A espécie *P. citrinum* já foi previamente isolada de uma alga (*Caulerpa* sp.) da região de São Sebastião, proveniente da mesma coleta (realizada sob supervisão do Prof. Roberto Berlinck) da ascídia *D. Ligulum* utilizada no presente trabalho (Pimenta *et al.*, 2010). O gênero *Penicillium*, de acordo com Bugni e Ireland (2004), é abundante no ambiente marinho e um grande produtor de metabólitos bioativos. Os autores atribuem esse fato a algumas características do gênero, como a tolerância ao sal, crescimento rápido e facilidade de desenvolvimento em diferentes substratos. *Penicillium* tem sido estudado também quanto ao potencial para aplicação em processos de biorremediação, como relata Leitão (2009) em seu trabalho, enumerando uma série de espécies desse gênero que demonstraram atividade para esse fim.

A espécie *Penicillium citrinum*, encontrada em quatro estágios da maturação e processamento de grãos de café, foi capaz de degradar resíduos provenientes da produção de café, incluindo celulose, galactomanano, pectina, cafeína, taninos e polifenóis (Leitão, 2009). Essa espécie também já foi relatada quanto à sua resistência e capacidade de degradação dos compostos organofosforados 2-aminoetilfosfonico e 2-oxoalquilfosfonico (Zboinska *et al.*, 1992). Outra espécie de *Penicillium*, a *P.*

waksmani, foi relacionada à degradação do pesticida organofosforado paration (Rao e Sethunathan, 1974).

Já a linhagem DL11A apresentou similaridade acima de 99% com *Fusarium proliferatum* (Figura 30). Essa espécie, que já foi encontrada no ambiente marinho (Sakayaroj *et al.*, 2012), é conhecida por sua capacidade de degradar lignina (Regalado *et al.*, 1997; Anderson *et al.*, 2005). Há relatos também da degradação de etinilestradiol, um estrogênio sintético componente de contraceptivos (Shi *et al.*, 2002) e de 2-naftol, um derivado de naftaleno geralmente presente em águas residuárias provenientes de indústrias, que é tóxico à vida marinha e à dos seres humanos (Zang e Lian, 2008).

Embora não tenham sido encontrados relatos sobre a degradação de metil paration por *Fusarium proliferatum*, uma nova linhagem de *Fusarium* sp. foi, recentemente, isolada do solo de uma área de agricultura contaminada com pesticida em Coimbatore, Índia (Usharani e Muthukumar, 2013). Essa linhagem foi capaz de degradar 93% da quantidade inicial de metil paration utilizada no estudo, em 7 dias, sob as condições ótimas de pH 6.5 e 30°C. Esse desempenho foi superior ao encontrado por *F. proliferatum* no presente estudo, o que, como discutido anteriormente, pode ser devido às condições abióticas nas quais o experimento foi conduzido.

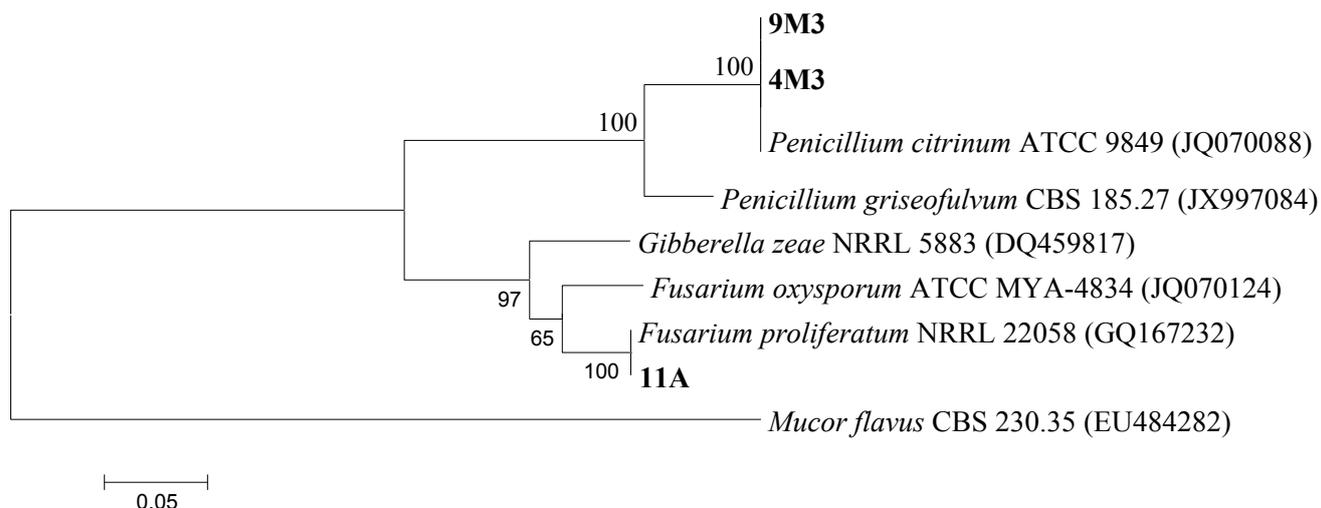


Figura 30 – Árvore filogenética indicando as espécies similares a DL11A, DL4M3 e DL9M3.

O gênero *Gibberella*, que aparece na árvore filogenética (Figura 30) como tendo alta similaridade (97%) com o gênero *Fusarium*, está intimamente relacionado a este. Por volta de 1980, taxonomistas subdividiram a seção *Liseola*, pertencente ao gênero *Fusarium*, em um pequeno número de espécies, entre as quais estão espécies do novo gênero *Gibberella* (Zeller *et al.*, 2003). O complexo de espécies *Gibberella fujikuroi* é responsável por muitas doenças que atingem plantas de interesse econômico, e está também relacionado à produção de metabólitos bioativos tóxicos (Nirenberg e O'Donnell, 1998). No entanto, não foram encontrados registros de utilização de *Gibberella* em estudos de biorremediação e/ou degradação de compostos químicos.

A Tabela 12 mostra, resumidamente, as linhagens de fungos identificadas, seus códigos utilizados inicialmente, antes da identificação estar concluída, e os principais resultados obtidos por cada uma.

Tabela 12 - Espécies encontradas, seus respectivos códigos e resultados obtidos.

| Espécie | Código | Resultados | |
|------------------------------|--------|--|--|
| | | Meio sólido | Meio Líquido |
| <i>Penicillium citrinum</i> | DL9M3 | - Resistente ao MP | - Inconclusivo quanto à degradação do MP - Possível degradação do PNF |
| <i>Penicillium citrinum</i> | DL4M3 | - Resistente ao MP - Potencial degradação do MP | - Inconclusivo quanto à degradação do MP - Possível degradação do PNF |
| <i>Fusarium proliferatum</i> | DL11A | - Resistente ao MP - Potencial degradação do MP | - Inconclusivo quanto à degradação do MP - Degradação do PNF |

Assim sendo, o presente trabalho foi elaborado utilizando espécies já conhecidas no ambiente marinho e que têm se mostrado interessantes para estudos de biorremediação de maneira geral. Nenhuma delas, no entanto, já havia sido descrita em processos de biotransformação do pesticida metil paration, nem na degradação do metabólito *p*-nitrofenol, proveniente da degradação desse pesticida.

5 CONCLUSÃO

Os fungos marinhos utilizados neste trabalho mostraram serem fontes interessantes para estudos de biodegradação de xenobióticos. Nos experimentos em meio sólido, foram obtidos bons resultados de desenvolvimento de nove linhagens de fungos frente a concentrações altas de metil paration, mostrando que estes micro-organismos são resistentes ao efeito tóxico do mesmo. E ainda, duas linhagens foram capazes de se desenvolver em um meio mínimo em nutrientes, constituído apenas por sais da água do mar artificial, ágar e pesticida. Isso sugere que estes fungos provavelmente consumiram o metil paration, utilizando-o como fonte de energia para o seu crescimento.

Os experimentos realizados em meio líquido não mostraram uma efetiva degradação do pesticida por *Penicillium citrinum* e *Fusarium proliferatum*. A degradação abiótica, causada por hidrólise química, foi bastante elevada, e apenas insignificamente menor em relação à taxa de degradação observada pelas linhagens de fungos. Dessa maneira, não foi possível afirmar que os micro-organismos estavam tendo papel fundamental na degradação do metil paration. Acredita-se que as condições de pH e temperatura escolhidas para o experimento influenciaram fortemente esse resultado.

Ainda que o metil paration possa não ter sido degradado por ação dos fungos, estes micro-organismos aparentemente foram capazes de degradar o *p*-nitrofenol, principal metabólito resultante da quebra do metil paration, tanto em condições abióticas (hidrólise química) quanto por intermédio de outros micro-organismos. O experimento específico sobre a degradação do *p*-nitrofenol pela linhagem DL11A mostrou que este fungo é capaz de degradar esse metabólito quando presente no meio.

Essa informação é muito valiosa, uma vez que o *p*-nitrofenol é um composto tóxico aos seres vivos, bem como o metil paration, e a sua eliminação do meio ambiente é tão necessária quanto a remoção do pesticida.

6 REFERÊNCIAS

ALMEIDA T. N. de. Contaminação por agrotóxicos carbamatos e organofosforados em água para consumo humano de Dourados, MS, 2008 a 2009. 2010. 110 f. Dissertação (mestrado) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Campo Grande. 2010.

ANDERSON, A. J.; KWON, S.; CARNICERO, A.; FALCO, M. A. Two isolates of *Fusarium proliferatum* from different habitats and global locations have similar abilities to degrade lignin. *FEMS Microbiology Letters*, v. 249, p. 149–155, 2005.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - UFPR. Seminário de mercado de agrotóxico e regulação. ANVISA, Brasília, 11 abril de 2012.

ARAÚJO T. M. de R. Degradação do paration metílico em ambientes aquáticos naturais. 2006. 117f. Dissertação (mestrado) – Campos dos Goytacazes - RJ. 2006.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY – ATSDR. Toxicological Profile for Methyl Parathion. Update. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 2001.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY – ATSDR. Toxicological profile for nitrophenols: 2- and 4-nitrophenol. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, Public Health Service. 1992.

BARNARD C.; DABERKOW S.; PADGITT M.; SMITH M. E.; URI N. D. Alternative measures of pesticide use. *The Science of the Total Environment*, v. 203, p. 229 – 244, 1997.

BARR D. B.; TURNER, W. E.; DIPIETRO, E.; MCCLURE, P. C.; BAKER, S. E.; BARR, J. R.; GEHLE, K.; GRISSOM JR. R. E.; BRAVO, R.; DRISKELL, W. J.; PATTERSON JR. D. G.; HILL JR. R. H.; NEEDHAM, L. L.; PIRKLE, J. L.; SAMPSON, E. J. Measurement of *p*-Nitrophenol in the Urine of Residents Whose Homes Were Contaminated with Methyl Parathion. *Environmental Health Perspectives*, v.110, p. 1085-1091, 2002.

BOLLAG, J. M. Biochemical transformation of pesticides by soil fungi. *CRC Critical Reviews in Microbiology*, v. 2, n. 1, p. 35-58, 1972.

BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R., SETTE, L. D. Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes. *Fungal Biology*, v. 114, p. 863–872, 2010.

BRASIL, Lei nº 7.802 de 11 de julho de 1989. Lei federal de agrotóxicos, Brasília, DF. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/17802.htm. Acesso em: 22 de maio 2013.

BRASIL, Decreto nº 4.074 de 4 de janeiro de 2002. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm. Acesso em: 22 de maio 2013.

BUGNI, T. S.; IRELAND, C. M. Marine-derived fungi: a chemically and biologically diverse group of microorganisms. *Natural Product Reports*, v. 21, p. 143-163, 2004.

BUMPUS, J. A.; NAKAR, S. N.; COLEMAN R. D. Fungal Degradation of Organophosphorous Insecticides. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v.39/40, p. 715-726, 1993.

BUMPUS, J. A.; TIEN, M.; WRIGHT, D.; AUST S. D. Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science*, v. 228, p. 1434-1436, 1985.

CALZA, P.; MASSOLINO, C.; PELIZZETTI, E.; MINERO, C. Solar driven production of toxic halogenated and nitroaromatic compounds in natural seawater. *Science of the Total Environment*, v. 398, p. 196-202, 2008.

CARNEIRO, F. F.; PIGNATI, W.; RIGOTTO, R. M.; AUGUSTO, L. G. S.; RIZOLLO, A.; MULLER, N. M.; ALEXANDRE, V. P.; FRIEDRICH, K.; MELLO, M. S. C. Dossiê ABRASCO – Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde. ABRASCO, Rio de Janeiro, 2012. 1ª Parte. 98p.

CHAUDHRY, G. R.; HUANG, G. H. Isolation of a methyl parathion-degrading *Pseudomonas* sp. that possesses DNA homologous to the opd gene from a *Flavobacterium* sp. *Applied Environmental Microbiology*, v. 54, n. 2, p. 288-293, 1988.

CHO, C. M.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Bacterial cell surface display of organophosphorus hydrolase for selective screening of improved hydrolysis of organophosphate nerve agents. *Applied Environmental Microbiology*, v. 68, n. 4, p. 2026-2030, 2002.

COLOSIO, C.; TIRAMANI, M.; BRAMBILLA, G.; COLOMBI, A.; MORETTO, A. Neurobehavioural Effects of Pesticides with Special Focus on Organophosphorus Compounds: Which is the Real Size of the Problem? *NeuroToxicology*, v. 30, n. 6, p. 1155-1161, 2009.

COSTA, E. M. M. B.; OLIVEIRA, V. de; PIMENTA, F. C. Citocromos P450 e biotransformação microbiana. *Revista de Patologia Tropical*, v. 33, n. 1, p. 21-31, 2004.

DA SILVA, M; PASSARINI, M. R. Z.; BONUGLI, R. C.; SETTE, L. D. Cnidarian derived filamentous fungi from Brazil: isolation, characterization and RBBR decolourization screening. *Environmental Technology*, v. 29, p. 1331–1339, 2008.

DAMS, R. I. Pesticidas: Usos e perigos à saúde e ao meio ambiente. *Revista Saúde e Ambiente/Health and Environment Journal*, v. 7, n. 2, p. 37-44, 2006.

DONLON, B. A.; RAZO-FLARES, E.; LETTIGA, G.; FIELD, J. A. Continuous detoxification, transformation and degradation of nitrophenol in upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactors. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 51, p. 439–449, 1996.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA. Environmental Pathways of Selected Chemicals in Freshwater Systems: Part II. Laboratory Studies. Athens – Georgia, 1978, 406p.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – EPA. Ambient water quality criteria for nitrophenols. Washington, DC, 1980, 117p.

FARRAN, A.; PABLO, J. de; BARCELÓ, D. Identification of organophosphorus insecticides and their hydrolysis products by liquid chromatography in combination with UV and thermospray-mass spectrometric detection. *Journal of Chromatography*, v. 455, p. 163-172, 1988.

FINLEY, S. D.; BROADBELT, L. J.; HATZIMANIKATIS, V. In Silico Feasibility of Novel Biodegradation Pathways for 1,2,4-Trichlorobenzene. *BMC Systems Biology*, v. 14, n. 7, p. 4-14, 2010.

FIORAVANTE, I. A.; BARBOSA, F. A. R.; AUGUSTIC, R.; MAGALHÃES, S. M. S. Removal of methyl parathion by cyanobacteria *Microcystis novacekii* under culture conditions. *Journal of Environmental Monitoring*, v. 12, p. 1302–1306, 2010.

GAVRILESCU, M. Fate of Pesticides in the Environment and its Bioremediation. *Engineering in Life Sciences*, v. 5, n. 6, p. 497-526, 2005.

HERNANDEZ, J.; ROBLEDO, N. R.; VELASCO, L.; QUINTERO, R.; PICKARD, M. A., VAZQUEZ-DUHALT, R. Chloroperoxidase-mediated oxidation of organophosphorus pesticides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, v. 61, p. 87-94, 1998.

HERTEL, R. F. Environmental Health Criteria 145, Methyl Parathion. World Health Organization – WHO, Geneva, 1993.

INTERNATIONAL PROGRAM ON CHEMICAL SAFETY – IPCS. Environmental health criteria n°. 145: methyl parathion. IPCS/ World Health Organization, Geneva. 1993.

JAUREGUI, J.; VALDERRAMA, B.; ALBORES, A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Microsomal transformation of organophosphorus pesticides by white rot fungi. *Biodegradation*, v. 14, p. 397–406, 2003.

JOKANOVIC, M.; PROSTRAN, M. Pyridinium Oximes as Cholinesterase Reactivators. Structure-Activity Relationship and Efficacy in the Treatment of Poisoning with Organophosphorus Compounds. *Current Medicinal Chemistry*, v.16, n.17, pp. 2177-2188, 2009.

JONES, E. B. G. Are there more marine fungi to be described? *Botanica Marina*, v. 54, p. 343-354. 2011.

JU, K. S.; PARALES, R. E. Nitroaromatic Compounds, from Synthesis to Biodegradation. *Microbiology and Molecular Biology Review*, v. 74, n. 2, p. 250-272, 2010.

KANEKAR, P. P.; BHADBHADE, B.; DESHPANDE, N. M.; SARNAIK, S. Biodegradation of organophosphorus pesticides. *Proceedings of the Indian National Science Academy*, v. 1, p. 57-70, 2004.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence. *Journal of Molecular Evolution*, v. 16, p. 111–120, 1980.

KOHLMEYER, J.; KOHLMEYER, E. Marine mycology: the higher fungi. Academic Press: New York. 1979. 690 p.

KOSSUGA, M. H.; ROMMINGER, S.; XAVIER, C.; MILANETTO, M. C.; VALLE, M. Z.; PIMENTA, E.; MORAIS, R. P.; CARVALHO, E.; MIZUNO, C.; CORADELLO, L. F.; BARROSO, V. M.; VACONDIO, B.; SELEGHIM, M. H. R.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; LIMA, B. A.; GONÇALVES, R.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; SETTE, L. D.; BERLINCK, R. G. S. Evaluating methods for the isolation of marine-derived fungi strains and production of bioactive secondary metabolites. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 22, n.2, p. 257-267, 2012.

KOUZAYHA, A.; RABAA, A. R.; ISKANDARANI, M. A.; BEH, D.; BUDZINSKI, H.; JABER, F. Multiresidue Method for Determination of 67 Pesticides in Water Samples Using Solid-Phase Extraction with Centrifugation and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *American Journal of Analytical Chemistry*, v. 3, p. 257-265, 2012.

KRAUSE, E. Ocean acidification effects on marine microbial communities. 2013, 128f. Dissertação (mestrado) – Hamburgo, Alemanha. 2013.

KUMAR, A.; BISHT, B. S.; JOSHI, V. D.; DHEWA, T. Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. *International Journal of Environmental Science*, v. 1, n. 6, p. 1079-1093, 2011.

LEITÃO, A. L. Potential of *Penicillium* Species in the Bioremediation Field. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 6, p. 1393-1417, 2009.

LI, S.; ZHONG, Y. Microbial degradation of methamidophos. *Shanghai Huanjin Kexue*, v.18, p. 564-567, 1999.

LIU, Y. H.; LI, S.; LIU, F. Degradation of roger by *Aspergillus* sp. L8. *Shanghai Huanjin Kexu*, v. 17, p. 20-21, 1998.

LIU, Y. H.; ZHONG, Y. C. Degradation of organophosphate insecticide (Dimethoate) by *Aspergillus* sp. Z₅₈. *Acta Scientiae Circumstantiae*, v. 20, p. 95-99, 2000.

LIU, Z.; QING, H.; JIANHONG, X.; JUN, W.; XIAOZHOU, Z.; XIAOHUA, Z.; AIZHI, M.; JUN, Z.; SHUNPENG, L. Cloning, Analysis and Fusion Expression of Methyl Parathion Hydrolase. *Acta Genetica Sinica*, v. 30, n. 11, p. 1020-1026, 2003.

LIU, H.; ZHANG, J. J.; WANG, S. J.; ZHANG, X. E.; ZHOU, N. Y. Plasmid-Borne Catabolism of Methyl Parathion and *p*-Nitrophenol in *Pseudomonas* sp. Strain WBC-3. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 334, n. 4, p. 1107-1114, 2005.

LIU, F. Y.; HONG, M. Z.; LIU, D. M.; LI, Y. W.; SHOU, P. S.; YAN, H.; SHI, G. Q. Biodegradation of methyl parathion by *Acinetobacter radioresistens* USTB-04. *Journal of Environmental Sciences*, v. 19, p. 1257–1260, 2007.

LONDRES, F. Por que campeão em agrotóxicos? In: LONDRES F. Agrotóxicos no Brasil – um guia para ação em defesa da vida. Rio de Janeiro: AS-PTA – Assessoria e Serviços a Projetos em Agricultura Alternativa, 2011. p. 17-24.

MARINHO, G.; RODRIGUES, K.; ARAUJO, R.; PINHEIRO, Z. B.; SILVA, G. M. M. Efeito da glicose na degradação cinética de metil paration pela espécie fúngica *Aspergillus niger* AN400. *Revista de Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 16, n. 3, p. 225-230, 2011.

MARTINS MP, OUZZANI J, ARCILE G, JELLER AH, LIMA JPF, SELEGHIM MHR, OLIVEIRA ALL, DEBONSI HM, VENÂNCIO T, PORTO ALM (2013) Biohydroxylation of Terpenes by Whole Cells of Brazilian Marine-derived Fungi. *Mar Drugs* 11. Doi:10.3390/md110x000x.

MAYNARD, R. L. The Merck Index, 12^a edição. London: Chapman and Hill, 1996.

MEGHARAJ, M.; MADHAVI, D. R.; SREENIVASULU, C.; UMAMAHESWARI, A.; VENKATESWARLU, K. Biodegradation of methyl parathion by soil isolates of microalgae and cyanobacteria. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 53, n. 2, p. 292-297, 1994.

MENEZES, C. B. A.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; MIQUELETTO, P. B.; PASSARINI, M. R. Z.; SILVA, C. H. D.; JUSTO, M. R.; LEAL, R. R.; FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; OLIVEIRA, V. M.; BERLINCK, R. G. S.; SETTE, L. D. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the north coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiological Research*, v. 165, p. 466–482, 2010.

MILESON, B.E.; CHAMBERS, J. E.; CHEN, W. L.; DETTBARN, W.; ENRICH, M.; ELDEFRAWI, A. T.; GAYLOR, D. W.; HAMERNIK, K.; HODGSON, E.; KARCZMAR, A. G.; PADILLA, S.; POPE, C. N.; RICHARDSON, R. J.; SAUNDERS, D. R.; SHEETS, L. P.; SULTATOS, L. G.; WALLACE, K. B. Common

Mechanism of Toxicity: A Case Study of Organophosphorus Pesticides. *Toxicological Sciences*, v. 41, p. 8-20, 1998.

MONTEIRO, D. A. Efeito do inseticida organofosforado metil paration (Folisuper 600 Br) sobre biomarcadores do estresse oxidante no teleósteo de água doce matrinxã *Brycon cephalus* (Günther, 1969) e o papel da suplementação de selênio na dieta. 2006. 163f. Dissertação (mestrado) – São Carlos - SP. 2006.

MS/SVS/OPAS. Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos. Brasília, 1997. 69p.

MUNNECKE, D. M. Hydrolysis of Organophosphate Insecticides by an Immobilized-Enzyme System. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 21, p. 2247-2261, 1979.

MUNNECKE, D. M.; HSIEH, D. P. H. Microbial Decontamination of Parathion and p-Nitrophenol in Aqueous Media. *Applied Microbiology*, v. 28, n. 2, p. 212-217, 1974.

Nº, Resolução Conama. "357, de 17 de março de 2005." *CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE*. Disponível em: < <http://www.mma.gov.br/conama/>>. Acesso em 10 de junho de 2013.

NIRENBERG, H. I.; O'DONNELL, K. New *Fusarium* species and combinations within the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, v. 90, n. 3, p. 434-458, 1998.

O'DONNELL, K. *Fusarium* and its near relatives. In: REYNOLDS, D. R.; TAYLOR, J. W. The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics. CAB International, Wallingford, 1993. p. 225-233.

OCAMPO, G. Y.; SALINAS, E. S.; HERNÁNDEZ, M. L. O. Removal of methyl parathion and tetrachlorvinphos by a bacterial consortium immobilized on tezontle-packed up-flow reactor. *Biodegradation*, v. 22, p. 1203-1213, 2011.

OMAR, S. A. Availability of phosphorus and sulfur of insecticide origin by fungi. *Biodegradation*, v. 9, n. 5, p. 327-336, 1998.

ORTEGA, N. O.; NITSCHKE, M.; MOUAD, A. M.; LANDGRAF, M. D.; REZENDE, M. O. O.; SELEGHIM, M. H. R.; SETTE, L. D.; PORTO, A. L. M. Isolation of Brazilian Marine Fungi Capable of Growing on DDD Pesticide. *Biodegradation*, v. 22, p. 43-50, 2011.

ORTIZ-HERNÁNDEZ, M. L.; MONTERROSAS-BRISSEON, M.; YANEZ-OCAMPO, G.; SÁNCHEZ-SALINAS, E. Biodegradation of methyl-parathion by bacteria isolated of agricultural soil. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, v. 17, n. 3, p. 147-155, 2001.

PAKALA, S. B.; GORLA, P.; PINJARI, A. B.; KROVIDI, R. K.; BARU, R.; YANAMANDRA, N.; MERRICK, M.; SIDDAVATTAM, D. Biodegradation of methyl parathion and *p*-nitrophenol: evidence for the presence of a *p*-nitrophenol 2-hydroxylase in a Gram-negative *Serratia* sp. strain DS001. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 73, p. 1452–1462, 2007.

PARALES, R. E.; BRUCE, N. C.; SCHMID, A.; WACKETT, L. P. Biodegradation, Biotransformation, and Biocatalysis (B3). *Applied And Environmental Microbiology*, v. 68, n. 10, p. 4699–4709, 2002.

PASSARINI, M. R. Z. Estudo da degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e da produção de antimicrobianos por fungos isolados de invertebrados marinhos. 2008. 107f. Dissertação (mestrado) – São Paulo –SP. 2008.

PEHKONEN, S. O.; ZHANG, Q. The degradation of organophosphorus pesticides in natural waters: a critical review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 32, n. 1, p. 17-72, 2002.

PIMENTA, E. F.; VITA-MARQUES, A. M.; TININIS, A.; SELEGHIM, M. H. R.; SETTE, L. D.; VELOSO, K.; FERREIRA, A. G.; WILLIAMS, D. E.; PATRICK, B. O.; DALISAY, D. S.; ANDERSEN, R. J.; BERLINCK, R. G. S. Use of Experimental Design for the Optimization of the Production of New Secondary Metabolites by Two Species. *Journal of Natural Products*, v. 73, p. 1821-1832, 2010.

PINO N, PEÑUELA G. (2011) Simultaneous degradation of the pesticides methyl parathion and chlorpyrifos by an isolated bacterial consortium from a contaminated site. *International Biodeterior & Biodegrad* 65 (6): 827-831

POPE, C. N. Organophosphorus pesticides: do they all have the same mechanism of toxicity? *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B, Critical Reviews*, v. 2, p. 161–181, 1999.

PORTO, A. L. M. P.; MELGAR, G. Z.; KASEMODEL, M. C.; NITSCHKE, M. Biodegradation of Pesticides. In: STOYTCHIEVA, M. Pesticides in the modern world – Pesticides use and management. Croatia: InTech, 2011. p. 407-438.

PRESTES, O. D.; FRIGGI, C. A.; ADAIME, M. B.; ZANELLA, R. QuEChERS – Um método moderno de preparo de amostra para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 32, n. 6, p. 1620-1634, 2009.

RAGNARSDOTTIR, K. Environmental Fate and Toxicology of Organophosphate Pesticides. *Journal of the Geological Society of London*, v. 157, n. 4, p. 859-876, 2000.

RANI, N. L.; LALITHAKUMARI, D. Degradation of methyl parathion by *Pseudomonas putida*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 40, n. 12, p. 1000-1006, 1994.

RAO, A. V.; SETHUNATHAN, N. Degradation of Parathion by *Penicillium waksmani* Zaleski Isolated from Flooded Acid Sulphate Soil. *Archives of Microbiology*, v. 97, p. 203-208, 1974.

REGALADO, V.; RODRIGUEZ, A.; PERESTELO, F.; CARNICERO, A.; DE LA FUENTE, G.; FALCON, M. A. Lignin Degradation and Modification by the Soil-Inhabiting Fungus *Fusarium proliferatum*. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 63, n. 9, p. 3716–3718, 1997.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771-780, 2004.

RIBEIRO, M. L.; LOURENCETTI, C.; POLESE, L.; NAVICKIENE, S.; OLIVEIRA, L. C. Pesticidas: usos e riscos para o meio ambiente. *Holos Environment*, v. 8, n. 1, p. 53-71, 2008.

ROWLAND, S. S.; SPEEDIE, M. K.; POGELL, B. M. Purification and characterization of a secret recombinant phosphotriesterase (parathion hydrolase) from *Streptomyces lividan*. *Applied Environmental Microbiology*, v. 57, p. 440-444, 1991.

SAKAYAROJ, J.; PREEDANON, S.; PHONGPAICHIT, S.; BUATONG, J.; CHAOWALIT, P.; RUKACHAISIRIKUL, V. Diversity of endophytic and marine-derived fungi associated with marine plants and animals. In: JONES, E. B. G.; PANG, K. L. Marine fungi and fungal-like organisms. Germany: Walter de Gruyter, 2012. p. 291-328.

SHARMILA, M.; RAMANAND, K.; SETHUNATHAN, N. Effect of yeast extract on the degradation of organophosphorus insecticides by soil enrichment and bacterial cultures. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 35, p. 1105–1110, 1989.

SHI, J. H.; SUZUKI, Y.; LEE, B. D.; NAKAI, S.; HOSOMI, M. Isolation and characterization of the ethynylestradiolbiodegrading microorganism *Fusarium proliferatum* strain HNS-1. *Water Science and Technology*, v. 45, n. 12, p. 175-179, 2002.

SILVA, F. C.; CARDEAL, Z. L.; DE CARVALHO, C. R. Determination of Organophosphorus Pesticides in Water Using SPME-GC-MS. *Química Nova*, v. 22, n. 2, p. 197-200, 1999.

SILVA, C. M. M. S.; MELO, I. S.; FAY, E. F. Biotransformação de agrotóxicos e biorremediação. In: SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F. Agrotóxicos e meio ambiente. Brasília, DF, Embrapa Informação Tecnológica, 2004. p. 145 – 192.

SILVA, A.; ASMUS, C.; FILHOTE, M.; BUOSI, D.; ALONZO, H. Estudo de avaliação de risco por resíduos perigosos no bairro Mansões Santo Antônio – Município de Campinas/SP. 6. Mecanismos de Transporte. 2005. 429p. Disponível em: http://antigo.campinas.sp.gov.br/saude/visa/mansoes_sto_antonio/.

SILVA, N. A. da. Biodegradação dos pesticidas clorpirifós, metil paration e profenofós por fungos de origem marinha. 2013. 159f. Dissertação (mestrado) – São Carlos –SP. 2013.

SINGH, B. K.; WALKER, A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology*, v. 30, p. 428–471, 2006.

SINGH, B. K.; KUHAD, R. C.; SINGH, A.; LAL, R.; TRIAPTHI, K. K. Biochemical and molecular basis of pesticide degradation by microorganisms. *Critical Reviews in Biotechnology*, v. 19, p. 197–225, 1999.

SINGH B. K. Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, p. 156-164, 2009.

SOMARA, S.; SIDDAVATTAM, D. Plasmid mediated organophosphate pesticide degradation by *Flavobacterium balustinum*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, v. 36, p. 627–631, 1995.

SWOFFORD, DAVID. *PAUP 4.0: phylogenetic analysis using parsimony*. Smithsonian Institution, 1998.

SYNDER, M. J. Cytochrome P450 Enzymes in Aquatic Invertebrates: Recent Advances and Future Directions. *Aquatic Toxicology*, v. 48, n. 4, p. 529-547, 2000.

TERAMOTO, H.; TANAKA, H.; WARIISHI, H. Degradation of 4-nitrophenol by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 66, p. 312–317, 2004.

TERRA, F. H. B. A indústria de agrotóxicos no Brasil. 2008. 156f. Dissertação (mestrado) – Curitiba –PR. 2008.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. *Nucleic Acids Research*, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

USHARANI, K.; MUTHUKUMAR, M. Optimization of aqueous methylparathion biodegradation by *Fusarium sp* in batch scale process using response surface methodology. *International Journal of Environmental Science and Technology*, v. 10, p. 591–606, 2013.

WALKER, G. M.; WHITE, N. A. Introduction to Fungal Physiology. In: KAVANAGH, K. *Fungi - Biology and Applications*. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd, 2011. p. 1-34.

WAUCHOPE, R. D.; BUTTLER, T. M.; HORNSBY, A. G.; AUGUSTIJN-BECKERS, P. W. M.; BURT, J. P. The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decisionmaking. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 123, p. 1-157, 1992.

WITHFORD, F.; WOLT, J.; NELSON, H.; BARRET, M.; BRICHFORD, S.; TURCO, R. *Pesticides And Water Quality - Principles, Policies and Programs*. Purdue University Cooperative Extension Service, West Lafayette, 1995.

ZANG, S.; LIAN, B. Synergistic degradation of 2-naphthol by *Fusarium proliferatum* and *Bacillus subtilis* in wastewater. *Journal of Hazardous Materials*, v. 166, p. 33–38, 2009.

ZBOINSKA, E.; MALISZEWSKBA, I.; LEJCZAK, B.; KAFARSK, P. Degradation of organophosphonates by *Penicillium citrinum*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 15, p. 269-272, 1992.

ZELLER, K. A.; SUMMERELL, B. A.; BULLOCK, S.; LESLIE, J. F. *Gibberella konza* (*Fusarium konzum*) sp. nov. from prairie grasses, a new species in the *Gibberella fujikuroi* species complex. *Mycologia*, v. 95, n. 5, p. 943–954, 2003.

ZHONGLI, C.; SHUNPENG, L.; GUOPING, F. Isolation of Methyl Parathion-Degrading Strain M6 and Cloning of the Methyl Parathion Hydrolase Gene. *Applied And Environmental Microbiology*, v. 67, n. 10, p. 4922–4925, 2001.

APÊNDICES

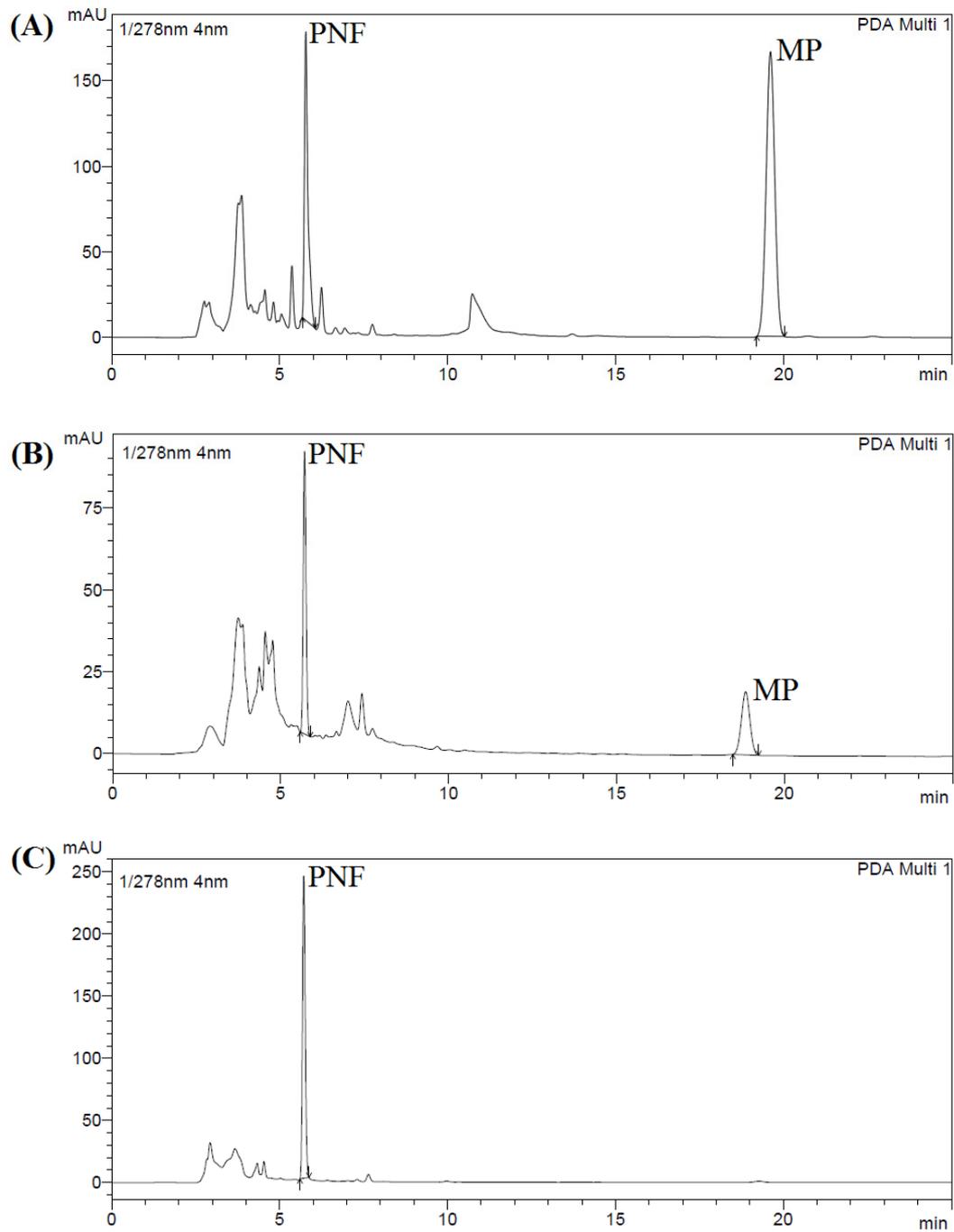


Figura 1 – Cromatogramas evidenciando a degradação do metil paration e formação de *p*-nitrofenol pela linhagem DL9M3 em (A) 10 dias, (B) 20 dias e (C) 30 dias.

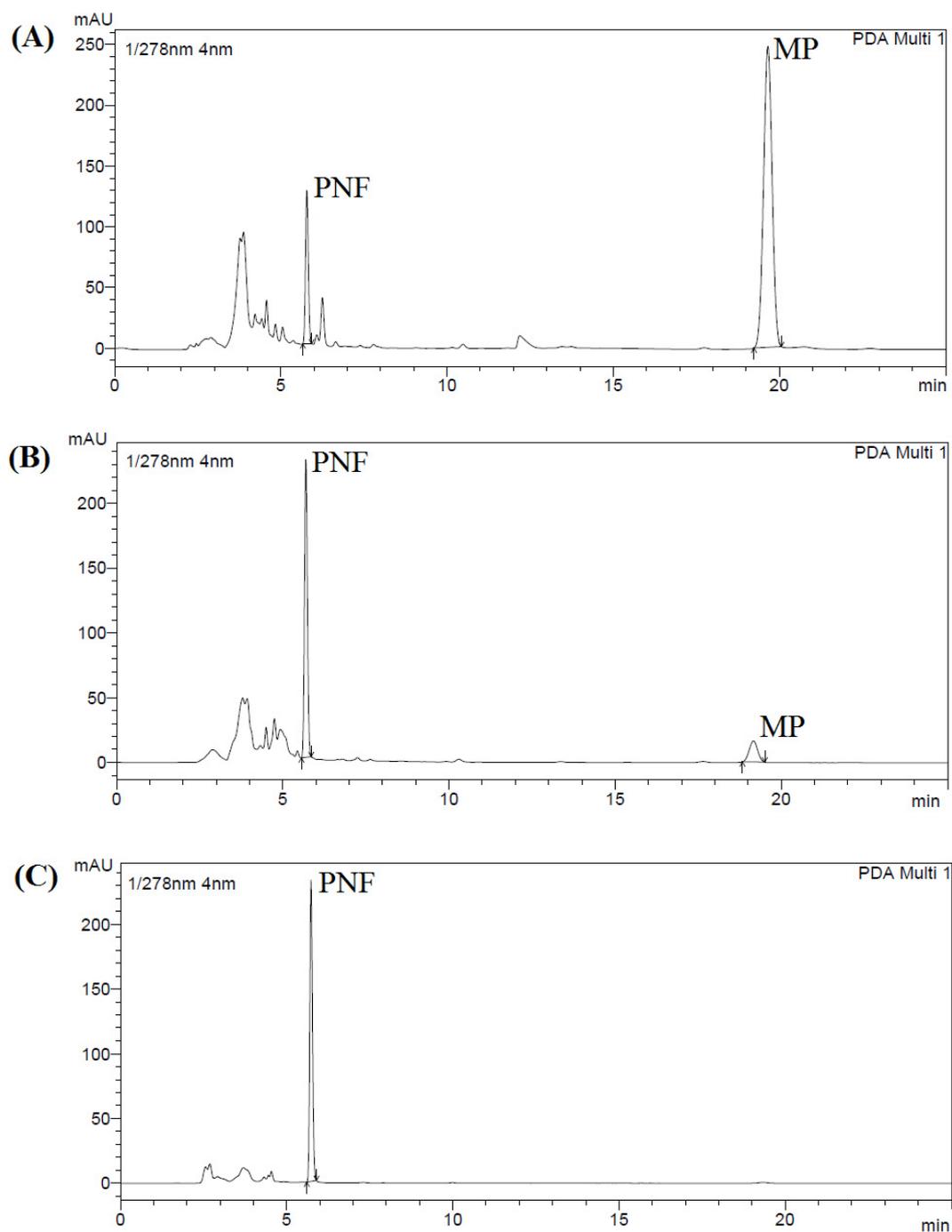


Figura 2 – Cromatogramas evidenciando a degradação do metil paration e formação de *p*-nitrofenol pela linhagem DL4M3 em (A) 10 dias, (B) 20 dias e (C) 30 dias.

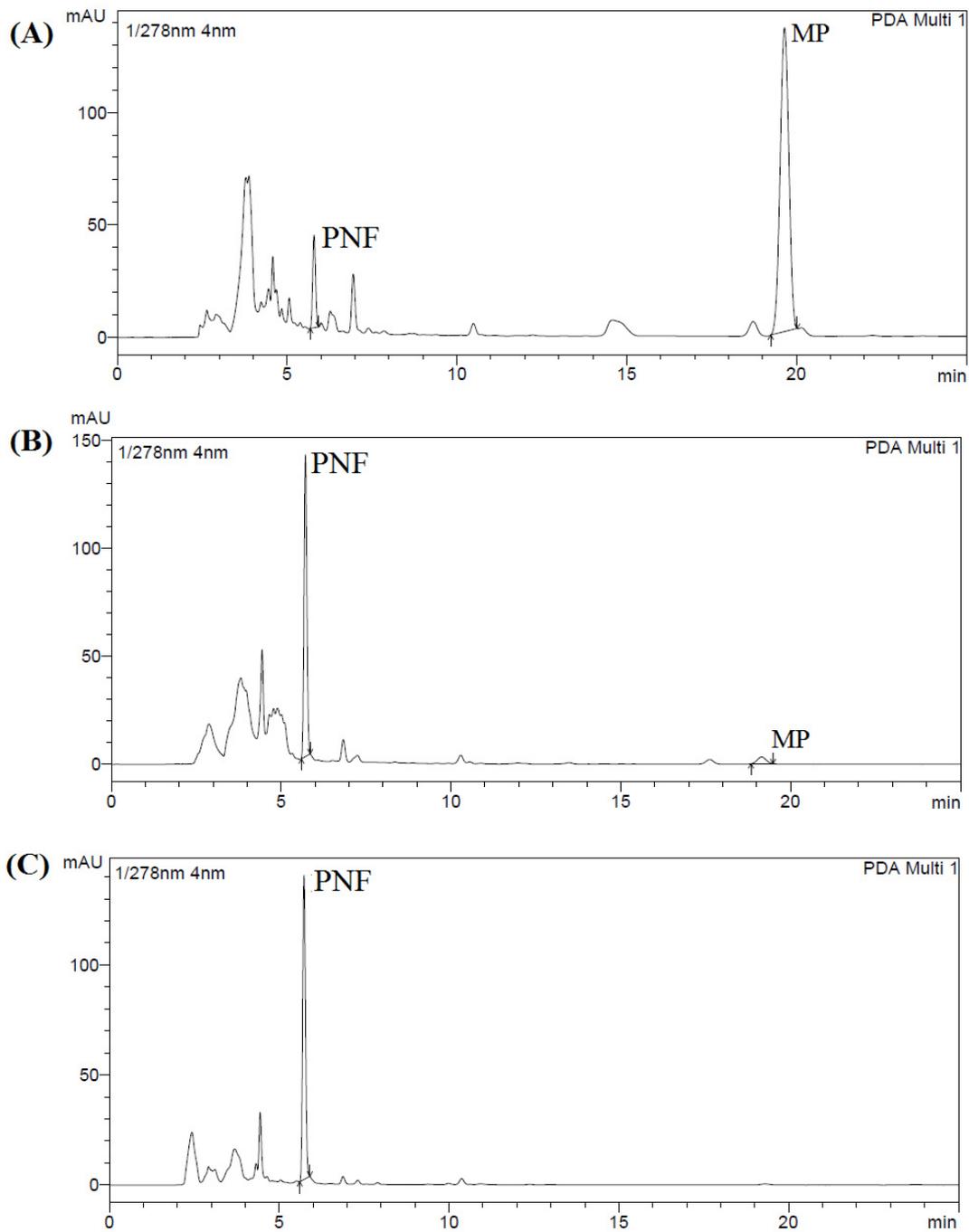


Figura 3 – Cromatogramas evidenciando a degradação do metil paration e formação de *p*-nitrofenol pela linhagem DL11A em (A) 10 dias, (B) 20 dias e (C) 30 dias.

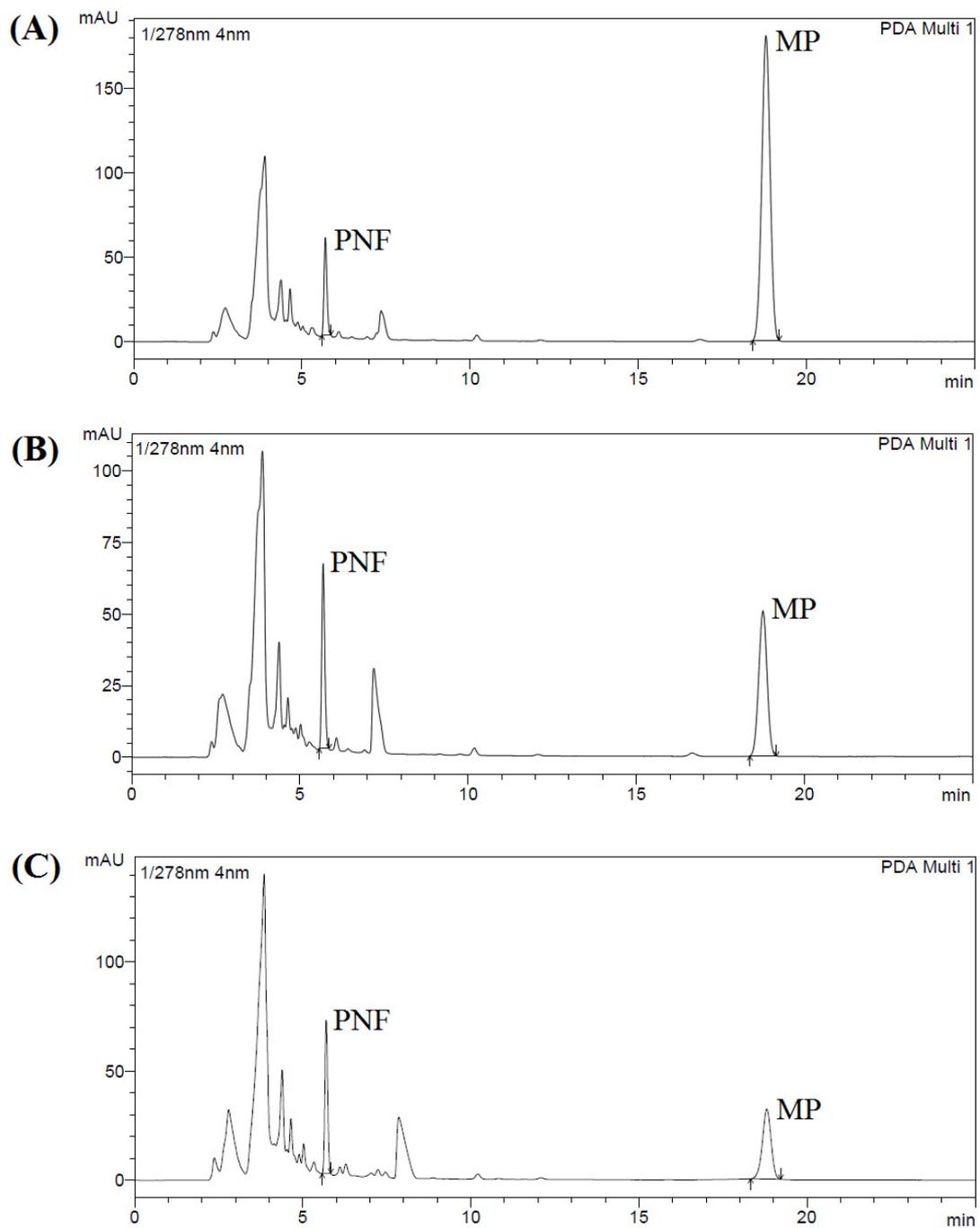


Figura 4 – Cromatogramas evidenciando a degradação do metil paration e formação de *p*-nitrofenol no controle abiótico em (A) 10 dias, (B) 20 dias e (C) 30 dias.

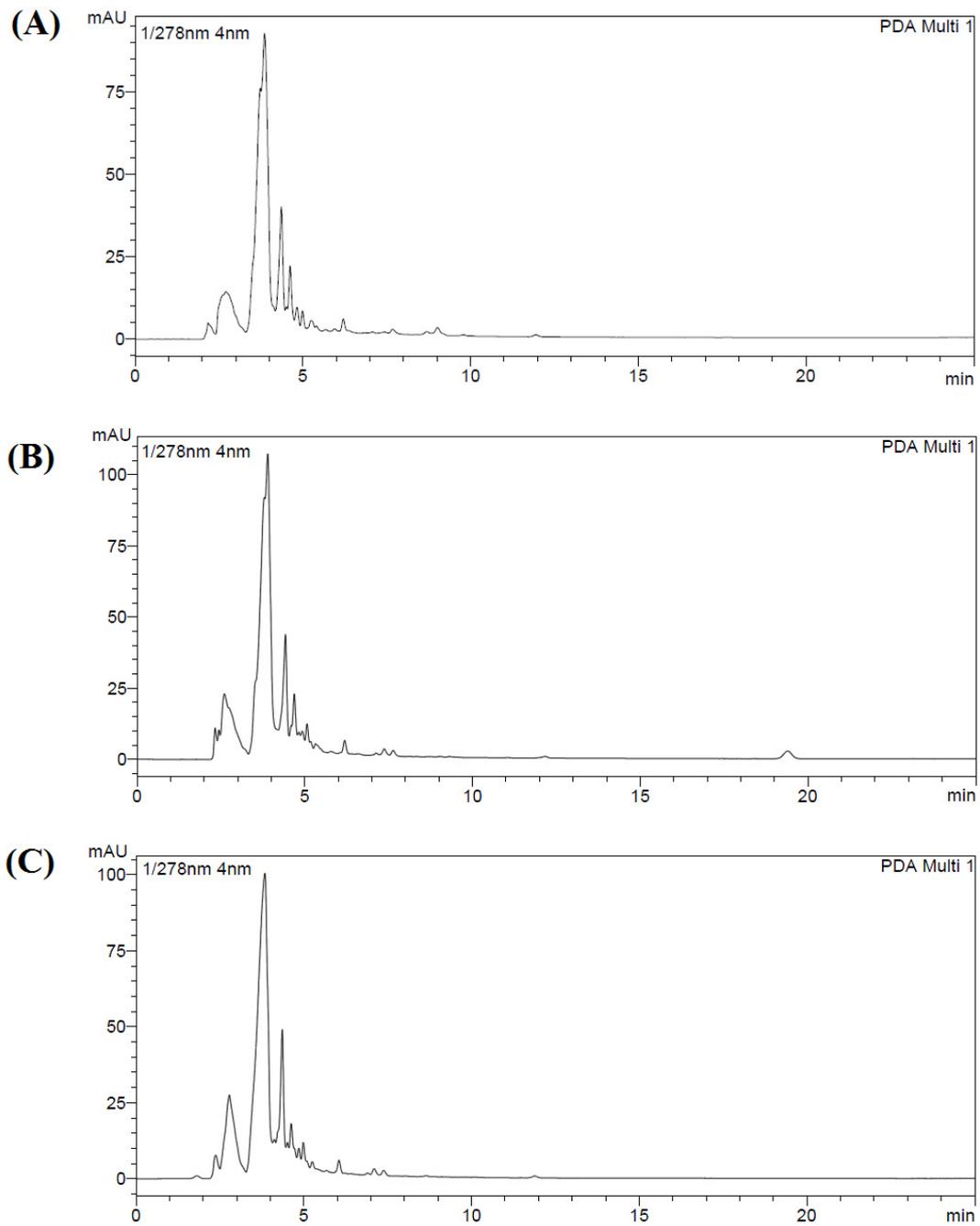


Figura 5 – Cromatogramas mostrando os picos das substâncias presentes no meio de cultura malte 3% puro, sem nenhum inoculo de fungo e sem pesticida, em (A) 10 dias, (B) 20 dias e (C) 30 dias.