



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E
RECURSOS NATURAIS

**BIODEGRADAÇÃO DO PESTICIDA PENTACLOROFENOL POR
UMA LINHAGEM DE FUNGO MARINHO ISOLADO DA ASCÍDIA
*DIDEMNUN LIGULUM***

BRUNA VACONDIO

São Carlos - SP

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E
RECURSOS NATURAIS

**BIODEGRADAÇÃO DO PESTICIDA PENTACLOROFENOL POR
UMA LINHAGEM DE FUNGO MARINHO ISOLADO DA ASCÍDIA
*DIDEMNUN LIGULUM***

BRUNA VACONDIO

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 - SP

2014

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

V119bp

Vacondio, Bruna.

Biodegradação do pesticida pentaclorofenol por uma linhagem de fungo marinho isolado da ascídia *Didemnum ligulum* / Bruna Vacondio. -- São Carlos : UFSCar, 2014. 94 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Fungos. 2. Pentaclorofenol. 3. Biodegradação. 4. Compostos organoclorados. I. Título.

CDD: 589.2 (20^a)

Bruna Vacondio

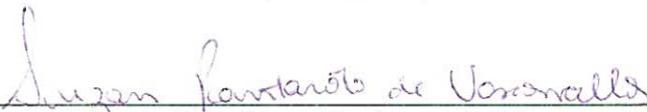
Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2014

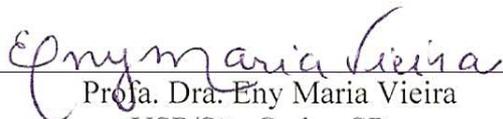
BANCA EXAMINADORA

Presidente 

Prof. Dra. Mirna Helena Regali Seleghim
(Orientadora)

1º Examinador 

Prof. Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos
UNIFESP/Diadema-SP

2º Examinador 

Prof. Dra. Eny Maria Vieira
USP/São Carlos-SP

Aos meus pais Donizete e Ivone, e a minha irmã Rafaela, pelo amor, confiança, motivação e por serem tão presentes em todos os momentos de minha vida. A meu noivo, Rafael, pelo apoio, carinho e paciência nesta jornada tão importante.

AGRADECIMENTOS

Á Deus, que sempre está comigo me protegendo, iluminando os meus caminhos, meu trabalho e minhas escolhas.

Aos meus pais, Donizete e Ivone, minha irmã Rafaela e toda minha família pela motivação, apoio e confiança depositados nessa caminhada e pelo exemplo, amor e paciência.

Ao meu noivo, Rafael, pelo amor, escuta, conselhos e autoestima que foram muito importantes nesta etapa de minha vida.

Á minha orientadora, Profa. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim, pela orientação, confiança, colaboração e pelo vínculo de amizade estabelecido ao longo desses anos.

Á Darci pela paciência, carinho, ensinamentos, amizade e disposição em sempre ajudar seus “filhos” quando necessário.

Á todos os meus amigos de laboratório e do departamento Caio, Helena, Rafaela, Zaryf, Gisele, Dani, Raquel, Germano, Natália, Lidiane, Renata, Neto, Marcos, Marcela, Zé, Edna, e Maíra pelos momentos de alegria e confraternização no nosso ambiente de trabalho. Em especial, à Laine e a May, pela amizade verdadeira, apoio, acolhida, escuta e torcida.

Aos amigos Fernanda, Flávia, Priscila, Karina, Carol, Henrique e Érica pela amizade sincera construída durante minha fase em São Carlos e que mesmo à distância ela permanece.

Ás minhas companheiras de moradia durante esta jornada Patrícia, Priscila, Mayara e Marina pelo companheirismo, alegrias, desentendimentos apoio e amizade.

Ao Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto pela parceria firmada, confiança, orientação e pelos recursos necessários oferecidos para desenvolvimento de grande parte deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Química Orgânica e Biocatálise (IQSC – USP) Natália, Ana Maria, Lenilson, Beatriz, Darlison, Sandra, Davi, Matheus pela acolhida, socorro e momentos de alegrias e, em especial, ao João, Marília, Willian e Irlon pelos ensinamentos, paciência, ajuda e parcerias realizadas durante a execução deste trabalho.

À Profa. Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos pela gentileza, prontidão e parceria, e à Dra. Sarah Gonçalves, que juntas colaboraram para finalização deste trabalho.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento pelo apoio financeiro concedido ao projeto.

Ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, ao Laboratório de Ecologia de Microrganismos Aquáticos do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da Universidade Federal de São Carlos pelo suporte e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

E a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para realização e finalização deste trabalho.

*“Foi o tempo que dedicastes à tua
rosa que a fez tão importante”*

ANTOINE DE SAINT-EXUPÉRY

RESUMO

A contaminação ambiental pelo uso de pesticidas na agricultura tem causado muitos danos ambientais irreparáveis ao ecossistema. O pentaclorofenol (PCP), da classe dos organoclorados, é um composto fenólico e um perigoso poluente. Este pesticida é objeto de muita preocupação por possuir elevada toxicidade e poder de persistência no meio ambiente, devido à sua resistência à degradação biótica e abiótica. Apesar de proibido no Brasil desde 1985, existem ainda muitas áreas contaminadas por ele. A utilização de micro-organismos como agentes degradadores de diversas substâncias químicas é considerada uma forma eficiente para reduzir os efeitos adversos dos contaminantes sobre o ambiente. Os fungos derivados do ambiente marinho são adaptados às condições extremas e possuem atributos que lhes conferem a capacidade de produzir compostos biologicamente ativos diferentes dos seus respectivos representantes que habitam o meio terrestre. Além disso, os fungos marinhos apresentam um excelente potencial bioenzimático a ser explorado na biotransformação de xenobióticos como, por exemplo, os pesticidas. Neste trabalho, quinze linhagens de fungos isoladas de um invertebrado marinho, a ascídia *Didemnum ligulum*, foram avaliadas segundo sua resistência à toxicidade, habilidade de crescer e biodegradar o pesticida pentaclorofenol (PCP) e seus metabólitos. Foram avaliadas as concentrações 10, 25, 30, 40 e 50 mgL⁻¹ de PCP, em meio de cultura sólido Malte 3%. Nove, dentre as linhagens avaliadas, apresentaram crescimento em pelo menos uma das concentrações, mas a linhagem DL2B (identificada como *Trichoderma harzianum*) apresentou ótimo crescimento na concentração mais drástica (50 mgL⁻¹), mostrando ser resistente à sua toxicidade e sugerindo seu potencial para biodegradação do composto. Sendo assim, foi selecionada para reações em meio líquido na presença do pesticida com concentração inicial de 20 mgL⁻¹ de PCP, para quantificar sua biodegradação. As avaliações da biodegradação foram realizadas após 7, 14 e 21 dias de incubação. Com 7 dias de incubação já não foi detectada a presença do PCP nas amostras. Os metabólitos pentacloroanisol (PCA) e 2,3,4,6-tetracloroanisol (2,3,4,6-TeCA) oriundos da biotransformação do PCP foram identificados por cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM), indicando a biotransformação do pesticida pelo fungo. Em uma segunda etapa, a linhagem de *Trichoderma harzianum* foi submetida às reações de biodegradação em meio líquido contendo os metabólitos PCA e 2,3,4,6-TeCA. Observou-se que esses compostos possivelmente causam algum efeito tóxico sobre este micro-organismo, mas não o suficiente para inviabilizar a biodegradação pelo fungo. O fungo não degradou esses compostos completamente no período de 21 dias, como ocorreu com o PCP, mas conseguiu reduzir as concentrações dos metabólitos nas amostras. Estes resultados confirmam

a eficiência de fungos derivados do ambiente marinho em biodegradar compostos persistentes e possibilitam o aprimoramento de metodologias utilizando esses micro-organismos em técnicas para descontaminação de ambientes poluídos com xenobióticos.

Palavras-chave: Fungos marinhos • Organoclorados • Biodegradação • PCP • PCA • 2,3,4,6-TeCA.

ABSTRACT

Environmental contamination by pesticides in agriculture has caused many irreparable damage environmental to the ecosystem. Pentachlorophenol (PCP), the class of organochlorines, is a phenolic compound and a dangerous pollutant, that although banned in Brazil since 1985, there are many contaminated areas. This pesticide is the subject of much concern because it has high toxicity and power of persistence in the environment due to their resistance to biotic and abiotic degradation. The use of microorganisms as degrading agents of several chemical is considered an effective method to reduce the adverse effects of contaminants on the environment. The fungi derived from marine environment are adapted to extreme conditions, developing attributes that give them the ability to produce various of biologically active compounds differentes of their respective representatives who inhabit the land environment. In addition, marine fungi present an excellent bioenzimatic potential to be explored in the biotransformation of xenobiotics such as, for example, pesticides. In this work, fifteen strains of fungi isolated from a marine invertebrate, the ascidian *Didemnum ligulum* were evaluated according to their resistance, ability to grow in the presence of the pentachlorophenol (PCP) pesticide and its enzymatic potential against biodegradation of the pesticide and its metabolites. Concentrations were evaluated 10, 25, 30, 40 and 50 mgL⁻¹ in solid media 3% malt. Nine among the tested strains showed growth in at least one concentration, but the DL2B strain (identified as *Trichoderma harzianum*) obtained optimal growth in most (50 mgL⁻¹), proving be resistant to its toxicity and suggesting its potential for biodegradation. Therefore, it was selected for reactions in liquid medium in the presence of the pesticide with an initial concentration of 20 mgL⁻¹ of PCP, to measure biodegradation. he biodegradation were evaluated after 7, 14 and 21 days of incubation. In 7 days of incubation it was no longer detected the presence of PCP in the samples, indicating the biodegradation of the pesticide by the fungus. The pentachloroanisole (PCA) metabolites and 2,3,4,6-tetrachloroanisole (2,3,4,6-TeCA) were identified by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), indicating degradation of the pesticide by the fungus. In a second step, the strain of *Trichoderma harzianum* was subjected to biodegradation reactions in liquid medium containing metabolites PCA and 2,3,4,6-TeCA. It was observed that these compounds possibly cause some toxic effect on this micro-organism, but not enough to cripple the biodegradation by fungi. The fungus didn't degrade these compounds completely as occurred with the PCP, but got reduce the concentrations of metabolites in the samples. These results confirm the efficiency of fungi derived from marine environment to biodegrade

persistent compounds and enables the improvement methodologies using these microorganisms in techniques for decontamination of polluted environments with xenobiotics.

Keywords: Marine fungi • Organochlorines • Biodegradation • PCP • PCA • 2,3,4,6-TeCA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processos químicos, físicos e biológicos que atuam na persistência, circulação, e degradação dos pesticidas na natureza (Fonte: Adaptado de Silva, 2010).....	19
Figura 2: Primeiros organoclorados sintéticos produzidos utilizados como inseticidas (Fonte: Santos <i>et al.</i> , 2007).	20
Figura 3: Degradação do PCP pela bactéria <i>Sphingobium chlorophenolic</i> ATCC 39723 (Fonte: Cai; Xun, 2002).....	27
Figura 4: Compostos biotransformados por fungos degradadores de lignina: A- Monômeros de lignina; B- Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs); e C- compostos halogenados. (Fonte: modificado de Pointing, 2001).....	29
Figura 5: Degradação do PCP pelo fungo <i>Anthracoxyllum discolor</i> . (Fonte: Rubilar, 2007).....	30
Figura 6: Técnicas de preservação das linhagens de fungos: A- Água destilada e B- ágar inclinado em tubos de ensaio (elaborado pelo autor).	36
Figura 7: Transferências dos micélios para placas contendo meio de cultura sólido Malte 3% na presença do PCP, em diferentes concentrações e placas controles (elaborado pelo autor).	38
Figura 8: Cultivo em meio de cultura líquido Malte 3%: A- As reações foram conduzidas em agitação orbital e B- Crescimento obtido após 21 dias de cultivo (elaborado pelo autor).	39
Figura 9: Fluxograma das etapas de extração das amostras com análise do extrato total (caldo enzimático acrescido do extrato micelial) das reações de biodegradação do PCP.....	40
Figura 10: Fluxograma das etapas de extração do caldo enzimático das reações de biodegradação do PCP.....	41
Figura 11: Fluxograma das etapas de extração do extrato micelial das reações de biodegradação do PCP.....	42
Figura 12: Curva analítica para quantificação do pesticida PCP.	44
Figura 13: Reação de metilação do composto PCP para formação do metabólito PCA.....	45
Figura 14: Reação de metilação do composto tetraclorofenol para formação do metabólito 2,3,4,6-TeCA.	45
Figura 15: Curva analítica para quantificação do metabólito PCA.....	47
Figura 16: Linhagens puras isoladas da ascídia <i>Didemnum Ligulum</i> : 1- DL5A; 2- DL6A; 3- DL11A; 4- DL2B; 5- DL5B; 6- DL1F; 7- DL2F; 8- DL5G; 9- DL3M2; 10- DL1M3; 11- DL4M3; 12- DL6M3; 13- DL7M3; 14- DL8M3; 15- DL9M3 (elaborado pelo autor).	49

Figura 17: Cultivo da linhagem DL6A em 21 dias nas concentrações de: 1- 10; 2- 25; 3- 30; 4- 40 e 5- 50 mgL ⁻¹ de PCP/placa.....	53
Figura 18: Cultivo da linhagem DL5A em 21 dias nas concentrações de: 1- 10; 2- 25; 3- 30; 4- 40 e 5- 50 mgL ⁻¹ de PCP/placa	53
Figura 19: Cultivo da linhagem DL11A em 21 dias nas concentrações de: 1- 10; 2- 25; 3- 30; 4- 40 e 5- 50 mgL ⁻¹ de PCP/placa	53
Figura 20: Cultivo da linhagem DL2B em 21 dias nas concentrações de: 1- 10; 2- 25; 3- 30; 4- 40 e 5- 50 mgL ⁻¹ de PCP/placa	54
Figura 21: Porcentagem de PCP degradado no controle abiótico em 7, 14 e 21 dias de incubação.....	55
Figura 22: Cromatogramas obtidos por CG-DIC para a reação de biodegradação do pesticida PCP com a linhagem DL2B, em 7 dias: A- padrão PCP e PCNB com tempos de retenção de 14,2 e 14,4 minutos, respectivamente; B- extrato micelial; C- caldo enzimático; D- extrato total.....	56
Figura 23: Cromatogramas obtidos por CG-DIC para a reação de biodegradação do pesticida PCP com a linhagem DL2B, em 14 dias: A- padrão PCP e PCNB com tempos de retenção de 14,2 e 14,4 minutos, respectivamente; B- extrato micelial; C- caldo enzimático; D- extrato total.....	57
Figura 24: Cromatogramas obtidos por CG-DIC para a reação de biodegradação do pesticida PCP com a linhagem DL2B, em 21 dias: A- padrão PCP e PCNB com tempos de retenção de 14,2 e 14,4 minutos, respectivamente; B- extrato micelial; C- caldo enzimático; D- extrato total.....	57
Figura 25: Cromatograma de íons obtido por meio das análises em CG-EM da reação de biodegradação do PCP em 7 dias, referente a extração do extrato micelial.....	60
Figura 26: Espectro de massas obtido por meio da análise do PCA em CG-EM: A- extrato micelial; B- Padrão da biblioteca de espectros de massa NIST/05.	61
Figura 27: Espectro de massas obtido por meio da análise do 2,3,4,6-TeCA em CG-EM: A- extrato micelial; B- Padrão da biblioteca de espectros de massa NIST/05.	62
Figura 28: Cromatogramas obtidos por CG-DIC para a reação de biodegradação do pesticida PCP com a linhagem DL2B: A- padrões analíticos 2,3,4,6-TeCA (8,2 minutos), PCA (13,7 minutos) e PCNB (14,4 minutos); B- reação em 7 dias; C- reação em 14 dias; D- reação em 21 dias.....	63

Figura 29: Aumento da concentração de 2,3,4,6-TeCA na degradação do PCP ao longo de 7, 14 e 21 dias evidenciado pelo aumento da intensidade do íon m/z 231 em análise de CG-EM.	64
Figura 30: Cromatogramas obtidos por CG-DIC para a reação de biodegradação do metabólito PCA com a linhagem DL2B, em: A- padrão PCA e PCNB com tempos de retenção de 13,7 e 14,4 minutos, respectivamente; B- reação em 7 dias; C- reação em 14 dias; D- reação em 21 dias.	67
Figura 31: Cromatogramas obtidos por CG-DIC para a reação de biodegradação do metabólito 2,3,4,6-TeCA com a linhagem DL2B, em: A- padrão 2,3,4,6-TeCA e PCNB com tempos de retenção de 8,2 e 11,6 minutos, respectivamente; B- reação em 7 dias; C- reação em 14 dias; D- reação em 21 dias.	68
Figura 32: Espectro de massa obtido em CG-EM no tempo retenção de 15,57 minutos referente ao 2,3,4,6-TeCA na biodegradação do PCA: A- Espectro na biodegradação do PCA durante 7 dias; B-Espectro do padrão 2,3,4,6-TeCA sintetizado; C-Espectro de 2,3,4,6-TeCA da biblioteca de espectros de massa NIST/05.	69
Figura 33: Diminuição da concentração de 2,3,4,6-TeCA na degradação do PCA ao longo de 7,14 e 21 dias evidenciado pelo aumento da intensidade do íon m/z 231 em análise de CG-EM.	70
Figura 34: Proposta de rota para biodegradação do pesticida PCP por uma linhagem de fungo marinho.	70
Figura 35: Espectro de RMN de ^1H do composto 1,2,3,4,5-pentacloro-6-metoxibenzeno (pentacloroanisol).	91
Figura 36: Espectro de RMN de ^{13}C do composto 1,2,3,4,5-pentacloro-6-metoxibenzeno (pentacloroanisol).	92
Figura 37: Espectro de RMN de ^1H do composto 2,3,4,6-tetraclorofenol (2,3,4,6-tetracloroanisol).	93
Figura 38: Espectro de RMN de ^{13}C do composto 2,3,4,6-tetraclorofenol (2,3,4,6-tetracloroanisol).	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características físicas e químicas dos principais pesticidas organoclorados (Fonte: Adaptado de Almeida <i>et al.</i> , 2007).....	22
Tabela 2: Propriedades físicas e químicas do composto PCP (Fonte: adaptado de EPA, 2010).	23
Tabela 3: Composição dos meios de cultura para isolamento das linhagens de fungos marinhos (Kossuga <i>et al.</i> , 2012).....	35
Tabela 4: Crescimento médio ^b das linhagens de fungos marinhos em 7 dias na presença de concentrações crescentes de PCP em meio de cultura sólido de extrato de malte 3%.....	50
Tabela 5: Crescimento médio ^c das linhagens de fungos marinhos em 14 dias na presença de concentrações crescentes de PCP em meio de cultura sólido de extrato de malte 3%.....	51
Tabela 6: Crescimento médio ^d das linhagens de fungos marinhos em 21 dias na presença de concentrações crescentes de PCP em meio de cultura sólido de extrato de malte 3%.....	52
Tabela 7: Quantificação do PCA por CG-DIC nas reações de biodegradação do PCP em 7, 14 e 21 dias de incubação.....	63
Tabela 8: Quantificação do PCA por CG-DIC após biodegradação em 7, 14 e 21 dias de incubação (30°C, 130 rpm).....	65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Aveia
AcOEt	Acetato de etila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitárias
ASW	Artificial Sea Water (Água do Mar Artificial)
C	Celulose
CB	Cenoura e Batata
CEBIMar - USP	Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo
CETESB	Companhia Ambiental do Estado de São Paulo
CG-DIC	Cromatografia a gás com Detector de Ionização de Chamas
CG-EM	Cromatografia à gás acoplada a Espectrômetro de Massas
DDD	Dicloro Difenil Dicloroetano
DDT	<i>p</i> -diclorodifeniltricloroetano
EPA	Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental)
F	Fubá
GPY	Glucose, Peptone and Yeast extract (Glicose, Peptona e Extrato de Levedura)
Lac	Lacase
LiP	Lignina Peroxidase
M2%	Malte 2%
M3%	Malte 3%
MnP	Manganês Peroxidase
PCA	Pentacloroanisol
PCNB	Pentacloronitrobenzeno
PCP	Pentaclorofenol
POP	Poluentes Orgânicos Persistentes
T	Tubaki
TCBQ	Tetraclorobenzoquinona
TCHQ	Tetraclorohidroquinona
2,3,4,6-TeCA	2,3,4,6-tetracloroanisol
VP	Versátil Peroxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 Pesticidas	17
1.2 Pesticidas organoclorados.....	20
1.2.1 Pentaclorofenol (PCP).....	23
1.3 Biodegradação de pesticidas por micro-organismos	25
1.3.1 Biodegradação de PCP	26
1.4 Fungos marinhos.....	30
2 OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo geral	33
2.2 Objetivos específicos	33
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
3.1 Reagentes, solventes e meios de cultivo	34
3.2 Coleta das amostras e cultivo dos fungos antes do isolamento	34
3.3 Isolamento, purificação e caracterização das linhagens	36
3.4 Crescimento das linhagens em meio de cultura sólido	36
3.5 Seleção das linhagens de fungos resistentes ao PCP, em meio de cultura sólido.....	37
3.6 Ensaio em meio de cultura líquido contendo PCP.....	38
3.6.1 Ensaios controle	39
3.7 Análise da biodegradação do pesticida PCP	39
3.7.1 Extração do pesticida PCP dos meios de cultura.....	39
3.7.2 Análises cromatográficas	42
3.7.3 Curva analítica para quantificação do pesticida.....	43
3.8 Síntese dos compostos pentacloroanisol e 2,3,4,6-tetracloroanisol.....	44
3.9 Análises da biodegradação dos metabólitos PCA e 2,3,4,6-TeCA pela linhagem DL2B	46
3.9.1 Curva analítica para quantificação do metabólito PCA.....	46

3.10 Identificação das linhagens que apresentaram os melhores resultados na triagem em meio de cultura sólido na presença do pesticida PCP	47
3.11 Descarte de resíduos	48
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
4.1 Seleção das linhagens de fungos resistentes ao pesticida PCP	49
4.2 Degradação do pesticida PCP	54
4.2.1 Degradação abiótica do PCP	54
4.2.2 Cultivo em meio líquido do fungo selecionado para quantificação da biodegradação do pesticida PCP	56
4.2.3 Avaliação da biodegradação do pesticida PCP pela linhagem DL2B em meio de cultura líquido	56
4.3 Identificação de produtos da biodegradação do PCP.....	59
4.4 Degradação dos metabólito PCA e 2,3,4,6-TeCA	64
4.4.1 Cultivo em meio líquido da linhagem DL2B para avaliação da biodegradação do metabólito PCA.....	64
4.4.2 Cultivo em meio líquido da linhagem DL2B para avaliação da biodegradação do metabólito 2,3,4,6-TeCA	67
4.5 Identificação de produtos da biodegradação dos metabólitos PCA e 2,3,4,6-TeCA.....	68
4.6 Identificação das linhagens DL6A, DL5A, DL11A e DL2B	70
5 CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS	75
ANEXOS	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pesticidas

Os pesticidas são substâncias ou misturas de substâncias químicas utilizadas para controlar organismos indesejáveis durante a produção, colheita ou armazenamento de alimentos, os quais podem ser classificados quanto ao tipo de estrutura química ou ao tipo de organismo-alvo a ser controlado. Esses produtos possuem uma grande variedade de estruturas químicas, incluindo moléculas orgânicas ou inorgânicas (Baird, 2002), e podem ser introduzidos no ambiente de diversas formas: na fabricação, na aplicação ou ainda na posterior lixiviação do composto (Rand, 1995), afetando os organismos-alvo e também outros organismos não alvos. O termo pesticida utilizado neste trabalho também é conhecido como defensivo agrícola, biocida, agrotóxico e praguicida, embora, haja definições mais específicas que incluem e excluem dessas classificações diferentes grupos de substâncias químicas (Terra, 2008). Independente do termo empregado, todos possuem a propriedade comum de bloquear um processo metabólico vital dos organismos para os quais são tóxicos (Estevez *et al.*, 2008).

O uso de diferentes substâncias tóxicas contra pragas e doenças é datado desde a Antiguidade. Eram utilizados produtos de origem natural, tais como o piretro e a nicotina, essa extraída de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum L.*) (Contreras e Argumedo, 2012), além de compostos inorgânicos como o mercúrio e o enxofre (Coutinho *et al.*, 2005). O uso moderno de pesticidas é datado do século XX com o emprego intensivo de substâncias inorgânicas como o aceto arsenito de sódio, fluoreto de cálcio, arsênio branco, entre outras (Galli, 2006). A partir da década de 30, os diferentes tipos de culturas juntamente com o aumento da produção agrícola exigiram a formulação e uso de substâncias com melhor ação pesticida (Galli, 2006). Um intenso desenvolvimento da indústria química ocorreu com a Revolução Industrial, o que determinou o incremento na pesquisa e produção de novos pesticidas, intensificando-se a produção em escala global a partir de 1940 (Da Silva *et al.*, 2005).

Com o crescimento da agricultura em produtividade e área cultivada, o uso de agrotóxicos na agricultura se expandiu, principalmente no Brasil que se tornou um dos maiores consumidores desses produtos xenobióticos. Em terras brasileiras, o uso dos pesticidas na agricultura começou na década de 70, incentivado pelo Plano Nacional de Desenvolvimento (PND), a partir do qual aumentou o seu consumo progressivamente e se

tornou um dos maiores consumidores destes produtos na atualidade (Dams, 2006). Em 2011, o mercado brasileiro de pesticidas foi considerado o maior do mundo, representando 16% do mercado mundial, segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e, atualmente, ocupa a sexta posição no ranking mundial de importações de agrotóxicos, considerando o investimento em dólar de alimento produzido (Welle, 2013).

O homem passou a sintetizar pesticidas e outros produtos químicos cada vez mais eficientes de ação mais rápida. Nos últimos 50 anos, o uso de pesticidas aumentou a quantidade e melhorou a qualidade dos alimentos para a crescente população mundial. No entanto, com o aumento das montantes utilizados, preocupação com seus efeitos adversos contra organismos não alvos, incluindo os seres humanos também cresceu (Eerd *et al.*, 2003). Esses compostos químicos, apesar de terem um efeito benéfico perante a produção agrícola, são estranhos à natureza e podem produzir alterações e desequilíbrios (Diez, 2010). Muitos deles são tóxicos não apenas aos insetos e pragas nocivas, mas também a outros seres vivos que são úteis ou participam do processo de equilíbrio ambiental (Coutinho *et al.*, 2005). Estão sujeitos a sofrerem combinações por diferentes processos afetando os seus destinos e comportamentos (Costa e Olivi, 2008). Segundo Kouzayha *et al.* (2012), os pesticidas são considerados um dos contaminantes mais perigosos ao meio ambiente, porque além de serem compostos muito tóxicos, podem também se bioacumularem, e fazer parte de processos químicos, físicos e biológicos na natureza.

Os pesticidas são introduzidos na agricultura e, de acordo com suas características próprias, permanecem no solo, no local de aplicação, ou são transportados depositando-se em diferentes partes do ambiente, tais como sedimentos, vegetais, águas superficiais e subterrâneas, nos ambientes marinhos e até mesmo volatilizados para a atmosfera (Shalaby e Abdou, 2010; Soares *et al.*, 2012). Uma vez presentes nos solos, há inúmeros processos que atuam na circulação e degradação dos pesticidas na natureza (Figura 1). Eles podem ser evaporados, lixiviados, infiltrados, aderirem-se à matéria orgânica e sofrerem processos de degradação biótica ou química (Flores *et al.*, 2004). O destino metabólico do pesticida depende das condições ambientais abióticas (temperatura, pH do solo, umidade), das espécies vegetais presentes no solo, da comunidade microbiana, das características do pesticida (hidrofilicidade, nível de solubilidade, massa molecular) e das reações químicas e biológicas envolvidas (Ortiz-Hernandéz *et al.*, 2011). A degradação abiótica dos pesticidas ocorre por meio de transformações químicas e físicas em processos de hidrólise, oxidação, redução, fotólise e rearranjo (Ortiz-Hernandéz *et al.*, 2011). Entretanto, as transformações enzimáticas,

resultantes dos processos bióticos realizados por micro-organismos e plantas, é de longe as principais vias de desintoxicação do ambiente (Van Eerd *et al.*, 2003).

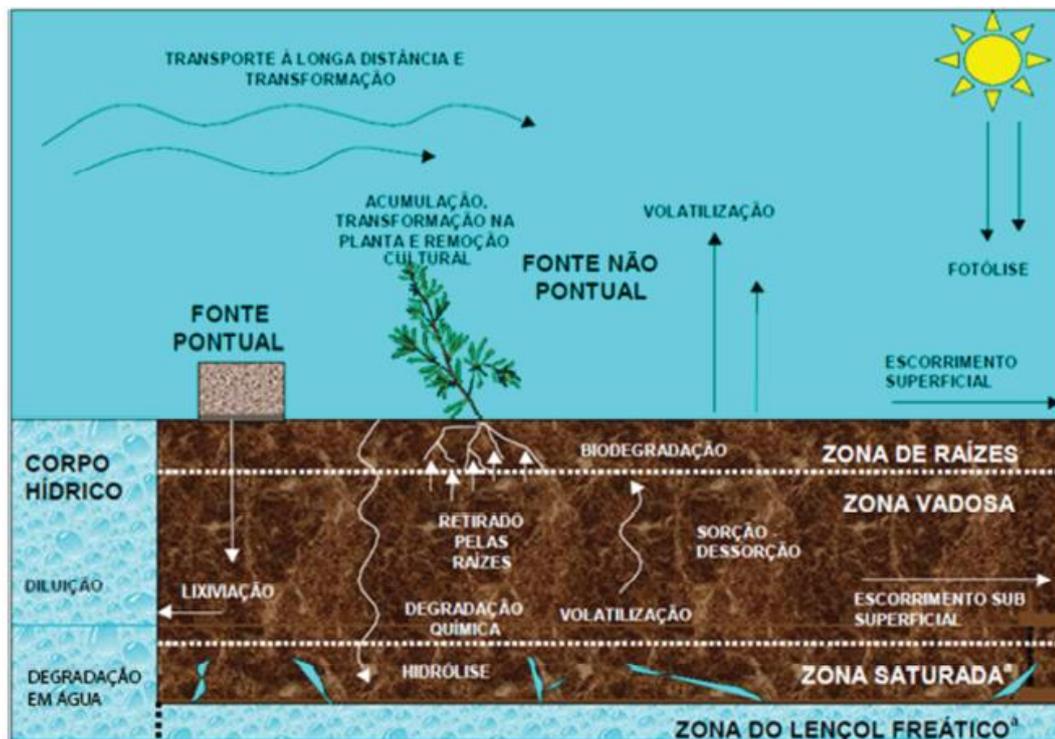


Figura 1: Processos químicos, físicos e biológicos que atuam na persistência, circulação, e degradação dos pesticidas na natureza (Fonte: Adaptado de Silva, 2010).

Existe uma variedade de mais de mil formulações diferentes de pesticidas, incluindo herbicidas, fungicidas, nematicidas, inseticidas, fumigantes e outros compostos orgânicos, além de substâncias utilizadas como dessecantes, desfoliantes e reguladoras de crescimento (Braibante e Zappe, 2012). As formulações dos pesticidas são constituídas de princípios ativos e baseadas na natureza química dos mesmos, podem ser classificados em organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (EPA, 2013).

Entre todos os pesticidas utilizados na agricultura, os pertencentes ao grupo dos organoclorados são objetos de muita preocupação, principalmente por possuírem elevada toxicidade e poder de persistência no ambiente, devido à sua resistência à degradação biótica e abiótica (Singh *et al.*, 2009).

1.2 Pesticidas organoclorados

A era dos organoclorados foi iniciada em 1948 com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina entregue a Paul Müller, que condensou clorobenzeno à preparação do composto *p*-diclorodifeniltricloroetano (DDT), produto com alto poder de inseticida eficiente contra grandes pragas da época (Faria, 2009). A partir de então, novos outros tipos de organoclorados foram desenvolvidos e extensivamente utilizados pelas populações (Figura 2). Juntamente com a eficiência de ação dos organoclorados, mais tarde, ao longo dos anos, apareceram os aspectos negativos desses compostos, como a persistência e toxicidade para os seres humanos e outros organismos, mesmo em concentrações muito baixas, devido à exposição crônica em longo prazo (Masci *et al.*, 2014).

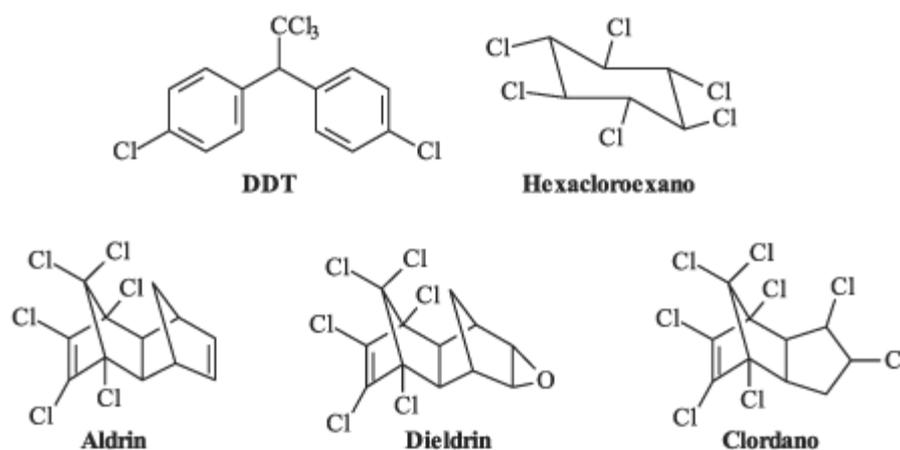


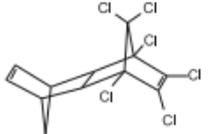
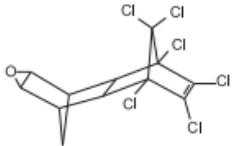
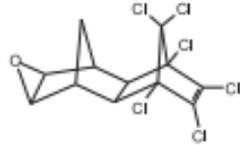
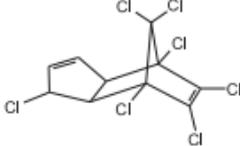
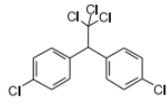
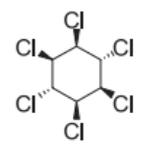
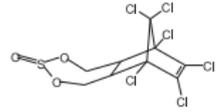
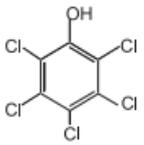
Figura 2: Primeiros organoclorados sintéticos produzidos utilizados como inseticidas (Fonte: Santos *et al.*, 2007).

Em 1962, a bióloga norte-americana Rachel Carson lançou um livro com o título de “Silent Spring” (Primavera Silenciosa), que denunciava os efeitos altamente nocivos e alarmantes que os inseticidas, principalmente o organoclorado DDT, quando aplicados sem critério, podiam produzir sobre a natureza. Apesar de ter sido alvo de muitas críticas, a publicação foi determinante para que alguns organoclorados fossem proibidos nos Estados Unidos, no início da década de 70 (Flores *et al.*, 2004). Embora os organoclorados tenham sido banidos da agricultura, ainda são muito estudados, pois foram amplamente utilizados em lavouras nas décadas de 1960 a 1980 gerando um acúmulo de resíduos tóxicos em vários ecossistemas de todo o mundo (Kayser *et al.*, 2001).

Os pesticidas organoclorados são compostos químicos orgânicos sintéticos, de estrutura cíclica, altamente termoestáveis (Smith e Gangolli, 2002), formados principalmente por hidrogênio, carbono e cloro (Abou-Arab *et al.*, 1995), conhecidos por serem o grupo de poluentes orgânicos persistentes (POP) mais tóxicos ao meio ambiente (Cai *et al.*, 2013; Luzardo *et al.*, 2014). São compostos pouco solúveis em água e com elevada solubilidade em lipídios (lipossolúveis), o que facilita a sua deposição em tecidos gordurosos de animais (Masci *et al.*, 2014). Assim, são capazes de bioacumularem e biomagnificarem por meio da cadeia biológica (Ahmad *et al.*, 2010), persistindo no organismo dessas espécies e comprometendo sua saúde, afetando principalmente os predadores de topo (Hamlin e Guillette Jr, 2010). São caracterizados como persistentes, estrogênicos, carcinogênicos (Valerón *et al.*, 2009), podendo interferir na função normal dos sistemas endócrino e reprodutivo (Xue *et al.*, 2005) de animais e de seus consumidores.

Os principais pesticidas organoclorados e algumas de suas características físicas e químicas encontram-se descritas na Tabela 1.

Tabela 1: Características físicas e químicas dos principais pesticidas organoclorados (Fonte: Adaptado de Almeida *et al.*, 2007).

Composto	Número CAS	Solubilidade em água	Pressão de vapor	Estrutura química
Aldrin	309-00-2	27 µg/L a 25°C	2,31 x 10 mm Hg a 20°C	
Dieldrin	60-57-1	140 µg/L a 20°C	1,78 x 10 mm Hg a 20°C	
Endrin	72-20-8	220-260 µg/L a 25°C	7 x 10 mm Hg a 25°C	
Heptacloro	76-44-8	180 µg/L a 25°C	0,3 x 10 mm Hg a 20°C	
Diclorodifeniltricloeroetano (DDT)	50-29-2	1,2-5,5 µg/L a 25°C	0,02 x 10 mm Hg a 20°C	 p,p'-DDT
Lindano	58-89-9	7 mg/L a 20°C	3,3 x 10 mm Hg a 20°C	
Endossulfan	115-29-7	320 µg/L a 25°C	0,17 x 10 mm Hg a 25°C	
Pentaclorofenol	87-86-5	14 mg/L a 25°C	16 x 10 mm Hg a 20°C	

^aCódigos de registros designados as substâncias que estão presentes na Base de Dados do CAS (Chemical Abstract Service)

O pentaclorofenol (PCP) é um dos compostos organoclorados mais estudados por ser pouco solúvel em água, muito tóxico (Pires *et al.*, 2003), altamente volátil, por liberar dioxinas e seus derivados no ambiente e também por ser resistente ao ataque de micro-organismos (Majer *et al.*, 2002).

1.2.1 Pentaclorofenol (PCP)

Um relevante pesticida do grupo dos organoclorados, o pentaclorofenol (PCP) é utilizado como inseticida, fungicida, herbicida e conservante de madeira (Salmerón-Alcocer *et al.*, 2007). Além disso, o PCP aparece como subproduto nos processos de branqueamento do papel, nos processos de desinfecção de águas contendo fenóis com cloro ou hipoclorito de sódio, na incineração de resíduos sólidos municipais, na cloração de águas residuárias e outros processos (Vaz *et al.*, 2003; Chandra *et al.*, 2006). O PCP pode ser encontrado em águas superficiais e subterrâneas, na forma de sal ionizado, adsorvido em solos e sedimentos ou presente no ar, na forma de vapor (Orta *et al.*, 2003).

A Tabela 2 apresenta algumas propriedades físicas e químicas do PCP.

Tabela 2: Propriedades físicas e químicas do composto PCP (Fonte: adaptado de EPA, 2010).

Propriedade	Informação
Fórmula química	C ₆ HOC _l ₅
Peso molecular	266,34
Ponto de fusão	190-191°C
Ponto de ebulição	~309-310°C
Densidade	1,978 g/mL
Densidade de vapor	9,20 (ar=10)
Solubilidade em água a 25°C	14 mg/L
Constante da Lei de Henry	2,45 x 10 ⁻⁸ atm·m ³ /mol

O PCP pode ser produzido por meio de duas vias diferentes: por cloração gradual de fenóis, na presença de catalisadores (cloreto férrico ou cloreto de alumínio anidro) ou por hidrólise alcalina do hexaclorobenzeno (Proudfoot, 2003). Segundo dados técnicos informados pela Companhia Ambiental do Estado de São Paulo (Cetesb), o PCP é um sólido branco, de odor fenólico, insolúvel em água, mas altamente solúvel em óleos e gorduras. A forma comercial do produto PCP contém cerca de 85% de princípio ativo, 6% de

tetraclorofenóis e 6% de outros tipos de fenóis clorados além de materiais inertes (Silva, 2007). O seu grau técnico contém dioxinas (tetra-, hexa- e octaclorodibenzeno-*p*-dioxina) e hexaclorobenzeno como subprodutos da fabricação que podem ser facilmente liberados ao ambiente. O PCP não é mais comercializado no Brasil, mas pode ser facilmente encontrado na forma de seu sal sódico, o pentaclorofenato de sódio (Cetesb, 2014). O pentaclorofenato de sódio, utilizado como preservante de madeira é um produto solúvel em água, formado por uma reação de neutralização, na qual o PCP é submetido à ação do hidróxido de sódio (Moreschi, 2013). A alta solubilidade do sal sódico em água faz com que o composto persista por muito tempo em corpos d'água e, com que o nível de intoxicação de organismos presentes nesses ambientes seja elevado (Grisolia, 2005). Os peixes, em especial, absorvem o PCP pela ingestão de alimentos e por meio de suas brânquias e, posteriormente, o transfere para os seres humanos pelo consumo destes organismos (Zhou *et al.*, 2008). Sendo assim, de acordo com Ondarza *et al.*, (2014) do ponto de vista da saúde humana, o acúmulo desse poluente em tecidos comestíveis é preocupante, uma vez que a presença do composto em peixes reflete, de alguma forma, o estado de contaminação no ambiente

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA, 2010) vários estudos têm fornecido dados sobre os níveis de PCP em amostras de sangue e urina em humanos (amostras da população em geral ou grupos com exposição conhecida ao PCP), indicando que o PCP é absorvido pelos humanos. O PCP pode ser absorvido por qualquer via, entretanto, as intoxicações humanas mais frequentes ocorrem por inalações de seus vapores durante sua produção e manipulação (Pereira, 2009). É um composto muito lipossolúvel e pode facilmente ser absorvido pelas vias dérmicas e pelo trato gastrointestinal, podendo se dissipar por todo o organismo concentrando-se principalmente no fígado, rins, coração, cérebro, adrenais e tecido adiposo (Ferreira *et al.*, 1997). Segundo Kussumi *et al.* (2004) o PCP possui ação carcinogênica e a exposição crônica ao composto pode acarretar em sério danos ao fígado e rins.

Mesmo com a proibição do uso do pesticida PCP no Brasil no ano de 1985 (Portaria N°329, de 02 de setembro de 1985 do Ministério da Agricultura), muitas áreas continuam contaminadas. Os motivos mais relevantes para a atual situação são, dentre outros, pelo uso indiscriminado do pesticida há algumas décadas, pela presença do composto PCP na formulação de preservantes ainda comercializados e, principalmente, devido à sua persistência no ambiente (Almeida *et al.*, 2007). Estudos comprovam altos teores de resíduos deste composto ainda dispersos em diversas matrizes ambientais, como em solos, águas,

sedimentos, suspenso em matéria orgânica, na atmosfera e, inclusive, em muitos organismos (Liu *et al.*, 2008; Cai *et al.*, 2010). Sendo assim, a utilização de técnicas biológicas na degradação desses resíduos recorre da possibilidade de conversão desses compostos em produtos inócuos completamente mineralizados, ou a compostos menos recalcitrantes ou tóxicos (Chowdhury *et al.*, 2008).

1.3 Biodegradação de pesticidas por micro-organismos

Os micro-organismos são capazes de utilizar os pesticidas como fonte de alimento e energia em transformações catalisadas por suas enzimas biológicas, as quais resultam em modificações na estrutura química, propriedades toxicológicas e no potencial poluente desses compostos (Gavrilescu, 2005). Os micro-organismos são adaptáveis a condições adversas e encontram meios de se desenvolverem mesmo em ambientes inóspitos (Kumar *et al.*, 2011). Algumas das características que fazem com que os micro-organismos sejam ótimos agentes biodegradadores e com potencial biotecnológico são, dentre outros fatores, a tolerância a condições ambientais extremas, o crescimento acelerado, o baixo custo de cultivo (Simões e Tauk-Tornisielo, 2005) e, principalmente, por possuírem um sistema enzimático capaz de transformar uma grande variedade de compostos químicos não naturais ao sistema biológico (Yu *et al.*, 2011).

A utilização de micro-organismos como agentes degradadores de diversas substâncias, tais como corantes, cosméticos, detergentes, medicamentos, produtos químicos agrícolas (Harms *et al.*, 2011) é considerado um método eficiente para reduzir os efeitos adversos dos contaminantes sobre o ambiente (Cea *et al.*, 2010). A degradação biológica causada pela atividade de micro-organismos é considerada o principal processo que conduz a dissipação de pesticidas no solo (Vryzas *et al.*, 2012).

Uma das etapas para se efetuar a biotransformação microbiana consiste na seleção de micro-organismos adequados. Se um grupo de micro-organismo consegue proliferar-se eficientemente em ambientes com alta concentração de determinados poluentes, é um indício de que esses micro-organismos podem possuir um sistema adaptado para metabolização desses contaminantes (Martins *et al.*, 2003). Os fungos e as bactérias são os agentes micro-organismos mais utilizados como agentes biodegradadores em técnicas de biorremediação. Alguns grupos de bactérias de diferentes gêneros como *Rhodococcus*, *Pseudomonas* e *Flavobacterium*, já foram eleitos como eficientes na metabolização de pesticidas (Gavrilescu, 2005). E quanto aos fungos, algumas espécies também demonstram igual capacidade tais como

Lentinula edodes, *Phlebia radiata*, *Phanerochaete chrysosporium* (Silva *et al.*, 2004), *Trametes hirsutus*, *Phanerochaete sordida* e *Cyathus bulleri* (Singh e Walker, 2006).

Os organoclorados são compostos químicos conhecidos por sofrerem desidrocloração, oxidação, descloração, rearranjo, hidrólise e reações fotoquímicas (Grande *et al.*, 2003). Entretanto, as duas vias principais de degradação desses compostos por micro-organismos são: por descloração redutiva, em condições anaeróbias, e desidrocloração, que ocorre na presença de oxigênio (Ortiz-Hernández *et al.*, 2011).

Alguns gêneros de bactérias foram comprovados como sendo bons agentes biodegradadores dessas substâncias, como *Klebsiella* (Kwon *et al.*, 2005), *Staphylococcus* (Sonkong *et al.*, 2008) e *Pseudomonas* (Barragan-Huerta *et al.*, 2007). Os fungos também são conhecidos por serem capazes de metabolizar esses poluentes. Dentre estes, os basidiomicetos aparecem como um dos mais eficientes a estes compostos (Gomes Machado *et al.*, 2005; Rigas *et al.*, 2005), em especial, os fungos da podridão branca, que são os mais utilizados como degradadores de organoclorados como os *Trametes villosa* (Yamanaka *et al.*, 2008), *Phanerochaete chrysosporium*, *Phanerochaete sordida* (Castillo *et al.*, 2001), *Phlebia radiata* (Quintero *et al.*, 2008), dentre outros. Mas há também relatos de outros grupos e espécies de fungos envolvidos na biodegradação dos organoclorados como *Trichoderma harzianum* (Katayama e Matsumura, 2009), *Aspergillus niger* (Bhalerao, 2012), *Fusarium verticillioides* (Guillén-Jiménez *et al.*, 2012), mostrando excelentes resultados.

1.3.1 Biodegradação de PCP

A degradação do pesticida PCP no ambiente pode ocorrer por meio de processos químicos, microbiológicos, fotoquímicos (Thuan e Chang, 2012; Yu *et al.*, 2014), eletrólise e tratamento térmico (Thuan e Chang, 2012). A decomposição microbiológica deste composto é um mecanismo de remoção importante (Yu *et al.*, 2014), porém difícil para determinadas espécies. O pesticida PCP possui algumas características que podem retardar sua degradação por alguns micro-organismos. Isso, porque é um composto altamente clorado, visto que a resistência de compostos aromáticos clorados aumenta com o grau de cloração e, também, por ser um produto muito tóxico para alguns organismos, pode causar o desacoplamento da fosforilação oxidativa e perturbar as propriedades das membranas das células dos mesmos (Copley, 2000). Entretanto, apesar de possuir esses atributos desfavoráveis que dificultam o

processo por alguns micro-organismos, há outros que possuem a capacidade de degradá-lo com eficiência (Do Vale, 2012).

Algumas bactérias são conhecidas por degradarem o PCP utilizando-o como recursos de carbono e energia em condições aeróbias (Santosh *et al.*, 2010). Dentre elas, já foram relatadas como potentes degradadoras do organoclorado PCP as espécies *Pseudomonas fluorescens* (TE3) (Shah e Thakur, 2002), *Pseudomonas aeruginosa* (PCP2) (Sharma e Thakur, 2008), *Serratia marcescens* (Singh *et al.*, 2007), *Pseudomonas stutzeri* (CL7) (Santosh *et al.*, 2010) e *Comamonas testosteroni* (CCM7350) (Vítková *et al.*, 2011), como potentes degradadoras do organoclorado PCP. Em seu estudo, Cai e Xun (2002) propuseram uma via de degradação do PCP pela bactéria *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723 (Figura 3).

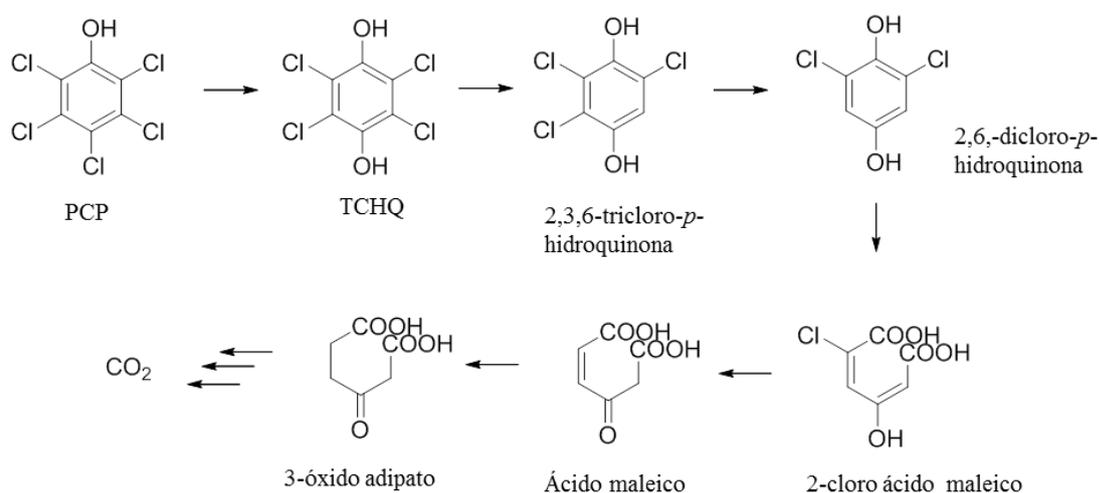


Figura 3: Degradação do PCP pela bactéria *Sphingobium chlorophenolicum* ATCC 39723 (Fonte: Cai; Xun, 2002).

O processo de degradação de compostos por fungos é conhecido como micodegradação. Nele o composto é degradado em moléculas menores, que podem ser tóxicos ou não, ou ainda removido por mecanismos de absorção, adsorção ou por reações de conjugação da *fase II*. (Ramadevi *et al.*, 2012). Usualmente, biotransformações metabólicas em sistemas biológicos podem ser divididas em 2 fases. As reações da *fase I* promovem modificações em xenobióticos, como reações de oxidação, redução, hidrólise e outras que inserem grupos polares no xenobiótico. Após esta etapa, ocorrem as reações da *fase II*, que são nomeadas de conjugações. Estas conjugações introduzem grupos endógenos, os quais são usualmente polares e presentes em abundância *in vivo*, resultando em produtos mais polares

(exceto em reações de metilação) e portanto são mais facilmente eliminados. É importante ressaltar que os xenobióticos conjugados podem sofrer as reações inversas de conjugação gerando o metabólito modificado novamente (Derelanko e Hollinger, 2002).

Na literatura há muitos relatos que envolvem o uso de fungos terrestres na biodegradação do PCP. Dentre eles, em especial os fungos da podridão branca, possuem grande tolerância a compostos tóxicos e são muito utilizados em técnicas de biodegradação desse composto (Yamanaka *et al.*, 2008). Esses fungos são eficientes na degradação do PCP por possuírem um sistema enzimático composto principalmente por enzimas ligninolíticas e peroxidases (Souza *et al.*, 2011) que não são específicas e podem atuar também em uma variedade de compostos recalcitrantes poluentes (Figura 4) estruturalmente relacionados com a lignina, como é o caso do PCP (Asgher *et al.*, 2008). Essas enzimas agem por meio da geração de radicais livres (Pointing, 2001).

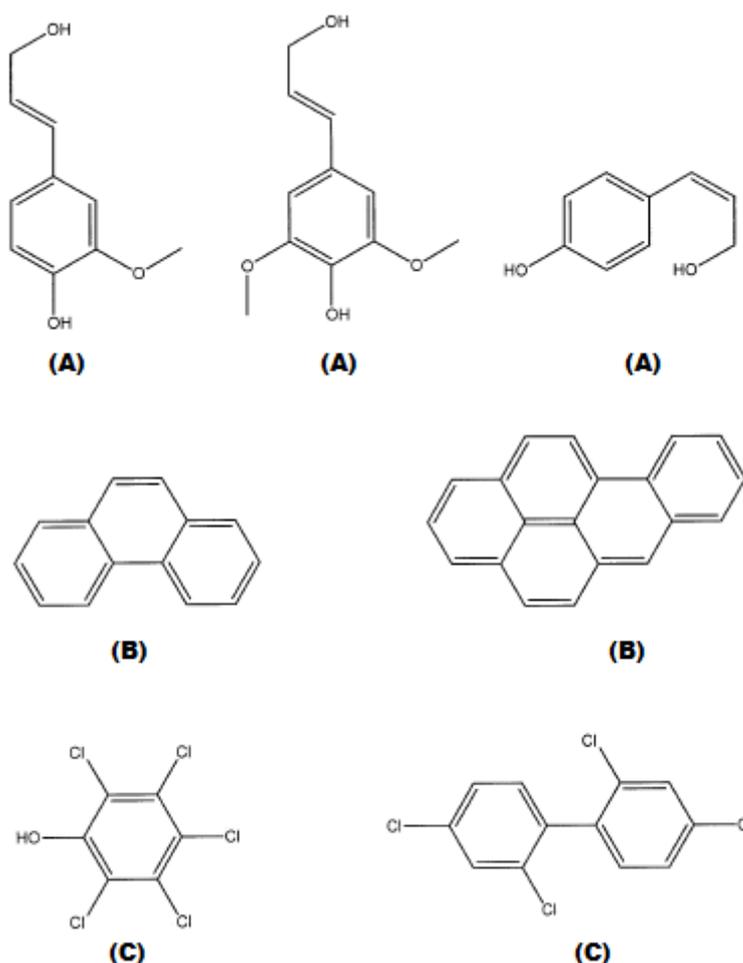


Figura 4: Compostos biotransformados por fungos degradadores de lignina: A- Monômeros de lignina; B- Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs); e C- compostos halogenados. (Fonte: modificado de Pointing, 2001).

A produção e efetiva atividade de enzimas extracelulares ligninolíticas por algumas espécies de fungos é considerada uma característica promissora na degradação do PCP (Montiel *et al.*, 2004; Okeke *et al.*, 2007; Maciel *et al.*, 2012). O *Phanaerochaete chrysosporium* demonstrou alta capacidade de degradar organopoluentes, incluindo o PCP (Ryu *et al.*, 2000; Ning e Wang, 2012), assim como o *Phlebia brevispora* (Kamei *et al.*, 2006), *Phlebia radiata* e *Trametes versicolor* (Tuomela *et al.*, 1999). Carvalho *et al.* (2009) e Carvalho *et al.* (2011) constataram que o fungo *Mucor plumbeus* possui potencial de reduzir PCP em meios de cultura. Espécies de fungos pertencentes ao gênero *Trichoderma*, como o *Trichoderma virgatum* (Cserjesi e Johnson, 1971) e o *Trichoderma harzianum* (Rigot e Matsumura, 2002) também são apresentados como micro-organismos eficientes na mineralização do pesticida PCP. Uma via de degradação do PCP utilizando o fungo

Anthracophyllum discolor em reatores contendo solo em suspensão foi estabelecido por Rubilar (2007) e está apresentado na Figura 5.

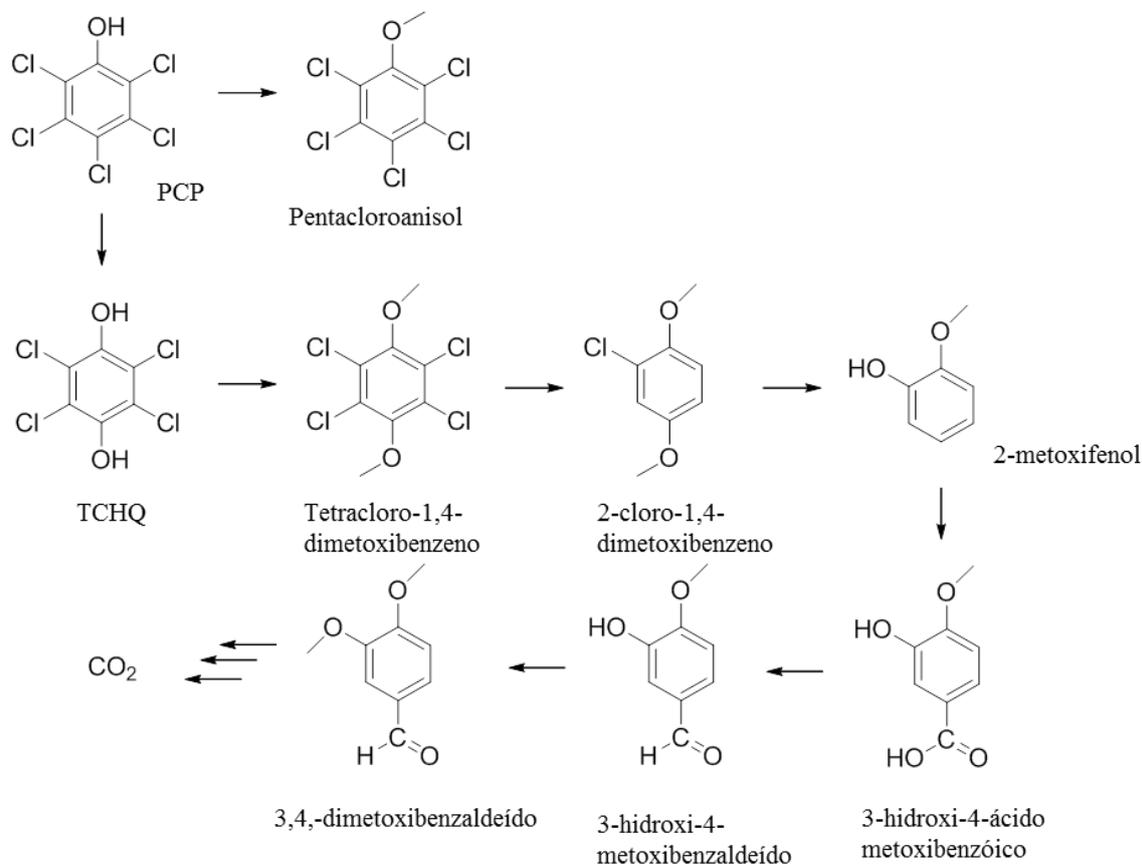


Figura 5: Degradação do PCP pelo fungo *Anthracophyllum discolor*. (Fonte: Rubilar, 2007).

Por apresentarem um alto potencial biodegradativo, biossortivo e mecanismos de resistência em condições ambientais adversas, a utilização de alguns fungos filamentosos e seus metabólitos nos processos de biodegradação está aumentando consideravelmente nos últimos anos (Conceição *et al.*, 2005). Segundo Sankaran *et al.* (2010) o interesse pelo uso de fungos em mecanismos de biorremediação está crescendo muito, por serem micro-organismos com alta diversidade de espécies, alto potencial enzimático e elevada extensão de hifas.

1.4 Fungos marinhos

O ambiente marinho ocupa mais de três quartos da superfície terrestre e é considerado um ecossistema promissor em abundância de recursos para o desenvolvimento de pesquisas (Rocha *et al.*, 2012). Enzimas isoladas desse ambiente são de grande potencial para o uso em reações biocatalíticas e produção de compostos bioativos por possuírem características peculiares do ambiente marinho. Nos últimos anos, uma grande variedade de enzimas com atividades específicas foram isoladas de micro-organismos marinhos (Ghosh *et al.*, 2005) e

estão sendo extensivamente estudadas, principalmente as proteases, carboidrases e peroxidases (Rocha *et al.*, 2013).

Os fungos marinhos não são classificados apenas por características fisiológicas sendo considerados mais um grupo ecológico do que uma classe taxonômica. A definição mais adequada para fungos marinhos foi proposta por Kohlmeyer e Kohlmeyer (1979): “*fungos marinhos obrigatórios são aqueles que se desenvolvem e esporulam exclusivamente em um habitat marinho ou de estuário; fungos marinhos facultativos são aqueles provenientes de ambientes de águas doce ou terrestres e que são capazes de crescerem e até mesmo esporularem no ambiente marinho*” (Pang e Mitchell, 2005). Estes fungos podem ser encontrados em uma ampla variedade de habitats, como em mar aberto, sedimentos, madeira, manguezais, conchas de moluscos, corais, associados a vertebrados e invertebrados marinhos, na superfície ou interiores das algas e, até mesmo, em fontes hidrotermais. A variedade de seus habitats reflete também nas suas diversidades metabólicas, o que contribui para que sejam muito utilizados como ótimos produtores de enzimas e moléculas bioativas (Sarkar *et al.*, 2010).

Ao contrário dos fungos terrestres, que foram inicialmente explorados para a descoberta de drogas, fungos marinhos atraíram a atenção dos pesquisadores como fonte de produtos naturais e de enzimas (Tarman *et al.*, 2011). Os fungos derivados do ambiente marinho são adaptados à alta salinidade e condições extremas, desenvolvendo atributos que lhes conferem a capacidade de produzir compostos biologicamente ativos diferentes dos seus respectivos representantes que habitam o meio terrestre (Saleem *et al.*, 2007). As pesquisas baseadas em atividades biológicas de fungos derivados do ambiente marinho focam, geralmente, em suas atividades antibióticas e anticancerígenas, e todos os processos celulares metabólicos envolvidos nesses mecanismos de ação (Bugni e Ireland, 2004). Entretanto, recentemente, novas abordagens têm sido intensamente investigadas, tais como, descloração e desintoxicação de efluentes (Verma *et al.*, 2011), biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Passarini *et al.*, 2011), lignina (Chen *et al.*, 2011), pesticidas organoclorados (Ortega *et al.*, 2011) e polietilenos (Pramila e Ramesh, 2011).

Os fungos filamentosos *Aspergillus sydowii* GC12, *Penicillium raistrckii* CE16, *Penicillium miczynskii* GC5 e *Trichoderma* sp. Gc1 isolados do ambiente marinho e cultivados em água do mar artificial foram capazes de catalisar a hidrólise do benzil glicidil de éter (Martins *et al.*, 2011). No trabalho de Bonugli-Santos *et al.* (2010) resultados semelhantes foram observados em um estudo de produção de enzimas ligninolíticas pelos

fungos marinhos *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857, e *Mucor racemosus* CBMAI 847. Os fungos marinhos *Microsphaeropsis* sp., *Acremonium* sp. e *Westerdykella* sp. promoveram a degradação do pesticida piretróide esfenvalerato com formação de metabólitos como produtos da reação em 28 dias de incubação, em meio de cultura líquido, sob agitação orbital (Birolli, 2013).

As reações enzimáticas catalisadas por fungos marinhos podem ser realizadas em laboratório utilizando água do mar artificial. Estudos demonstram que bactérias e fungos marinhos cultivados em laboratório possuem exigências específicas de sais, principalmente, os íons sódio, potássio, magnésio e cloreto (Rocha *et al.*, 2009; Martins *et al.*, 2011).

Segundo Rateb e Ebel (2011) para uso em estudos de biotransformação e produção de metabólitos secundários, as linhagens de fungos marinhos têm sido isoladas, principalmente, a partir de substratos inorgânicos, plantas, invertebrados e vertebrados marinhos. Neste contexto, estudos sobre a produção enzimática por fungos filamentosos marinhos, são importantes para uma possível aplicação em metodologias de biorremediação de ambientes contaminados por poluentes orgânicos. Assim, o presente trabalho se propôs a explorar o potencial enzimático de biodegradação do pesticida PCP por linhagens de fungos, isoladas de um invertebrado marinho, a ascídia *Didemnum ligulum*, apresentando promissores resultados.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo o estudo da biodegradação do pesticida organoclorado pentaclorofenol (PCP) utilizando o sistema enzimático de fungos provenientes do ambiente marinho.

2.2 Objetivos específicos

- a) Selecionar fungos marinhos que sejam resistentes ao pesticida PCP e com potencial para biodegradação.
- b) Quantificar a biodegradação fúngica do PCP e de seus metabólitos de degradação por métodos cromatográficos.
- c) Propor uma rota de biodegradação para o pesticida PCP.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes, solventes e meios de cultivo

Os padrões analíticos PCP (grau de pureza 98%) e o pentacloronitrobenzeno (PCNB) (grau de pureza 99%) utilizados nos testes de biodegradação e como padrão interno na preparação da curva de calibração foram obtidos comercialmente da Sigma-Aldrich, Brasil. O procedimento para síntese do composto 2,3,4,6-tetracloroanisol está descrito na seção 3.8 e o seu precursor utilizado o 2,3,4,6-tetraclorofenol foi obtido da SUPELCO. Os sais utilizados para composição da água do mar artificial e o solvente acetato de etila utilizado na extração foram adquiridos das empresas Synth e Vetec. O acetato de etila grau cromatográfico da empresa Panreac. O extrato de malte e a peptona de farinha de soja utilizados para composição do meio de cultura foram da marca ACUMEDIA.

3.2 Coleta das amostras e cultivo dos fungos antes do isolamento

Os fungos marinhos foram coletados da ascídia marinha *Didemnum ligulum* de acordo com protocolo descrito em Kossuga *et al.* (2012). A coleta de amostras de ascídias foi efetuada na região de São Sebastião – Litoral Norte de São Paulo, em setembro de 2005, sob supervisão do professor R. G. S. Berlinck (Instituto de Química de São Carlos - USP). O material coletado foi acondicionado em sacos plásticos, contendo água do mar. Após a coleta, o material foi transferido para frascos esterilizados e encaminhados ao Centro de Biologia Marinha da Universidade de São Paulo (CEBIMar - USP) localizado também em São Sebastião, para o isolamento, purificação e inoculação dos fungos marinhos.

No laboratório, as amostras da ascídia coletadas foram submetidas à esterilização superficial por meio de sucessivas lavagens com solução $0,001 \text{ gL}^{-1}$ de HgCl_2 em 5% de etanol por 1 minuto, seguido de 3 lavagens com água do mar estéril (Newel, 1976). Em seguida, porções de aproximadamente 1 cm^2 foram retiradas da parte interna da ascídia com o auxílio de um bisturi. Esses fragmentos foram inoculados em placas de Petri contendo meio agarizado com água do mar artificial (ASW – Artificial Sea Water) e com o antibiótico de amplo espectro, rifampicina 0,3%, para inibir o crescimento bacteriano (Holler *et al.*, 2000). As placas foram incubadas durante 7 dias à temperatura de 25°C . Foram preparados oito meios de cultura (Tabela 3) com a finalidade de ampliar as possibilidades de obtenção de diferentes cepas que porventura estivessem associadas à ascídia.

Tabela 3: Composição dos meios de cultura para isolamento das linhagens de fungos marinhos (Kossuga *et al.*, 2012).

Meio de cultura	Componentes (L⁻¹ de ASW)
Ágar Malte 2% (M2%)	20 g de Extrato de Malte 15 g de Ágar e 1 L de ASW
Ágar Malte 3% (M3%)	30 g de Extrato de Malte 5 g de Peptona micológica 15 g de Ágar e 1 L de ASW
Ágar de Glicose, Peptona e Extrato de Levedura (GPY)	1 g de Glicose 0,5 g de Peptona de Soja 0,1 g de Extrato de Levedura 15 g de Ágar e 1 L de ASW
Ágar Cenoura e Batata (CB)	20 g de Batatas cozidas e esmagadas 20 g de Cenouras cozidas e esmagadas 20 g de Ágar e 1 L de ASW
Ágar Fubá (F)	42 g de fubá foram agitados em 500 mL de água destilada a 60°C por 12h, filtrados e o filtrado diluído em ASW até obter 1 L 15 g de Ágar
Ágar Aveia (A)	30 g de flocos de aveia foram fervidos em 500 mL de água destilada por 1h, filtrados e o filtrado diluído em ASW até obter 1 L 20 g de Ágar
Ágar Tubaki (T)	30 g de Glicose 0,5 g de Extrato de Levedura 1 g de Peptona 1 g de Fosfato de potássio dibásico 0,5 g de Sulfato de magnésio heptahidratado 0,01 g de Sulfato de ferro heptahidratado 15 g de Ágar e 1 L de ASW
Ágar Celulose (C)	10 g de Celulose 1 g de Extrato de Levedura 15 g de Ágar e 1 L de ASW

3.3 Isolamento, purificação e caracterização das linhagens

As placas foram examinadas periodicamente para verificar o crescimento de fungos filamentosos a partir dos fragmentos de ascídia inoculados nos diferentes meios de cultura. As linhagens isoladas foram submetidas à sucessivos repiques utilizando o método de esgotamento por estrias em placas de Petri, até que linhagens puras fossem obtidas. As culturas puras foram fotografadas, descritas morfológicamente e nomeadas com códigos que continham as iniciais DL, referente ao organismo a partir do qual as linhagens foram isoladas, a ascídia *Didemnum ligulum*, e a abreviação do meio de cultura utilizado no isolamento. A metodologia detalhada da coleta, isolamento e purificação foram descritos por Kossuga *et al.* (2012). Os procedimentos descritos nesta etapa foram realizados no Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva da UFSCar, São Carlos, Brasil.

Após o isolamento e a purificação das linhagens, essas foram depositadas no Laboratório de Ecologia de Micro-organismos Aquáticos da UFSCar, São Carlos, Brasil e preservadas utilizando duas técnicas de estocagem sob refrigeração: em água destilada, adaptada de Deshmukh (2003) e em ágar inclinado em tubos de ensaio (Figura 6). A reativação das linhagens no momento dos experimentos de cultivo foi feita com a remoção asséptica dos discos de micélio e transferência destes para os meios de cultura.

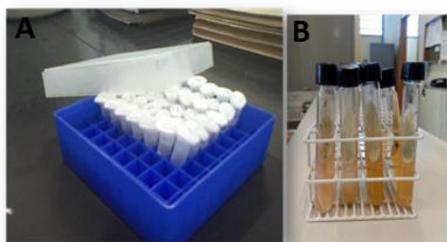


Figura 6: Técnicas de preservação das linhagens de fungos: A- Água destilada e B- ágar inclinado em tubos de ensaio (elaborado pelo autor).

3.4 Crescimento das linhagens em meio de cultura sólido

Foram utilizadas 15 linhagens de fungos (códigos: DL5A, DL6A, DL11A, DL2B, DL5B, DL1F, DL2F, DL5G, DL3M₂, DL1M₃, DL4M₃, DL6M₃, DL7M₃, DL8M₃ e DL9M₃).

Inicialmente os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultura sólido Malte 3% em água do mar artificial, com a seguinte composição (Kossuga *et al.*, 2012): extrato de malte (30,0 gL⁻¹), peptona de farinha de soja (3,0 gL⁻¹) e ágar bacteriológico

(20,0 gL⁻¹). O pH do meio foi ajustado para 8,0 com solução de KOH (0,1 molL⁻¹), sendo próximo ao pH encontrado no ambiente marinho (Kossuga *et al.*, 2012). Para composição da água do mar artificial (Menezes *et al.*, 2010) foram empregados: CaCl₂.2H₂O (1,36 gL⁻¹), MgCl₂.6H₂O (9,68 gL⁻¹), KCl (0,61 gL⁻¹), NaCl (30,0 gL⁻¹), Na₂HPO₄ (0,014 mgL⁻¹), Na₂SO₄ (3,47 gL⁻¹), NaHCO₃ (0,17 gL⁻¹), KBr (0,10 gL⁻¹), SrCl₂.6H₂O (0,04 gL⁻¹) e H₃BO₃ (0,03 gL⁻¹).

Após o preparo, todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos e, posteriormente, os micro-organismos foram manipulados em câmara asséptica, de acordo com o protocolo utilizado em microbiologia e aqueles já estabelecidos no laboratório (Ortega *et al.*, 2011).

3.5 Seleção das linhagens de fungos resistentes ao PCP, em meio de cultura sólido

Para cada uma das 15 linhagens de fungos foram preparadas placas de Petri, em triplicata, contendo meio de cultura sólido Malte 3%, sem o PCP (controle) e com o organoclorado em diferentes concentrações. Para preparação da solução estoque do pesticida foi utilizado acetato de etila como solvente na proporção de 5,0 mg de PCP / 100 µL de acetato de etila. As concentrações de PCP testadas nas placas contendo meio de cultura sólido foram de 10, 25, 30, 40 e 50 mgL⁻¹.

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave a 121°C por 20 minutos, resfriados à temperatura de aproximadamente 40-50°C e, em seguida, a solução estoque do pesticida foi adicionada, de acordo com a concentração desejada. A mistura foi homogeneizada e em seguida vertida nas respectivas placas de Petri. As inoculações das linhagens de fungos nas placas foram feitas por transferência dos micélios das culturas puras reativadas em meio Malte 3% após 5 dias de crescimento, com o auxílio de uma agulha de platina por um ponto de inserção ao centro da placa (Figura 7). As placas foram incubadas a 30°C e os crescimentos radiais dos fungos foram observados por 21 dias, medindo-se com uma régua graduada o diâmetro da colônia formada na superfície das placas, em intervalos de 7 dias de cultivo. A linhagem que apresentou o melhor crescimento radial foi selecionada para o cultivo em meio líquido para a quantificação da biodegradação e identificação de possíveis metabólitos oriundos dessa transformação.



Figura 7: Transferências dos micélios para placas contendo meio de cultura sólido Malte 3% na presença do PCP, em diferentes concentrações e placas controles (elaborado pelo autor).

3.6 Ensaio em meio de cultura líquido contendo PCP

Foram inoculados 10^5 esporos da linhagem fúngica selecionada em meio de cultura Malte 3% líquido. Para preparar a solução de esporos, as linhagens foram cultivadas em tubos de ensaio contendo 5 mL de meio de cultura sólido inclinado por 7 dias à temperatura de 25°C. Após o crescimento das culturas, 2 mL de Tween 80 a 1,0 % foram adicionados em cada tubo e, com o auxílio de uma alça, a superfície do ágar contendo as colônias de fungo foi levemente raspada. O micélio com os esporos foi transferido para um frasco de Erlenmeyer contendo pérolas de vidro previamente esterilizadas, e agitado por alguns minutos para a liberação dos esporos. Em seguida, o material foi filtrado em fibra de vidro em conjunto de filtração estéril. Após sucessivas lavagens com água destilada estéril para remoção completa do Tween 80, utilizou-se um hemociômetro (Câmara de Neubauer) para contagem dos esporos obtidos em suspensão.

Foram utilizados frascos de Erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 100 mL de meio de cultura líquido Malte 3%. O pH do meio foi ajustado para 8,0 e, em seguida, esterilizado em autoclave a 121°C por 20 minutos. Após o resfriamento, foram adicionados aos meios uma média de 10^5 esporos/mL da linhagem de fungo selecionada, que foram incubados em agitação orbital por 3 dias (30°C, 130 rpm).

Após inoculação e incubação por 3 dias, adicionou-se ao meio de cultura 2 mg do pesticida PCP dissolvido em acetato de etila, estabelecendo uma concentração inicial de 20 mgL^{-1} . As reações foram conduzidas em agitação orbital, mantendo as condições anteriores (30°C, 130 rpm), por período de 7, 14 e 21 dias. Todas as reações foram realizadas em triplicata (Figura 8).



Figura 8: Cultivo em meio de cultura líquido Malte 3%: A- As reações foram conduzidas em agitação orbital e B- Crescimento obtido após 21 dias de cultivo (elaborado pelo autor).

3.6.1 Ensaios controle

Concomitantemente às reações, também foram feitos experimentos controle para verificar a produção de metabólitos naturais do fungo, os quais foram cultivados nas mesmas condições, no entanto, na ausência do pesticida. Para verificar a estabilidade do pesticida e a degradação abiótica durante a incubação foram realizados o controle abiótico, contendo nos frascos Erlenmeyer de 250 mL apenas o meio de cultura à base de água do mar artificial e o pesticida. Após 21 dias de reação, foi feita a extração dos meios de cultura controle e as amostras analisadas por cromatografia a gás (CG-DIC). Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

3.7 Análise da biodegradação do pesticida PCP

3.7.1 Extração do pesticida PCP dos meios de cultura

Os ensaios foram feitos em triplicatas e interrompidos em 7, 14 e 21 dias. Para as análises cromatográficas as amostras foram fracionadas e extraídas de três formas diferentes, resultando em três tipos de análises: análise do caldo enzimático, análise do extrato micelial e análise do extrato total (caldo enzimático acrescido do extrato micelial).

Para a extração das amostras com análise do extrato total, o micélio formado foi filtrado a vácuo em funil de Büchner acoplado a um kitassato de 250 mL utilizando papel de filtro. Após essa primeira filtração, o caldo enzimático ficou reservado separadamente e o micélio úmido retido ao filtro foi transferido para um frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 30,0 mL de água destilada e 30,0 mL de acetato de etila e submetido à agitação magnética,

para quebra das células fúngicas, por 30 minutos. Em seguida, essas células foram submetidas a uma segunda filtração em funil de Büchner e o extrato micelial obtido adicionado ao caldo enzimático da primeira filtração. O extrato final foi extraído por partição líquido-líquido em três etapas com 30 mL de acetato de etila cada para separação da fase orgânica e da fase aquosa. Com o descarte da fase aquosa, à fase orgânica foi adicionado secante Na_2SO_4 anidro, filtrada e transferida para um balão de fundo redondo de 250 mL para evaporação do excesso de solvente em rotaevaporador. O conteúdo do balão foi ressuspensionado em acetato de etila grau cromatográfico obtendo um volume final de 1,0 mL. A Figura 9 apresenta na forma de fluxograma as etapas da extração para obtenção da amostra de análise total.

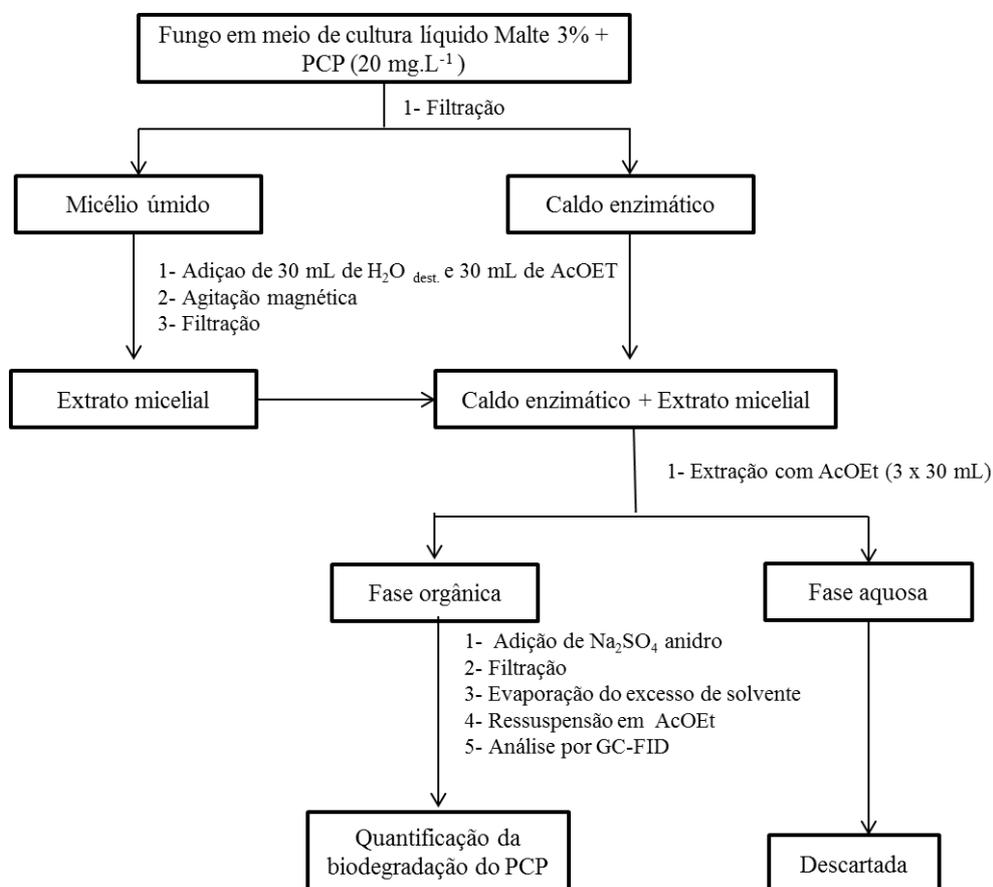


Figura 9: Fluxograma das etapas de extração das amostras com análise do extrato total (caldo enzimático acrescido do extrato micelial) das reações de biodegradação do PCP.

Para realização das análises separadas do caldo enzimático e do extrato micelial, as amostras do caldo enzimático foram preparadas através da extração apenas do caldo enzimático obtido com a primeira filtração, sem adição do extrato micelial. Para preparação

das amostras do extrato micelial, o caldo enzimático obtido com a primeira filtração foi descartado e a extração realizada a partir do extrato micelial obtido com a segunda filtração, após quebra das células fúngicas por agitação magnética. As extrações procederam de acordo com a descrita para as amostras com análise do extrato total. As Figuras 10 e 11 apresentam na forma de fluxograma, as etapas da extração para a obtenção da amostra de caldo enzimático e extrato micelial, respectivamente, descritas acima. Todas as reações foram extraídas e analisadas independentemente.

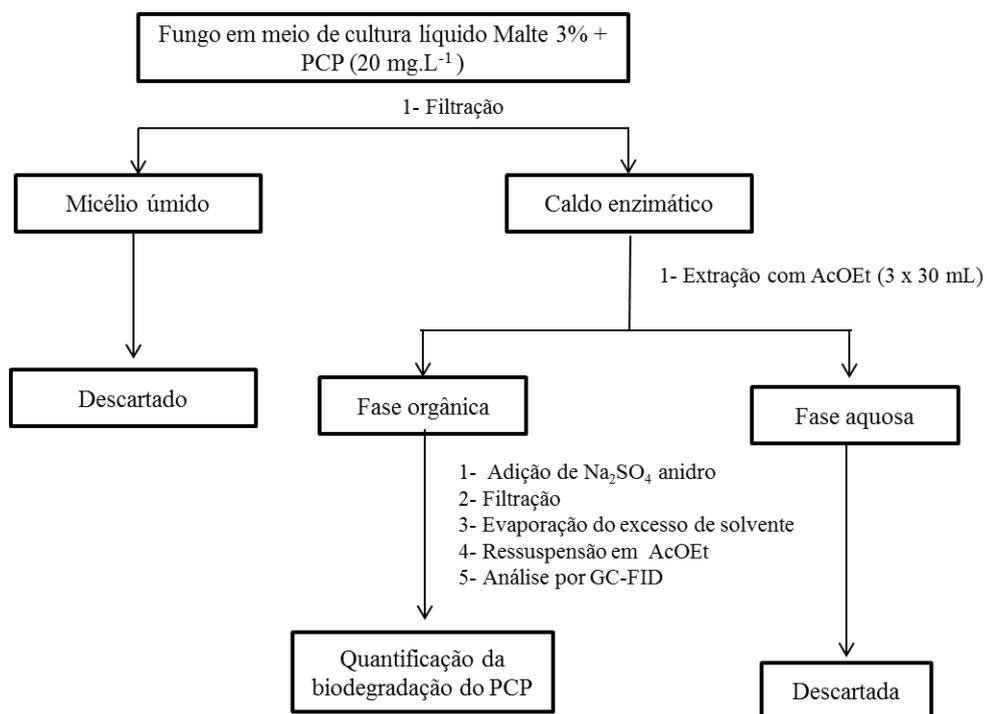


Figura 10: Fluxograma das etapas de extração do caldo enzimático das reações de biodegradação do PCP.

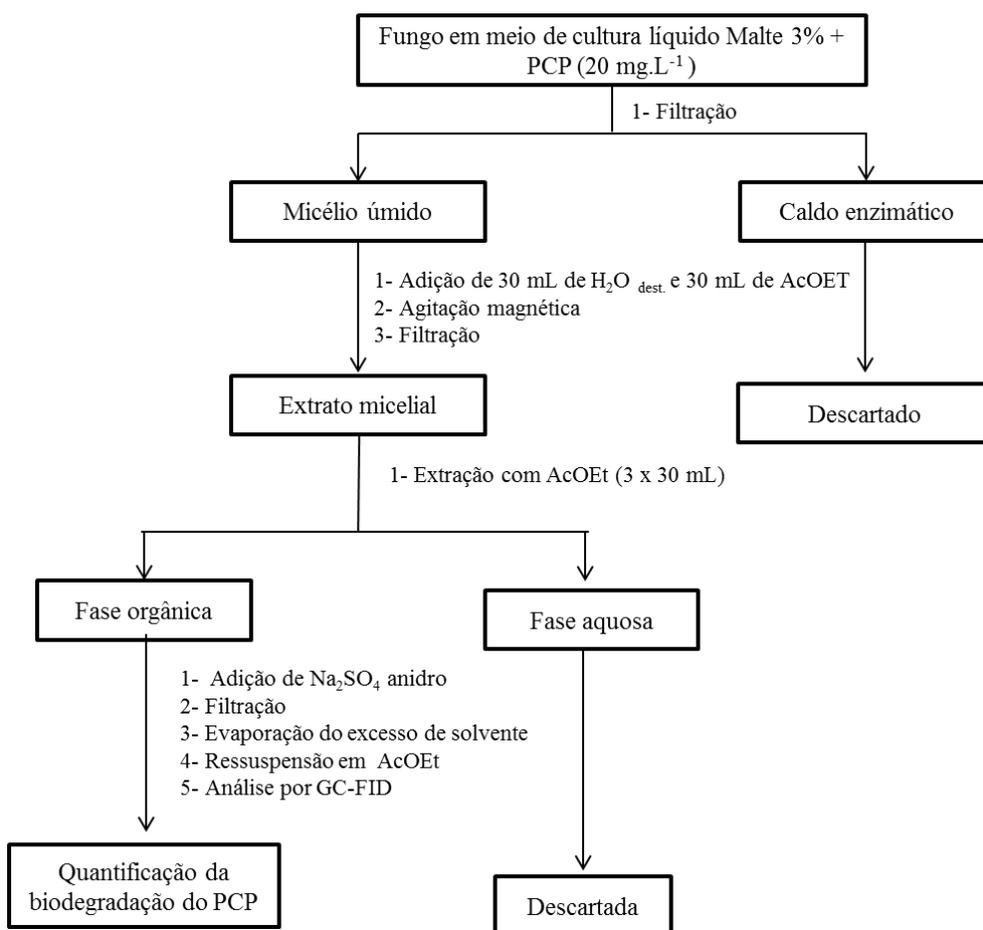


Figura 11: Fluxograma das etapas de extração do extrato micelial das reações de biodegradação do PCP.

3.7.2 Análises cromatográficas

3.7.2.1 Cromatografia gasosa com detector de ionização de chamas (CG-DIC)

Após as extrações serem realizadas, as amostras obtidas foram analisadas por cromatografia à gás com detector de ionização de chamas para quantificação do pesticida PCP remanescente. As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás Shimadzu/GC-2010 equipado com autoinjeter Shimadzu/AOC-20s. O forno do cromatógrafo foi equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (J&W Scientific, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). O gás de arraste utilizado foi o nitrogênio com um fluxo de 1,5 mLmin⁻¹. A temperatura do injeter utilizada foi de 250 °C e do detector foi de 290°C. A temperatura inicial da coluna foi de 100°C atingindo uma temperatura final de 290°C com uma taxa de aquecimento de 10°Cmin⁻¹. O tempo total de análise foi de 24 minutos. O tempo de retenção para o PCP e para o padrão interno PCNB foi de 14,2 e 14,4 min, respectivamente.

3.7.2.2 Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM)

Para identificação e detecção de possíveis metabólitos da biodegradação do pesticida PCP, as amostras foram submetidas às análises por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas. As análises cromatográficas foram feitas em um aparelho Shimadzu/GC-2010 equipado com autoinjeter Shimadzu/AOC-5000 e detector de massas (Shimadzu MS2010plus) em modo de impacto de elétrons (IE, 70eV). O forno do cromatógrafo foi equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 (J&W Scientific, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). O gás de arraste utilizado foi o hélio com um fluxo de coluna de 0,75 mLmin⁻¹. A temperatura do injetor utilizada foi de 250°C. A temperatura inicial da coluna foi de 90°C mantida durante 2 minutos, depois elevada a 150°C, na taxa de aquecimento de 6°Cmin⁻¹ e mantida nesta temperatura por 1 minuto. Posteriormente, a temperatura foi elevada até 180°C a 10°Cmin⁻¹ e mantida durante 4 minutos. Após isto a temperatura foi elevada até 280°C à taxa de aquecimento de 20°Cmin⁻¹ e mantida durante 15 minutos. O tempo total de análise foi de 40 minutos, injetando-se 2 μ L utilizando-se Split 1:10. A temperatura da fonte de íon foi de 200°C e a da interface de 270°C, os íons foram monitorados de 4 a 40 minutos na faixa entre m/z 40-500.

3.7.3 Curva analítica para quantificação do pesticida

Para a determinação das concentrações do PCP remanescente foi obtida uma curva analítica utilizando o método do padrão interno.

Preparou-se 5 soluções do pesticida, em triplicatas, as quais foram analisadas por cromatografia gasosa (CG-DIC), com concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mgmL⁻¹ de PCP. O pesticida foi dissolvido em acetato de etila grau cromatográfico e utilizou-se como padrão interno o PCNB com concentração de 2,0 mgmL⁻¹. Com os valores das áreas dos picos dos cromatogramas, foi possível estabelecer a razão das concentrações e das áreas, e assim, obter um gráfico (Figura 12) com a equação da reta ($y = a + bx$) e um coeficiente de correlação. O coeficiente de correlação é um parâmetro que afere a qualidade da curva obtida, sendo que valores mais próximos de 1 apresentam uma menor dispersão do conjunto de pontos experimentais (Aragão *et al.*, 2009).

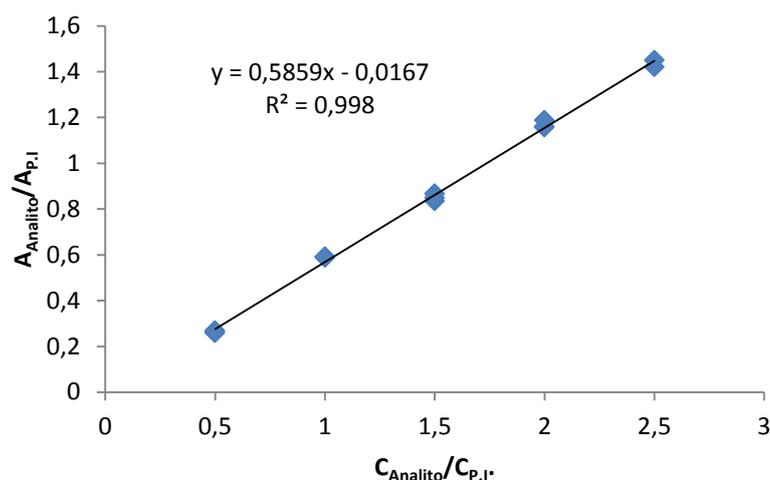


Figura 12: Curva analítica para quantificação do pesticida PCP.

Os valores de **a** e **b** foram utilizados para calcular a concentração do PCP pela equação:

$$C_{\text{PCP}} = \frac{C_{\text{PCNB}} (y - a)}{b}$$

sendo:

a = coeficiente linear,

b = coeficiente angular,

x = razão das concentrações ($C_{\text{PCP}}/C_{\text{PCNB}}$)

y = razão das áreas que foi utilizada para quantificação do analito nas reações enzimáticas ($A_{\text{PCP}}/A_{\text{PCNB}}$)

Foi realizada uma validação analítica simplificada do método de determinação do PCP, onde foi obtido, em quintuplicata, para a concentração de $1,25 \text{ mgmL}^{-1}$ (ponto central da curva analítica) o valor de $1,28 \pm 0,15 \text{ mgmL}^{-1}$ que representa uma exatidão de 102% e uma precisão de 11,7%. Para o limite de quantificação de $0,5 \text{ mgmL}^{-1}$ foi obtido o valor de $0,61 \pm 0,04 \text{ mgmL}^{-1}$ que representa uma exatidão de 122% e uma precisão de 6,5%.

3.8 Síntese dos compostos pentacloroanisol e 2,3,4,6-tetracloroanisol

O procedimento para síntese dos compostos pentacloroanisol (PCA) e 2,3,4,6-tetracloroanisol (2,3,4,6-TeCA) foi realizado de acordo com o protocolo descrito em Alberico *et al.* (2007), com modificações. Esta etapa de preparação dos compostos foi realizada pelo MSc. Irlon Maciel Ferreira no Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP) no

Laboratório de Química Orgânica e Biocatálise sob a supervisão do Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto.

O PCA foi sintetizado por meio de uma reação de metilação do composto PCP (Figura 13).

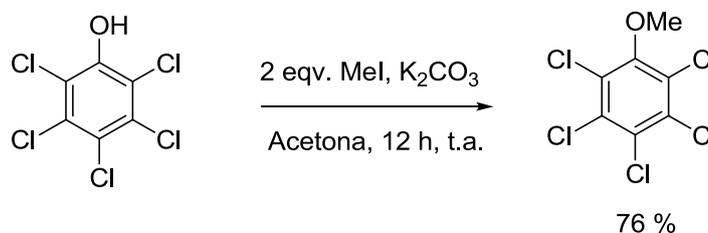


Figura 13: Reação de metilação do composto PCP para formação do metabólito PCA.

Em um frasco Erlenmeyer com capacidade de 100 mL adicionou-se 1,0 mmol do PCP (0,265 g), 2 mmol de K_2CO_3 (0,276 g) em 20 mL de acetona e 2,0 mmol de iodeto de metila (0,284 g) mantidos em agitação e temperatura ambiente por 24h. A extração foi feita com 10 mL da solução saturada de NaCl, 5 mL de HCl (1% v/v) e acetato de etila (3 x 50 mL). O material formado foi purificado por cromatografia em coluna (sílica gel, *n*-hexano/acetato de etila = 9:1). Foi obtido um sólido branco em 76 % de rendimento (0,2117 g). O produto obtido foi caracterizado por RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3). δ (ppm): 3,95 (3H, OMe) e RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3). δ (ppm): 60,9; 138,3; 129,4; 131,8; 152,6 (Anexos).

O 2,3,4,6-TeCA foi produzido por meio de uma reação de metilação do composto tetraclorofenol (Figura 14).

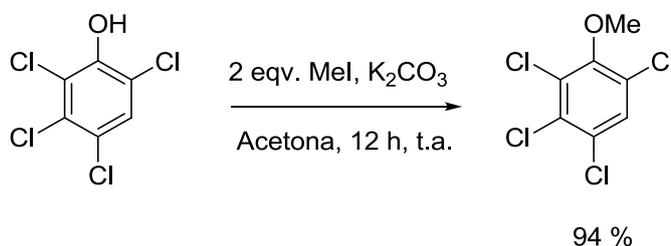


Figura 14: Reação de metilação do composto tetraclorofenol para formação do metabólito 2,3,4,6-TeCA.

Em um frasco Erlenmeyer com capacidade de 50 mL adicionou 0,25 mmol do tetraclorofenol (0,060 g), 1 mmol de K_2CO_3 (0,137 g) em 20 mL de acetona e 0,75 mmol de iodeto de metila (0,33 mL) mantidos em agitação à temperatura ambiente por 24h. A extração

foi realizada com adição de 10 mL de um solução saturada de NaCl, 5 mL de HCl (1% v/v) e acetato de etila (3 x 50 mL). O material foi purificado por cromatografia em coluna (sílica gel, *n*-hexano/acetato de etila = 9:1). Foi obtido um sólido branco com 94 % de rendimento (0,0583 g) (Figura 15). O produto obtido foi caracterizado por RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3). δ (ppm): 3,90 (3H, s), 7,46 (1H, s) e RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3). δ (ppm): 60,8; 127,7; 128,8; 129,2; 130,2; 131,1; 152,3 (Anexos).

3.9 Análises da biodegradação dos metabólitos PCA e 2,3,4,6-TeCA pela linhagem DL2B

A linhagem DL2B foi selecionada para os testes de biodegradação dos metabólitos PCA e 2,3,4,6-TeCA. Para o cultivo do micro-organismo foram preparados frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 100 mL de meio de cultura Malte 3% líquido (pH 8,0), previamente esterilizado. Os inóculos do fungo foram adicionados ao meio de cultura por meio de uma suspensão de esporos (10^5 esporos/mL). As reações foram conduzidas em agitação orbital (130 rpm), em temperatura de 30°C por 3 dias, para promover o crescimento do fungo. Após esse período em 9 frascos Erlenmeyer com o cultivo foram adicionados 2 mg do metabólito PCA dissolvidos em acetato de etila (20 mgL^{-1}) e, em outros 9 frascos, 2 mg do metabólito TeCA também dissolvidos em acetato de etila (20 mgL^{-1}). Estes foram novamente mantidos sob agitação orbital (30°C, 130 rpm).

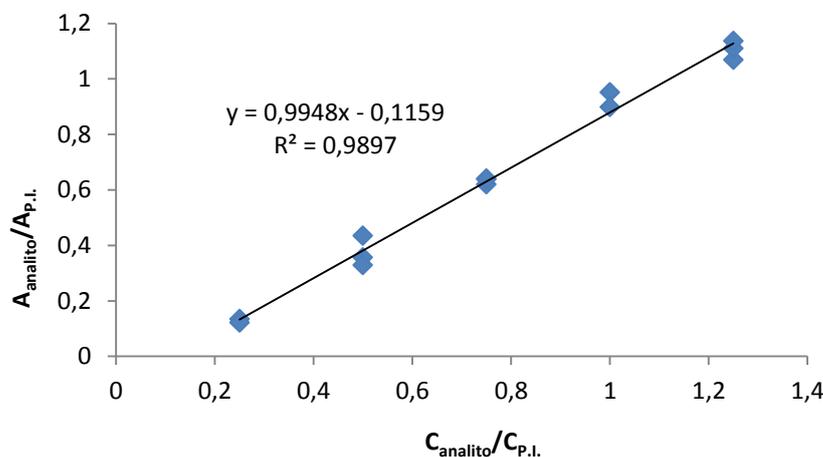
Os experimentos foram realizados em triplicatas e cessados com 7, 14 e 21 dias de reação. O método de extração prosseguiu conforme o realizado na seção 3.7.1, para obtenção das amostras de análise total. Para quantificação dos metabólitos remanescentes em cada reação e identificação de possíveis outros subsequentes metabólitos produzidos, as amostras foram submetidas às análises cromatográficas mantendo as mesmas condições descritas acima (seções 3.7.2.1 e 3.7.2.2).

3.9.1 Curva analítica para quantificação do metabólito PCA

A curva analítica para quantificação do metabólito PCA foram preparadas através da técnica de padronização interna, seguindo os mesmos procedimentos realizados para o PCP (seção 3.7.3). Foram produzidas soluções padrões do PCA com concentrações de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mgmL^{-1} , dissolvidos em acetato de etila (grau cromatográfico). As soluções foram analisadas por cromatografia gasosa (CG-DIC) gerando um gráfico com a equação da reta

(Figura 16) para serem utilizados na quantificação das reações de biodegradação desse metabólito.

Figura 15: Curva analítica para quantificação do metabólito PCA.



3.10 Identificação das linhagens que apresentaram os melhores resultados na triagem em meio de cultura sólido na presença do pesticida PCP

As linhagens que melhor se desenvolveram em meio de cultura sólido, na presença do PCP, obtendo crescimento radial diferencial e significativo, foram caracterizadas por técnicas moleculares, seguindo os procedimentos descritos no trabalho de Rodrigues, (2013). Os isolados foram sequenciados usando primers da região ITS do rDNA.

Os fungos foram cultivados em meio de cultura líquido Malte 3% e o DNA genômico das culturas puras foram extraídos utilizando o protocolo descrito por Da Silva *et al.* (2008). Em seguida, foi realizada 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') por reações de polimerase em cadeia (O'Donnell, 1993). A amplificação ocorreu como descrito por Bonugli-Santos *et al.* (2010), com uma desnaturação inicial por 5 minutos à temperatura de 94 °C, 30 ciclos de 30 segundos à temperatura de 94 °C, 30 segundos à temperatura de 55 °C e 1 minuto à temperatura de 72 °C, 10 minutos à temperatura de 72 °C, e, finalmente, resfriamento à temperatura de 4°C.

Os produtos de PCR dos DNA amplificados foram encaminhados para sequenciamento Sanger, no Laboratório Especial de Micologia (LEMI) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). As sequências foram alinhadas com cepas referência do

banco de dados do CBS-Fungal Biodiversity Centre utilizando a ferramenta Blast. Os resultados foram confirmados utilizando características macro e micromorfológicas.

Estas análises foram realizadas no Laboratório Especial de Micologia da Escola Paulista de Medicina (LEMI) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Campus São Paulo, pela Dra. Sarah Gonçalves, sob supervisão da Profa. Suzan Pantaroro de Vasconcellos.

3.11 Descarte de resíduos

As linhagens fúngicas cultivadas na ausência do pesticida foram autoclavadas a 121°C por 20 minutos e depois descartadas. Aquelas que foram cultivadas em meios de cultura contendo o pesticida foram autoclavadas e acondicionadas em frascos devidamente etiquetados e, posteriormente, encaminhados ao Laboratório de Resíduos Químicos (LRQ) da Universidade de São Paulo campus São Carlos para descarte.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção das linhagens de fungos resistentes ao pesticida PCP

Inicialmente foram isoladas 15 linhagens de fungos marinhos da ascídia *Didemnum Ligulum* codificadas em: DL5A, DL6A, DL11A, DL2B, DL5B, DL1F, DL2F, DL5G, DL3M₂, DL1M₃, DL4M₃, DL6M₃, DL7M₃, DL8M₃ e DL9M₃ (Figura 16) as quais foram submetidas a uma triagem para verificação da resistência frente ao PCP em meio de cultura sólido.

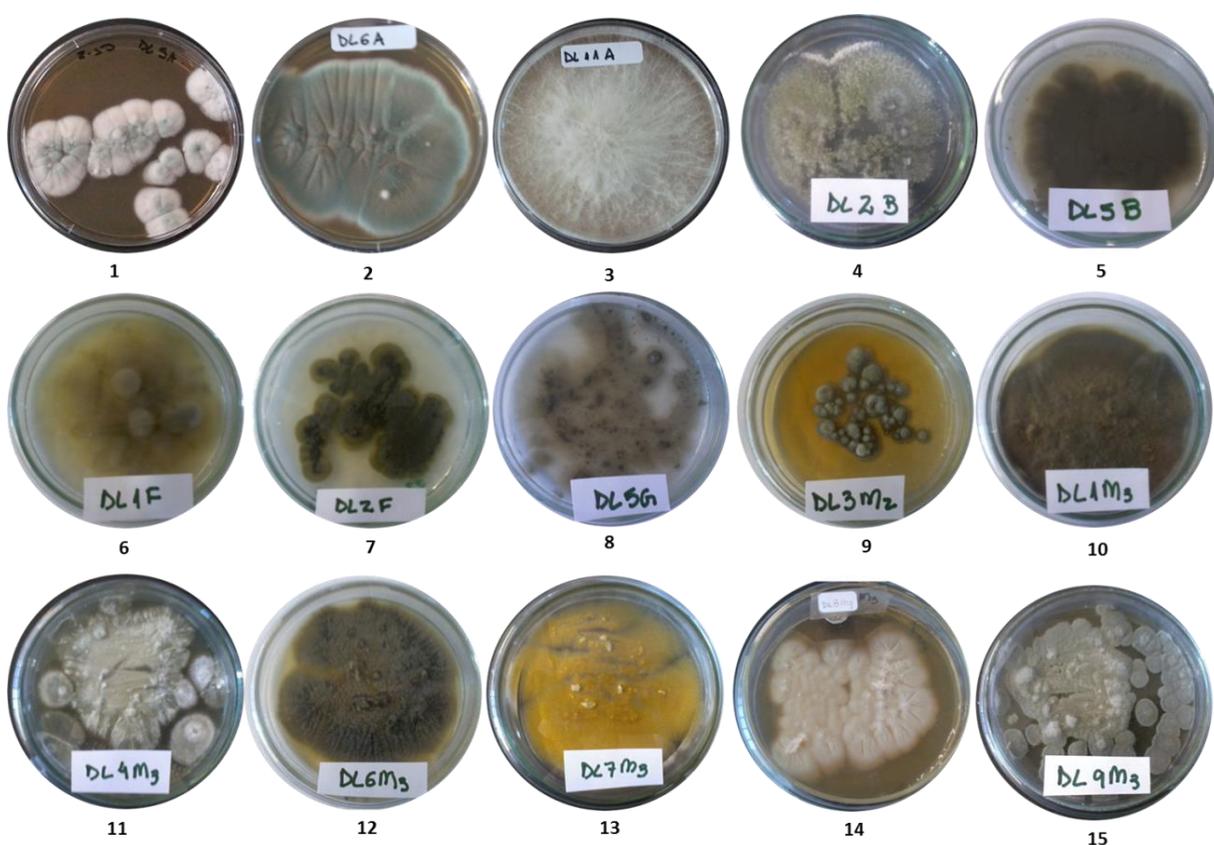


Figura 16: Linhagens puras isoladas da ascídia *Didemnum Ligulum*: 1- DL5A; 2- DL6A; 3- DL11A; 4- DL2B; 5- DL5B; 6- DL1F; 7- DL2F; 8- DL5G; 9- DL3M₂; 10- DL1M₃; 11- DL4M₃; 12- DL6M₃; 13- DL7M₃; 14- DL8M₃; 15- DL9M₃ (elaborado pelo autor).

Os diâmetros médios de crescimento obtidos com os ensaios em 7, 14 e 21 dias de incubação em meio de cultura sólido Malte 3% na presença do PCP estão apresentados nas Tabelas 4, 5 e 6, respectivamente.

Em 7 dias de cultivo todas as placas controle apresentaram um bom crescimento das

linhagens, mostrando que o meio de cultura Malte 3 % foi apropriado para o cultivo dos fungos marinhos, como sugerido por Kjer *et al.* (2010). Segundo Kossuga *et al.* (2012) quando se deseja obter extratos bioativos de micro-organismos, o Malte 3% é recomendado por ser um meio isento de misturas de gorduras complexas. Ao término de 21 dias de experimento, 60% das linhagens cresceram por toda superfície de placa nos controles, atingindo 8,0 cm de diâmetro de colônia, que equivale ao tamanho do diâmetro das placas de Petri utilizadas no cultivo.

As linhagens DL1M₃, DL4M₃, DL6M₃, DL7M₃, DL8M₃ e DL9M₃ não conseguiram desenvolver em nenhuma das concentrações de PCP testadas, apresentando baixo potencial de resistência e adaptação na presença desse organoclorado. O fato de esses micro-organismos serem oriundos de ambientes sem histórico prévio de contaminação por esse composto pode ter ocasionado a inibição do crescimento dessas linhagens.

Tabela 4: Crescimento médio^b das linhagens de fungos marinhos em 7 dias na presença de concentrações crescentes de PCP em meio de cultura sólido de extrato de malte 3%.

Fungos marinhos	Diâmetro de crescimento (cm) em 7 dias					
	Placa controle (sem o PCP)	Placas com o PCP				
		10 mg.mL ⁻¹	25 mg.mL ⁻¹	30 mg.mL ⁻¹	40 mg.mL ⁻¹	50 mg.mL ⁻¹
DL1M ₃	4,2	0	0	0	0	0
DL4M ₃	1,5	0	0	0	0	0
DL6M ₃	1,9	0	0	0	0	0
DL7M ₃	0,9	0	0	0	0	0
DL8M ₃	0,6	0	0	0	0	0
DL9M ₃	3,9	0	0	0	0	0
DL1F	1,9	0,2	0	0	0	0
DL2F	2,1	0,4	0	0	0	0
DL3M ₂	2,5	0,5	0	0	0	0
DL5B	1,6	0,6	0	0	0	0
DL5G	1,5	0,9	0	0	0	0
DL6A	5,1	1,8	0,7	0	0	0
DL5A	3,1	1,6	1,0	0,1	0	0
DL11A	6,6	2,2	0,8	0,7	0	0
DL2B	7,8	4,1	3,0	1,8	0,7	0,9

^bDesvio padrão mínimo de 0,07 e máximo de 0,4

Tabela 5: Crescimento médio^c das linhagens de fungos marinhos em 14 dias na presença de concentrações crescentes de PCP em meio de cultura sólido de extrato de malte 3%.

Fungos marinhos	Diâmetro de crescimento (cm) em 14 dias					
	Placa controle (sem o PCP)	Placas com o PCP				
		10 mg.mL ⁻¹	25 mg.mL ⁻¹	30 mg.mL ⁻¹	40 mg.mL ⁻¹	50 mg.mL ⁻¹
DL1M ₃	6,6	0	0	0	0	0
DL4M ₃	3,6	0	0	0	0	0
DL6M ₃	4,2	0	0	0	0	0
DL7M ₃	3,1	0	0	0	0	0
DL8M ₃	1,5	0	0	0	0	0
DL9M ₃	5,4	0	0	0	0	0
DL1F	2,6	0,4	0	0	0	0
DL2F	4,3	1,2	0	0	0	0
DL3M ₂	4,3	1,3	0	0	0	0
DL5B	3,1	1,5	0	0	0	0
DL5G	4,8	3,4	0	0	0	0
DL6A	6,7	3,6	1,7	0,1	0	0
DL5A	4,8	3,0	1,6	0,3	0	0
DL11A	8,0	4,9	1,8	1,6	0	0
DL2B	8,0	6,6	5,9	2,7	1,4	2,1

^cDesvio padrão mínimo de 0 e máximo de 0,2

Tabela 6: Crescimento médio^d das linhagens de fungos marinhos em 21 dias na presença de concentrações crescentes de PCP em meio de cultura sólido de extrato de malte 3%.

Fungos marinhos	Diâmetro de crescimento (cm) em 21 dias					
	Placa controle (sem o PCP)	Placas com o PCP				
		10 mg.mL ⁻¹	25 mg.mL ⁻¹	30 mg.mL ⁻¹	40 mg.mL ⁻¹	50 mg.mL ⁻¹
DL1M ₃	8,0	0	0	0	0	0
DL4M ₃	6,5	0	0	0	0	0
DL6M ₃	8,0	0	0	0	0	0
DL7M ₃	6,2	0	0	0	0	0
DL8M ₃	2,8	0	0	0	0	0
DL9M ₃	7,1	0	0	0	0	0
DL1F	6,1	0,9	0	0	0	0
DL2F	8,0	3,0	0	0	0	0
DL3M ₂	8,0	3,2	0	0	0	0
DL5B	8,0	3,3	0	0	0	0
DL5G	8,0	6,3	0	0	0	0
DL6A	8,0	5,4	2,5	0,2	0	0
DL5A	6,6	4,5	3,2	0,4	0	0
DL11A	8,0	7,2	3,1	2,8	0	0
DL2B	8,0	7,6	7,2	3,8	2,2	3,5

^dDesvio padrão mínimo de 0,1 e máximo de 0,5

Como é possível observar com os dados das Tabelas 4-6 acima, ao longo de todo o experimento, algumas linhagens não cresceram e dentre as que se desenvolveram, o crescimento obtido foi inversamente proporcional ao aumento da concentração do PCP no meio de cultivo. Esses resultados indicam que o PCP provoca um efeito tóxico nesses micro-organismos. No entanto, o fato de a maioria das linhagens submetidas ao experimento apresentarem crescimento em pelo menos uma das concentrações avaliadas, indica que apesar do efeito tóxico exercido pelo composto, esses fungos marinhos conseguem desenvolver alguma resistência podendo ser capazes de degradar o pesticida em determinadas concentrações. Segundo Bonugli-Santos *et al.* (2012) e Ortega *et al.* (2011), fungos de origem marinha tendem a ser resistentes e podem ser utilizados em técnicas de biorremediação por apresentarem enzimas adaptadas à ambientes complexos de diversificadas taxas de pressão, salinidade e temperatura. São capazes de desenvolver atividades fisiológicas e metabólicas

únicas com potencial degradativo de pesticidas organoclorados (Ortega *et al.*, 2011).

Os melhores resultados foram obtidos pelos fungos DL6A, DL5A, DL11A e DL2B, que foram os únicos capazes de crescerem em concentrações maiores do que 10 mgL^{-1} . As linhagens DL6A (Figura 17) e DL5A (Figura 18) cresceram nas três concentrações iniciais, mas os tamanhos dos diâmetros das colônias formadas foram bem inferiores em comparação as linhagens DL11A (Figura 19) e DL2B (Figura 20).

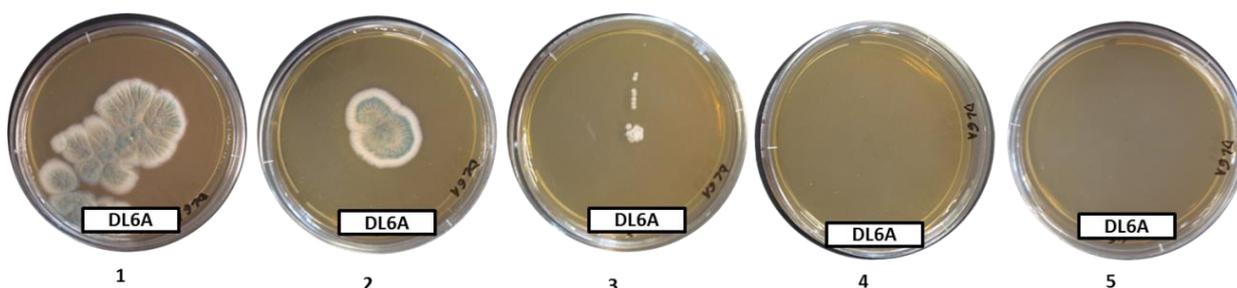


Figura 17: Cultivo da linhagem DL6A em 21 dias nas concentrações de: 1- 10 ; 2- 25 ; 3- 30 ; 4- 40 e 5- 50 mgL^{-1} de PCP/placa.

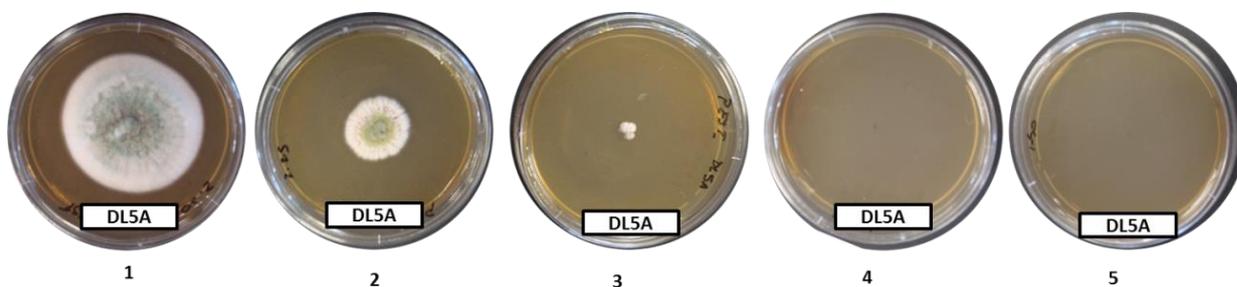


Figura 18: Cultivo da linhagem DL5A em 21 dias nas concentrações de: 1- 10 ; 2- 25 ; 3- 30 ; 4- 40 e 5- 50 mgL^{-1} de PCP/placa.

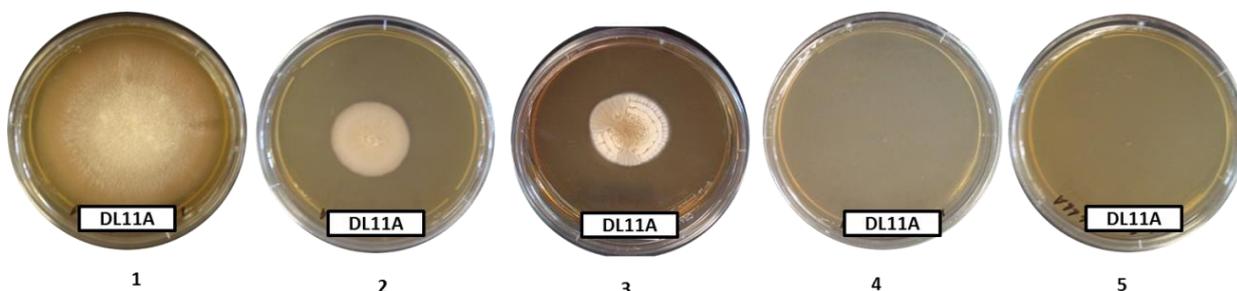


Figura 19: Cultivo da linhagem DL11A em 21 dias nas concentrações de: 1- 10 ; 2- 25 ; 3- 30 ; 4- 40 e 5- 50 mgL^{-1} de PCP/placa.

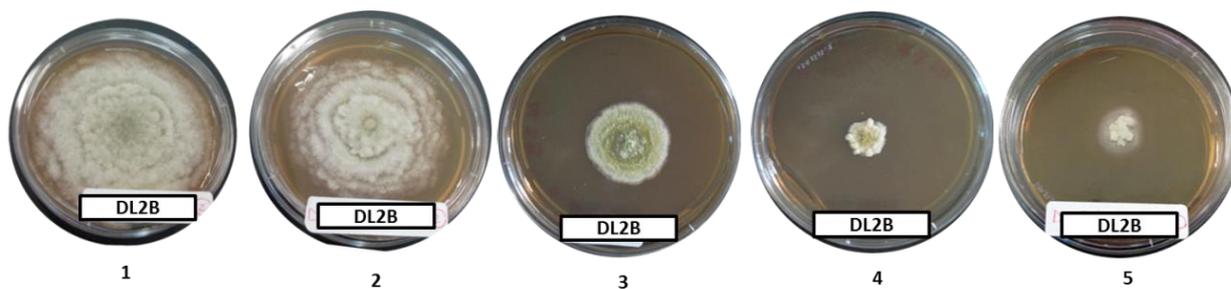


Figura 20: Cultivo da linhagem DL2B em 21 dias nas concentrações de 1- 10; 2- 25; 3- 30; 4- 40 e 5- 50 mgL⁻¹ de PCP/placa.

Alguns micro-organismos costumam seguir o padrão de crescimento observado no experimento, de modo a ter menor crescimento na presença de determinados compostos químicos. Entretanto, isso não foi observado com a linhagem DL2B, que apresentou o melhor resultado nos testes em meio sólido, com ótimo crescimento tanto na presença, como ausência do pesticida. Na maior concentração do pesticida (50 mg L⁻¹), com um relativo aumento no tamanho do diâmetro da colônia (Figura 20/n°5), sugerindo possuir alta resistência à toxicidade, capacidade adaptativa e potencial de crescimento na presença do PCP, mesmo em concentrações elevadas. No trabalho de Creswell e Curl (1982) resultados semelhantes foram alcançados ao ser testado o fungo *Trichoderma harzianum* frente aos herbicidas prometrina, ciazina e norflurazon. Neste trabalho, o crescimento fúngico aumentou significativamente na dose mais alta do herbicida norflurazon. Segundo Tomasini *et al.* (2001) os fungos precisam de um período inicial de adaptação em condições de alta toxicidade e, se apresentarem resistência, nos períodos finais do cultivo tendem a crescer mais. Se um grupo de micro-organismos consegue se proliferar eficientemente em ambientes com alta concentração de determinados poluentes, é um indício de que esses micro-organismos possuem um sistema adaptado para metabolização desses contaminantes (Martins *et al.*, 2003). Isso ocorre, pois o xenobiótico passa a ser utilizado também como fonte de nutriente, especialmente de carbono, nitrogênio e fósforo.

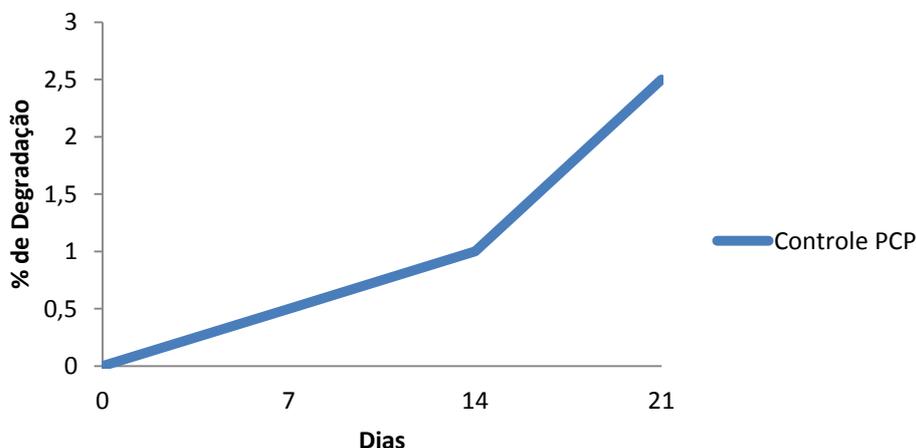
4.2 Degradação do pesticida PCP

4.2.1 Degradação abiótica do PCP

O controle abiótico composto por meio de cultura líquido Malte 3% à base de água do

mar artificial e com concentração de 20 mgL^{-1} de PCP mostrou baixo índice de degradação do pesticida ao longo do tempo de experimento, conforme mostra o gráfico abaixo (Figura 21).

Figura 21: Porcentagem de PCP degradado no controle abiótico em 7, 14 e 21 dias de incubação.



Após 21 dias de incubação do meio na presença do pesticida (sem o inóculo), foram detectados $97,7 \pm 0,8\%$ do PCP inicial, demonstrando que a degradação abiótica não intervém significativamente nos resultados finais da degradação do pesticida pelo fungo. Segundo Crosby (1981) a remoção do PCP por processo abióticos de volatilização e fotólise são muito lentos e demorados comparados a demais compostos recalcitrantes. Alta recuperação de PCP em ensaios controles também foram relatados por Tomasini *et al.* (2001), adquirindo 100% do pesticida inicial adicionado ao meio após 7 dias de incubação. Uma variação de 3% a 37% na redução abiótica do PCP, em 60 dias de incubação, foi observada em ensaios controle com substratos sólidos não inoculados por Ballaminut e Matheus (2007), atribuindo as maiores reduções encontradas à presença de fungos mitosporicos contaminantes observados em algumas das réplicas do controle. Matheus *et al.* (2000) em estudos com *Psilocybe castanella* mostraram uma redução abiótica de até 13% nos tratamentos controle sem fungo.

A maioria dos trabalhos da literatura que visam avaliar a degradação do pesticida PCP por micro-organismos utilizam fungos terrestres, principalmente os degradadores de lignina. Alguns autores relacionam as perdas abióticas significativas dos ensaios controle a fatores como adsorção de poluentes à matriz sólida (Matheus, 2000; Seradati *et al.*, 2003), ao pH ácido do solo e ao tempo de incubação. A alta recuperação do composto nos ensaios controle deste trabalho pode ter sido atribuída ao tempo de incubação do experimento, um tempo relativamente médio comparado aos outros estudos, ao meio de cultura em estado líquido, ausente de substâncias sólidas evitando a adsorção do composto e ao pH básico do meio.

4.2.2 Cultivo em meio líquido do fungo selecionado para quantificação da biodegradação do pesticida PCP

A linhagem DL2B apresentou resultados significativos nos experimentos em meio sólido obtendo crescimento em todas as concentrações de PCP avaliadas. Por isso, essa linhagem foi selecionada para realização dos experimentos seguintes de degradação e quantificação do pesticida PCP em meio de cultura líquido Malte 3%.

4.2.3 Avaliação da biodegradação do pesticida PCP pela linhagem DL2B em meio de cultura líquido

Os extratos obtidos com 7, 14 e 21 dias de reação do fungo na presença do PCP foram analisados por CG-DIC. Os cromatogramas dos extratos obtidos após o crescimento da linhagem DL2B em 7, 14 e 21 dias estão apresentados nas Figuras 22, 23 e 24, respectivamente. O sinal em 14,2 minutos corresponde ao analito PCP e em 14,4 minutos ao padrão interno PCNB. Os demais picos presentes nos cromatogramas são compostos não identificados, provavelmente oriundos do metabolismo natural dos fungos.

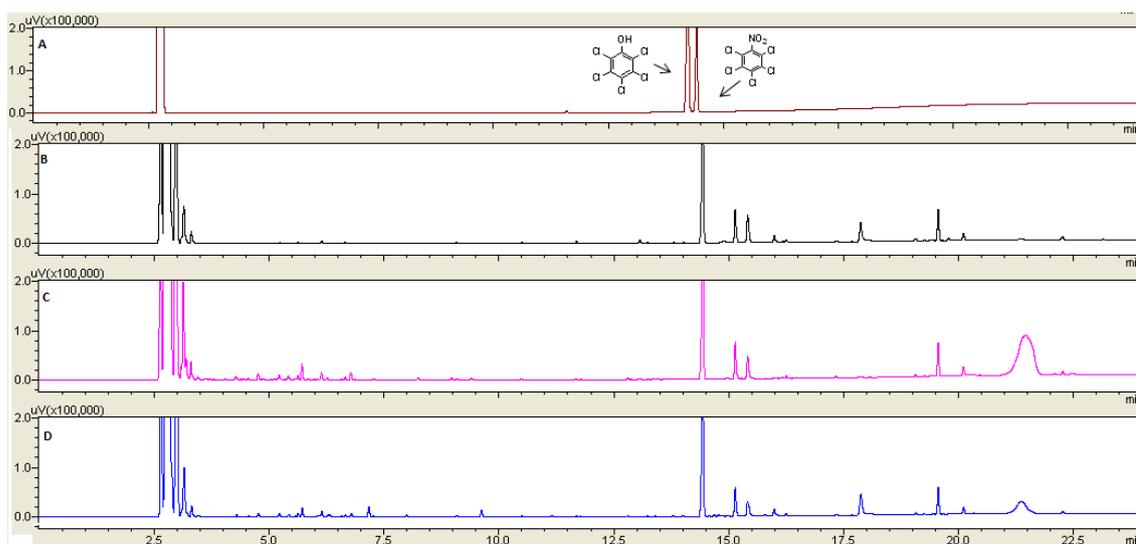


Figura 22: Cromatogramas obtidos por CG-DIC para a reação de biodegradação do pesticida PCP com a linhagem DL2B, em 7 dias: A- padrão PCP e PCNB com tempos de retenção de 14,2 e 14,4 minutos, respectivamente; B- extrato micelial; C- caldo enzimático; D- extrato total.

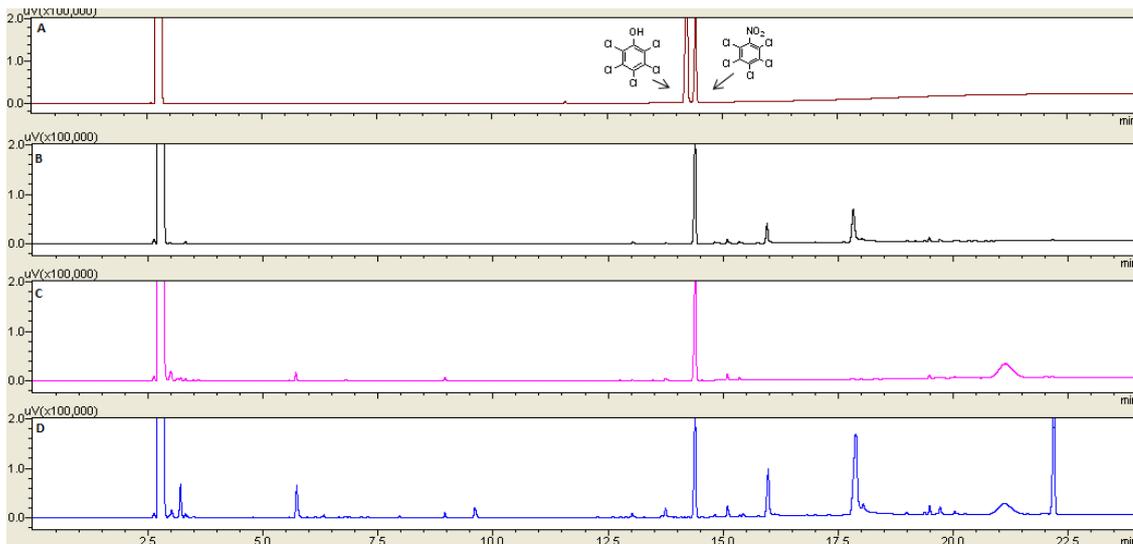


Figura 23: Cromatogramas obtidos por CG-DIC para a reação de biodegradação do pesticida PCP com a linhagem DL2B, em 14 dias: A- padrão PCP e PCNB com tempos de retenção de 14,2 e 14,4 minutos, respectivamente; B- extrato micelial; C- caldo enzimático; D- extrato total

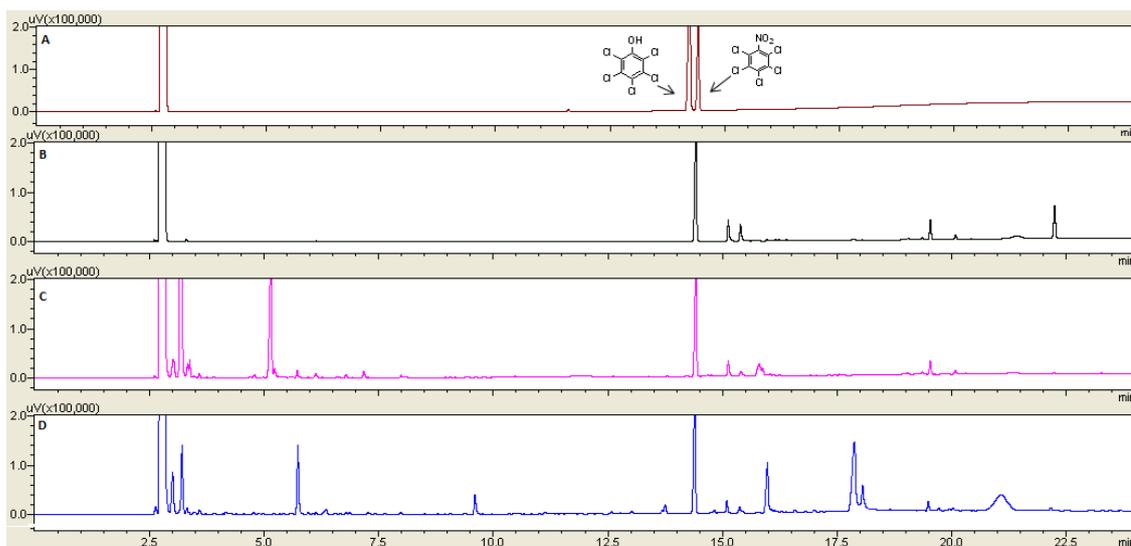


Figura 24: Cromatogramas obtidos por CG-DIC para a reação de biodegradação do pesticida PCP com a linhagem DL2B, em 21 dias: A- padrão PCP e PCNB com tempos de retenção de 14,2 e 14,4 minutos, respectivamente; B- extrato micelial; C- caldo enzimático; D- extrato total.

Por meio das análises dos cromatogramas verificou-se que, após 7 dias de reação, já não é observado resíduos do PCP nas amostras em níveis detectáveis, assim como em 14 e 21 dias. Devido a isso, não foi possível calcular com o auxílio da curva analítica os valores parciais de PCP degradado ao longo do tempo de incubação. Para estimar o tempo exato em que ocorreu a biodegradação total do pesticida e os valores sequenciais de decaimento das

concentrações ao longo dos dias, seria necessário a incubação do fungo com o composto em períodos de tempo inferiores a 7 dias, mantendo as mesmas condições experimentais (30°C, 130 rpm).

Embora as reações sejam realizadas em triplicata e com o inóculo padronizado em 10^5 esporos/mL, o padrão do crescimento fúngico pode variar de um experimento para o outro, pois os cultivos ocorrem de forma independente e são considerados como reações únicas. Além desses, outros fatores também podem ter interferido no crescimento que resultou em algumas diferenças entre os sinais dos cromatogramas. Porém, os sinais dos cromatogramas referentes à biotransformação do pesticida, que é o mais importante neste caso, foi sempre observada de forma muito eficiente.

A ausência do PCP logo após 7 dias de incubação em todas as amostras, principalmente no extrato micelilal, é um indício de que o PCP foi absorvido pelo fungo e biodegradado, sugerindo que esse fungo tem um alto potencial de biodegradação. Essa linhagem de fungo provavelmente possui um aparato enzimático com características que propiciam a degradação de compostos organoclorados.

O metabolismo enzimático responsável pela transformação de xenobióticos ocorre através de várias reações bioquímicas que estão inter-relacionadas, sendo essas tanto de natureza oxidativa quanto redutora, nas quais o produto formado em uma reação pode servir de substrato para outra reação (Thomas, 2003). Há fungos que possuem em seu metabolismo enzimas celulares e extracelulares conhecidas por serem capazes de degradar o PCP, tais como fenoloxidasas e celobiose desidrogenases, que atuam simultaneamente com enzimas ligninolíticas nesse processo (Hallberg *et al.*, 2003; Montiel *et al.*, 2004).

O fungo da podridão branca é muito utilizado na degradação do PCP, função geralmente atribuída às atividades enzimáticas ligninolíticas (Pointing, 2001; Okeke *et al.*, 2007), as quais são desempenhadas principalmente por quatro enzimas extracelulares: lignina peroxidase (LiP), manganês peroxidase, (MnP), versátil peroxidase (VP) e lacase (Lac) (Maciel *et al.*, 2012), que atuam através da geração de radicais livres, considerado um meio eficiente para alcançar os seus substratos (Coelho-Moreira *et al.*, 2013). Estudos também sugerem o envolvimento da enzima intracelular P450 monoxigenase na hidroxilação inicial do PCP por *Phlebia brevispora* (Kamei *et al.*, 2006). Enzimas com esse perfil e potencial de degradação também podem ser encontradas em fungos marinhos, como mostra Bonugli-Santos *et al.* (2010), que isolaram fungos marinhos associados a cnidários produtores de enzimas ligninolíticas em resposta as condições nutritivas e de salinidade.

Ortega *et al.* (2011) analisaram a biodegradação do pesticida organoclorado DDD (Dicloro Difenil Dicloroetano), em diferentes condições e concentrações, pelos fungos marinhos *Trichoderma* sp., *Bionectria* sp., *Penicillium miczynskii* e *Aspergillus sydowii* obtendo bons resultados. Embora a micologia marinha seja uma ciência relativamente recente e, portanto pouco se conhece sobre a biologia de fungos marinhos, os poucos resultados obtidos são significativos e ressaltam o potencial desses micro-organismos em biodiversidade, bioprospecção de compostos ativos e habilidades degradadoras de contaminantes (Passarini *et al.*, 2011).

Para confirmação do bom desempenho da linhagem selecionada e de sua eficiência como agente degradador do pesticida PCP outras análises foram necessárias para verificar a presença de compostos metabólitos que fossem procedentes da transformação do pesticida pelo fungo.

4.3 Identificação de produtos da biodegradação do PCP

As amostras foram inicialmente submetidas às análises em CG-EM para identificação de possíveis metabólitos originados a partir da degradação do PCP. Os espectros de massas obtidos foram comparados e identificados com auxílio da base de dados da biblioteca de espectros de massa NIST/05.

Em todas as amostras foram identificados picos referentes a esteroides e ácidos graxos, que provavelmente, são derivados do metabolismo fúngico. Nas análises das reações do caldo enzimático não foi identificado nenhum metabólito resultante da biodegradação do PCP. As análises das amostras referentes às reações do extrato micelial (Figura 25) e análises totais detectaram a formação dos compostos pentacloroanisol (PCA) e 2,3,4,6-tetracloroanisol (2,3,4,6-TeCA).

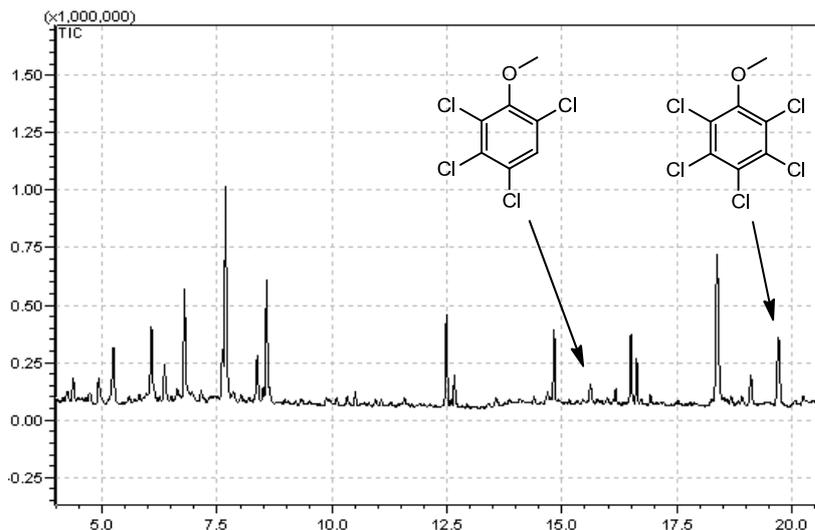


Figura 25: Cromatograma de íons obtido por meio das análises em CG-EM da reação de biodegradação do PCP em 7 dias, referente a extração do extrato micelial.

O metabólito PCA é um composto considerado produto da biodegradação do PCP (Laugero *et al.*, 1997), o qual apresentou similaridade de 96% de acordo com a base de dados da biblioteca de espectros de massas NIST/05 (Figura 26). O PCA é um dos metabólitos intermediários da degradação do PCP identificado com maior frequência. O PCP foi conjugado formando o PCA por uma reação de metilação no grupo hidroxila (-OH), o qual é transformado em um grupo metóxi (-OCH₃) (Rubilar *et al.*, 2007).

A metilação do PCP com a consequente formação de PCA também foi observada por outros autores (Lin *et al.*, 1990; Lamar e Dietrich, 1992; Ruttimann-Johnson e Lamar, 1997; Rigot e Matsumura, 2002; Ning e Wang, 2012). D'Angelo e Reddy (2000) analisaram a biotransformação do PCP em condições aeróbias em oito diferentes tipos de solo e, em sete deles, depois de uma semana de tratamento com PCP, foi detectada a formação de PCA como produto da metilação, que, após 30 dias de incubação decaiu em mais de 75%, sugerindo que, provavelmente, há outros processos de mineralização envolvidos na transformação do PCA.

Uma redução de praticamente 100% da concentração inicial de PCP em meio de cultura contendo extrato de malte foi obtida pelo fungo *Trichoderma virgatum* em 8 dias, de acordo com os resultados apresentados por Cserjesi e Johnson (1971), que detectaram também a presença do PCA e sua subsequente queda no decorrer dos dias, deduzindo que a metilação pode ser o primeiro passo da degradação do PCP. De acordo com Ning e Wang (2012) a metilação e a descloração são as duas principais vias de biotransformação do PCP que contribuem para a detoxificação de ambientes contaminados.

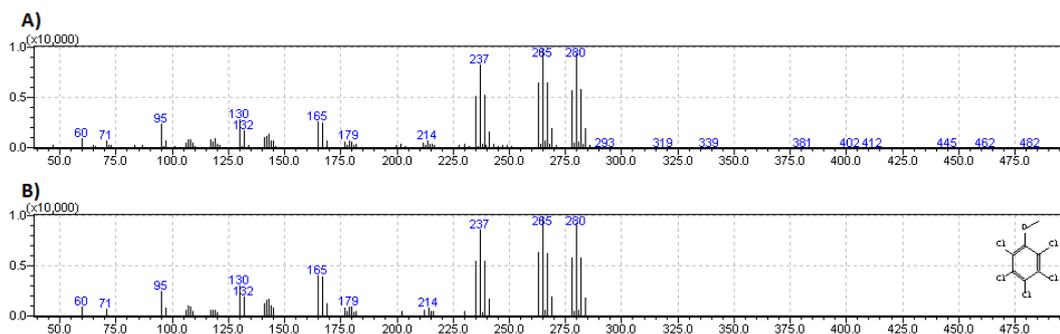


Figura 26: Espectro de massas obtido por meio da análise do PCA em CG-EM: A- extrato micelial; B- Padrão da biblioteca de espectros de massa NIST/05.

Na literatura é possível encontrar elucidações de diversas rotas de biodegradação do PCP por fungos (Colpley, 2000; Reddy e Gold, 2000; Rubilar *et al.*, 2007; Field e Sierra-Alvarez, 2008; Yadid *et al.*, 2013), que produzem tanto metabólitos intermediários em comum, como diferentes, os quais variam de acordo com a espécie e, conseqüentemente, as enzimas envolvidas em cada reação. Fiel e Sierra-Alvarez (2008) apresentam em sua revisão um tópico sobre o metabolismo de degradação aeróbica de diferentes espécies de fungos e seus respectivos produtos da biodegradação. Dentre os produtos intermediários formados, os mais frequentes são o PCA, tetraclorobenzoquinona (TCBQ) e tetraclorohidroquinona (TCHQ) (Colpley, 2000; Reddy e Gold, 2000; Rubilar *et al.*, 2007; Field e Sierra-Alvarez, 2008; Yadid *et al.*, 2013). No entanto, na biodegradação do presente trabalho não foi observada a formação da TCBQ e TCHQ, assim como, nenhum dos demais metabólitos citados nos trabalhos referenciados acima.

Além do PCA, foi observado também o composto 2,3,4,6-tetracloroanisol (2,3,4,6-TeCA) o qual foi identificado por análises em CG-EM (Figura 27). É importante ressaltar a existência de isômeros para o tetracloroanisol, a descloração pode ocorrer na posição *orto*, *meta* ou *para* do anel aromático. Pelas análises utilizando o CG-EM observou-se o espectro de massas com similaridade de 90% para a formação do 2,3,4,6-TeCA, resultante da descloração na posição *meta*. Para os compostos 2,3,4,5- TeCA e 2,3,5,6-TeCA obteve similaridade de 85% para ambos, em comparação com a base de dados da NIST/05. A produção do 2,3,4,6-TeCA pode ser resultado da degradação do PCA que, possivelmente, sofreu uma reação de desalogenação, ocorrendo a descloração do composto e formando o 2,3,4,6-TeCA. Os compostos PCA e 2,3,4,6-TeCA foram detectadas por análises em cromatografia gasosa no trabalho de Tuomela *et al.* (1999) como produtos da biodegradação do PCP em solos pelo fungo *Trametes versicolor*, porém, a rota biodegradativa e as

sequências de reações dessas transformações não foram expostas. Portanto, estudos posteriores ainda são necessários para a elucidação da rota biodegradativa completa do PCP.

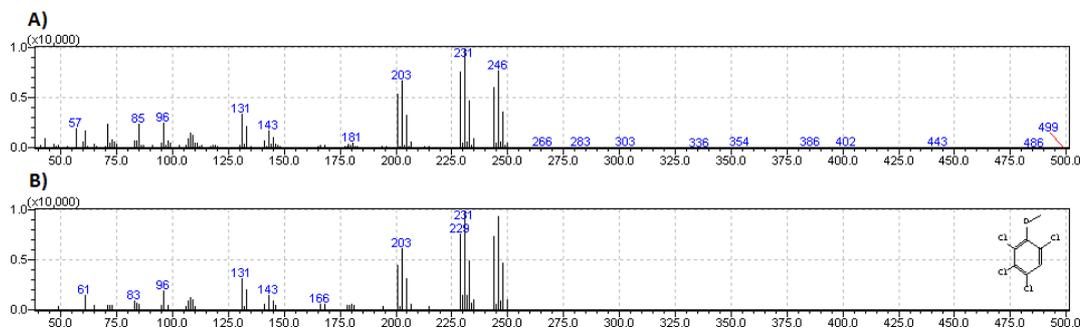


Figura 27: Espectro de massas obtido por meio da análise do 2,3,4,6-TeCA em CG-EM: A- extrato micelial; B- Padrão da biblioteca de espectros de massa NIST/05.

Para verificar a presença dos sinais referentes aos metabólitos PCA e 2,3,4,6-TeCA nas reações de biodegradação do PCP, os padrões analíticos desses dois compostos foram analisados por CG-DIC e os seus respectivos tempos de retenção foram determinados. O cromatograma obtido foi comparado com os das reações de biodegradação do PCP, das amostras referentes à extração total, em 7, 14 e 21 dias (Figura 28), para visualização da formação dos metabólitos. O sinal em 8,2 minutos corresponde ao 2,3,4,6-TeCA, o sinal em 13,7 minutos ao PCA e o sinal em 14,4 ao padrão interno PCNB. Como já discutidos anteriormente, os padrões PCA e 2,3,4,6-TeCA foram sintetizados no decorrer deste trabalho.

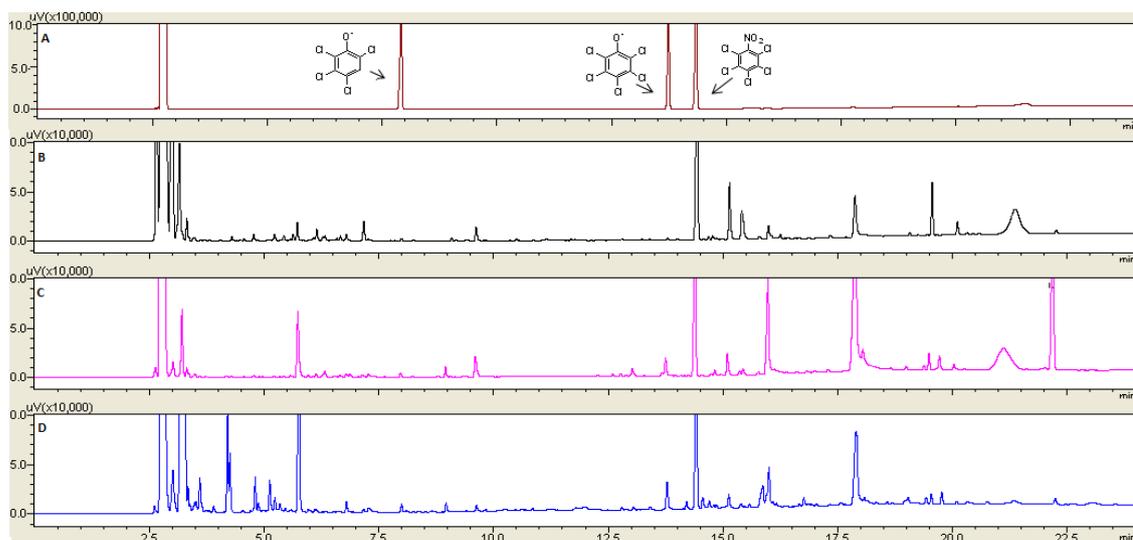


Figura 28: Cromatogramas obtidos por CG-DIC para a reação de biodegradação do pesticida PCP com a linhagem DL2B: A- padrões analíticos 2,3,4,6-TeCA (8,2 minutos), PCA (13,7 minutos) e PCNB (14,4 minutos); B- reação em 7 dias; C- reação em 14 dias; D- reação em 21 dias.

É possível observar que no mesmo tempo de retenção do padrão analítico do PCA, a partir de 14 dias, começou a ficar evidente um novo pico, o qual não está tão aparente em 7 dias e que, posteriormente, apresenta-se mais intenso ao final de 21 dias. Esta crescente formação desse sinal em um tempo de retenção equivalente ao do padrão PCA é um indício da formação desse metabólito durante a reação de biodegradação do PCP com aumento da concentração do PCA ao longo do tempo. Por meio da curva analítica obtida para o PCA foi possível quantificar a concentração do composto nas reações (Tabela 7), e os resultados comprovam a formação crescente do metabólito durante o período de 21 dias.

Tabela 7: Quantificação do PCA por CG-DIC nas reações de biodegradação do PCP em 7, 14 e 21 dias de incubação.

Tempo (dias)	Concentração do PCA (mgL ⁻¹)
7	0,28 ± 0,03
14	0,37 ± 0,11
21	0,45 ± 0,05

A formação do 2,3,4,6-TeCA também foi observada na Figura 28. Analisando os sinais nos cromatogramas (B, C e D) que apresentam tempos de retenção equivalentes ao tempo de retenção do padrão analítico 2,3,4,6-TeCA (cromatograma A) foi possível notar a formação de um pequeno sinal crescente durante o período de experimento. No entanto, a intensidade do pico formado não foi tão evidenciado em comparação ao PCA, indicando que o metabólito 2,3,4,6-TeCA está presente nas amostras, mas em concentrações inferiores em relação ao PCA. O aumento da concentração do 2,3,4,6-TeCA nas reações de biodegradação do PCP foi comprovada por monitoramento do íon m/z 231 (pico base) em análises em CG-EM (Figura 29).

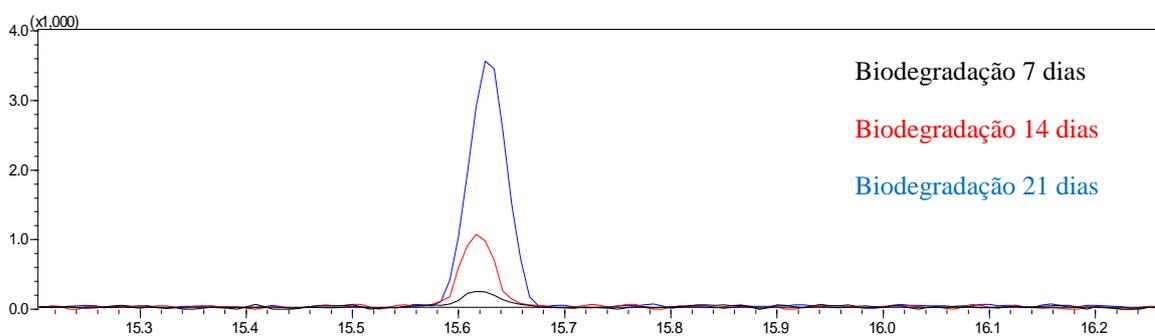


Figura 29: Aumento da concentração de 2,3,4,6-TeCA na degradação do PCP ao longo de 7, 14 e 21 dias evidenciado pelo aumento da intensidade do íon m/z 231 em análise de CG-EM.

4.4 Degradação dos metabólito PCA e 2,3,4,6-TeCA

4.4.1 Cultivo em meio líquido da linhagem DL2B para avaliação da biodegradação do metabólito PCA

Verificar a possibilidade da biotransformação de metabólitos é importante porque esses compostos podem ser tóxicos aos organismos e ao meio ambiente. Em tratamentos com biodegradação de compostos persistentes, como o PCP, quando produtos perigosos estão sendo tratados, é muito importante determinar os produtos intermediários e finais da degradação e, posteriormente, a degradabilidade de cada um (Suegara *et al.*, 2005). Já que os pesticidas são tóxicos, é necessário saber se os produtos de degradação são também tóxicos e se serão posteriormente degradados a compostos menos agressivos aos seres vivos (Kaneekar, 2004).

Os cloroanisóis são originados por meio da degradação de moléculas cloradas empregues como pesticidas ou também podem ser diretamente sintetizados a partir de fenóis livres presentes na água que podem reagir com o cloro (Riboulet *et al.*, 2002). Os cloroanisóis são considerados um contaminante ambiental, em especial, o pentacloroanisol por ser mais volátil e mais lipofílico do que o PCP, portanto, é mais suscetível a bioacumulação (McBain *et al.*, 1995).

O PCA foi o principal metabólito de degradação do PCP identificado nesse estudo. Para averiguar a capacidade de degradação do PCA pelo fungo e procurar identificar novos metabólitos formados nessa sequência de reações, a linhagem DL2B foi submetida ao cultivo em meio líquido Malte 3% contendo 20 mgL^{-1} do metabólito PCA. O composto PCA utilizado nesses experimentos foi obtido por meio de uma reação de metilação do PCP pelo procedimento descrito na seção 3.8 de materiais e métodos.

As concentrações de PCA remanescente nas reações de 7, 14 e 21 dias foram determinadas quantitativamente por cromatografia gasosa utilizando uma curva analítica com o método de padrão interno. A Tabela 8 apresenta as concentrações de PCA restante em cada reação e as porcentagens de composto degradado ao longo de 21 dias de experimento.

Tabela 8: Quantificação do PCA por CG-DIC após biodegradação em 7, 14 e 21 dias de incubação (30°C, 130 rpm).

Tempo (dias)	Concentração do PCA (mgL^{-1})	% de PCA degradado
7	$2 \pm 0,1$	0
14	$1,82 \pm 0,01$	9
21	$1,54 \pm 0 12$	23

Como é possível observar com os dados obtidos o fungo DL2B não foi tão eficiente na degradação do PCA como foi para o PCP em 7 dias, mas apresentou uma redução de 23% da concentração inicial do metabólito ao fim de 21 dias de experimento. O PCA é considerado um produto tóxico e, portanto a sua degradação por micro-organismos é mais lenta. Em seu trabalho McGrath e Singleton (2000) relataram que a atividade da enzima desidrogenase de fungos presentes em solos contaminados com PCP diminui depois de algumas semanas de incubação e passa a degradar o composto e seus metabólitos mais lentamente, atribuindo esse efeito a toxicidade dos produtos da degradação. Neste contexto, Rubilar *et al.* (2007)

demonstraram que o principal metabólito da degradação PCP no solo é o PCA, no entanto, este composto é subsequentemente degradado por micro-organismos do solo ao longo do tempo.

De acordo com Butler *et al.* (2012) a degradação completa de cloroanisóis não ocorre totalmente em condições aeróbias, seu estudo mostra que maiores quantidades desses compostos são degradadas inicialmente por micro-organismos aeróbios, mas para que ocorra a transformação final dos compostos é necessário o uso de micro-organismos do solo selecionados em condições anaeróbias. Laine e Jorgensen (1996) constataram que cloroanisóis como produtos da biotransformação de clorofenóis são rapidamente mineralizados quando se mistura ao solo contaminado outras espécies de micro-organismos ativos e recurso de carbono adicional.

O tempo de duração dos experimentos dos trabalhos citados acima foi no mínimo de 6 semanas (McGrath e Singleton, 2000), os demais permaneceram por mais tempo. A capacidade da linhagem DL2B de degradar o composto PCA em 21 dias confirma o bom desempenho dessa linhagem na biodegradação de compostos orgânicos poluentes.

A Figura 30 apresenta o cromatograma dos padrões analíticos de PCA e PCNB, e os cromatogramas referentes as reações de biodegradação do PCA, obtidos por CG-EM. Com a análise comparativa dos cromatogramas é possível observar o decaimento da concentração de PCA em 7, 14 e 21 dias de reação. O sinal em 13,7 minutos corresponde PCA e em 14,4 minutos ao padrão interno PCNB.

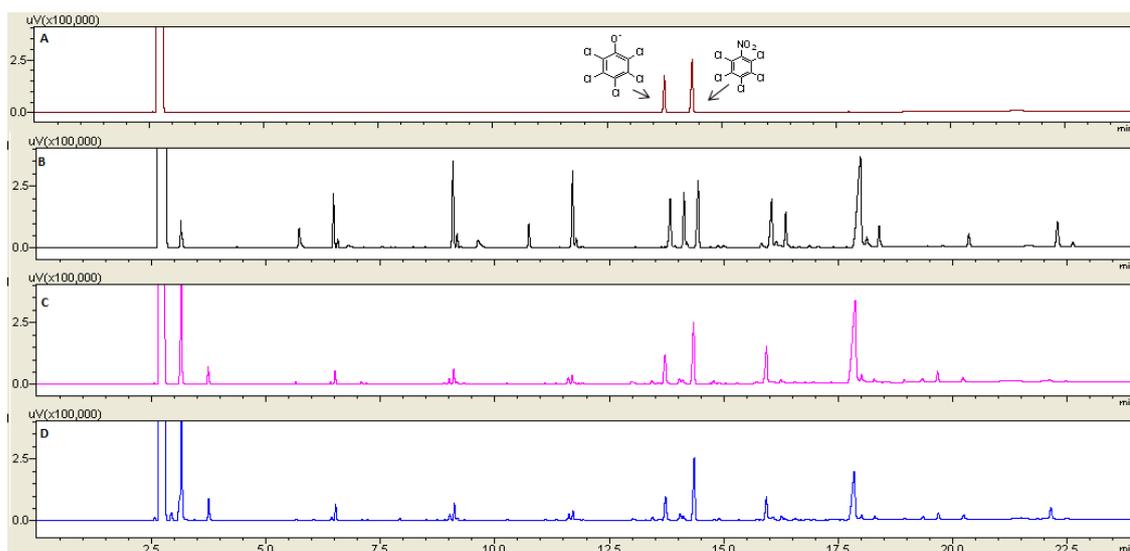


Figura 30: Cromatogramas obtidos por CG-DIC para a reação de biodegradação do metabólito PCA com a linhagem DL2B, em: A- padrão PCA e PCNB com tempos de retenção de 13,7 e 14,4 minutos, respectivamente; B- reação em 7 dias; C- reação em 14 dias; D- reação em 21 dias.

4.4.2 Cultivo em meio líquido da linhagem DL2B para avaliação da biodegradação do metabólito 2,3,4,6-TeCA

O metabólito 2,3,4,6-TeCA também foi identificado por CG-EM como produto da biodegradação do PCP. Sendo assim, 2 mg desse composto sintético foram adicionados ao meio de cultura líquido Malte 3% contendo o fungo DL2B previamente cultivado, obtendo uma concentração inicial de 20 mgL^{-1} do metabólito, para verificar o potencial de degradação dessa linhagem. O composto 2,3,4,6-TeCA utilizado nesses experimentos foi sintetizado de acordo com o procedimento descrito na seção 3.8 de materiais e métodos. O cultivo foi realizado em agitação orbital (30°C , 130 rpm) e após 7, 14 e 21 dias de reação, o metabólito 2,3,4,6-TeCA (8,2 minutos) e o padrão interno PCNB (11,6 minutos) foram analisados por CG-DIC (Figura 31).

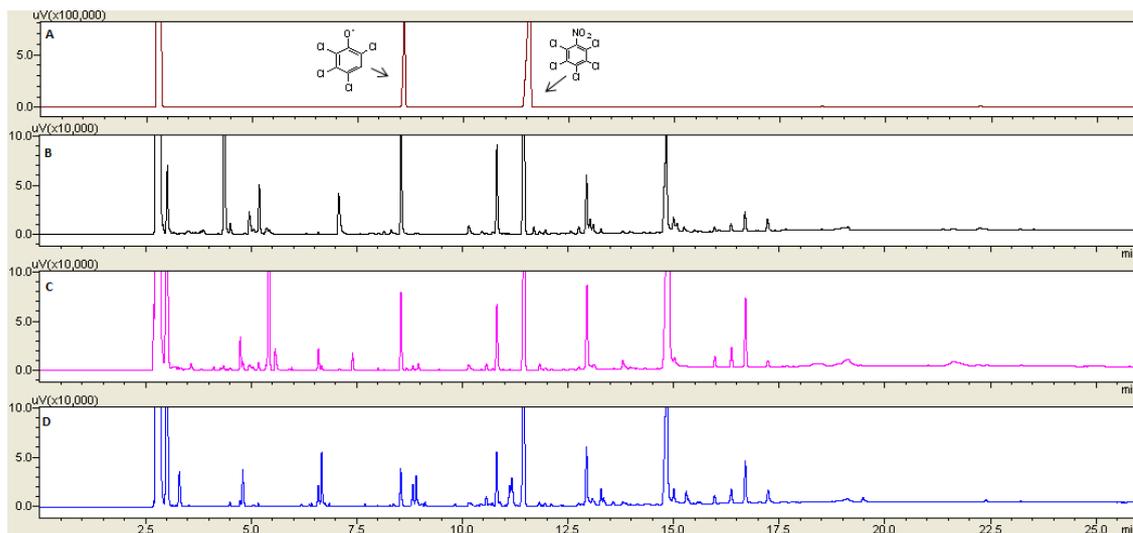


Figura 31: Cromatogramas obtidos por CG-DIC para a reação de biodegradação do metabólito 2,3,4,6-TeCA com a linhagem DL2B, em: A- padrão 2,3,4,6-TeCA e PCNB com tempos de retenção de 8,2 e 11,6 minutos, respectivamente; B- reação em 7 dias; C- reação em 14 dias; D- reação em 21 dias.

Analisando os cromatogramas foi possível verificar que a linhagem DL2B promoveu a degradação do metabólito 2,3,4,6-TeCA, fato comprovado pela detecção desse composto. Houve decaimento da sua concentração com o tempo de reação, apresentando a maior degradação na reação cessada em 21 dias, na qual o sinal referente ao composto no cromatograma se evidencia em um pico menor em relação aos observados em 7 e 14 dias.

Até o término deste trabalho não foi possível obter uma curva analítica para quantificação do metabólito, portanto os dados quantitativos das concentrações do composto degradadas e remanescentes nas amostras não foram calculados. Entretanto, com os resultados apresentados nos cromatogramas pode-se inferir que a linhagem DL2B apresentou uma atividade de biodegradação eficiente nas condições empregadas.

4.5 Identificação de produtos da biodegradação dos metabólitos PCA e 2,3,4,6-TeCA

As amostras resultantes das reações de degradação do PCA e 2,3,4,6-TeCA foram posteriormente analisadas por CG-EM para a identificação de novos metabólitos correspondentes à essas transformações. Nas amostras referentes às reações de biodegradação do 2,3,4,6-TeCA, não foi detectado e identificado nenhum metabólito. Nas reações de PCA não foi identificado outro metabólito, além do 2,3,4,6-TeCA. No cromatograma de íons obtido com a reação de biodegradação do PCA não ficou evidenciado claramente a detecção do sinal referente ao 2,3,4,6-TeCA, porque provavelmente o metabólito encontra-se

sobreposto a um outro composto, o qual apresentou um íon de maior intensidade que interferiu no sinal. Entretanto, a presença do metabólito na reação foi confirmada por meio do monitoramento seletivo do íon de interesse. Para isso o padrão sintético 2,3,4,6-tetracloroanisol foi analisado separadamente para obtenção do seu tempo de retenção, padrão de fragmentação e intensidade do íon selecionado, que foram determinados com auxílio da base de dados da biblioteca que contém o espectro de massas completo do composto. Com essas informações foi possível observar apenas o íon de interesse e identificar o íon molecular correspondente ao metabólito na amostra (Figura 32) e confirmar sua presença na reação de degradação do PCA.

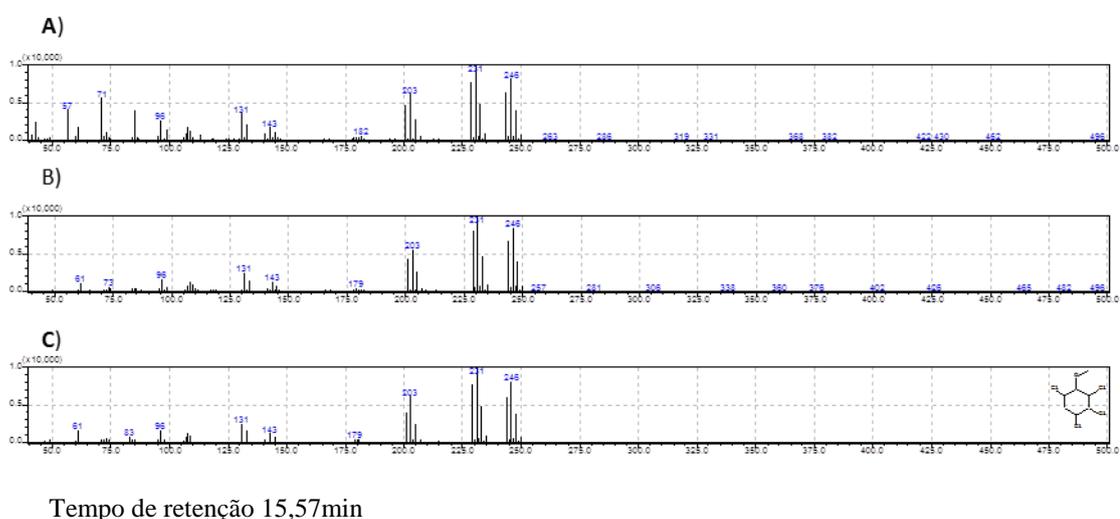


Figura 32: Espectro de massa obtido em CG-EM no tempo retenção de 15,57 minutos referente ao 2,3,4,6-TeCA na biodegradação do PCA: A- Espectro na biodegradação do PCA durante 7 dias; B-Espectro do padrão 2,3,4,6-TeCA sintetizado; C-Espectro de 2,3,4,6-TeCA da biblioteca de espectros de massa NIST/05.

O monitoramento do íon m/z 231 (pico base) em análises em CG-EM das reações de biodegradação do PCA detectou a redução do metabólito 2,3,4,6-TecA, que apresentou um decaimento na sua concentração ao longo do experimento (Figura 33). A formação do metabólito 2,3,4,6-TeCA na degradação do PCP (Figura 29) e, posterior decaimento com a degradação do PCA comprova que, para reação de biodegradação do PCP pela linhagem de fungo marinho DL2B, o 2,3,4,6-TeCA é o próximo produto intermediário formado.

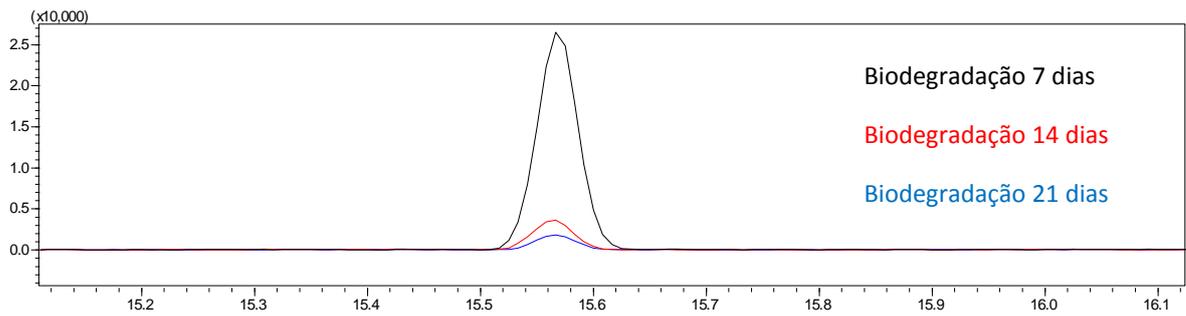


Figura 33: Diminuição da concentração de 2,3,4,6-TeCA na degradação do PCA ao longo de 7,14 e 21 dias evidenciado pelo aumento da intensidade do íon m/z 231 em análise de CG-EM.

Por meio dos resultados obtidos com as reações de biodegradação do pesticida PCP, e dos metabólitos PCA e 2,3,4,6-TeCA foi possível propor uma rota de biodegradação do PCP pela linhagem de fungo marinho DL2B (Figura 34).

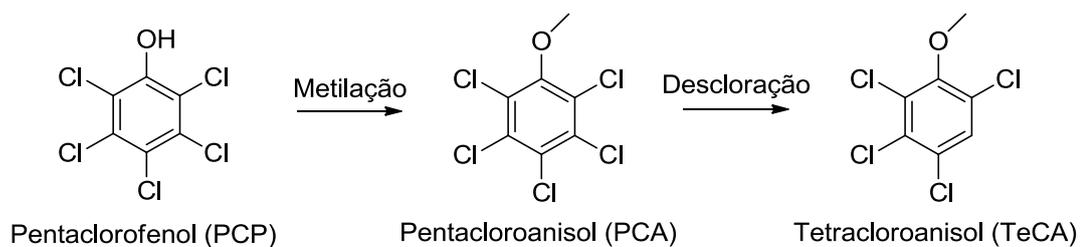


Figura 34: Proposta de rota para biodegradação do pesticida PCP por uma linhagem de fungo marinho.

4.6 Identificação das linhagens DL6A, DL5A, DL11A e DL2B

A linhagem DL6A apresentou similaridade acima de 97% com *Apergillus sydowii*, enquanto a linhagem DL5A mostrou similaridade de 100% com *Aspergillus versicolor*. As duas linhagens cresceram em meio de cultura sólido acrescido de PCP nas três concentrações iniciais (10, 25 e 30 mgL⁻¹) e apresentaram um diâmetros de crescimento colonial com tamanhos similares. O fato de ambas as espécies pertencerem ao mesmo gênero de fungo pode justificar o crescimento semelhante apresentado por elas ao longo do experimento.

Essas espécies de fungos podem ser encontradas no ambiente marinho isolada de esponjas e são considerados ótimos produtores de compostos citotóxicos e metabólitos bioativos (Lee *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2010; Debbab *et al.*, 2012). A espécie *Aspergillus sydowii* já foi isolada de ambiente marinho em trabalhos anteriores e utilizada em estudos de degradação apresentando bons resultados. O fungo mostrou potencial em catalisar a hidrólise

do benzil glicidil de éter (Martins *et al.*, 2011) e degradar o organoclorado DDD (Ortega *et al.*, 2011).

Embora não tenha sido encontrados relatos sobre a degradação de poluentes pela espécie *Aspergillus versicolor*, estudos envolvendo a degradação de pesticidas sugerem que as espécies do gênero *Aspergillus* sejam bons candidatos a agentes biodegradadores. A espécie *Aspergillus niger* apresentou alta atividade de biodegradação para o pesticida malation (Mattozzi *et al.*, 2006). *Aspergillus flavus* e *Aspergillus sydowii* foram capazes de degradar malation, pirimifós-metil e pirazofós, em concentrações elevadas e utilizá-los como única fonte de carbono e fósforo (Ramadevi *et al.*, 2012).

Já a linhagem DL11A mostrou similaridade acima de 97% com a espécie *Gibberella intermedia*, telemorfo de *Fusarium proliferatum*. Por volta de 1980, a seção *Liseola*, pertencente ao gênero *Fusarium*, foi subdividida por taxonomistas em um pequeno número de espécies, entre as quais estão as espécies do novo gênero *Gibberella* (Zeller *et al.*, 2003). Não foram encontrados registros na literatura utilizando a base de dados “Web of Science” sobre o uso de espécies do gênero *Gibberella* em estudos de degradação de compostos orgânicos. Entretanto, a espécie *Fusarium proliferatum* já foi encontrada no ambiente marinho (Sakayaroj *et al.*, 2012; Rodrigues, 2013) e é conhecida por sua capacidade em degradar lignina (Anderson *et al.*, 2005). O fungo *Fusarium proliferatum* e demais espécies pertencentes ao gênero *Fusarium* já foram relatadas como bons degradadores do pesticida PCP (Murandi-Seigle *et al.*, 1993; Marcial *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2010).

A linhagem DL2B apresentou similaridade de 99,6% com *Trichoderma harzianum*. Essa espécie de fungo derivada do ambiente marinho pode ser considerada um micro-organismo promissor, exemplo disso são trabalhos publicados na literatura ao longo dos anos (Kobayashi, *et al.*, 1993; Holler *et al.*, 2000; Savitha *et al.*, 2010) e que ainda continua sendo objeto de estudos de pesquisas recentes (Yamada, *et al.*, 2014).

No trabalho de Katayama e Matsumura, (2009), uma cepa *Trichoderma harzianum* foi apresentada como capaz de degradar organoclorados por meio de um sistema oxidante. As espécies do gênero *Trichoderma* podem ser encontradas nos mais diversos lugares como solos, sedimentos marinhos, esponjas marinhas e manguezais (Gal-Hemed *et al.*, 2011). A maioria dos trabalhos que envolvem pesquisas com diversos fungos do gênero *Trichoderma*, inclusive espécies derivadas do ambiente marinho, exploram sua capacidade como controle biológico de plantas contra fungos fitopatogênicos, produção de enzimas bioativas (Ren *et al.*, 2009) e produção de produtos naturais (Reino *et al.*, 2008). Nos últimos anos, novos

trabalhos que utilizam espécies de *Trichoderma* como biodegradadores de poluentes estão sendo publicados e com resultados satisfatórios. O pesticida organoclorado DDT, foi completamente biodegradado pelo fungo de origem marinha *Trichoderma* sp. CBMAI 932 na presença de peróxido de hidrogênio no trabalho de Ortega *et al.*, 2011. Tang *et al.* (2001) estudaram cepas do fungo *Trichoderma* sp. Gc1 isoladas dos invertebrados marinhos *Geodia corticostylifera* e *Chelonaplysilla erecta* para a degradação do pesticida diclorvós, encontrando uma taxa de degradação do pesticida de 72% após 120 horas de incubação em meio líquido a base de água do mar artificial em pH 8,0. No estudo de Silva (2013) o fungo *Trichoderma* sp. apresentou ótimo crescimento em placas de Petri contendo meio sólido acrescido de clorpirifós e em meio de cultura líquido, na presença do pesticida (50 ppm), promoveu a degradação de aproximadamente 53% do composto após 10 dias de reação.

Como mencionado anteriormente, os fungos mais utilizados e conhecidos como degradadores de substâncias químicas recalcitrantes, como o pesticida PCP são os portadores de enzimas ligninolíticas (Okeke *et al.*, 2007;). A espécie *T. harzianum* além de possuir esse aparato enzimático característico (Do Vale, *et al.*, 2012), pode também ser facilmente encontrada em ambiente marinho (Yamada *et al.*, 2014). Embora a degradação do pesticida PCP pelo fungo *T. harzianum* seja pouco explorado na literatura, a espécie é considerada um potente degradador de organoclorados (Melo *et al.*, 2010; Kataoka e Takagi, 2013). Portanto, os bons resultados apresentados pela linhagem DL2B nas reações de degradação do pesticida PCP e seus metabólitos podem ser justificados pelo uso de enzimas específicas presentes na espécie, as quais lhes conferem atributos que permitem uma atividade biodegradadora de alta eficiência.

5 CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível avaliar a resistência e eficiência de fungos do ambiente marinho na degradação do pesticida PCP obtendo resultados promissores. Por meio de um *screening* com quinze cepas de fungos marinhos em meio sólido contendo malte 3% na presença do PCP foi possível selecionar uma linhagem resistente ao pesticida com potencial biodegradativo na presença deste composto. O fungo *Trichoderma harzianum* obteve ótimo crescimento na presença do pesticida apresentando alta resistência à toxicidade e potencial de crescimento em concentrações elevadas de PCP.

As análises das reações com esse fungo o *Trichoderma harzianum* em meio líquido contendo o pesticida mostraram excelentes resultados, pois após sete dias de incubação não foi detectada a presença do pesticida, indicando sua eficiência na biodegradação do PCP. O ensaio controle para avaliar a estabilidade do pesticida confirmou a eficiência do sistema enzimático deste fungo, uma vez que na ausência deste, praticamente toda a quantidade de PCP introduzida ao meio foi recuperada após 21 dias de incubação. Com as análises das amostras em CG-EM foi possível a identificação dos metabólitos PCA e 2,3,4,6-TeCA, correspondentes da degradação do PCP. O resultado do controle abiótico, a formação dos produtos da degradação e a não identificação destes metabólitos no caldo enzimático indicam que o fungo *Trichoderma harzianum* foi o agente principal na biotransformação do PCP, comprovando sua resistência à toxicidade e seu alto potencial de biodegradação desse organoclorado.

Com os experimentos realizados em meio líquido na presença do metabólito PCA e 2,3,4,6-TeCA observou-se que esses compostos possivelmente causam algum efeito tóxico sobre este micro-organismos, mas não o suficiente para inviabilizar a biodegradação pelo fungo. Os resultados obtidos mostraram que o fungo foi eficaz em reduzir as concentrações dos metabólitos nas amostras, e esse fato pode ser considerado de grande importância ecológica, pois a remoção desses compostos do meio ambiente é tão necessária quanto à do pesticida PCP, uma vez que os cloroanisóis são tóxicos e resistentes à biodegradação por micro-organismos.

Por meio dos resultados obtidos com as reações de biodegradação do PCP, PCA e 2,3,4,6-TeCA foi possível propor uma rota de degradação do pesticida PCP pela linhagem de fungo marinho *Trichoderma harzianum*. Na literatura não há relatos específicos sobre a espécie *Trichoderma harzianum*, isolada do ambiente marinho, como agente biodegradador

do pesticida PCP e de seus metabólitos PCA e 2,3,4,6-TeCA. Portanto, este trabalho pode ser considerado inovador e de grande valia para as pesquisas em ecologia e química orgânica.

REFERÊNCIAS

- ABOU-ARAB, A. A. K.; GOMMA, M. N. E.; BADAWY, Q.; NAGUIB, K. Distribution of organochlorides pesticide in the Egyptian aquatic ecosystem. **Food Chemistry**, v. 54, p. 141–146, 1995.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Estudo traça perfil do mercado de agrotóxicos no Brasil**. Disponível em: <<http://anvisa.gov.br/wps/s/r/oFb>>. Acesso em: 08 de jan. 2014.
- AHMAD, R.; SALEM, N. M.; ESTAITIEH, H. Occurrence of organochlorine pesticide residues in eggs, chicken and meat in Jordan, **Chemosphere**, v. 78, p. 667–671, 2010.
- ALBERICO, D.; RUDOLPH, A.; LAUTENS, M. Synthesis of tricyclic heterocycles via a tandem aryl alkylation/heck coupling sequence. **Journal of Organic Chemistry**, v. 72, p. 775-781, 2007.
- ALMEIDA, F. V.; CENTENO, A. J.; BISINOTI, M. C.; JARDIM, W. F. substâncias tóxicas persistentes (stp) no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1976-1985, 2007.
- ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.
- ASGHER, M.; BHATTI, H.N.; ASHRAF, M.; LEGGE, R. L. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white-rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, v. 19, p. 771-783, 2008.
- BAIRD, C. **Química Ambiental** 2 ed: Bookman, Porto Alegre, RS, 2002.
- BALLAMNUT N.; MATHEUS, D. R. Characterization of fungal inoculum used in soil bioremediation. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 248-252, 2007.
- BARRAGÁN-HUERTA, B. E.; COSTA-PÉREZ, C.; PERALTA-CRUZ, J.; BARRERA-CORTÉS, J.; ESPARZA-GARCÍA, F.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Biodegradation of organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of the porous structure of green bean coffee. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 59, n. 3, p. 239-244, 2007.
- BHALERAO, T. S. Bioremediation of endosulfan-contaminated soil by using bioaugmentation treatment of fungal inoculant *Aspergillus niger*. **Turkish Journal of Biology**, v. 36, p. 561-567, 2012.
- BIROLLI, W. G. **Biodegradação do pesticida esfenvalerato por fungos do ambiente marinho**. 2013. 118f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade de São Paulo, 2013.

BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; DA SILVA, M.; SETTE, L. D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 1, p. 32-37, 2010.

BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SETTE, L. D. The production of ligninolytic enzymes by marine-derived basidiomycetes and their biotechnological potential in the biodegradation of recalcitrant pollutants and the treatment of textile effluents. **Water Air and Soil Pollution**, v. 223, p. 2333-2345, 2012.

BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L.; SILVA, M. R.; SETTE, L. D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by Brazilian marine-derived fungi. **Enzyme. Applied Microbiology and Technology**, v. 46, p. 32-37, 2010.

BRAIBANTE, M. E. F.; ZAPPE, J. A. A química dos agrotóxicos. **Química e Sociedade**, v. 34, n. 1, p. 10-15, 2012.

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

BUTLER, E.; WHELANA, M. J.; SAKRABANI, R.; VAN EGMOND, R. Fate of triclosan in field soils receiving sewage sludge. **Environmental Pollution**, v. 167, p.101-109, 2012.

CAI, J.; ZHU, F.; RUAN, W.; LUI, L.; LAI, R.; ZENG, F.; OUYANG, G. Determination of organochlorine pesticides in textiles using solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. **Microchemical Journal**, v. 110, p. 280-284, 2013.

CAI, M. G.; QIU, C. R.; SHEN, Y.; CAI, M. H.; HUANG, S.Y.; QIAN, B. H., SUN, J. H.; LIU, X.Y. Concentration and distribution of 17 organochlorine pesticides (OCPs) in seawater from the Japan Sea northward to the Arctic Ocean. **Chemistry**, v. 53, p.1033-1047, 2010.

CAI, M.; XUN, L. Organization and regulation of pentachlorophenol-degrading genes in *Sphingobium chlorophenicum* ATCC 39723. *Journal of Bacteriology*, v. 184, n. 17, p. 4672-4680, 2002.

CARAVALHO, M. B.; TAVARES, S.; MEDEIROS, J.; NUNEZ, O.; GALLART-AYALA, H.; LEITAO, M. C.; GALCERAN, M. T.; HURSTHOUSE, A.; PEREIRA, C. S. Degradation pathway of pentachlorophenol by *Mucor plumbeus* involves phase II conjugation and oxidation-reduction reactions. **Journal of Hazardous Materials**, v. 198, p. 133-142, 2011.

CARAVALHO, M. B.; MARTINS, I.; LEITAO, M. C.; GARCIA, H.; RODRIGUES, C.; SAN ROMAO, V.; MCLELLAN, I.; HURSTHOUSE, A.; SILVA, C. P. Screening pentachlorophenol degradation ability by environmental fungal strains belonging to the phyla Ascomycota and Zygomycota, **Journal of Industry Microbiology and Biotechnology**, v. 36, p.1249-1256, 2009.

CASTELLANI, A. Maintenance and cultivation of the common pathogenic fungi of main in sterile distilled water. Further researches. **Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, p. 181-184, 1967.

CASTILLO, M.; ANDERSSON, A.; ANDER, P.; STENSTRÖM, J.; TORSTENSSON, L. Establishment of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* on unsterile straw in solid substrate fermentation systems intended for degradation of pesticides. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, p. 627-633, 2001.

CEA, M.; JORQUERA, M.; RUBILAR, O.; LANGER, H.; TORTELLA, G.; DIEZ, M. C. Bioremediation of soil contaminated with pentachlorophenol by *Anthracophyllum discolor* and its effect on soil microbial community. **Journal of Hazardous Materials**, v. 181, p. 315-323, 2010.

CHANDRA, R.; GHOSH, A.; JAIN, R. K.; SINGH, S. Isolation and characterization of two potential pentachlorophenol degrading aerobic bacteria from pulp paper effluent sludge. **Journal of General Applied Microbiology**, v. 52, p. 125-130, 2006.

CHEN, H. Y.; XUE, D. S.; FENG, X.-Y.; YAO, S. J. Screening and production of ligninolytic enzyme by a marine-derived fungal *Pestalotiopsis* sp. J63. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 165, p. 1754-1769, 2011.

CHOWDHURY, A. PRADHAN, S. SAHA, M. SANYAL, N. Impact of pesticide on soil microbiology parameters and possible bioremediation strategies. **Indian Journal of Microbiology**, v.48, n.1, p. 114-127, 2008.

COELHO-MOREIRA, J. S.; MACIEL, G. M.; CASTOLDI, R.; MARIANO, S. S.; INÁCIO, F. D.; BRANCHT, A.; PERALTA, R. M. Involvement of Lignin-Modifying Enzymes in the Degradation of Herbicides. In: **Herbicides – Advanced in Research**, Dr. Andrew Price (Ed.), ISBN: 978-953-51-1122-1, In Tech, doi: 10.5772/55848, 2013.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Ficha de Informações Toxicológicas**. Disponível em:

<<http://www.cetesb.sp.gov.br/userfiles/file/laboratorios/fit/pentaclorofenol.pdf>>. Acesso em: 03 de jan. 2014.

CONCEIÇÃO, D. M.; ANGILIS, D. A.; ANGELIS, D. F.; BIDOIA, E. D. Fungos filamentosos isolados do Rio Atibaia e refinarias de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 99-106, 2005.

CONTRERAS, M. G. L.; ARGUMEDO, J. J. Identificación de enemigos naturales de *Diaphorina citri kuwayama* (hemiptera: psyllidae) en el estado de Yucatán, México. **Fitosanidad**, v. 16, n. 1, p. 5-11, 2012.

COPLEY, S. D. Evolution of a metabolic pathway for degradation of a toxic xenobiotic: the patchwork approach. **Trends in Biochemical Science**, v. 25, n.6, p. 261-265, 2000.

- 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.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de Avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.
- COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas**, v. 15, p. 65-72, 2005.
- CRESWELL, T. C.; Curl, E. A. Effects of some herbicides on *Rhizoctonia solani* and *Trichoderma harzianum*. **Phytopathology**, v. 72, p. 356-362, 1982.
- CROSBY, D. G. Iupac reports on pesticides: Environmental Chemistry of Pentachlorophenol, **Pure and Applied Chemistry**, v. 53, p. 1051-1080, 1981.
- CSERJESII, A. J.; JOHNSON, E. L. Methylation of pentachlorophenol by *Trichoderma virgatum*. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 18, p. 45-49, 1971.
- D'ANGELO, E. M.; REDDY, K. R. Aerobic and Anaerobic Transformations of Pentachlorophenol in Wetland Soils. **Soil Science Society of America Journal**, v. 64, p. 933-94, 2000.
- DA SILVA, J. M.; SILVA, E. N.; FARIA, H. P.; PINHEIRO, T. M. M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 10, n.4, 2005.
- 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**, v. 7, n. 2, p. 37-44, 2006.
- DEBBAB, A.; ALY, A. H. PROKSCH. Endophytes and associated marine derived fungi-ecological and chemical perspectives. **Fungal Diversity**, v. 12, p. 810-849, 2012.
- DERELANKO, M. J.; HOLLINGER, M. A. **Handbook of toxicology**. New Jersey: Taylor & Francis, 2002. v. 1, p. 1440.
- DESHMUKH, S. K. The maintenance and preservation of keratinophilic fungi and related dermatophytes. **Mycoses**, v. 46, p. 203-207, 2003.
- DIEZ, M. Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 10, n. 3, p. 244-267, 2010.
- DO VALE, L. H. F.; GOMEZ-MENDOZA, D. P.; KIM, M. PANDEY, A.; RICART, C. A.; FILHO, E. X.; SOUSA, M. V. Secretome analysis of the fungus *Trichoderma harzianum* grown on cellulose. **Proteomics**, v. 12, p. 2716-2728, 2012.

EERD, L. L. V.; HOAGLAND, R. E.; ZABLOTOWICZ, R. M.; HALL, J. C. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. **Weed Science**, v.51, n. 4, p. 472–495, 2003.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **About pesticides**. Washington, 2012. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>>. Acesso em: 10 jan. 2014.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **Toxicological Review of Pentachlorophenol**. Washington, 2010. Disponível em: <<http://www.epa.gov/iris/toxreviews/0086tr.pdf>> . Acesso em: 16 jan. 2014.

ESTEVEZ, M. A.; PERIAGO, E. L.; CARBALLO, E. M.; GANDARA, J. S.; MEJUTO, J. C.; RIO, L. G. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 123, p. 247–260, 2008.

FARIA, Á. B. C. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo integrado de pragas florestais. **Ambiência**, v. 5, n. 2, p. 345-358, 2009.

FERREIRA, A. J.; VIEIRA, D. N.; MARQUES, E. P.; PEDRO, I. S. Occupational Exposure to Pentachlorophenol: The Portuguese Situation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.837, p. 291-299, 1997.

FIELD, J. A.; SIERRA-ALVAREZ, R. Microbial degradation of chlorinated phenols. **Reviews in Environmental Science and Biotechnology**, v. 7, p. 211–241, 2008.

FLORES, A. V.; RIBEIRO, J. N.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, E. L. R. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente e Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 125-143, 2004.

GAL-HEMED, I.; ATANASOVA, J.; KOMON-ZELAZOWSKA, M.; *et al.*, Marine Isolates of *Trichoderma* spp. as Potential Halotolerant Agents of Biological Control for Arid-Zone Agriculture. **Journal of Environmental Microbiology**, v. 77, p. 5100-5109, 2011.

GALLI, A.; DE SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105, 2006.

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

GHOSH, D.; SAHA, M.; SANA, B.; MUKHERJEE, J. Marine enzymes. **Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology**, v. 96, p. 189–218, 2005.

GOMES-MACHADO, K. M.; MATHEUS, D. R.; ROSIM-MONTEIRO, R. T.; RAMOS-BONONI, V. L. Biodegradation of pentachlorophenol by tropical basidiomycetes in soils contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 3, p. 297-301, 2005.

- GRANDE, M. D.; REZENDE, M. O. O.; ROCHA, O. Distribuição de compostos organoclorados nas águas e sedimentos da bacia do rio Piracicaba/SP – Brasil. **Revista Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 678-686, 2003.
- GRISOLIA, C.K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução**. Brasília: Editora UnB, p. 2005, 392 p.
- GUILLÉN-JIMÉNEZ, F. M.; CRISTIANI-URBINA, E.; CANCINO-DIAZ, J. C.; FLORES-MORENO, J. L.; BARRAGÁN-HUERTA, B. E. Lindane biodegradation by the *Fusarium verticillioides* AT-100 strain, isolated from *Agave tequilana* leaves: Kinetic study and identification of metabolites. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 74, p. 36-47, 2012.
- HALLBERG, B. M.; HENRIKSSON, G.; PETTERSSON, G.; VASELLA, A.; DIVINE, C. Mechanism of the reductive half-reaction in cellobiose dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p. 7160-7166, 2003.
- HAMLIN, H. J.; GUILLETTE JR, L. J. Birth defects in wildlife: the role of environmental contaminants as inducers of reproductive and developmental dysfunction. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 56, p. 113–21, 2010.
- HARMS, H.; SCHLOSSER, D.; WICK, L. Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. **Applied and Industrial Microbiology**, v. 9, p. 177–192, 2011.
- HATFIELD, J. L. Sustainable agriculture: impacts on non-point pollution. **Water Science Technology**, v. 28, n. 3-5, p. 415-424, 1993.
- HOLLER, U.; WRIGHT, A. D.; MATTHEE, G. F.; KONIG, G. M.; DRAEGER, S.; AUGUST, H. J. Fungi from marine sponges: diversity, biological, activity and secondary metabolites. **Mycology Research**, v. 104, p. 1354-1365, 2000.
- KAMEI, I.; SONOKI, S.; HARAGUCHI, K.; KONDO, R. Fungal bioconversion of toxic polychlorinated biphenyls by white-rot fungus, *Phlebia brevispora*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 73, p. 932–940, 2006.
- KANEKAR, P. P.; BHADBHADE, B.; DESHPANDE, N. M.; SARNAIK, S. Biodegradation of organophosphorus pesticides. **Indian National Science Academic**, v. 1, p. 57-70, 2004.
- KATAOKA, R.; TABAGI, K. Biodegradability and biodegradation pathways of endosulfan. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 3285–3292, 2013.
- KAYSER, A.; VOIGT, F.; STUBBE, M. First results on the concentrations of some persistent organochlorines in the common hamster *Cricetus cricetus* (L.) in Saxony-Anhalt. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 67, n. 5, p.712-720, 2001.

KJER, J.; DEBBAB, A.; ALY, A. H.; PROKSCH, P. Methods for isolation of marine-derived endophytic fungi and their bioactive secondary products. **Nature Protocols**, v. 5, p. 479–490, 2010.

KOBAYASHI, M.; UEHARA, H.; MATSUNAMI, K.; AOKI, S.; KITAGAWA. Trichoharzin, a new polyketide produced by the imperfect fungus *Trichoderma harzianum* separated from the marine sponge *Micale Cecilia*. **Tetrahedron Letters**, v. 34, p. 7925-7928, 1993.

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

KOSSUGA, M. H.; ROMMINGER, S.; XAVIER, C.; MILANETTO, M. C.; DO VALLE, M. Z.; PIMENTA, E. F.; MORAIS, R. P.; CARVALHO, E.; MIZUNO, C. M.; CORADELLO, L. F. C.; BARROSO, V. M.; VACONDIO, B.; JAVAROTI, D. C. D.; SELEGHIM, M. H. R.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; LIMA, B. A.; GONCALVES, R.; BONUGLI-SANTOS, R. C.; SETTE, L. D.; BERLINCK, R. G. S. Evaluating methods for the isolation of marine-derived fungal strains and production of bioactive secondary metabolites. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, 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.

KUMAR, A.; BISHT, B. S.; JOSHI, V. D.; DHEWA, T. Review on bioremediation environment: A management tool. **International Journal of Environmental and Science**, v. 1, n. 6, p. 1079-1093, 2011.

KUSSUMI, T. A.; LEMES, V. R. R.; ROCHA, S. B.; BARRETTO, H. H. C. Pentachlorophenol residues in drinking water from an area close to a lumberyard. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 63, n. 1, p. 31-34, 2004.

KWON, G. S.; SOHN, H. Y.; SHIN, K. S.; KIM, E.; SEO, B. I. Biodegradation of the organochlorine insecticide, endosulfan, and the toxic metabolite, endosulfan sulfate, by *Klebsiella oxytoca* KE-8. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.67, n. 6 p. 845-850, 2005.

LAINE, M. M.; JORGENSEN, K. S. Effective and safe composting of chlorophenol-contaminated soil in pilot scale. **Environmental Science and Technology**, v, 31, p. 71–378, 1997.

LAMAR, R. T.; DIETRICH, D. M. Use of lignin-degrading fungi in the disposal of pentachlorophenol-treated wood. **Journal of Industrial Microbiology**, v. 9, p. 181-191, 1992.

- LAUGERO, C.; MOUGIN, C.; SIGOILLOT, J. C.; MOUKHA, S.; ASTHER, M. Comparison of static and agitated immobilized cultures of *Phanerochaete chrysosporium* for the degradation of pentachlorophenol and its metabolite pentachloroanisole. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 378–383, 1997.
- LEE, Y. M.; LI, H.; HONG, J.; CHO, H. Y. BAE, K. S., KIM, M. A. KIM, D. K. JUNG, J. H. Bioactive metabolites from the sponge-derived fungus *Aspergillus versicolor*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, p. 231-235, 2010.
- LIN, J. E.; WANG, H. Y.; HICKEY, R. F. Degradation kinetics of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 35, p. 1125-1134, 1990.
- LIU, M.; CHENG, S. B.; OU, D. N.; YANG, Y.; LIU, H. L.; HOU, L. J.; GAO, L.; XU, S. Y. Organochlorine pesticides in surface sediments and suspended particulate matters from the Yangtze estuary, China. **Environmental Pollution**, v. 156, p.168–173, 2008.
- LUZARDO, O. P.; SUÁREZ, N. R.; HERNANDÉZ, L. A. H.; VELÉRON, M. C.; ZUMABDO, M.; BOADA, L. D. Assessment of the exposure to organochlorine pesticides, PCBs and PAHs in six species of predatory birds of the Canary Islands, Spain. **Science of the Total Environment**, v. 472, p. 146–153, 2014.
- MACIEL, G. M.; BRACHT, A.; SOUZA, C. G. M.; COSTA, A. M.; PERALTA, R. M. Fundamentals, diversity and application of white-rot fungi. In: SILVA A. P. **Fungi: types, environmental impact and role in disease**, Nova Science Publishers, p. 409-458, 2012.
- MAJER, B. J.; TSCHERKO, D.; PASCHKE, A.; WENNRICH, R.; KUNDI, M.; KANDELER, E.; KNASMULLER, S. Effects of heavy metal contamination of soils on micronucleus induction in *Tradescantia* and on microbial enzyme activities: a comparative investigation. **Mutation Research**, v. 515, p. 111-124, 2002.
- MARCIAL, J.; BARRIOS-GONZÁLEZ, J.; TOMASINI, A. Effect of medium composition on pentachlorophenol removal by *Amylomyces rouxii* in solid-state culture. **Process Biochemistry**, v. 41, n. 2, p. 496-500, 2006.
- MARTINS, A. *et al.* Biorremediação. III Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas, 2003, Rio Claro, SP. **Anais Eletrônico**. Rio Claro, SP: Ceset, 2005. Disponível em:<www.ceset.unicamp.br/lte/artigos/3fec2401>. Acesso em: 23 de nov. 2013.
- MARTINS, M. P.; MOUAD, A. M.; BOSCHINI, L.; SELEGHIM, M. H. R.; SETTE, L. D.; PORTO, A. L. M. Marine fungi *Aspergillus sydowii* and *Trichoderma* sp. catalyze the hydrolysis of benzyl glycidyl ether. **Marine Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 314-320, 2011.
- MASCI, M.; ORBAN, E. NEVIGATO, T. Organochlorine pesticide residues: An extensive monitoring of Italian. **Chemosphere**, v. 94, p.190–198, 2014.

MATHEUS, D. R.; BONONI, V. L. R. E MACHADO, K. M. G. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 415-421, 2000.

MATTOZZI, M. P.; TEHARA, S. K.; HONG, T.; KEASLING, J. D. Mineralization of paraoxon and its use as a sole C and P source by a rationally designed catabolic pathway in *Pseudomonas putida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 10, p. 6699-6706, 2006.

MCBAIN, A.; CUI, F.; HEBERT, L.; RUDDICK, N. R. The microbial degradation of chlorophenolic preservatives in spent, pressure-treated timber. **Biodegradation**, v. 6, p. 47-55, 1995.

MCGRATH, R.; SINGLETON, I. Pentachlorophenol transformation in soil: a toxicological assessment. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 32, p. 1311-1314, 2000.

MELO, I. S.; SILVA, C. M. M. S.; FAULL, J. L. Isolation and characterization of carbendazim degrading *Trichoderma harzianum* rifai mutants. **Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 20, p. 1-6, 2010.

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.

MONTIEL, A. M.; FERNANDEZ, F. J.; MARCIAL, J.; SORIANO, J.; BARRIOS-GONZALEZ, J.; TOMASINI, A. A fungal phenoloxidase (tyrosinase) involved in pentachlorophenol degradation. **Biotechnology Letters**, v. 26, p. 1353-1357, 2004.

MORESCHI, J.C. **Produtos Preservantes de Madeira**. Departamento de Engenharia e Tecnologia Florestal da UFPR. Disponível em: < <http://www.madeira.ufpr.br> > Acesso em 03 dez. 2013.

MURANDI-SEIGLE, F.; STEIMAN, R.; BENOIT-GUYOD, GUIRAUD, P. Fungal degradation of pentachlorophenol by micromycetes. *Journal of Biotechnology*, v. 30, n.1, p. 27-35, 1993.

NEWEL, S. Y. Mangrove fungi: The succession in the microflora of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.). In: JONES, E. B. G. **Recent advances in aquatic mycology**. UK: Paul Elek Scientific Books, p. 51-91, 1976.

NING, D.; WANG, H. Involvement of Cytochrome P450 in pentachlorophenol transformation in a white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 9: e45887. doi:10.1371/journal.pone.0045887, 2012.

- 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**, p. 225–233, 1993.
- OKEKE, B. C.; PATERSON, A.; SMITH, J. E.; WATSONCRAIK, I. A. Comparative biotransformation of pentachlorophenol in soils by solid substrate cultures of *Lentinula edodes*. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 48, p. 563-569, 1997.
- ONDARZA, P. M.; GONZALEZ, M.; FILLMANN, G.; MIGLIORANZA, K. S. B. PBDEs, PCBs and organochlorine pesticides distribution in edible fish from Negro River basin, Argentinean Patagonia. **Chemosphere**, v. 94, p.135–142, 2014.
- ORTA, M. M. G. H.; BARRÓN, J. M.; CORONADO, R. M. G.; RAMOS, R. L. Adsorción de pentaclorofenol en solución acuosa sobre Carbones activados comerciales. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v. 19, n. 3, p. 137144, 2003.
- ORTEGA, S. N.; 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-HERNANDÉZ, L.; SANCHES-SALINAS, E.; OLEVERA-VELONA, A.; FOLCH-MALLOL, L. Pesticides in the Environment: Impacts and Their Biodegradation as a Strategy for Residues Treatment. In: **Pesticides-Formulations, Effects, Fate**. (M. Stoytcheva, Ed.). InTech. Croatia, p. 551-574, 2011.
- PANG, K. L.; MITCHELL, J. I. Molecular approaches for assessing fungal diversity in marine substrata. **Botanica Marina**, v. 48, p. 332-347, 2005.
- PASSARINI, M. R. Z.; RODRIGUES, M. V. N.; SILVA, M.; SETTE, L. D. Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. **Marine Pollution Bulletin**, v. 62, p. 364-370, 2011.
- PEREIRA, L. A.; PETERSEN, G. O.; LEITE, C. E.; TEIXEIRA, A. C.; VARGAS, V. M. F.; THIESEN, F. V. Avaliação da exposição ao Pentaclofenol na população do município de Triunfo-RS. **Anais de Iniciação Científica – PUCRS**, v. 10, p. 572-574, 2009.
- PIRES, F. R.; SOUZA, C. M.; SILVA, A. A.; PROCÓPIO, S. O.; FERREIRA, L.R. Fitorremediação de solos contaminados com herbicidas. **Planta Daninha**, Viçosa-MG, v.21, n.2, p.335-341, 2003.
- POINTING, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 20–33, 2001.
- PRAMILA, R.; RAMESH, K.V. Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by fungi isolated from marine water – a SEM analysis. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, p. 5013–5018

PROUDFOOT, A. T. Pentachlorophenol poisoning. **Toxicological Reviews**, v. 22, p. 3–11, 2003.

QUINTERO, J. C.; MOREIRA, M. T.; FEIJOO, G.; LEMA, J. M. Screening of white rot fungal species for their capacity to degrade lindane and other isomers of hexachlorocyclohexane (HCH). **Ciência e Invesgación Agraria**, v. 35, n. 2, p. 159-167, 2008.

RAMADEVI, C.; NATH, M. M.; PRASAD, M. G. Mycodegradation of malathion by a soil fungal isolate, *Aspergillus niger*. **International Journal of Basic and Applied Chemical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 108-115, 2012.

RAND, G. M. **Fundamentals of Aquatic Toxicology: effects, environmental fate and risk assessment**. Taylor e Francis, 1124 p, 1995.

RATEB, M. E.; EBEL, R. Secondary metabolites of fungi from marine habitats. **Natural Products Reports**, v. 28, p. 290–344, 2011.

REDDY, G. V. B; GOLD, M. H. Degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete chrysosporium*: intermediates and reactions involved. **Microbiology**, v. 146, p. 405–413, 2000.

REINO, J. L.; GUERRERO, R. F.; HERNADÉZ-GALÁN, R.; COLLADO, I. G. Secondary metabolities from species of the biocontrol agent *Trichoderma*. **Phytochemistry**, v. 7, p. 89-123, 2008.

REN, J.; XUE, C.; TIAN, L.; XU, M.; CHEN, J.; DENG, Z.; PROKSCH, P.; LIN, W.; 2009. Asperelines A–F, Peptaibols from the Marine-Derived Fungus *Trichoderma asperellu*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1036-1044, 2009.

RIBOULET, J. M.; ALVES, L. A. R.; URREIZT, N. Quantificação dos cloroanisóis por micro extração em fase sólida (SPME) e cromatografia gasosa (CG) com detecção por espectrometria de massa (EM) em macerados de lotes de rolhas de cortiça ou em vinho. **Ciência e Técnica Vitivinícola**, v. 17, p. 61-71, 2002.

RIGAS, F.; DRITSA, V.; MARCHANT, R.; PAPADOPOULOU, K.; AVRAMIDES, E. J. E HATZIANESTIS, I. Biodegradation of lindane by *Pleurotus ostreatus* via central composite design. **Environment International**, v. 31, n. 2, p. 191-196, 2005.

RIGOT, J.; MATSUMURA, F. Assessment of the rhizosphere competency and pentachlorophenol-metabolizing activity of a pesticide-degrading strain of *Trichoderma harzianum* introduced into the root zone of corn seedlings. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 37, p. 201–210, 2002.

ROCHA, L. C.; FERREIRA, H. V.; LUIZ, R. F.; SETTE, L. D.; PORTO, A. L. M. Stereoselective bioreduction of 1-(4-methoxyphenyl) ethanone by whole cells of marine-derived fungi. **Marine Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 358-362, 2012.

ROCHA, L. C.; FERREIRA, H. V.; PIMENTA, E. F.; BERLINCK, R. G. S.; SELEGHIM, M. H. R.; JAVAROTI, D. C. D.; SETTE, L. D.; BONUGLI, R. C.; PORTO, A. L. M. Bioreduction of α -chloroacetophenone by whole cells of marine fungi. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 10, p. 1559-1563, 2009

ROCHA, L. C.; OLIVEIRA, J. R.; VACONDIO, B.; RODRIGUES, G. N.; SELEGHIM, M. H. R.; PORTO, A. L. M. Bioactive Marine Microorganisms for Biocatalytic Reactions in Organic Compounds. In: KIM, S. **Marine Microbiology: Bioactive Compounds and Biotechnological Applications**. 1. ed., Wiley, v. 1, p. 453-484, 2013.

RODRIGUES, G. N. **Biodegradação do pesticida metil paration por fungos isolados da ascídia *Didemnum ligulum***. 2013. 103f. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais). Universidade Federal de São Carlos, 2013.

RUBILAR, O.; FEIJOO, G.; DIEZ, C.; LU-CHAU, T. A.; MOREIRA, M. T.; LEMA, J. M. Biodegradation of Pentachlorophenol in Soil Slurry Cultures by *Bjerkandera adusta* and *Ant. hracophyllum discolor*. In: **Chemical and Engineering Research**, v. 46, p. 6744-6751, 2007.

RUTTIMANN-JOHNSON, C.; LAMAR, R. T. Binding of pentachlorophenol to humic substances in soil by the action of white rot fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 29, n. 7, p. 1143-1148, 1997.

RYU, W. R.; SHIM, S. H.; JANG, M. Y.; JEON, Y. J.; OH, K. K.; CHO, M. H. Biodegradation of pentachlorophenol by white rot fungi under ligninolytic and nonligninolytic conditions. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 5, p. 211-4, 2000.

SALEEM, M.; ALI, M. S.; HUSSAIN, S.; JABBAR, A.; ASHRAF, M.; LEE, Y. S. Marine natural products of fungal origin. **Natural Products Reports**, v. 24, p. 1142-1152, 2007.

SALMERÓN-ALCOCER, A.; RUIZ-ORDAZ, N.; JUAREZ-RAMÍREZ, C.; GALÍNDEZ-MAYER, J. Continuous biodegradation of single and mixed chlorophenols by a mixed microbial culture constituted by *Burkholderia* sp., *Microbacterium phyllosphaerae*, and *Candida tropicalis*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 37, p. 201-211, 2007.

SANKARAN, S.; KHANAL, S. K.; JASTI, N.; JIN, B.; POMETTO, A. L.; VAN LEEUWEN, J. Use of filamentous fungi for wastewater treatment and production of high value fungal byproducts: a review, **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, v. 40, p. 400-449, 2010.

SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; DACOSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 159-170, 2007

SANTOSH, K. K.; CHAKRABARTY, S. K.; REDDY, M. S. Pentachlorophenol degradation by *Pseudomonas stutzeri* CL7 in the secondary sludge of pulp and paper mill. **Journal of Environmental Sciences**, v. 22, n. 10, p.1608–1612, 2010.

SARKAR, S.; PRAMANIK, A.; MITRA, A.; MUKHERJEE, J. Bioprocessing data for the production of marine enzymes. **Marine Drugs**, v. 8, n. 4, p. 1323-1372, 2010.

SAVITHA, S.; SADHASIVAM, S.; SWAMINATHAN, K. Regeneration and molecular characterization of an intergeneric hybrid between *Graphium putredinis* and *Trichoderma harzianum* by protoplasmic fusion. **Biotechnology Advances**, v. 28, P. 285-292, 2010.

SERADATI, M. R.; KESHAVARZ, T.; LEONTIEVSKY, A. A.; EVANS, C. S. Transformation of high concentrations of chlorophenols by the white-rot basidiomycete *Trametes versicolor* immobilized on nylon mesh. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 106-114, 2003.

SHAH, S.; THAKUR, I. S. Enrichment and characterization of microbial community of tannery effluent for the degradation of pentachlorophenol. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 18, p. 693–698, 2002.

SHALABY SH, E. M.; ABDU, G. Y. The influence of soil microorganisms and bio- or -organic fertilizers on dissipation of some pesticides in soil and potato tube. **Journal of Plant Protection Research**, v. 50, n. 1, p. 86-92, 2010.

SHARMA, A.; THAKUR, I. S. Characterization of pentachlorophenol degrading bacterial consortium from chemostat. **Bulletin of Environment Contamination Toxicology**, v. 81, p. 12–18, 2008.

SILVA, I. S.; MENEZES, C. R.; FRANCISCON, E.; SANTOS, E. C.; DURRAN, L. R. Degradation of lignosulfonic and tannic acids by ligninolytic soil fungi cultivated under microaerobic conditions. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 53, n. 3, p. 693-699, 2010.

SILVA, J. C. Preservantes. In: **Revista da Madeira**, ed. 103. 2007. Disponível em: <http://www.remade.com.br/br/revistadamadeira_materia.php?num=1061&subject=Preservantes&title=Madeira>. Acesso em: 16 jan. 2014.

SILVA, N. A. **Biodegradação dos pesticidas clorpirifós, metil paration e profenofós por fungos de origem marinha**. 2013. 161f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade de São Paulo. São Carlos, 2013.

SILVA, R. L. **Desenvolvimento de método para determinação de resíduos de pesticidas em alface (*Lactuca sativa* L.) produzida em sistema convencional**. 2010. 85f. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão, 2010.

SIMÕES, M. L. G.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Comparação da técnica tradicional e do método turbidimétrico automatizado no cultivo de diferentes fontes de carbono de fungos

filamentosos isolados de solo de área de Caatinga. **Holos Environment**, v. 5, n. 2, p. 94-103, 2005.

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

SINGH, S.; CHANDRA, R.; PATEL, D. K.; RAI, V. Isolation and characterization of novel *Serratia marcescens* (AY927692) for pentachlorophenol degradation from pulp and paper mill waste. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1747–1754, 2007.

SINGH, S.; SINGH, B. B.; CHANDRA, R.; PATEL, D. K.; RAI, V. Synergistic biodegradation of pentachlorophenol by *Bacillus cereus* (DQ002384), *Serratia marcescens* (AY927692) and *Serratia marcescens* (DQ002385). **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 1821–1828, 2009.

SMITH, A. G.; GANGOLLI, S. D. Organochlorine chemicals in seafood: occurrence and health concerns. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, p. 767–779, 2002.

SOARES, A. F.; LEÃO, M. D.; NETO, M. R. V.; OLIVEIRA, S. M. A. Risk estimate of water contamination by pesticides used in coffee crops. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.16, n.4, p.425–432, 2012.

SOLYANIKOVA, I. P.; GOLOVLEVA, L. A. Bacterial degradation of chlorophenols: pathways, biochemical and genetic aspects. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 39, n. 3, p. 333–351, 2004.

SONKONG, K.; PRASERTSAN, P.; SOBHON, V. Screening and identification of p,p'-DDT degrading soil isolates. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 30, p. 103-110, 2008.

SOUZA, D. F.; COSTA, S. C.; DACOME, A. S.; SOUZA, C. G. M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M. Pentachlorophenol removal by *Pleurotus pulmonarius* in submerged cultures. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 54, n. 2, p. 357-362, 2011.

SUEGARA, J.; LEE, B. D.; ESPINO, M. P.; NAKAI, S.; HOSOMI, M. Photodegradation of pentachlorophenol and its degradation pathways predicted using density functional theory. **Chemosphere**, v. 61, n. 3, p. 341–346, 2005.

TARMAN, K.; LINDEQUIST, U.; WENDE, K.; PORZEL, A.; ARNOLD, N.; WESSJOHAN, L. A. Isolation of a New Natural Product and Cytotoxic and Antimicrobial Activities of Extracts from Fungi of Indonesian Marine Habitats. **Marine Drugs**, v. 9, p. 294-306, 2011.

TERRA, F. H. B. **A indústria de agrotóxicos no Brasil**. 2008. 156f. Dissertação (mestrado) Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2008.

THOMAS, G. **Química medicinal – uma introdução**. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 414p, 2003.

THUAN, N. T.; CHANG, M. B. Investigation of the degradation of pentachlorophenol in sandy soil via low-temperature pyrolysis. **Journal of Hazardous Materials**, v. 229, p.411–418, 2012.

TOMASINI, A.; FLORES, V.; CORTÉS, D.; BARRIOS-GONZALEZ, J. An isolate of *Rhizopus nigricans* capable of tolerating and removing pentachlorophenol. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, V. 17, p. 201-205, 2001.

TORTELLA, G. R.; DIEZ, M. C.; DURAN, N. Fungal diversity and use in decomposition of environmental pollutants. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 31, n. 4, p. 197–212, 2005.

TUOMELA, M.; LYYTIKAEINENB, M.; OIVANENA, P.; HATAKKA, A. Mineralization and conversion of pentachlorophenol (PCP) in soil inoculated with the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 31, p. 65-74, 1999.

VALERÓN, P. F.; PESTANO, J. J.; LUZARDO, O, P.; ZUMBADO, M. L.; ALMEIDA, M.; BOADA, L. D. Differential effects exerted on human mammary epithelial cells by environmentally relevant organochlorine pesticides either individually or in combination, **Chemico-Biological Interactions**, v. 180, p. 485–491, 2009.

VAN EERD L. L.; HOAGLAND R. E.; ZABLOTOWICZ R. M.; HALL J. C. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. **Weed Science**, v. 51, n. 4, p. 472–495, 2003.

VAZ, D.; SOARES, H. M.; SOUZA, S. M. G. U.; FURIGO JR, A. Influence of the pentaclorophenol (PCP) on the kinetic of the anaerobic degradation of the volatile acids. In: **4th European Congress of Chemical Engineering**, Granada, Espanha, 2003.

VERMA, A. K.; RAGHUKUMAR, C.; NAIK, C. G. A novel hybrid technology for remediation of molasses-based raw effluents. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2411–2418, 2011.

VÍTKOVÁ, M.; DERCOVÁ, K.; MOLNÁROVÁ, J.; TÓTHOVÁ, L.; POLEK, B.; GODOČÍKOVÁ, J. The Effect of Lignite and *Comamonas testosteroni* on Pentachlorophenol Biodegradation and Soil Ecotoxicity. **Water Air Soil Pollut**, v. 218, p. 145–155, 2011.

VRYZAS, Z.; PAPADAKIS, E. N.; ORIAKLI, K.; MOYSIADIS, T. P.; PAPADOPOULOU-MOURKIDOU, E. Biotransformation of atrazine and metolachlor within soil profile and changes in microbial communities. **Chemosphere**, v. 89, p. 1330-1338, 2012.

WEI, M. Y.; WANG, C. Y.; LIU, Q. A.; SHAO, C. L.; SHE, Z. G.; LIN, Y. C. Five Sesquiterpenoids from a Marine-Derived Fungus *Aspergillus* sp. Isolated from a Gorgonian *Dichotella gemmacea*. **Marine Drugs**, v. 8, p. 941-949, 2010.

WELLE, D. 2013. **Brasil é o sexto país que mais usa pesticida no mundo**. Disponível em: <<http://economia.terra.com.br/brasil-e-o-sexto-pais-que-mais-usa-pesticida-no-mundo,64184f9a5b890410VgnCLD200000bbcceb0aRCRD.html>>. Acesso em: 08 de jan. 2014.

XUE, N.; WANG, H.; XU, X. Progress in study on endocrine disrupting pesticides (EDPs) in aquatic environment. **Chinese Science Bulletin**, v. 50, p.2257–66, 2005.

YADID, I.; RUDOLPH, J.; HLOUCHOVA, K.; COPLEY, S. D. Sequestration of a highly reactive intermediate in an evolving pathway for degradation of pentachlorophenol. **PNAS Plus**, v. 110, n. 24, p. 182-190, 2013.

YAMADA, T.; MIZUTANI, Y.; UMEBAYASHI, Y.; INNO, N.; KAWASHIMA, M.; KIKUCHI, T.; TANAKA, R. Tandyukisin, a novel ketoaldehyde decalin derivative, produced by a marine sponge-derived *Trichoderma harzianum*. **Tetrahedron Letters**, v. 55, p. 662-664, 2014.

YAMANAKA, R.; SOARES, C. F.; MATHEUS, D. R.; MACHADO, K. M. G. Lignolytic enzymes produced by *Trametes villosaccb176* under different culture conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 1, p. 78-84, 2008.

YU, H. Y.; WANG, Y. K.; CHEN, P. C.; LI, F. B.; CHEN, M. J.; HU, MIN.; OUYANG, X. Effect of nitrate addition on reductive transformation of pentachlorophenol in paddy soil in relation to iron(III) reduction. **Journal of Environmental Management**, v. 132, p. 42-48, 2014.

YU, Z.; ZENG, G. M.; CHEN, Y. N.; ZHANG, J. C.; YU, Y *et al.* Effects of inoculation with *Phanerochaete chrysosporium* on remediation of pentachlorophenol contaminated soil waste by composting. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1285–1291, 2011.

ZHOU, R.; ZHU, L.; CHEN, Y.; KONG, Q. Concentrations and characteristics of organochlorine pesticides in aquatic biota from Qiantang River in China. **Environmental Pollution**, v. 151, p. 190–199, 2008

ANEXOS

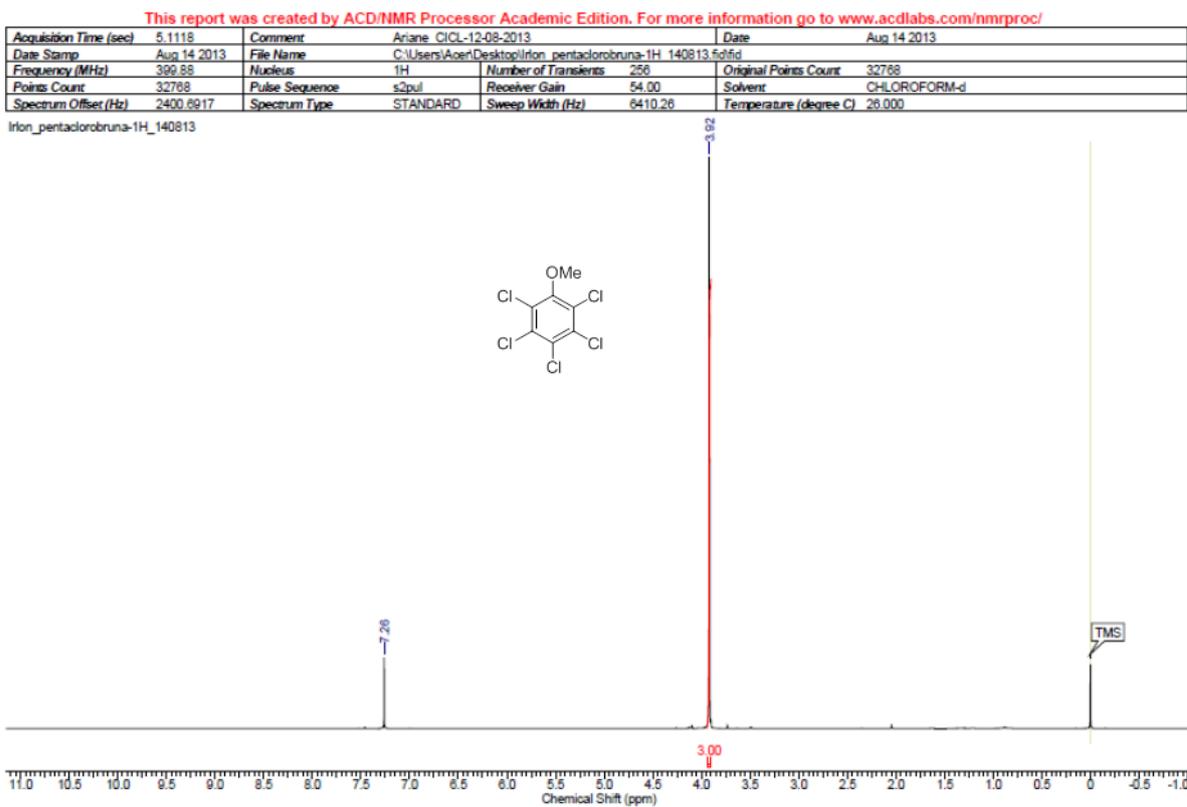


Figura 35: Espectro de RMN de ¹H do composto 1,2,3,4,5-pentacloro-6-metoxibenzeno (pentacloroanisol).

This report was created by ACD/NMR Processor Academic Edition. For more information go to www.acdlabs.com/nmrproc/

Acquisition Time (sec)	1.3197	Comment	Ariane ClCl-12-08-2013	Date	Aug 14 2013
Date Stamp	Aug 14 2013	File Name	C:\Users\Acer\Desktop\Irfon_pentaclorobruna13C_140813.f6f6d		
Frequency (MHz)	100.56	Nucleus	13C	Number of Transients	2368
Points Count	32768	Pulse Sequence	s2pul	Receiver Gain	60.00
Spectrum Offset (Hz)	11063.3408	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	25000.00
				Temperature (degree C)	26.000

Irfon_pentaclorobruna13C_140813

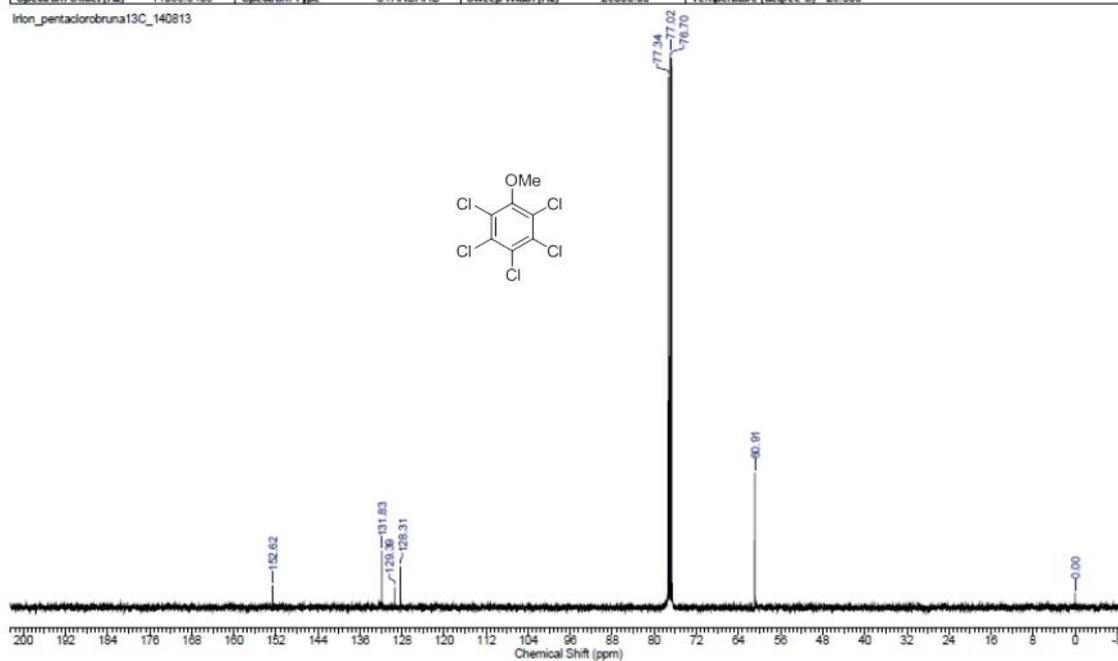


Figura 36: Espectro de RMN de ^{13}C do composto 1,2,3,4,5-pentacloro-6-metoxibenzeno (pentacloroanisol).

Acquisition Time (sec)	5.4528	Date	Dec 6 2013	Date Stamp	Dec 6 2013	Frequency (MHz)	499.84	Nucleus	¹ H		
File Name	C:\Users\USER\Desktop\Irlon_tetrachloroanisol_1H_061213.fid\fid				Points Count	85538	Pulse Sequence	s2pul	Receiver Gain	38.00	
Number of Transients	401	Original Points Count	32788	Points Count	85538	Spectrum Offset (Hz)	2493.3003	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	6009.62
Solvent	CHLOROFORM-d										
Temperature (degree C)	26.000										

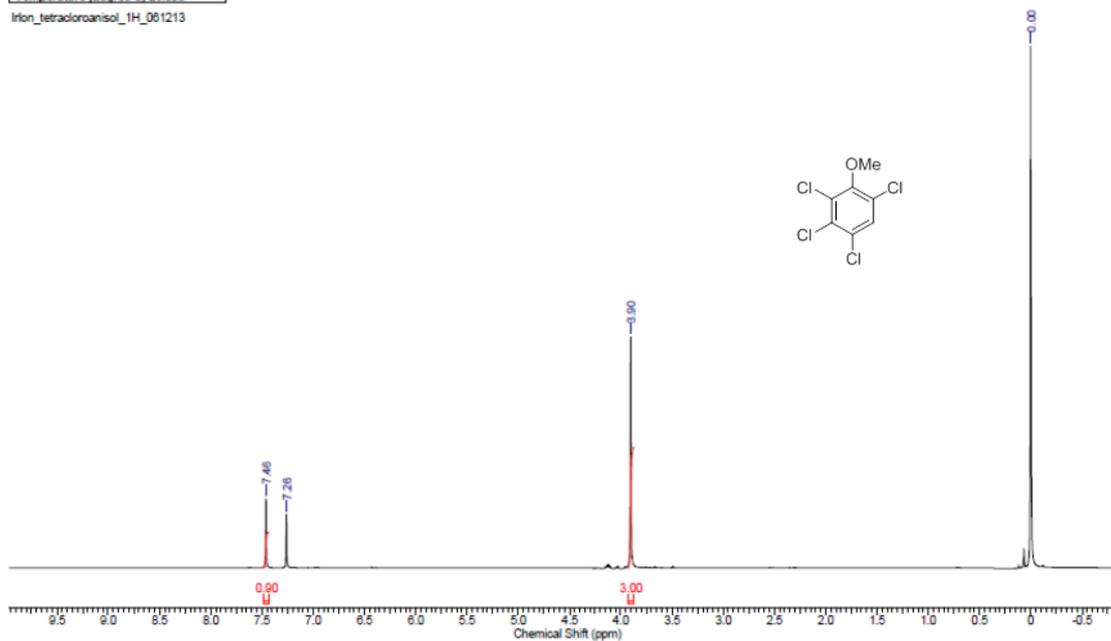


Figura 37: Espectro de RMN de ¹H do composto 2,3,4,6-tetraclorofenol (2,3,4,6-tetracloroanisol).

Acquisition Time (sec)	1.0458	Date	Dec 6 2013	Date Stamp	Dec 6 2013	Frequency (MHz)	125.70	Nucleus	¹³ C
File Name	C:\Users\USER\Desktop\Irfon_tetrachloroanisol_13C_061213.fid\fid				Pulse Sequence	szpul	Receiver Gain	80.00	
Number of Transients	5824	Original Points Count	32768	Points Count	65536	Spectrum Type	STANDARD	Sweep Width (Hz)	31250.00
Solvent	CHLOROFORM-d				Spectrum Offset (Hz)	13827.2809			
Temperature (degree C)	26.000								

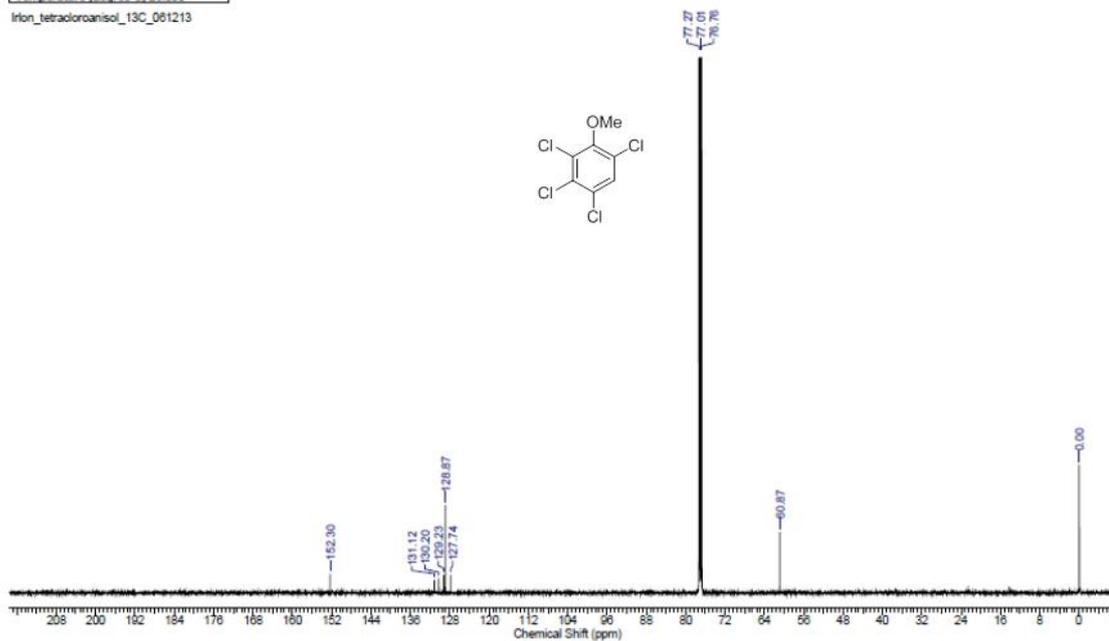


Figura 38: Espectro de RMN de ¹³C do composto 2,3,4,6-tetraclorofenol (2,3,4,6-tetrachloroanisol).