UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**Biodegradação do pesticida esfenvalerato por
fungos de ambiente marinho**

Willian Garcia Birolli

São Carlos, 2013

Willian Garcia Birolli

Biodegradação do pesticida esfenvalerato por fungos de ambiente marinho

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto.

São Carlos, 2013

Aos meus pais, Wilson e Angela, meu irmão Wellington e toda a minha família que me inspiraram e motivaram a encontrar o meu próprio caminho sem medos ou anseios. À minha namorada, Carolina, que me incentivou ao longo desta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Wilson e Angela, meu irmão Wellington e toda a minha família que me inspiraram e motivaram a encontrar o meu próprio caminho sem medos ou anseios.

À minha namorada, Carolina, que me incentivou ao longo desta etapa da minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto, pela orientação, companheirismo e confiança no meu trabalho

À todos os meus amigos do laboratório Alex, Ana Maria, Beatriz, Bruna, Darlisson, David, Gisele, Irlon, Julieta, Katia, Lenilson, Mariana, Matheus, Pâmela, Natália e Sandra pela ajuda nos momentos mais críticos, pelo companheirismo e por tornarem o laboratório um ambiente agradável e acolhedor com conversas produtivas e/ou improdutivas.

Aos técnicos do Laboratório, Marília e João, pelos ensinamentos e companheirismo ao longo destes dois anos.

À Profa. Dra. Maria Olímpia de Oliveira Rezende, por permitir o uso do cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas.

À técnica do laboratório de Química Ambiental (IQSC), Diva, pela obtenção dos cromatogramas e por toda a colaboração para o meu mestrado e ao Dr. Guilherme Titato, do Laboratório de Cromatografia (IQSC), pela obtenção dos cromatogramas e disposição em ajudar.

Ao CNPq pelo apoio financeiro recebido através da bolsa de mestrado.

À todos os amigos e funcionários do IQSC que sempre me trataram com muita solicitude e, de forma direta ou indireta, contribuíram para a finalização deste trabalho.

“Ninguém pode construir em teu lugar as pontes que precisarás passar para atravessar o rio da vida – ninguém, exceto tu, só tu. Existem, por certo, atalhos sem números, pontes e semi-deuses que se oferecerão para levar-te além do rio; mas isso te custaria a tua própria pessoa; tu te hipotecarias e te perderias. Existe no mundo um único caminho por onde só tu podes passar. Onde leva? Não perguntes, segue-o.”

FRIEDRICH WILHELM NIETZSCHE

RESUMO

Desde a revolução verde, na década de 1950, o processo tradicional de produção agrícola passou por mudanças com a inserção do uso intensivo de agrotóxicos como os piretróides, que são a terceira classe química de pesticidas mais comercializada no mundo. Estes compostos geralmente são ésteres que contêm um anel dimetilciclopropano com grupamentos variáveis e a presença de anéis aromáticos. Cada vez mais os cientistas vêm explorando a diversidade microbiana na biodegradação de pesticidas e neste contexto, o emprego de fungos de ambiente marinho possui grande potencialidade devido ao seu sistema enzimático único com a presença de compostos altamente oxigenados e halogenados, assim como o esfenvalerato empregado neste trabalho. Entretanto, estes micro-organismos não têm sido explorados na biotransformação de pesticidas piretróides. Neste estudo foi avaliada a eficiência de fungos de ambiente marinho [*Penicillium raistrickii* CBMAI 931, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Cladosporium* sp. CBMAI 1237, *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6, *Acremonium* sp. Dr(F)1, *Westerdykella* sp. Dr(M2)4 e *Cladosporium* sp. Dr(M2)2] na degradação do pesticida piretróide esfenvarelato. Observou-se que o esfenvalerato e seus principais metabólitos de degradação causam efeitos inibitórios significativos no crescimento dos fungos, mas não o suficiente para inviabilizar o estudo da biodegradação por meio destes micro-organismos. Os resultados obtidos sugerem que diversas espécies fúngicas contribuem para a biodegradação do pesticida esfenvalerato, entretanto a eficiência da degradação deste composto varia muito entre linhagens. Observou-se a degradação de 3 a 35% de 100 mg.L⁻¹ de esfenvalerato presente na formulação comercial (SUMIDAN 150SC®) em 14 dias para diferentes fungos. Os metabólitos identificados [3-fenoxibenzaldeído, ácido 3-fenoxibenzoico, álcool 3-fenoxibenzílico e ácido 3-(hidroxifenoxi)benzoico] tornaram possível uma proposta de rota biodegradativa, onde se observou metabólitos cada vez mais polares, aumentando a possibilidade de carreamento para o meio aquoso. Constatou-se que em geral ocorre a formação de grandes quantidade do ácido 3-fenoxibenzoico e do ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico, compostos

considerados tóxicos e que podem causar efeitos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente. Para a linhagem *Acremonium* sp. Dr(F)1 que apresentou os melhores resultados de biodegradação, após 28 dias de cultivo com 100 mg.L⁻¹ de esfenvalerato observou-se 20 mg.L⁻¹ de ácido 3-fenoxibenzoico, que posteriormente foi convertido ao ácido 3-(hidroxifenoxi)benzoico. Observou-se também uma biodegradação mais eficiente do princípio ativo esfenvalerato puro do que na formulação comercial, que pode ser causada por diversos fatores, como a toxicidade do xileno presente na formulação comercial ou a adsorção do esfenvalerato aos componentes da formulação emulsionável dificultando a ação enzimática. A partir destes resultados toma-se interessante o emprego destes micro-organismos visando a biorremediação deste pesticida.

Palavras-chaves: Ácido 3-fenóxi benzoico, Biodegradação, Esfenvalerato, Fungo Piretróide.

ABSTRACT

Since the green revolution in the 1950s, the traditional agricultural production has undergone changes such as the intensive use of pesticides, including pyrethroids, which is the third most sold chemical class of pesticide. These compounds are generally esters containing a dimethylcyclopropane ring with different groups and aromatic rings. Scientists are exploring the microbial diversity for the biodegradation of pesticides. The use of marine fungi may show great potential to an efficient biodegradation, because of its unique enzymatic system and the presence of halogenated and oxygenated compounds, such as the pesticide esfenvalerate used in this work. However, these microorganisms have not been explored in the biotransformation of pyrethroid pesticides. In this study, marine-derived fungi [*Penicillium raistrickii* CBMAI 931, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Cladosporium* sp. CBMAI 1237, *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6, *Acremonium* sp. Dr(F)1, *Westerdykella* sp. Dr(M2)4 and *Cladosporium* sp. Dr(M2)2] were applied in the biodegradation of the esfenvalerate. It was observed that the esfenvalerate and its degradation metabolites cause an inhibitory effect on the fungi growth, however not enough to make unfeasible the study of the biodegradation by these microorganisms. The results suggest that different fungal species contribute to the degradation of esfenvalerate, although the efficiency of degradation varies widely between strains. It was observed 3-35% of degradation at a concentration of 100 mg.l⁻¹ of esfenvalerate present in the commercial formulation (SUMIDAN 150SC®) in 14 days. The identified metabolites [3-phenoxybenzaldehyde, 3-phenoxybenzoic acid, 3- phenoxybenzyl alcohol and 3-(hydroxyphenoxy)benzoic acid) enabled the proposal of a biodegradative pathway, in which was noted the increasingly polar character of metabolites, raising the possibility of entrainment for aqueous medium . It was observed, in general, the large formation of 3-phenoxybenzoic and 2-(4-chlorophenyl)-3-methylbutanoic acid, compounds that are considered toxic and may cause harmful effects to human health and the environment. For the strain *Acremonium* sp. Dr (F)1, which showed the best results of 100 mg.l⁻¹ esfenvalerate biodegradation after 28 days, it was observed

20 mg.l⁻¹ of 3-phenoxybenzoic acid, which was later converted to 3-(hydroxyphenoxy)benzoic acid. It was also observed a more efficient biodegradation of the pure active ingredient than the commercial formulation, what can be caused by various reasons, such as the toxicity of the xylene present in the commercial formulation or the esfenvalerate adsorption in the components of the emulsifiable formulation, difficulting the enzymatic activity. These results shows the potential use of these microorganisms in the bioremediation of esfenvalerate.

Key words: Biodegradation, Esfenvalerate, Fungus, 3-Phenoxybenzoic acid, Pyrethroid.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais processos que atuam na movimentação/deslocamento e degradação de pesticidas na natureza (Adaptado de Gebler, 2004).	21
Figura 2 - Exemplos de estruturas de piretróides utilizados como pesticidas. ..	25
Figura 3 - Estrutura molecular dos sinergistas comumente empregados com pesticidas piretróides.	28
Figura 4 - Vendas e participação no mercado dos pesticidas piretróides (Housset e Dickman 2009).	29
Figura 5 - Divisão do mercado global de piretróides em 2008, por cultura, peste e região (Wirtz <i>et al.</i> 2009).....	30
Figura 6 - (A) Biodegradação da fempropatrina por <i>Achromobacter</i> sp. (Wang <i>et al.</i> , 2011)e da (B) cipermetrina por <i>Micrococcus</i> sp. (Tallur <i>et al.</i> , 2008)	34
Figura 7 - Biodegradação do esfenvalerato pelo fungo <i>Cladosporium</i> sp.....	35
Figura 8 - Biodegradação da β -ciflutrina pelo fungo <i>Trichoderma viride</i>	35
Figura 9 - Mecanismo catalítico de hidrólise da permetrina por carboxilesterases.	38
Figura 10 - Linhagens fúngicas de origem marinha empregadas neste estudo (Elaborado pelo autor).	42
Figura 11 - (A) Meio de cultura líquido inoculado com a linhagem fúngica <i>Westerdykella</i> sp. Dr(M2)4 e (B) cultivo em agitador orbital (elaborado pelo autor).	44
Figura 12 - Ilustração do experimento de crescimento radial (elaborado pelo autor).	46
Figura 13 - (A) Inoculação com ponto de inserção central com a face para baixo e (B) cultivo em incubadora B.O.D. (elaborado pelo autor).	46
Figura 14 - Fluxograma das etapas de preparação e extração do pesticida e de seus metabólitos para análises cromatográficas.....	48
Figura 15 - Curva analítica para o esfenvalerato.....	50
Figura 16 - Curva analítica para o FBAlD para a faixa de concentração entre 5-33 mg.L ⁻¹	51

Figura 17 - Curva analítica para o FBAlc para a faixa de concentração entre 25-250 mg.L ⁻¹	51
Figura 18 - Curva analítica para o FBAlc para a faixa de concentração entre 5-33 mg.L ⁻¹	52
Figura 19 - Curva analítica para o FBAlc para a faixa de concentração entre 25-250 mg.L ⁻¹	52
Figura 20 - Curva analítica para o FBAlc para a faixa de concentração entre 5-33 mg.L ⁻¹	53
Figura 21 - Curva analítica para o FBAlc para a faixa de concentração entre 25-250 mg.L ⁻¹	53
Figura 22 - Curva analítica para o ACI para a faixa de concentração entre 5-33 mg.L ⁻¹	54
Figura 23 - Curva analítica para o ACI para a faixa de concentração entre 25-250 mg.L ⁻¹	55
Figura 24 - Experimentos de crescimento microbiano para a linhagem de <i>Microsphaeropsis</i> sp. Dr(A)6 em meio sólido.	60
Figura 25 - Experimentos de crescimento microbiano para a linhagem de <i>Westerdykella</i> sp. Dr(M2)4 em meio sólido.	63
Figura 26 - Experimentos de crescimento microbiano para a linhagem de <i>Acremonium</i> sp. Dr(F)1 em meio sólido.	66
Figura 27 - Experimentos de crescimento microbiano para a linhagem de <i>Penicillium raistricki</i> Ce16.	68
Figura 28 - Experimentos de crescimento microbiano para a linhagem de <i>Cladosporium</i> sp. Dr(M2)2.	70
Figura 29 - Experimentos de crescimento microbiano para a linhagem de <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237.....	73
Figura 30 - Experimentos de crescimento microbiano durante 7 dias para a linhagem de <i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 935.....	74
Figura 31 - (A) Cromatograma obtido por CLAE-UV para a biodegradação de EsfCom (100 mg.L ⁻¹) durante 14 dias em agitador orbital (130 rpm e 32°C)	

utilizando a linhagem de <i>Acremonium</i> sp. Dr(F)1 e o controle abiótico e (B) a ampliação entre 9 e 18 minutos.	78
Figura 32 - (A) Cromatograma obtido por CLAE-UV para a biodegradação de EsfCom (100 mg.L ⁻¹) durante 14 dias em agitador orbital (130 rpm e 32°C) utilizando a linhagem de <i>Acremonium</i> sp. Dr(F)1 e o respectivo controle fúngico e (B) a ampliação entre 9 e 19 minutos.	79
Figura 33 - (A) Cromatograma obtido por CLAE-UV para a biodegradação de EsfCom (100 mg.L ⁻¹) durante 14 dias em agitador orbital (130 rpm e 32°C) utilizando a linhagem de <i>Cladosporium</i> sp. Dr(M2)2 e o respectivo controle fúngico e (B) a ampliação entre 8 e 18 minutos.....	80
Figura 34 - (A) Cromatograma obtido por CLAE-UV para a biodegradação de EsfCom (100 mg.L ⁻¹) durante 14 dias em agitador orbital (130 rpm e 32°C) utilizando a linhagem de <i>Microsphaeropsis</i> sp. Dr(A)6 e o respectivo controle fúngico e (B) a ampliação entre 7 e 13 minutos.....	81
Figura 35 - (A) Cromatograma obtido por CLAE-UV para a degradação de EsfCom (100 mg.L ⁻¹) durante 14 dias em agitador orbital (130 rpm e 32°C) abióticamente e o controle do meio de cultura e (B) a ampliação entre 9 e 19 minutos.....	82
Figura 36 - Cromatogramas obtidos por CLAE-UV da biodegradação de EsfCom (100 mg.L ⁻¹) pela linhagem <i>Acremonium</i> sp. Dr(F)1 em (A) 0, (B) 7, (C) 14, (D) 21 e (E) 28 dias	88
Figura 37 - Biodegradação de EsfCom (100 mg.L ⁻¹) ao longo do tempo sem a presença de micro-organismos (controle abiótico) e utilizando-se as linhagens <i>Microsphaeropsis</i> sp. Dr(A)6, <i>Acremonium</i> sp. Dr(F)1 e <i>Westerdykella</i> sp. Dr(M2)4.	90
Figura 38 - Determinação do FBAC resultante da biodegradação do EsfCom (100 mg.L ⁻¹) ao longo do tempo sem a presença de micro-organismos (controle abiótico) e utilizando-se as linhagens <i>Microsphaeropsis</i> sp. Dr(A)6, <i>Acremonium</i> sp. Dr(F)1 e <i>Westerdykella</i> sp. Dr(M2)4.....	91
Figura 39 - Determinação do ACI resultante da biodegradação do EsfCom (100 mg.L ⁻¹) ao longo do tempo (0,7,14,21 e 28 dias) sem a presença de micro-	

organismos (controle abiótico) e utilizando-se as linhagens <i>Microsphaeropsis</i> sp. Dr(A)6, <i>Acremonium</i> sp. Dr(F)1 e <i>Westerdykella</i> sp. Dr(M2)4.	91
Figura 40 – Cromatogramas obtidos por CLAE-UV da biodegradação de EsfTec pela linhagem <i>Acremonium</i> sp. Dr(F)1 por (A) 0, (B) 7, (C) 14, (D) 21 e (E) 28 dias.	96
Figura 41 – Biodegradação de EsfTec (100 mg.L ⁻¹) ao longo do tempo sem a presença de micro-organismos (controle abiótico) e utilizando-se as linhagens de <i>Microsphaeropsis</i> sp. Dr(A)6, <i>Acremonium</i> sp. Dr(F)1 e <i>Westerdykella</i> sp. Dr(M2)4.	99
Figura 42 - Determinação do FBAC resultante da biodegradação de EsfTec (100 mg.L ⁻¹) ao longo do tempo sem a presença de micro-organismos (controle abiótico) e utilizando-se as linhagens de <i>Microsphaeropsis</i> sp. Dr(A)6, <i>Acremonium</i> sp. Dr(F)1 e <i>Westerdykella</i> sp. Dr(M2)4.	99
Figura 43 - Determinação do ACI resultante da biodegradação de EsfTec (100 mg.L ⁻¹) ao longo do tempo sem a presença de micro-organismos (controle abiótico) e utilizando-se as linhagens <i>Microsphaeropsis</i> sp. Dr(A)6, <i>Acremonium</i> sp. Dr(F)1 e <i>Westerdykella</i> sp. Dr(M2)4.	100
Figura 44 – Cromatogramas obtidos por CLAE-EM da biodegradação de EsfTec (100 mg.L ⁻¹) pela linhagem <i>Microsphaeropsis</i> sp Dr(A)6 e o respectivo controle fúngico.	102
Figura 45 - Espectro de massas do (A) ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico (composto B) e (B) padrão analítico do ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico.	103
Figura 46 - Espectro de massas do (A) composto C e (B) padrão analítico do ácido 3-fenoxibenzoico.	103
Figura 47 – Espectro de massas obtido para o ácido 3-(hidroxifenoxi)benzoico.	104
Figura 48 – Padrão isotópico do íon m/z 231,06±0,05.	105
Figura 49 – Proposta de rota biodegradativa do esfenvalerato a partir dos metabólitos detectados neste estudo por fungos de ambiente marinho.	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição estereoisomérica do fenvalerato e do esfenvalerato (Schneiders 1994)	27
Tabela 2 - Bactérias degradadoras de pesticidas piretróides que já foram isoladas e caracterizadas.....	32
Tabela 3 - Diâmetro de colônia medido para o cultivo da linhagem de <i>Microsphaeropsis</i> sp. Dr(A)6 em meio sólido com ponto de inserção central.	59
Tabela 4 - Diâmetro de colônia medido para o cultivo da linhagem de <i>Westerdykella</i> sp. Dr(M2)4 em meio sólido com ponto de inserção central.	62
Tabela 5 - Diâmetro de colônia medido para o cultivo da linhagem de <i>Acremonium</i> sp. Dr(F)1 em meio sólido com ponto de inserção central.	65
Tabela 6 - Diâmetro de colônia medido para o cultivo da linhagem de <i>Penicillium raistrickii</i> CBMAI 931 em meio sólido com ponto de inserção central.	67
Tabela 7 - Diâmetro de colônia medido para o cultivo da linhagem de <i>Cladosporium</i> sp. Dr(M2)2 em meio sólido com ponto de inserção central.	69
Tabela 8 - Diâmetro de colônia medidos para o cultivo da linhagem de <i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237 em crescimento radial.....	72
Tabela 9 - Quantificação de EsfCom, FBAl _d , FBAC, FBAl _c e ACI por CLAE-UV após a biodegradação de EsfCom (100 mg.L ⁻¹ , durante 14 dias, 32°C e 130 rpm).	76
Tabela 10 - Massa fúngica e pH determinados para a biodegradação de 100 mg.L ⁻¹ de EsfCom e o controle fúngico cultivados durante 14 dias (130 rpm e 32°C).	84
Tabela 11 - Resultados da degradação abiótica do EsfCom (100mg.L ⁻¹) observada ao longo do tempo em agitador orbital (32°C e 130rpm).	86
Tabela 12 - Biodegradação do EsfCom (100 mg.L ⁻¹) pelo fungo <i>Acremonium</i> sp. Dr(F)1 ao longo do tempo em agitador orbital (32°C e 130rpm).....	87
Tabela 13 - Biodegradação do EsfCom (100mg.L ⁻¹) pelo fungo <i>Westerdykella</i> sp. Dr(M2)4 ao longo do tempo em agitador orbital (32°C e 130rpm).	89

Tabela 14 - Biodegradação do EsfCom (100 mg.L ⁻¹) pelo fungo <i>Microsphaeropsis</i> sp. Dr(A)6 ao longo do tempo em agitador orbital (32°C e 130rpm).....	90
Tabela 15 - Resultados da degradação abiótica do EsfTec (100mg.L ⁻¹) observada ao longo do tempo em agitador orbital (32°C e 130rpm).	94
Tabela 16 - Biodegradação do EsfTec (100 mg.L ⁻¹) pelo fungo <i>Acremonium</i> sp. Dr(F)1 em agitador orbital (32°C e 130rpm).	95
Tabela 17 - Biodegradação do EsfTec (100mg.L ⁻¹) por fungo <i>Westerdykella</i> sp. Dr(M2)4 em agitador orbital (32°C e 130rpm).....	95
Tabela 18 - Biodegradação do EsfTec (100mg.L ⁻¹) pelo fungo <i>Microsphaeropsis</i> sp. Dr(A) em agitador orbital (32°C e 130rpm).	98
Tabela 19 - Metabólitos detectados por CLAE-EM nas amostras de biodegradação de EsfCom (100 mg.L ⁻¹) durante 14 dias utilizando-se de diferentes fungos e na degradação abiótica.....	106

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Síntese do pesticida piretróide fenvalerato	26
Esquema 2 - Hidrólise de ligações ésteres por carboxilesterases. Onde R e R' são grupamentos alquílicos ou arílicos	31
Esquema 3 - Biodegradação da permetrina pela hidrolase de <i>Aspergillus niger</i> . 36	
Esquema 4 - Hidrólise do esfenvalerato por carboxilesterase de fungos de ambiente marinho.....	107
Esquema 5 - Biotransformação do 2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila ao 3-fenoxibenzaldeído que pode ocorrer pela ação de uma enzima oxinitrilase de fungos marinhos.	107
Esquema 6 - Oxidação do 3-fenoxibenzaldeído ao ácido 3-fenoxibenzoico pela ação de uma aldeído-desidrogenase de fungos marinhos.	107
Esquema 7 - Redução do 3-fenoxibenzaldeído ao álcool 3-fenoxibenzílico por aldeído redutase de fungos marinhos.	108
Esquema 8 - Hidroxilação do ácido 3-fenoxibenzoico ao ácido 3-(hidroxifenoxi)benzoico que pode ocorrer pela ação de uma mono-oxigenase de fungos marinhos.	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACI	Ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico
CG-EM	Cromatografia em fase gasosa acoplado à espectrometria de massas
CLAE-UV	Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
CTF	Catálise de transferência de fase
DMSO	Dimetilsulfóxido
Esf.	Esfenvalerato
EsfCom	Esfenvalerato presente na formulação comercial
EsfTec	Esfenvalerato grau técnico
FBAc	Ácido 3-fenoxibenzoico
FBAld	3-Fenoxibenzaldeído
FBAlc	Álcool 3-fenoxibenzílico
hidroxiFBAc	Ácido 3-(hidroxifenoxi)benzoico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1. Pesticidas piretróides.....	24
1.2. Riscos dos piretróides à saúde humana.....	27
1.3. Produção, comercialização e aplicação de pesticidas piretróides.....	28
1.4. Mecanismo enzimático da biodegradação de piretróides	30
1.5. Biodegradação de piretróides por micro-organismos	31
1.5.1. Biodegradação de piretróides por bactérias	31
1.5.2. Biodegradação de piretróides por fungos.....	34
1.5.3. Outros tipos de biodegradação de piretróides.....	37
2. OBJETIVOS.....	40
2.1. Objetivo geral	40
2.2. Objetivos específicos.....	40
3. MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1. Pesticida esfenvalerato e seus metabólitos de degradação.....	41
3.2. Micro-organismos	41
3.3. Cultivo dos micro-organismos.....	42
3.3.1. Cultivo dos micro-organismos em meio de cultura sólido	42
3.3.2. Cultivo em meio de cultura líquido.....	43
3.4. Crescimento microbiano em meio de cultura sólido	44
3.5. Quantificação dos pesticidas	47
3.5.1. Cultivo fúngico	47
3.5.2. Extração dos pesticidas e de seus metabólitos	47
3.5.3. Quantificação do pesticida e seus produtos de degradação por CLAE-UV	49
3.6. Detecção de metabólitos	55

3.7. Descarte de resíduos.....	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4.1. Crescimento fúngico em meio sólido na presença do esfenvalerato e seus metabólitos.....	57
4.2. Seleção de micro-organismos degradadores do pesticida esfenvalerato em meio líquido	75
4.2.1. Quantificação do princípio ativo esfenvalerato e dos principais metabólitos de biodegradação	76
4.2.2. Avaliação da biodegradação do esfenvalerato de acordo com a massa fúngica e pH do meio reacional.....	84
4.3. Biodegradação do princípio ativo esfenvalerato (EsfTec) e sua formulação comercial (EsfCom) com os fungos selecionados	85
4.3.1. Quantificação do EsfCom e de seus principais metabólitos de degradação.....	85
4.3.2. Quantificação do EsfTec e de seus principais metabólitos de degradação.....	93
4.4. Identificação de metabólitos da biodegradação por CLAE-EM.....	101
4.5. Proposta de rota de biodegradação do esfenvalerato.....	106
5. CONCLUSÃO	110
REFERÊNCIAS.....	111

1. INTRODUÇÃO

Desde a revolução verde, na década de 1950, o processo tradicional de produção agrícola passou por mudanças com a inserção de novas tecnologias visando à produção intensiva de “commodities” como soja, cana, laranja e café. Estas tecnologias envolvem o uso de agrotóxicos com a finalidade de controlar doenças e aumentar a produtividade agrícola. Atualmente, essa difusão maciça de substâncias químicas constitui uma das principais ameaças ao meio ambiente, pois apesar destes agrotóxicos terem sido desenvolvidos para atuarem em um conjunto específico de organismos, eles são potencialmente danosos para todas as formas de vida com as quais entram em contato. Os efeitos do uso de agrotóxicos podem interferir na fisiologia (inclusive na genética), no comportamento, na expectativa de vida e na reprodução de todos os seres vivos e dependendo de sua toxicidade e do tempo que permanece disponível no meio ambiente, estes compostos podem interferir em processos básicos do ecossistema, tais como a “respiração do solo” e a ciclagem de nutrientes (Rebelo *et al.*, 2010).

Segundo a Lei nº 7802 de 11 de julho de 1989 *“Agrotóxicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas, ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos”* (Brasil, 1989). Os agrotóxicos, também conhecidos como pesticidas, são frequentemente divididos de acordo com o tipo de peste que estes visam controlar. Uma outra classificação muito utilizada é baseada na natureza química do ingrediente ativo, como: organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretróides (EPA, 2013).

Na degradação de agrotóxicos é importante levar em consideração alguns processos químicos, físicos e biológicos que ocorrem com o pesticida e seus produtos de degradação. Pois, não ocorre somente uma degradação físico-química do pesticida no solo, mas também uma ação enzimática da biota do solo, de modo que pode se tornar difícil a separação do que é degradado

biologicamente daquilo que é transformado abioticamente, especialmente nos casos de grupos funcionais lábeis ou facilmente interconvertidos.

Existem diversos processos que atuam na movimentação e degradação de pesticidas na natureza (Figura 1). A degradação química pode ocorrer em um número maior de processos como: hidrólise, oxidação-redução, adsorção-dessorção e fotólise. A biodegradação dos pesticidas envolve a biota existente no solo e na água, sendo mais ativa na chamada zona de raízes e diminuindo à medida que o produto se aprofunda no solo. Também é importante ressaltar que praticamente todos os agrotóxicos são susceptíveis a estas transformações, entretanto em maior ou menor grau (Schnoor, 1992; Havens *et al.*, 1995; Radosevich *et al.*, 1997).

Figura 1 - Principais processos que atuam na movimentação/deslocamento e degradação de pesticidas na natureza (Adaptado de Gebler, 2004).

Entre os pesticidas susceptíveis a estes processos estão os piretróides, os quais são derivados sintéticos das piretrinas, que são pesticidas naturais encontrados na planta *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Existem diversas estruturas, mas em geral estes pesticidas são ésteres que contêm um anel dimetilciclopropano com um grupamento variável e a presença de anéis aromáticos (Sogorb e Vilanova, 2002).

Devido à capacidade dos micro-organismos em transformar e/ou degradar xenobióticos, os cientistas cada vez mais vêm explorando a diversidade microbiana, particularmente em áreas contaminadas, na busca de micro-organismos capazes de degradarem uma variedade de poluentes químicos. Assim, a biotransformação de pesticidas tem sido investigada por seleção de micro-organismos nativos com alto potencial de degradação, bem como, por estudos envolvendo a tecnologia do DNA recombinante, através da identificação e caracterização de vários genes/enzimas com a capacidade de degradar organopesticidas. Portanto, a seleção de micro-organismos e a engenharia genética podem ser usadas para melhorar o desempenho destes organismos, que possuem propriedades e características essenciais na biodegradação de uma diversidade de compostos tóxicos disseminados no meio ambiente (Schroll *et al.*, 2004).

Uma grande parte do meio ambiente e também das áreas cultivadas são caracterizadas por elevadas temperaturas, acidez ou basicidade, alta pressão e/ou grande concentração de sais. Micro-organismos marinhos são expostos naturalmente a estas condições adversas e conseqüentemente evoluíram para desenvolverem-se em tais ambientes. Outra característica muito importante é a rápida adaptação destes micro-organismos às variações ambientais constantes, uma vez que estes eventos são muito frequentes em ambientes marinhos, como mudanças de temperatura e pH devido à correntes marítimas e/ou alterações de luminosidade devido à mudanças de marés, tempestades tropicais e influências terrestres. Estes micro-organismos também podem apresentar grande eficiência biodegradativa pois apresentam um sistema enzimático único com compostos altamente halogenados e oxigenados, assim como o

esfenvalerato utilizado neste estudo. Desta forma, fungos marinhos podem apresentar um grande potencial biodegradativo no tratamento biológico de poluentes, inclusive em ambientes extremos (Dash *et al.*, 2013).

Heinis e Knuth observaram que após a aplicação superficial de Asana EC® (formulação comercial que tem como princípio ativo o esfenvalerato) em ambiente marinho fechado (“littoral enclosures”) a concentração de esfenvalerato ($5 \mu\text{g.L}^{-1}$) diminuiu rapidamente em 24 horas, de modo que 90% do princípio ativo não estava presente na água após este período. Observou-se que o esfenvalerato se acumulou nos sedimentos, na vegetação aquática e no material de isolamento, principalmente depois de aplicações sucessivas. O que sugere que este pesticida seja relativamente persistente no ambiente marinho, o qual é o ecossistema nativo dos fungos utilizados neste trabalho (Heinis e Knuth, 1992).

Fungos de ambiente marinho já foram empregados com sucesso em processos biodegradativos, como as linhagens *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849 e *Mucor racemosus* CBMAI 847, que foram capazes de metabolizar o pireno para pirenilsulfato e benzo[a]pireno para benzo[a]pirenilsulfato (Passarini *et al.*, 2011). Verma *et al.* também empregaram fungos marinhos em diferentes reações de biodegradação, como no tratamento de efluente industrial contendo polímeros melanoidínicos (Verma *et al.*, 2011), no tratamento de efluentes têxteis (Verma *et al.*, 2010) e na biorremediação do corante antraquinona (Verma *et al.*, 2012).

A biodegradação de pesticidas utilizando fungos de origem marinha foi realizada pelo nosso grupo utilizando-se o pesticida organoclorado Dicloro-Difenil-Tricloroetano (DDT) pela linhagem fúngica *Trichoderma* sp. (Ortega *et al.*, 2011) e o organofosforado profenofos (Silva *et al.*, 2013) pelas linhagens fúngicas de *Aspergillus sydowii* CBMAI 935 e *Penicillium raistrickii* CBMAI 931.

Existem diversos trabalhos na literatura que demonstram a eficiência de micro-organismos na degradação de organoclorados, organofosforados e

carbamatos. No que se refere aos piretróides, existem estudos demonstrando o potencial de degradação por bactérias (Wang *et al.*, 2011), porém poucos estudos foram realizados utilizando-se de fungos (Chen *et al.*, 2011d). Assim, o potencial enzimático degradativo de fungos marinhos foi explorado neste trabalho para esta classe química de pesticidas.

1.1. Pesticidas piretróides

As *piretrinas* são ésteres isolados de crisântemos e foram utilizadas como inseticidas durante muitos anos devido a sua ação tóxica sob uma diversidade de insetos com baixa toxicidade em mamíferos. Contudo, as piretrinas naturais apresentam grande instabilidade à luz solar e ao ar, motivo pelo qual foram desenvolvidos os *piretróides*, que são derivados sintéticos mais estáveis que apresentam a mesma especificidade e atividade das piretrinas (Santos *et al.*, 2007).

A maioria dos piretróides contém um grupamento ciclopropano, ligado a anéis aromáticos através de uma ligação éster. Entretanto, visando uma maior atividade inseticida e estabilidade foram realizadas diversas modificações nas estruturas destes compostos. Entre estas se destaca a adição de um grupo ciano que potencializa a atividade inseticida, de modo que os piretróides que não possuem o grupo ciano são conhecidos como piretróides do *tipo I*, enquanto os que possuem este grupamento são chamados de *tipo II*. Outras modificações como a inserção de halogênios, posicionamento de grupos hidrofóbicos e arranjos estereoquímicos também foram introduzidos para o melhor desempenho destes pesticidas. Sendo assim, mais de 1000 estruturas foram desenvolvidas, inclusive compostos que não possuem o anel ciclopropano e a ligação éster (Figura 2) (Sogorb e Vilanova, 2002; Soderlund *et al.*, 2002).

Figura 2 - Exemplos de estruturas de piretróides utilizados como pesticidas.

Piretróides do Tipo I (ausência do grupo α -ciano)

Piretróides do Tipo II (presença do grupo α -ciano)

(Piretrina natural)

(Primeiro análogo sintético)

(Inserção de anéis aromáticos)

(Halogenação e/ou inserção do grupo α -ciano)

(Ausência do ciclopropano e/ou da ligação ester)

(Enriquecimento Isomérico)

O fenvalerato [2-(4-clorofenil)-3-metilbutirato de α -ciano-3-fenoxibenzila] é um pesticida do *tipo II* que contém anéis aromáticos e um átomo de halogênio. Este pesticida é sintetizado em várias etapas por catálise de transferência de fase (CTF). O método melhor descrito envolve a reação de substituição nucleofílica entre o cloreto do *p*-clorobenzoíla e o cianeto de sódio formando o *p*-clorofenilacetonitrila. O segundo passo é a reação do *p*-CBCN com o cloreto de isopropila em condições básicas. Em seguida o produto é hidrolisado em meio básico e após o tratamento em meio ácido fornece o correspondente ácido

carboxílico, o qual é convertido no derivado de cloreto de acila na presença de SOCl_2 . Posteriormente a reação entre o cloreto de acila e o 3-fenoxibenzaldeído na presença de NaCN fornece o fenvalerato (Esquema 1) (Ganapati e Yogeeta, 2003).

Esquema 1 – Síntese do pesticida piretróide fenvalerato

O fenvalerato é um ingrediente ativo composto de quatro estereoisômeros. Originalmente, a mistura foi comercializada como Pidrin® (fenvalerato), uma mistura de todos os estereoisômeros em composições similares. Entretanto, desde que foi observada a maior atividade inseticida para a configuração *SS* (Figura 2) os processos de síntese passaram a ser modificados para o enriquecimento do fenvalerato com este estereoisômero. Ao produto do enriquecimento isomérico foi dado o nome de esfenvalerato, o qual contém uma proporção diastereoisomérica 85:15 e uma proporção enantiomérica de 84:1 (Tabela 1) (Schneiders, 1994).

Tabela 1 – Composição estereoisomérica do fenvalerato e do esfenvalerato (Schneiders 1994)

Estereoisômero	S,S	S,R	R,S	R,R
Fenvalerato	23	27	27	23
Esfenvalerato	84	8	7	1

1.2. Riscos dos piretróides à saúde humana

Os piretróides são aproximadamente 2250 vezes mais tóxicos para insetos do que para mamíferos, pois estes invertebrados possuem maior sensibilidade nos canais de sódio, enquanto os mamíferos são protegidos pela baixa absorção dermal e rápido metabolismo de degradação. Os mecanismos de toxicidade dos piretróides são complexos e se tornam ainda mais complicados quando estes são formulados juntamente com outras classes de inseticidas (Bradberry *et al.* 2005). Por exemplo, com os neonicotinóides tiametoxam (Actara Plus®, EngeoPLeno® e Alike® fabricados pela Syngenta) ou imidacloprido (Connect® e Confidor Supra®, Bayer), ou ainda como os organofosforados profenofos (Polytrin®, Syngenta), triazofos (Deltaphos®, Bayer) ou fenitrotriona (SumigranPlus®, Iharabras). Outros sinergistas muito empregados são o MGK264 e o butóxido de piperonila (Figura 3).

Os principais efeitos de intoxicação por piretróides são sobre os canais de sódio e cloreto. Estes compostos modificam a voltagem característica destes canais tornando a sua abertura e fechamento mais lento, de modo que o fluxo prolongado de sódio pode gerar a completa despolarização da membrana nervosa, juntamente com o bloqueio da excitabilidade neural. Mesmo em baixas concentrações estes compostos podem causar um estado de hiperexcitabilidade, o qual é a base da maioria dos casos de intoxicação (Bradberry *et al.*, 2005).

Piretróides do *tipo II* também diminuem o fluxo dos canais de cloreto e isto contribui para casos mais graves de envenenamento. Em concentrações elevadas, os piretróides do *tipo II* podem agir sobre os canais de GABA-cloro, o que pode ser responsável pelas convulsões observadas em envenenamentos severos (Bradberry *et al.*, 2005).

Figura 3 – Estrutura molecular dos sinergistas comumente empregados com pesticidas piretróides.

Os sintomas característicos de envenenamento por piretróides do *tipo I* são tremores, hipersensibilidade, hiperexcitabilidade, câibras musculares e convulsões. Enquanto os principais sintomas da intoxicação por piretróides do *tipo II* são: coreoatetose (movimentos involuntários), salivação excessiva, lacrimejamento, hipersecreção nasal, hipersensibilidade, distúrbios sensoriais cutâneos (formigamento, entorpecimento e sensação de queimação), irritação cutânea (eritema papular), cefaleia intensa, perda do apetite, fadiga, tonturas, perda da consciência, câibras musculares e convulsões (Barrot, 1996).

1.3. Produção, comercialização e aplicação de pesticidas piretróides

Durante a década de 1980 ocorreram sérios problemas no controle de insetos devido à resistência adquirida aos pesticidas organofosforados e carbamatos, fazendo-se necessária uma nova classe de pesticidas. Os piretróides, desde a sua origem, destacaram-se devido à sua eficácia, baixas doses e velocidade de ação, de modo que durante a década de 80 o seu uso cresceu rapidamente, atingindo em 1986 cerca de 20% do mercado global.

Posteriormente a sua participação estabilizou-se em cerca de 17% (Housset e Dickman, 2009).

Atualmente, os piretróides representam a terceira maior classe de inseticidas químicos, com um valor de mercado de 1.300 milhões de dólares e 320 milhões de hectares tratados, mesmo com o desenvolvimento de novas classes de produtos químicos com a mesma finalidade (Figura 4) (Housset e Dickman, 2009).

Figura 4 - Vendas e participação no mercado dos pesticidas piretróides (Housset e Dickman 2009).

Os piretróides continuam a oferecer benefícios substanciais à agricultura, especialmente nos grandes mercados emergentes onde a demanda por soluções de menor custo é requerida, pois são inseticidas de baixo custo, baixas doses, largo espectro de ação e eficazes, além de mais seguros para agricultores e consumidores que outras classes de inseticidas disponíveis no mercado. Esta classe química de pesticida é utilizado em todas as regiões do mundo, todos os tipos de culturas e em todas as classes de insetos (Figura 5) (Wirtz *et al.*, 2009).

Figura 5 – Divisão do mercado global de piretróides em 2008, por cultura, peste e região (Wirtz *et al.* 2009)

Desde 2008 o Brasil é o maior consumidor de agrotóxicos do mundo. Somente em 2009 foram consumidos mais de 280 mil toneladas deste tipo de produto e a demanda aumenta a cada ano devido à maior produtividade proporcionada pelo uso de agrotóxicos, mesmo com o concomitante aumento dos casos de contaminação devido ao seu uso excessivo (Rebelo *et al.*, 2010, ANVISA, 2010).

1.4. Mecanismo enzimático da biodegradação de piretróides

Alguns micro-organismos degradadores de pesticidas piretróides foram isolados e caracterizados, incluindo fungos, mas principalmente bactérias. As rotas de degradação foram propostas e enzimas responsáveis pela quebra da ligação éster, que impede a atividade inseticida, foram caracterizadas (Wang, 2011).

As estruturas químicas dos piretróides contêm grupamentos ésteres, sendo assim, o primeiro passo de biodegradação pode envolver a hidrólise destes compostos por carboxilesterases (CBEs). De acordo com a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, as *hidrolases* estão incluídas no grupo EC 3 da nomenclatura enzimática, neste grupo as *esterases* estão localizadas no subgrupo EC 3.1., onde os subtipos são definidos com base em diferentes tipos de ligações ésteres que podem ser hidrolisadas. Portanto CBEs

estão incluídas no subgrupo EC 3.1.1, classificação das enzimas capazes de hidrolisar ésteres carboxílicos e são nomeadas como EC 3.1.1.1 (Barman, 1969).

A hidrólise enzimática de ésteres por CBEs baseia-se na acilação reversível de um resíduo de serina no sítio ativo da proteína. Esta acilação provoca a liberação da porção álcool do éster carboxílico e da enzima acilada. Este intermediário acil-enzima é posteriormente hidrolisado por um ataque nucleofílico da água, que libera o ácido carboxílico e a enzima é regenerada. Uma ilustração da sequência de reação de hidrólise é apresentada no Esquema 2. Após a hidrólise, vários passos são realizados para metabolizar o álcool e o ácido carboxílico produzidos (Sogorb e Vilanova, 2002).

Esquema 2 - Hidrólise de ligações ésteres por carboxilesterases. Onde R e R' são grupamentos alquílicos ou arílicos

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 excretados. É importante ressaltar que os xenobióticos conjugados podem sofrer as reação inversas de conjugação gerando o metabólito modificado novamente (Derelanko e Hollinger, 2002).

1.5. Biodegradação de piretróides por micro-organismos

1.5.1. Biodegradação de piretróides por bactérias

Um número considerável de bactérias capazes de degradar pesticidas piretróides foram isoladas e caracterizadas ao longo do tempo (Tabela 2)

Tabela 2 – Bactérias degradadoras de pesticidas piretróides que já foram isoladas e caracterizadas.

Micro-organismos	Piretróides	Referências
<i>Achromobacter</i> sp. SM-2	Deltametrina	(Maloney <i>et al.</i> , 1988)
<i>Bacillus cereus</i> SM-3	Fluvalinato	(Maloney <i>et al.</i> , 1993)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> SM-1	Cipermetrina	
	Fenvalerato	
	Permetrina	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Beta-ciflutrina	(Saikia <i>et al.</i> , 2005)
<i>Acidomonas</i> sp.	Aletrina	(Paingankar <i>et al.</i> , 2005)
<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	Permetrina	(Liu <i>et al.</i> , 2005)
	Cipermetrina	
	Fenvalerato	
	Deltametrina	
<i>Micrococcus</i> sp.	Cipermetrina	(Tallur <i>et al.</i> , 2008)
<i>Ochrobactrum tritici</i>	Cipermetrina	(Wang <i>et al.</i> , 2011)
<i>Streptomyces aureus</i>	Deltametrina	(Chen <i>et al.</i> , 2011a)
<i>Stenotrophomonas</i> sp	Fenvalerato	(Chen <i>et al.</i> , 2011b)
<i>Sphingobium</i> sp.	Fenpropatrina	(Guo <i>et al.</i> , 2009)
	Cipermetrina	
	Permetrina	
	Cialotrina	
	Deltametrina	
	Fenvalerato	
	Bifenthrina	
<i>Achromobacter</i> sp.	Deltametrina	(Chen <i>et al.</i> , 2011c)
	Fenvalerato	
	Beta-cipermetrina	
	Beta-ciflutrina	
	Cialotrina	
<i>Streptomyces</i> sp.	Cipermetrina	(Lin <i>et al.</i> , 2011)
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Lambda-cialotrina	(Zhai <i>et al.</i> , 2012)

Rotas biodegradativas da cipermetrina, deltametrina e fempropatrina foram propostas em diferentes estudos utilizando-se bactérias. Na rota biodegradativa da fempropatrina por *Achromobacter* sp. (Wang *et al.*, 2011) observou-se que a fempropatrina foi hidrolisada ao ácido 2,2,3,3-tetrametilciclopropanocarboxílico e 3-fenoxibenzaldeído, este último foi convertido ao ácido 3-fenoxibenzoico. O ácido 3-fenoxibenzoico foi transformado ao ácido 3-(4-hidroxifenoxi)benzoico, que foi oxidado para o ácido 3,4-di-hidroxibenzoico e *p*-hidroquinona. O ácido 3,4-di-hidroxibenzoico foi convertido para ácido (Z)-but-3-eno-1,2,4-tricarboxílico. Enquanto a *p*-hidroquinona foi transformada no ácido (Z)-4-oxo-hex-2-enedioico, o qual foi convertido ao ácido 3-oxo-hexanodioico (Figura 6A). Na rota de degradação pela bactéria *Sphingobium* sp. (Guo *et al.*, 2009) não foi observado a formação do ácido 3-(4-hidroxifenoxi)benzoico, de modo que foi sugerida a conversão direta ao ácido 3,4-di-hidróxibenzoico e fenol.

Similarmente, a rota biodegradativa da cipermetrina por *Micrococcus* sp. iniciou-se com a hidrólise da ligação éster, gerando o ácido 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico e 3-fenoxibenzaldeído. O 3-fenoxibenzaldeído foi posteriormente convertido ao ácido 3-fenoxibenzoico, o qual deu origem ao ácido 3,4-di-hidróxibenzoico e ao fenol. O ácido 3,4-di-hidroxibenzoico foi convertido ao (Z)-but-3-eno-1,2,4-tricarboxílico, enquanto o fenol foi convertido a pirocatecol, o qual foi transformado em ácido (2Z,4Z)-hexa-2,4-dienodioico (Figura 6B) (Tallur *et al.*, 2008).

Chen *et al.* mostraram que a deltametrina foi degradada pela hidrólise do éster carboxílico produzindo α -hidroxi-3-fenoxi-benzoacetonitrila e 3-fenoxibenzaldeído. Estes intermediários foram posteriormente degradados por oxigenólise para formar 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona e o ácido 1,2-benzenodicarboxílico, posteriormente resultando em mineralização (Chen *et al.*, 2011c).

Existem na literatura um maior número de estudos sobre a biodegradação de pesticidas piretróides por bactérias do que por fungos.

Consequentemente, a rota biodegradativa por bactérias foi melhor estudada e propostas de rotas mais completas foram elaboradas, como as descritas para o *Achromobacter* sp. e *Micrococcus* sp. (Figura 6).

Figura 6 - (A) Biodegradação da fempropatrina por *Achromobacter* sp. (Wang *et al.*, 2011) e da (B) cipermetrina por *Micrococcus* sp. (Tallur *et al.*, 2008)

1.5.2. Biodegradação de piretróides por fungos

Poucos fungos degradadores de pesticidas piretróides foram isolados e caracterizados, incluindo *Trichoderma viride* (Saikia e Gopal, 2004), *Aspergillus niger* (Liang *et al.*, 2005), *Sepedonium maheswarium* (Mukherjee e Mittal, 2007), *Aspergillus oryzae* (Liu *et al.*, 2011) e *Cladosporium* sp. (Chem *et al.*, 2011d).

Culturas de *Cladosporium* sp. degradaram 90% de uma mistura de piretróides (fenvalerato, fempropatrina, cipermetrina, deltametrina, bifentrina e

permetrina). A concentração de fenvalerato (100 mg.L^{-1}) diminuiu ao longo do tempo e desapareceu completamente após 5 dias, simultaneamente à produção de 3-fenoxibenzaldeído e 2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila. Apesar de ter sido observado que o intermediário 3-fenoxibenzaldeído foi o metabólito principal, ambos os produtos foram transientes denotando a posterior biotransformação destes compostos (Figura 7) (Chem *et al.*, 2011).

Figura 7 - Biodegradação do esfenvalerato pelo fungo *Cladosporium* sp.

Culturas de *Trichoderma viride* catalisaram a biotransformação da β -ciflutrina no 2-hidroxi-2-(3-fenoxi-4-fluorofenil)acetonitrila e no ácido 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanoico via clivagem da ligação éster, demonstrando que o fungo contém enzimas carboxilesterases. Posteriormente foi observada a clivagem da ligação éter, resultando no α -ciano-4-fluorobenzil-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropano e fenol (Figura 8) (Saikia e Gopal, 2004).

Figura 8 - Biodegradação da β -ciflutrina pelo fungo *Trichoderma viride*.

Poucos dados cinéticos sobre degradação fúngica são apresentados na literatura. Entretanto Chen *et al.* demonstraram que o tempo de meia vida ($T_{1/2}$)

do fenvalerato, fempopatrina, cipermetrina, deltametrina, bifentrina e permetrina estão no intervalo de 0,99-1,54 dias, quando degradados por carboxilesterases do fungo *Cladosporium* sp. Para a β -ciflutrina foram relatados os $T_{1/2}$ de biodegradação de 7, 11 e 19 dias por *Trichoderma viride*, *Aspergillus nidulans* e *Sepedonium maheswarium*, respectivamente (Mukherjee e Mittal, 2007; Chen *et al.*, 2011d; Saikia e Gopal, 2004).

De acordo com um levantamento bibliográfico na base de dados *web of knowledge*, verificou-se que apenas uma enzima degradadora de piretróides de origem fúngica foi isolada e caracterizada, a hidrolase de *Aspergillus niger*. Esta enzima fúngica hidrolisou a permetrina ao álcool 3-fenoxibenzílico e ao ácido 2,2-dimetil-3-(2,2-diclorovinil)ciclopropanoico em quantidades equimolares (Esquema 3). Esta hidrolase foi afetada significativamente por metais oxidantes de grupos sulfídricos (Hg^{2+} e Ag^{+}) e reagentes tiol-modificadores como o *p*-clorobenzoato de mercúrio(II), sugerindo que grupos sulfídricos podem estar envolvidos no centro catalítico, interação com o substrato e/ou sítio de reconhecimento (Liang *et al.*, 2005).

EDTA e 1,10-fenantrolina não afetaram a atividade enzimática, indicando que cátions divalentes não são requeridos para a atividade enzimática. A enzima purificada não só hidrolisou vários ésteres *p*-nitrofenílicos e de ácidos graxos de cadeia curta e média, mas também muitos outros pesticidas semelhantes, tal como a cipermetrina, a permetrina, o fenvalerato, a deltametrina e o malation, este último um pesticida organofosforado, indicando que a esterase de *A. niger* possui larga especificidade de ação frente a diferentes substratos (Liang *et al.* 2005).

Esquema 3 - Biodegradação da permetrina pela hidrolase de *Aspergillus niger*.

Apesar da realização destes estudos de biodegradação de pesticidas piretróides por fungos, não foi observado estudos mais elaborados visando a identificação de uma rota biodegradativa destes compostos. Sendo assim, existe

uma lacuna nestas rotas de biodegradação que devem ser estudadas e conhecidas.

1.5.3. Outros tipos de biodegradação de piretróides

Estudos mostraram que os piretróides são principalmente metabolizados por oxidação e clivagem da ligação éster, os quais são mediados por isoformas de citocromos e carboxilesterases, respectivamente. A resistência aos piretróides devido ao citocromo P450 é geralmente atribuída à super expressão destas enzimas (Wheelock e Scott, 1992; Feyereisen, 2005; Muller *et al.*, 2008).

Glutathione-S-transferases também estão envolvidas na resistência a piretróides onde participam no sequestro dos pesticidas e/ou na desintoxicação dos produtos da peroxidação lipídica induzida pela presença dos piretróides e não no metabolismo direto destes compostos (Li *et al.*, 2007; Russel *et al.*, 2011).

De acordo com Wheelock *et al.* o mecanismo catalítico geral de carboxilesterases de mamíferos (Figura 9) envolve uma tríade catalítica de resíduos de aminoácidos, constituída de uma serina (Ser), histidina (His) e ácido glutâmico (Glu) ou aspártico (Asp). Um próton é transferido da Ser para a His, aumentando o caráter nucleofílico do grupo hidroxila terminal da Ser. Após isto, a histidina é estabilizada por uma ligação hidrogênio formada com o Glu (ou Asp). O ataque nucleofílico da Ser ao carbono deficiente eletronicamente da ligação éster do substrato forma um intermediário tetraédrico, o qual é estabilizado por dois resíduos de glicina. Este intermediário origina o complexo acil-enzima, liberando a Ser e a porção álcool do piretróide. Uma molécula de água ativada pela His ataca o complexo acil-enzima repetindo as etapas anteriores e liberando a porção ácida e a enzima regenerada (Wheelock *et al.*, 2005).

Figura 9 – Mecanismo catalítico de hidrólise da permetrina por carboxilesterases.

Em mamíferos os piretróides podem ser metabolizados por via oxidativa ou hidrolítica, de modo que estudos realizados por Mikata *et al.* em ratos e humanos foi observado que o metabolismo da bifentrina, aletrina e *cis*-permetrina em microsossomos hepáticos é resultante de processos oxidativos. Enquanto o metabolismo da resmetrina e cipermetrina foi ocasionada por processos hidrolíticos em microsossomos humanos. Resmetrina e cipermetrina em microsossomos de ratos e beta-ciflutrina e *trans*-permetrina em microsossomos de ambas as espécies foram metabolizados por ambos os processos, o oxidativo e o hidrolítico (Mikata *et al.*, 2012).

A expressão de carboxilesterases é natural em mamíferos, destacando-se a maior atividade de hidrolases no fígado. As carboxilesterases também são detectadas no intestino delgado, rins e tecidos do pulmão (Sato e Hosokawa, 2006). Carboxilesterases humanas puras (hCE1 and hCE2) foram utilizadas para o estudo do metabolismo hidrolítico da (*RS*)-*trans*-resmetrina, (*RS*)-*trans*-

permetrina e (*RR*)-*cis*-permetrina. As enzimas hCE1 e hCE2 hidrolisaram a *trans*-permetrina mais eficientemente que a *cis*-permetrina, enquanto a hidrólise da resmetrina foi mais eficiente por hCE1 do que por hCE2 (Ross *et al.*, 2006).

A hidrólise seletiva de vários piretróides por microsossomos humanos do fígado e as enzimas recombinantes hCE1 e hCE2 já foi reportada, destacando-se as menores taxas de conversão de piretróides do *tipo II*. A hCE1 hidrolisou preferencialmente aletrina, resmetrina, deltametrina, esfenvalerato e lambda-cialotrina. Enquanto a hCE2 mostrou atividade hidrolítica maior para baitroide, bifentrina, *cis*-pemetrina, fluvalinato e tetrametrina. (Yang *et al.*, 2009; Mikata *et al.*, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo o estudo da biodegradação do pesticida piretróide esfenvalerato utilizando o sistema enzimático de fungos de ambiente marinho.

2.2. Objetivos específicos

- a) Selecionar fungos de ambiente marinho que apresentam potencial biodegradativo para o esfenvalerato.
- b) Quantificar a biodegradação fúngica do esfenvalerato e de seus principais metabólitos de degradação por métodos cromatográficos.
- c) Propor uma rota de biodegradação para o pesticida esfenvalerato.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Pesticida esfenvalerato e seus metabólitos de degradação

O padrão analítico do pesticida esfenvalerato (EsfTec, 97%), assim como os padrões técnicos do 3-fenoxibenzaldeído (FBAI, 98%), do ácido 3-fenoxibenzoico (FBO, 98%), do álcool 3 fenoxibenzílico (98%) e do ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico (ACI, 96%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. A formulação comercial do pesticida esfenvalerato (EsfCom) denominada Sumidan 150SC foi doada pela empresa IHARABRAS S.A., com a seguinte composição: esfenvalerato (150 g.L⁻¹); xileno (160 g.L⁻¹) e outros ingredientes não especificados (720 g.L⁻¹).

3.2. Micro-organismos

A coleta dos micro-organismos marinhos utilizados neste trabalho foi realizada pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Química Orgânica de Produtos Naturais (IQSC/USP) sob a coordenação do Prof. Dr. Roberto G. S. Berlinck. O isolamento foi realizado em colaboração com o Grupo de Pesquisa do Laboratório de Ecologia de Micro-organismos Aquáticos, sob coordenação da Prof. Dra. Mirna Helena Regali Seleglim (UFSCar).

As cepas fúngicas *Penicillium raistrickii* CBMAI 931 e *Aspergillus sydowii* CBMAI 935 foram isolados da esponja *Chelonaphysilla erecta*. Enquanto o fungo *Cladosporium* sp. CBMAI 1237, *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6, *Acremonium* sp. Dr(F)1, *Westerdykella* sp. Dr(M2)4 e *Cladosporium* sp. Dr(M2)2 foram isoladas a partir da esponja marinha *Dragmacidon reticulata* (Figura 10). Os fungos com códigos CBMAI foram depositados na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Meio Ambiente e Indústria (CBMAI – CPQBA/UNICAMP). O armazenamento, a manipulação e as inoculações foram realizados de acordo com o protocolo utilizado em microbiologia e aqueles já estabelecidos no laboratório (ORTEGA *et al.*, 2011).

Figura 10 – Linhagens fúngicas de origem marinha empregadas neste estudo (Elaborado pelo autor).

3.3. Cultivo dos micro-organismos

Neste trabalho foram empregados o cultivo de fungos de origem marinha em meio de cultura sólido e líquido.

3.3.1. Cultivo dos micro-organismos em meio de cultura sólido

Os fungos foram cultivados em meio de cultura sólido utilizando-se placas de Petri. As culturas foram mantidas em refrigeração para posteriores inoculações em meios de cultura sólido e/ou líquido. A composição do meio de cultura para 1 L de água do mar foi: extrato de malte (30,0 g), peptona de

farinha de soja (3,0 g) e ágar (20,0 g), este último somente para meio de cultura sólido. Como os micro-organismos empregados neste estudo foram isolados em diferentes meios de cultivo, foi empregado malte 3% como fonte de nutrientes, pois trata-se de um meio de cultura rico e apropriado para organismos marinhos (Kjer *et al.*, 2010; Kossuga, 2012). O pH do meio foi ajustado para 7,0 utilizando-se solução aquosa de KOH 0,7M por meio do pHmetro Qualxtron/8010. É importante ressaltar que o pH do habitat natural de fungos de ambiente marinho é 8,0, contudo para se evitar a hidrólise básica do esfenvalerato foi empregado pH neutro.

A composição de 1 L de água do mar artificial empregada foi: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1,36 g), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (9,68 g), KCl (0,61 g), NaCl (30,0 g), Na_2HPO_4 (0,014 mg), Na_2SO_4 (3,47 g), NaHCO_3 (0,17 g), KBr (0,10 g), $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,04 g) e H_3BO_3 (0,03 g) (De Vita-Marques, 2008). Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave (autoclave vertical Phoenix/AV50) a 121°C por 20 minutos.

Em fluxo laminar (Veco) previamente esterilizado por meio do emprego de álcool 70% e luz ultravioleta, 25 mL de meio de cultura foram vertidos em cada placa de Petri (9x9 cm). Após o resfriamento à temperatura ambiente, os meios de cultura foram mantidos em estufa a 32°C durante 24 h para a posterior detecção de eventuais contaminações. A inoculação foi realizada pelo método de estrias utilizando-se de uma alça de transferência (níquel-cromo), os fungos foram cultivados em incubadora (Nova Ética B.O.D. 411D) à temperatura de 32°C.

3.3.2. Cultivo em meio de cultura líquido

A inoculação em meio líquido foi realizada em ambiente estéril por meio de 7 fatias circulares de 0,5 cm de diâmetro retiradas de uma placa fúngica, que foi previamente cultivada durante 7 dias em incubadora à temperatura de 32°C (Figura 11A). O crescimento fúngico em meio líquido foi realizado com o emprego de 50 mL de meio em frascos Erlenmeyer de 125 mL fechados com tampões de algodão, pois permitem trocas gasosas com o ambiente. O cultivo

fúngico foi realizado em agitador orbital (Tecnal TE-421) à temperatura de 32°C, rotação de 130 rpm e na ausência de luz, para evitar a fotodegradação dos xenobióticos (Figura 11B).

Figura 11 – (A) Meio de cultura líquido inoculado com a linhagem fúngica *Westerdykella* sp. Dr(M2)4 e (B) cultivo em agitador orbital (elaborado pelo autor).

(A)

(B)

3.4. Crescimento microbiano em meio de cultura sólido

Foram realizados experimentos de crescimento radial para uma avaliação da toxicidade do pesticida esfenvalerato, de seus metabólitos e do xileno (presente na formulação comercial) nos fungos. Para isso foram preparados meios de cultura sólidos contendo os compostos a serem avaliados. O experimento consistiu na medição do diâmetro de crescimento fúngico em placas de Petri ao longo do tempo estabelecido (Figura 12). Para estes experimentos foram elaborados meio sólidos com diferentes compostos xenobióticos:

- A) Malte 3%: Somente meio de cultura (25 mL) foi adicionado, sem a adição de compostos xenobióticos.
- B) Malte 3%+EsfCom (100 mg.L⁻¹): Meio de cultura sólido de malte 3% (25 mL) com a adição de EsfCom (SUMIDAN 150SC), onde 1 mL foi suspenso em 20 mL de água e posteriormente 334 µL da solução foram adicionados em cada placa, resultando na concentração final de princípio ativo de 100 mg.L⁻¹.

- C) Malte 3%+DMSO (100 μ L): Meio de cultura sólido de malte 3% (25 mL) com a adição de 100 μ L de DMSO.
- D) Malte 3%+Xileno (107 mg.L⁻¹): Meio de cultura sólido de malte 3% (25 mL) acrescido de 3 μ L de xileno, os quais foram dissolvidos em 100 μ L de DMSO que foi adicionado à cada placa, resultando na concentração final de 107 mg.mL⁻¹ no meio de cultura. Esta foi a concentração de xileno no meio de cultura quando foram adicionados 100 mg.L⁻¹ de EsfCom, já que a formulação comercial continha 160g.L⁻¹ de xileno.
- E) Malte 3%+EsfTec (100 mg.L⁻¹): Foram adicionados ao meio de cultura sólido (25 mL) 2,5 mg de EsfTec dissolvidos em 100 μ L de DMSO por placa, resultando na concentração de 100 mg.L⁻¹ de EsfTec no meio de cultura sólido.
- F) Malte 3%+EsfTec (100 mg.L⁻¹)+Xileno (107 mg.L⁻¹): Ao meio de cultura (25 mL) foram adicionados 2,5 mg de EsfTec e 3 μ L de xileno dissolvido em 100 μ L de DMSO por placa, resultando em 100 mg.L⁻¹ EsfTec e 107 mg.L⁻¹ de xileno no meio de cultura sólido.
- G) Malte 3%+ACI (20 mg.L⁻¹): A cada placa de meio de cultura sólido (25mL) foram adicionados 0,5 mg de ACI dissolvidos em 100 μ L de DMSO, resultando na concentração final de 20 mgL⁻¹ para o ACI.
- H) Malte 3%+FBAlc (20 mg.L⁻¹): Foram adicionados a cada placa de meio de cultura sólido (25mL) 0,5 mg de FBAlc dissolvidos em 100 μ L de DMSO, resultando na concentração final de 20 mgL⁻¹ para o FBAlc.
- I) Malte 3%+FBAc (20 mg.L⁻¹): A cada placa de meio de cultura sólido (25mL) foram adicionados 0,5 mg de FBAc dissolvidos em 100 μ L de DMSO, resultando na concentração final de 20 mgL⁻¹ para o FBAc.
- J) Malte 3%+FBAlc (20 mg.L⁻¹): Foram adicionado a cada placa de meio de cultura sólido (25mL) 0,5 mg de FBAlc dissolvidos em 100 μ L de DMSO, resultando na concentração final de 20 mgL⁻¹ para o FBAlc.

Os compostos xenobióticos foram adicionados somente após o resfriamento parcial do meio de cultura (entre 40 e 45°C) visando à prevenção

da degradação térmica e que, após a adição, o meio foi homogeneizado utilizando-se de movimentos circulares suaves.

Figura 12 - Ilustração do experimento de crescimento radial (elaborado pelo autor).

Neste experimento a inoculação foi realizada por meio de ponto de inserção central (realizado com a face da placa para baixo) para a promoção do crescimento radial (Figura 13A). O crescimento fúngico foi medido através do diâmetro da colônia após 7, 14, 21 e 28 dias de cultivo em incubadora (Figura 13B). Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Figura 13 – (A) Inoculação com ponto de inserção central com a face para baixo e (B) cultivo em incubadora B.O.D. (elaborado pelo autor).

(A)

(B)

3.5. Quantificação dos pesticidas

3.5.1. Cultivo fúngico

A quantificação da biodegradação dos pesticidas foi realizada em meio líquido, onde a linhagem fúngica foi cultivada durante 5 dias e posteriormente foi adicionado o esfenvalerato na concentração de 100 mg.L⁻¹ (5 mg de EsfTec dissolvidos em 100µL de DMSO para experimentos envolvendo o princípio ativo e 667 µL da solução de 1 mL comercial SUMIDAN 150SC dissolvida em 20 mL de água para experimentos envolvendo a formulação comercial, EsfCom). Após a adição do pesticida a reação prosseguiu durante 7, 14, 21 e 28 dias em triplicatas. É importante ressaltar que as reações foram finalizadas a cada 7 dias, de modo que cada cultivo e cada reação ocorreu de forma independente.

Um outro experimento realizado foi o cultivo fúngico na ausência de pesticida para a diferenciação entre metabólitos naturais produzidos pelos micro-organismos e os induzidos pela presença do esfenvalerato. Também foram realizados controles abióticos, onde se avaliou a degradação do pesticida esfenvalerato devido aos possíveis eventos físico-químicos durante a agitação orbital, a qual foi realizada no escuro e com temperatura controlada de 32°C. Todos os experimentos também foram realizados em triplicatas.

3.5.2. Extração dos pesticidas e de seus metabólitos

Para a preparação das amostras os micélios foram filtrados utilizando-se papel de filtro em um aparato de filtração de Büchner acoplado a um Kitassato de 250 mL. Após a separação, o caldo enzimático ficou reservado separadamente e o micélio úmido retido ao filtro foi transferido para um frasco de Erlenmeyer de 250 mL contendo 30 mL de água destilada e 30 mL de acetato de etila (P.A.) e submetido à agitação magnética por 30 minutos para a lise das células fúngicas. Em seguida, as células foram novamente filtradas em funil de Büchner e o extrato obtido adicionado ao caldo enzimático. A massa fúngica foi lavada com acetato de etila (30 mL) e posteriormente seca a 32°C durante 7 dias para a determinação da massa fúngica seca. O extrato final foi extraído por partição líquido-líquido com acetato de etila (P.A.) em 3 etapas de 30 mL. À fase

orgânica foi adicionado Na_2SO_4 anidro, a qual foi posteriormente filtrada e transferida para um balão de fundo redondo de 500 mL para a rotoevaporação do solvente. Posteriormente, as amostras foram ressuspensas em metanol utilizando-se de balões volumétricos de 5 mL para as análises cromatográficas (Figura 14).

Figura 14 - Fluxograma das etapas de preparação e extração do pesticida e de seus metabólitos para análises cromatográficas.

3.5.3. Quantificação do pesticida e seus produtos de degradação por CLAE-UV

O esfenvalerato, FBAl_d, FBAC, FBAl_c e ACL foram determinados quantitativamente utilizando um sistema cromatográfico Shimadzu, composto pelos seguintes módulos: sistema de bombeamento LC-20AT, degaseificador DGU-20A5, amostrador automático SIL-20AHT, detector UV-VIS SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A e controlador de sistema CBM-20A. As separações foram realizadas utilizando uma coluna Shim-pack CLC-ODS(M) (25 cm). O material foi eluído com uma mistura de 0,5% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,5% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B), da seguinte maneira: 0-17 min, 60% B (isocrático); 17-18 min, 50-90% B (gradiente linear); 18-30 min em 90% B (isocrático); 30-31 min 90-50% (gradiente linear) e 31-45 min. (isocrático). A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 10 µL. A detecção ultravioleta foi realizada em 277 nm para o esfenvalerato, o FBAl_d, o FBAC e o FBAl_c, para o ACL a detecção foi realizada em 266 nm.

Foram obtidas curvas analíticas utilizando o método de padrão externo para cada um dos compostos analisados, utilizando a Equação 1.

$$c = Ax + B \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: c = concentração do analito mg.L⁻¹

x = área do analito

A = coeficiente angular

B = coeficiente linear

É importante ressaltar que as amostras foram ressuspensas em 5 mL de metanol após a extração líquido-líquido, assim as amostras foram concentradas 10 vezes. Cada solução padrão foi adicionada em três *vials* que foram analisados por CLAE-UV.

Para valores inferiores a 5 mg.L⁻¹ de concentração dos metabólitos foi realizado uma estimativa linear da concentração do FBAl_d, FBAC, FBAl_c e ACL. De modo que foi utilizado a Equação 2.

$$c = (5,0 \cdot x) / Y \quad (\text{Equação 2})$$

Onde: c = concentração do analito (mg.L^{-1})

x = área do analito

Y = absorvância para a solução padrão de 5 mg.L^{-1} de concentração.

4.5.3.1. Quantificação do esfenvalerato por CLAE-UV

Para a quantificação do esfenvalerato foram produzidas soluções padrões de concentrações 50, 300, 550, 800 e 1050 mg.L^{-1} de esfenvalerato em metanol, gerando a equação linear: $c = 3503 \cdot x + 41097$ (Figura 15).

Figura 15 – Curva analítica para o esfenvalerato.

4.5.3.2. Quantificação do 3-fenoxibenzaldeído (FBAlD)

Para a quantificação do FBAlD foram elaboradas duas curvas analíticas. Uma para a faixa de concentração entre 5-33 mg.L^{-1} , onde foram utilizados soluções padrões de 5, 12, 19, 26 e 33 mg.L^{-1} . Gerando a equação linear $c = 4659 \cdot x - 1278,5$ (Figura 16). E outra curva analítica para a faixa de concentração entre 25 e 245 mg.L^{-1} , utilizando-se de soluções padrões de 25, 80, 135, 190 e 250 mg.L^{-1} de esfenvalerato, gerando a equação linear: $c = 5015,9 \cdot x + 2411,7$ (Figura 17).

Para concentrações inferiores a 5 mg.L⁻¹ foi realizada uma estimativa utilizando-se a absorbância para a solução padrão de 5 mg.L⁻¹ de concentração, onde utilizou-se a equação $c = (5,0 \cdot x) / 21035$

Figura 16 - Curva analítica para o FBAlD para a faixa de concentração entre 5-33 mg.L⁻¹.

Figura 17 - Curva analítica para o FBAlD para a faixa de concentração entre 25-250 mg.L⁻¹.

4.5.3.3. Quantificação do ácido 3-fenoxibenzoico (FBAc)

Para a quantificação do FBAc foram elaboradas duas curvas analíticas. Uma para a faixa de concentração entre 5-33 mg.L⁻¹, onde foram utilizados soluções padrões de 5, 12, 19, 26 e 33 mg.L⁻¹, gerando a equação linear $c = 4762,4 \cdot x - 1732,5$ (Figura 18). E uma outra curva analítica para a faixa de

concentração entre 25 e 245 mg.L⁻¹, utilizando-se de soluções padrões de 25, 80, 135, 190 e 250 mg.L⁻¹ de esfenvalerato, gerando a equação linear: $c=4554,7.x+3137,8$ (Figura 19).

Para concentrações inferiores a 5 mg.L⁻¹ foi realizada uma estimativa utilizando-se a absorbância para a solução padrão de concentração de 5 mg.L⁻¹, onde utilizou-se a equação $c= (5,0.x)/20495$.

Figura 18 - Curva analítica para o FBAC para a faixa de concentração entre 5-33 mg.L⁻¹.

Figura 19 - Curva analítica para o FBAlD para a faixa de concentração entre 25-250 mg.L⁻¹.

4.5.3.4. Quantificação do álcool fenoxibenzílico (FBAlc)

Para a quantificação do FBAlc foram elaboradas duas curvas analíticas. Uma para a faixa de concentração entre 5-33 mg.L⁻¹, onde foram utilizados soluções padrões de 5, 12, 19, 26 e 33 mg.L⁻¹. Gerando a equação linear $c=6320,2x-415,43$ (Figura 20). E uma outra curva analítica para a faixa de concentração entre 25 e 245 mg.L⁻¹, utilizando-se de soluções padrões de 25, 80, 135, 190 e 250 mg.L⁻¹ de esfenvalerato. Gerando a equação linear: $c=6355x-9062,3$ (Figura 21).

Figura 20 - Curva analítica para o FBAlc para a faixa de concentração entre 5-33 mg.L⁻¹.

Figura 21 - Curva analítica para o FBAlc para a faixa de concentração entre 25-250 mg.L⁻¹.

Para concentrações inferiores a 5 mg.L⁻¹ foi realizada uma estimativa utilizando-se a absorbância para a solução padrão de concentração de 5 mg.L⁻¹, onde utilizou-se a equação $c = (5,0 \cdot x) / 29213$.

4.5.3.5. Quantificação do ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico (ACI)

Para a quantificação do ACI foram elaboradas duas curvas analítica. Uma para para a faixa de concentração entre 5-33 mg.L⁻¹, onde foram utilizados soluções padrões de 5, 12, 19, 26 e 33 mg.L⁻¹. Gerando a equação linear $c = 683,7 \cdot x - 59,639$ (Figura 22). E uma outra curva analítica para a faixa de concentração entre 25 e 245 mg.L⁻¹, utilizando-se de soluções padrões de 25, 80, 135, 190 e 250 mg.L⁻¹ de esfenvalerato, gerando a equação linear: $c = 691 \cdot x + 556,35$ (Figura 23).

Para concentrações inferiores a 5 mg.L⁻¹ foi realizada uma estimativa utilizando-se a absorbância para a solução padrão de concentração de 5 mg.L⁻¹, onde utilizou-se a equação $c = (5,0 \cdot x) / 3351$.

Figura 22 - Curva analítica para o ACI para a faixa de concentração entre 5-33 mg.L⁻¹.

Figura 23 - Curva analítica para o ACI para a faixa de concentração entre 25-250 mg.L⁻¹.

3.6. Detecção de metabólitos

Para as análises de CLAE-TOF foi empregado um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu Prominence, equipado com bomba LC-20AD, degaseificador DGU-20A5, central de controle CBM-20A, injetor automático Sil-20A e forno CTO 20-AC. O espectrômetro de massas da marca Bruker modelo Microtof-Q, equipado com um detector híbrido quadrupolo/TOF, no modo de ionização eletrospray, localizado no Laboratório de Cromatografia no Instituto de Química de São Carlos. As separações foram realizadas utilizando a coluna Shim-pack CLC-ODS(M) (25cm). O material foi eluído com a mistura de 0,5% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,5% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B), da seguinte maneira: 0-17 min, 60% B (isocrático); 17-18 min, 50-90% B (gradiente linear); 18-30min em 90% B (isocrático); 30-31min 90-50% (gradiente linear) e 31-40 min. (isocrático). A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ e volume de injeção de 10 µL.

As análises por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas foram realizadas em um aparelho Shimadzu/GC-2010 equipado com auto injetor Shimadzu/AOC-5000 e detector de massas (Shimadzu MS2010plus) com impacto de elétrons (IE, 70eV), localizado no Laboratório de Química

Orgânica e Biocatálise. O forno do cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama foi equipado com uma coluna de sílica fundida DB-5 (J&W Scientific, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). O gás de arraste foi hélio utilizando o fluxo de coluna de 0,75 mL.min⁻¹. A temperatura do injetor utilizada foi de 250°C. A temperatura inicial da coluna foi de 90°C mantida durante 2 minutos, em seguida a temperatura foi elevada a 150°C na taxa de 6°C.min⁻¹ e mantida nesta temperatura por 1 minuto, posteriormente a temperatura foi elevada até a temperatura de 180°C a 10°C.min⁻¹ e mantida durante 4 minutos. Posteriormente a temperatura foi elevada até 280°C à taxa de 20°C e mantida durante 15 minutos. O tempo total de análise foi de 40 minutos, injetando-se 2 μ L com razão de Split 10. A temperatura da fonte de íon foi 200°C e a da interface 270°C, os íons foram monitorados de 4 a 40 minutos na faixa entre m/z 40 e 500.

3.7. Descarte de resíduos

Os micro-organismos cultivados na ausência dos pesticidas foram autoclavados a 121°C por 20 minutos e depois descartados. Aqueles que foram cultivados em meios de cultura contendo xenobióticos, depois de autoclavados, foram armazenados em frascos devidamente identificados e encaminhados para descarte no Laboratório de Resíduos Químicos (LRQ) do campus de São Carlos da Universidade de São Paulo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Crescimento fúngico em meio sólido na presença do esfenvalerato e seus metabólitos

Geralmente os agrotóxicos combatem um grupo específico de organismos como é o caso do esfenvalerato que visa o controle de insetos prejudiciais às lavouras (inseticida). Entretanto, frequentemente são observadas contaminações e intoxicações em diversas espécies não alvos como mamíferos, pássaros, peixes e inclusive micro-organismos. Sendo assim, é necessária uma seleção fúngica que tem como objetivo a avaliação preliminar da toxicidade do esfenvalerato (grau técnico e formulação comercial SUMIDAN 150SC), de seus principais metabólitos de degradação [3-fenoxibenzaldeído (FBAlde), ácido 3-fenoxibenzoico (FBAc), álcool 3-fenoxibenzílico (FBAlc) e ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico (ACI)] e do xileno (presente na formulação comercial).

Desta maneira foram realizados experimentos em meio de cultura sólido para a avaliação do crescimento radial de cada linhagem empregada neste estudo na presença de esfenvalerato (técnico e comercial, 100 mg.L⁻¹), FBAlde (20 mg.L⁻¹), FBAlc (20 mg.L⁻¹), FBAc (20 mg.L⁻¹), ACI (20 mg.L⁻¹) e xileno (107 mg.L⁻¹).

É importante destacar que em comparações envolvendo a formulação comercial foi utilizado como referência o desenvolvimento fúngico em placas contendo somente o meio de cultura de malte 3% (A). Para os compostos dissolvidos em 100 µL de DMSO a referência utilizada foi o experimento de cultivo fúngico em meio de cultura acrescido de 100 µL de DMSO (C). Já que os compostos avaliados foram dissolvidos em DMSO para uma melhor dispersão no meio de cultura. A inibição relativa foi calculada utilizando a equação 3, enquanto a estimulação relativa foi calculada utilizando a equação 4.

$$\% \text{Inibição} = 100 - [(D_{\text{cultura}} / D_{\text{cultura de referência}}) \times 100] \text{ (Equação 3)}$$

Onde: $\% \text{Inibição}$ = inibição do crescimento fúngico (%).

D_{cultura} = diâmetro da cultura na presença do composto xenobiótico (cm).

D_{cultura} = diâmetro da cultura de referência (cm).

$$\% \text{Estimulação} = [(D_{\text{cultura}} / D_{\text{cultura de referência}}) \times 100] - 100 \text{ (Equação 4)}$$

Onde: $\% \text{Estimulação}$ = inibição do crescimento fúngico (%).

D_{cultura} = diâmetro da cultura na presença do composto xenobiótico (cm).

D_{cultura} = diâmetro da cultura de referência (cm).

Nos experimentos de crescimento microbiano da linhagem *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6 (Tabela 3) (Figura 24) foi observado que a presença da formulação comercial (B) promoveu uma discreta estimulação de crescimento (4%) do micro-organismo em todos os tempos avaliados quando comparado com o crescimento em malte 3% (A). Entretanto, quando foram acrescidos xileno (D), EfvTec (E) ou xileno juntamente com EfvTec (F) foram observados uma inibição de aproximadamente 25% da colônia fúngica para o cultivo de 7 dias quando comparado com o desenvolvimento microbiano em malte 3% acrescido de 100 μL de xileno (C). Para 14 dias foi observado uma inibição de cerca de 10% do crescimento na adição de xileno (D) ou EfvTec (E). Enquanto no emprego dos dois compostos simultaneamente (F) foi denotado um aumento da inibição, que foi de aproximadamente 18%.

No desenvolvimento fúngico na presença dos metabólitos de degradação [ACI (G), FBAlc (H), FBAC (I) e FBAlD(J)] foi observado uma inibição média de 35% na linhagem em 7 dias de crescimento, enquanto que para 14 dias de

cultivo foi observada uma inibição de 25% quando comparado com o crescimento em malte 3% acrescido de 100µL de DMSO (C).

Para o período de 21 dias as colônias do fungo *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6 não cresceram por toda a superfície da placa nos experimentos na presença de metabólitos de degradação (G, H, I, J) ou na presença de EsfTec e/ou xileno (D, E, F,). Enquanto que nos controles (A e C) e nos experimentos contendo EsfCom (B) a colônia desenvolveu-se por toda a extensão da placa. Sendo assim, concluiu-se que os metabólitos da degradação apresentaram um efeito inibidor de crescimento mais significativo que o esfenvarelato, mesmo quando adicionados em menores concentrações.

Tabela 3 - Diâmetro de colônia medido para o cultivo da linhagem de *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6 em meio sólido com ponto de inserção central.

Meio de cultivo (Experimentos)		Tempo (dias)			
		7	14	21	28
		Diâmetro de colônia (cm)			
A-	Malte 3%	4,4±0,3	7,4±0,4	8,0*	8,0*
B-	Malte 3% com EsfCom (100 mg.L ⁻¹)	4,5±0,1	7,7±0,2	8,0*	8,0*
C-	Malte 3% com DMSO (100 µL)	4,6±0,1	7,5±0,2	8,0*	8,0*
D-	Malte 3% de Xileno (107 mg.L ⁻¹)	3,5±0,2	6,6±0,4	7,4±0,3	8,0*
E-	Malte 3% de EsfTec (100 mg.L ⁻¹)	3,4±0,2	7,0±0,4	7,6±0,4	8,0*
F-	Malte 3% com EsfTec (100 mg.L ⁻¹) e Xileno (107 mg.L ⁻¹)	3,5±0,3	6,2±0,5	7,2±0,5	8,0*
G-	Malte 3% com de ACl (20 mg.L ⁻¹)	3,3±0,2	5,7±0,3	6,4±0,2	8,0*
H-	Malte 3% com FBAlc (20 mg.L ⁻¹)	2,8±0,2	5,6±0,2	6,9±0,2	8,0*
I-	Malte 3% com FBAC (20 mg.L ⁻¹)	3,0±0,1	5,2±0,1	6,8±0,1	8,0*
J-	Malte 3% com FBAlD (20 mg.L ⁻¹)	2,9±0,4	5,8±0,1	7,1±0,3	8,0*

*Como o crescimento fúngico pode sofrer alterações nas extremidades da placa, o diâmetro da colônia foi considerado somente até 8,0 cm já que as placas de Petri empregadas nestes experimentos possuem 9 cm de diâmetro.

Figura 24 – Experimentos de crescimento microbiano para a linhagem de *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6 em meio sólido.

No cultivo da linhagem *Westerdykella* sp. Dr(M2)4 (Tabela 4) (Figura 25) observou-se que a presença da formulação comercial (B) propiciou um maior crescimento de cerca de 10% da colônia quando comparado com o cultivo em meio malte 3% (A). Quando foram acrescidos xileno (D), EfvTec (E) ou xileno juntamente com EfvTec (F) foram observados uma inibição de aproximadamente 40% da colônia fúngica no cultivo de 7 dias quando comparados com o diâmetro de crescimento no meio malte 3% acrescido de 100 μ L de xileno (C).

Para maiores tempos em cultivos na presença de xileno ou EfvTec esta inibição de aproximadamente 40% permaneceu constante, contudo no experimento de adição simultânea de xileno e EfvTec observou-se uma maior inibição ao longo do cultivo, alcançando uma diminuição de 70% no diâmetro de crescimento fúngico após 28 dias, quando comparado com o diâmetro de crescimento em meio de cultivo malte 3% acrescido de 100 μ L de DMSO (C).

No que se refere aos metabólitos de degradação do esfenvalerato não se observou uma tendência geral para todos os compostos como foi verificado para o *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6. Para o ACI (G) em todos os tempos avaliados não foi observado alteração significativa no crescimento fúngico quando comparado com o cultivo em malte 3% com 100 μ L de DMSO (C).

Enquanto para o FBAlc (H) em 7 e 14 dias de cultivo foi observado uma inibição de 20% da colônia e para o FBAlc (J) observou-se aproximadamente 25% de inibição da colônia, mas para 21 e 28 dias a colônia apresentou o mesmo

desenvolvimento que cultivo em malte 3% acrescido de 100 μ L de DMSO (C).

Uma observação importante é que a presença do FBAC (I) estimulou o crescimento fúngico, de modo que a colônia observada foi em média 25% maior que o controle de malte 3% com 100 μ L de DMSO (C) na presença deste metabólito de degradação do esfenvalerato.

Tabela 4 - Diâmetro de colônia medido para o cultivo da linhagem de *Westerdykella* sp. Dr(M2)4 em meio sólido com ponto de inserção central.

Meio de cultivo (Experimentos)		Tempo (dias)			
		7	14	21	28
		Diâmetro de colônia (cm)			
A-	Malte 3%	1,1 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,4	3,4 $\pm$ 0,7	4,5 $\pm$ 1,0
B-	Malte 3% com EsfCom (100 mg.L ⁻¹)	1,2 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,1	3,8 $\pm$ 0,2	5,0 $\pm$ 0,2
C-	Malte 3% com DMSO (100 μ L)	1,2 $\pm$ 0,2	2,5 $\pm$ 0,2	4,1 $\pm$ 0,4	5,5 $\pm$ 0,6
D-	Malte 3% de Xileno (107 mg.L ⁻¹)	0,7 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,2	2,7 $\pm$ 0,3
E-	Malte 3% de EsfTec (100 mg.L ⁻¹)	0,8 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,4	2,6 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,3
F-	Malte 3% com EsfTec (100 mg.L ⁻¹) e Xileno (107 mg.L ⁻¹)	0,8 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,5	1,8 $\pm$ 0,5
G-	Malte 3% com de ACl (20 mg.L ⁻¹)	1,2 $\pm$ 0,1	2,5 $\pm$ 0,1	4,1 $\pm$ 0,	5,2 $\pm$ 0,4
H-	Malte 3% com FBAlc (20 mg.L ⁻¹)	1,0 $\pm$ 0,0	1,9 $\pm$ 0,1	3,3 $\pm$ 0,3	4,5 $\pm$ 0,4
I-	Malte 3% com FBAC (20 mg.L ⁻¹)	1,2 $\pm$ 0,3	2,7 $\pm$ 0,3	5,1 $\pm$ 0,2	6,8 $\pm$ 0,3
J-	Malte 3% com FBAlD (20 mg.L ⁻¹)	0,9 $\pm$ 0,1	1,9 $\pm$ 0,1	3,9 $\pm$ 0,1	5,5 $\pm$ 0,2

Figura 25 - Experimentos de crescimento microbiano para a linhagem de *Westerdykella* sp. Dr(M2)4 em meio sólido.

Exp.	Tempo (Dias)			
	7	14	21	28
Malte 3% (A)
Malte 3% + EsfCom (B)
Malte 3% + DMSO (C)
Malte 3% + Xileno (D)
Malte 3% + EsfTec (E)
Malte 3% + EsfTec e Xileno (F)
Malte 3% + ACI (G)
Malte 3% + FBAlc (H)

Continuação

Nos experimentos de crescimento microbiano em meio de cultivo sólido para a linhagem *Acremonium* sp. Dr(F)1 (Tabela 5 e Figura 26) foi observado que a presença do EsfCom (B) promoveu a estimulação de 10% no crescimento da colônia quando comparado com o cultivo em malte 3% (A) sem xenobióticos.

Na presença de xileno (D) ou EfvTec (E) observou-se uma inibição de 10%, entretanto no experimento que inclui a adição simultânea de xileno e EfvTec (F) observou-se uma maior inibição de cerca de 15% quando comparado com o crescimento fúngico em meio malte 3% acrescido de 100µL de DMSO (C).

Diferentemente do que foi observado para outros fungos deste trabalho, a linhagem *Acremonium* sp. Dr(F)1 não apresentou diferenças de crescimento na presença dos metabólitos de degradação do esfenvalerato [ACI (G), FBAlc (H), FBAC (I), e FBAlD(J)] para o cultivo em 7 e 14 dias quando comparado com o desenvolvimento microbiano em malte 3% acrescido de 100 µL de DMSO (C). Para 21 dias de cultivo foi observado um maior crescimento (10%) das colônias na presença dos metabólitos de degradação para o ACI (G), FBAlc (H) e FBAC (I), enquanto o FBAlD não apresentou interferência significativa no crescimento fúngico.

Tabela 5 - Diâmetro de colônia medido para o cultivo da linhagem de *Acremonium* sp. Dr(F)1 em meio sólido com ponto de inserção central.

Meio de cultivo (Experimentos)		Tempo (dias)			
		7	14	21	28
		Diâmetro de colônia (cm)			
A-	Malte 3%	2,3±0,1	4,2±0,3	6,5±0,2	8,0*
B-	Malte 3% com EsfCom (100 mg.L ⁻¹)	2,4±0,1	4,6±0,1	7,0±0,2	8,0*
C-	Malte 3% com DMSO (100 µL)	2,4±0,1	4,5±0,2	6,6±0,1	8,0*
D-	Malte 3% de Xileno (107 mg.L ⁻¹)	1,8±0,1	4,4±0,1	6,2±0,2	8,0*
E-	Malte 3% de EsfTec (100 mg.L ⁻¹)	1,7±0,2	4,1±0,5	6,0±0,2	8,0*
F-	Malte 3% com EsfTec (100 mg.L ⁻¹) e Xileno (107 mg.L ⁻¹)	1,5±0,1	4,0±0,2	5,6±0,3	8,0*
G-	Malte 3% com de ACl (20 mg.L ⁻¹)	2,4±0,1	4,6±0,1	7,2±0,2	8,0*
H-	Malte 3% com FBAlc (20 mg.L ⁻¹)	2,2±0,1	4,3±0,2	7,2±0,1	8,0*
I-	Malte 3% com FBAC (20 mg.L ⁻¹)	2,3±0,1	4,4±0,1	7,1±0,2	8,0*
J-	Malte 3% com FBAlD (20 mg.L ⁻¹)	2,0±0,1	4,1±0,1	6,5±0,2	8,0*

*Como o crescimento fúngico pode sofrer alterações nas extremidades da placa, o diâmetro da colônia foi considerado somente até 8,0 cm já que as placas de Petri empregadas nestes experimentos possuem 9 cm de diâmetro.

Para a linhagem de *Penicillium raistrickii* CBMAI 931 (Tabela 6, Figura 27) nos experimentos de desenvolvimento microbiano foi observado que a presença do EsfCom (B) não promoveu alteração significativa no crescimento fúngico quando comparado com o cultivo em meio sólido malte 3% (A).

Em cultivos na presença de xileno (D), EfvTec (E) ou xileno juntamente com EfvTec (F) observou-se uma inibição de 25% do diâmetro da colônia para 7 dias de cultivo quando comparado com o cultivo em malte 3% acrescido de 100 µL de DMSO (C). Após 14 dias de cultivo foi observado uma inibição de cerca de 10% para experimentos de avaliação da presença de xileno (D) ou EfvTec (E), enquanto que para os experimentos de xileno juntamente com EfvTec (F) foi observado uma inibição mais acentuada de 15% quando comparado com o cultivo em malte 3% acrescido de 100 µL de DMSO (C).

Figura 26 - Experimentos de crescimento microbiano para a linhagem de *Acremonium* sp. Dr(F)1 em meio sólido.

Continuação

Nos experimentos de crescimento microbiano do *Penicillium raistrickii* CBMAI 931 na presença dos metabólitos de degradação do esfenvalerato [ACI (G), FBAlc (H), FBAC (I), e FBAlD(J)] observou-se uma inibição de aproximadamente 10% para 7 dias e de 3% para 14 dias quando comparado com o desenvolvimento fúngico em malte 3% com 100 µL de DMSO (C).

Tabela 6 - Diâmetro de colônia medido para o cultivo da linhagem de *Penicillium raistrickii* CBMAI 931 em meio sólido com ponto de inserção central.

Meio de cultivo (Experimentos)		Tempo (dias)			
		7	14	21	28
		Diâmetro de colônia (cm)			
A-	Malte 3%	5,2±0,1	7,8±0,2	8,0*	8,0*
B-	Malte 3% com EsfCom (100 mg.L ⁻¹)	5,2±0,2	7,9±0,1	8,0*	8,0*
C-	Malte 3% com DMSO (100 µL)	5,2±0,2	7,9±0,1	8,0*	8,0*
D-	Malte 3% de Xileno (107 mg.L ⁻¹)	4,1±0,1	7,1±0,1	8,0*	8,0*
E-	Malte 3% de EsfTec (100 mg.L ⁻¹)	4,0±0,2	7,0±0,2	8,0*	8,0*
F-	Malte 3% com EsfTec (100 mg.L ⁻¹) e Xileno (107 mg.L ⁻¹)	4,0±0,2	6,8±0,2	8,0*	8,0*
G-	Malte 3% com de ACI (20 mg.L ⁻¹)	4,6±0,1	7,7±0,1	8,0*	8,0*
H-	Malte 3% com FBAlc (20 mg.L ⁻¹)	4,5±0,1	7,6±0,1	8,0*	8,0*
I-	Malte 3% com FBAC (20 mg.L ⁻¹)	4,7±0,3	7,7±0,1	8,0*	8,0*
J-	Malte 3% com FBAlD (20 mg.L ⁻¹)	4,5±0,1	7,7±0,1	8,0*	8,0*

*Como o crescimento fúngico pode sofrer alterações nas extremidades da placa, o diâmetro da colônia foi considerado somente até 8,0 cm já que as placas de Petri empregadas nestes experimentos possuem 9 cm de diâmetro.

Figura 27 - Experimentos de crescimento microbiano para a linhagem de *Penicillium raistricki* CBMAI 931.

Continuação

Tabela 7 - Diâmetro de colônia medido para o cultivo da linhagem de *Cladosporium* sp. Dr(M2)2 em meio sólido com ponto de inserção central.

Meio de cultivo		Tempo (dias)			
		7	14	21	28
		Diâmetro de colônia (cm)			
A-	Malte 3%	1,9±0,2	3,0±0,1	3,0±0,1	3,0±0,2
B-	Malte 3% com EsfCom (100 mg.L ⁻¹)	2,0±0,2	2,9±0,1	3,0±0,2	3,0±0,2
C-	Malte 3% com DMSO (100 µL)	2,0±0,1	2,9±0,2	3,0±0,2	3,0±0,2
D-	Malte 3% de Xileno (107 mg.L ⁻¹)	2,0±0,2	2,8±0,1	2,8±0,1	2,8±0,1
E-	Malte 3% de EsfTec (100 mg.L ⁻¹)	1,9±0,1	2,7±0,2	2,8±0,2	2,8±0,2
F-	Malte 3% com EsfTec (100 mg.L ⁻¹) e Xileno (107 mg.L ⁻¹)	1,8±0,2	2,4±0,1	2,4±0,1	2,4±0,1
G-	Malte 3% com de ACI (20 mg.L ⁻¹)	1,9±0,2	2,6±0,1	2,6±0,1	2,6±0,1
H-	Malte 3% com FBAlc (20 mg.L ⁻¹)	1,8±0,1	2,4±0,1	2,5±0,1	2,5±0,1
I-	Malte 3% com FBAC (20 mg.L ⁻¹)	1,8±0,2	2,4±0,1	2,4±0,1	2,4±0,1
J-	Malte 3% com FBAlD (20 mg.L ⁻¹)	1,7±0,1	2,3±0,1	2,4±0,1	2,4±0,1

A linhagem *Cladosporium* sp. Dr(M2)2 (Tabela 7, Figura 28) não apresentou bom crescimento no cultivo em meio sólido. Entretanto foi possível observar que a presença do EsfCom (B) não promoveu uma alteração significativa no crescimento da colônia quando comparado com o cultivo em malte 3% (A).

Figura 28 - Experimentos de crescimento microbiano para a linhagem de *Cladosporium* sp. Dr(M2)2.

Continuação

Na presença de EfvTec (D) ou xileno (E) observou-se uma inibição de 10% do crescimento fúngico quando comparado com o cultivo em malte 3% com 100 μ L de DMSO (C). Na adição de EsfTec juntamente com xileno (F) foi observado uma inibição de 20% do desenvolvimento fúngico. Inibições semelhantes foram observadas para os metabólitos de degradação [ACI (G), FBAlc (H), FBAC (I), e FBAlc(J)] quando comparados com o cultivo em malte 3% acrescido de 100 μ L de DMSO em todos os tempos avaliados.

Para o crescimento microbiano da linhagem de *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 (Tabela 8, Figura 29) foi observado que na presença do EsfCom (B) o diâmetro da colônia foi 20% menor quando comparado com o cultivo em malte 3% (A) para 7, 14 e 21 dias. Para os experimentos contendo xileno (D), EsfTec (E) e xileno juntamente com EsfTec (F) não foram observadas diferenças de diâmetro de colônia quando comparados com o cultivo em meio sólido de malte 3% acrescido de 100 μ L de DMSO (C).

Para os experimentos envolvendo os metabólitos de degradação do esfenvalerato foi observado uma inibição de aproximadamente 30% para o FBAlc (H) e FBAlc(J), enquanto que para o ACI (G) e FBAC (I) foi observado uma inibição em todos os tempos avaliados quando comparados com o cultivo em malte 3% acrescido de 100 μ L de DMSO (C).

Tabela 8 - Diâmetro de colônia medidos para o cultivo da linhagem de *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 em crescimento radial.

Meio de cultivo		Tempo (dias)			
		7	14	21	28
		Diâmetro de colônia (cm)			
A-	Malte 3%	2,2±0,2	4,8±0,3	6,9±0,4	8,0*
B-	Malte 3% com EsfCom (100 mg.L ⁻¹)	1,8±0,1	3,8±0,1	5,5±0,2	7,0±0,1
C-	Malte 3% com DMSO (100 µL)	1,9±0,1	3,9±0,1	5,8±0,2	7,1±0,4
D-	Malte 3% de Xileno (107 mg.L ⁻¹)	2,0±0,2	4,0±0,3	5,9±0,3	7,2±0,2
E-	Malte 3% de EsfTec (100 mg.L ⁻¹)	2,0±0,0	4,1±0,1	6,3±0,1	6,9±0,8
F-	Malte 3% com EsfTec (100 mg.L ⁻¹) e Xileno (107 mg.L ⁻¹)	2,0±0,1	4,0±0,3	5,8±0,2	6,8±0,4
G-	Malte 3% com de ACl (20 mg.L ⁻¹)	1,6±0,2	3,5±0,2	5,1±0,1	6,7±0,1
H-	Malte 3% com FBAlc (20 mg.L ⁻¹)	1,2±0,1	2,8±0,1	4,5±0,3	6,4±0,2
I-	Malte 3% com FBAC (20 mg.L ⁻¹)	1,6±0,1	3,4±0,1	5,4±0,1	6,7±0,6
J-	Malte 3% com FBAlD (20 mg.L ⁻¹)	1,0±0,2	2,8±0,2	4,8±0,2	7,0±0,4

Para o cultivo da linhagem *Aspergillus sydowii* CBMAI 935 (Figura 30) não foi possível medir o diâmetro da colônia na superfície da placa de Petri, pois a colônia se desenvolveu de forma irregular por toda a placa devido à produção de esporos. Entretanto, foi possível a medição da colônia em alguns experimentos em que não houve o espalhamento de esporos na placa. Nos experimentos envolvendo os metabólitos de degradação do esfenvalerato [ACI (G), FBAlc (H), FBAC (I), e FBAlD(J)] observou-se que as colônias fúngicas cresceram por toda a placa, no entanto a cultura tornou-se menos espessa na superfície.

Figura 29 - Experimentos de crescimento microbiano para a linhagem de *Cladosporium* sp. CBMAI 1237.

Continuação

Figura 30 - Experimentos de crescimento microbiano durante 7 dias para a linhagem de *Aspergillus sydowii* CBMAI 935.

Em geral, a presença de EsfTec ou xileno promoveu um menor diâmetro de crescimento da colônia, o que denota que estes compostos exercem efeitos inibitórios de crescimento nas cepas avaliadas. Uma inibição de crescimento fúngico mais acentuada foi observada nos experimentos onde EfvTec juntamente com xileno foram adicionados ao meio sólido, fato que denota um efeito inibitório sinérgico no crescimento fúngico. Também foi observado que em geral a presença da formulação comercial promoveu um maior crescimento da colônia, possivelmente devido aos polissacarídeos presentes na formulação que podem ser utilizados como fontes de nutrientes. Como o meio de cultura de malte 3% é um meio rico, a adição de polissacarídeos da formulação comercial é pequena de modo que a estimulação fúngica foi discreta.

Uma outra possibilidade para o efeito inibitório observado no emprego do EsfTec e não observado no EsfCom, seria uma possível degradação menos eficiente do esfenvalerato na formulação comercial, pois haveria uma menor formação de metabólitos de degradação (FBAld, FBAC, FBAlc e ACI) que como foi observado geram uma inibição significativa de crescimento, mesmo em concentrações menores que a do esfenvalerato.

Foi observado um bom crescimento das linhagens fúngicas no meio de cultura de malte 3%, mesmo quando foi adicionado EfvTec, EfvCom, xileno ou EfvTec juntamente com xileno. Esta observação indica que todos os micro-organismos avaliados apresentam potencial biodegradativo deste pesticida e podem ser empregados neste tipo de estudo.

4.2. Seleção de micro-organismos degradadores do pesticida esfenvalerato em meio líquido

Todas as linhagens fúngicas empregadas neste estudo foram capazes de se desenvolver na presença do pesticida esfenvalerato e de seus principais metabólitos. Sendo assim, foi realizada uma seleção fúngica em cultivo em meio líquido com o objetivo de avaliar a eficiência de cada linhagem na biodegradação do esfenvalerato

4.2.1. Quantificação do princípio ativo esfenvalerato e dos principais metabólitos de biodegradação

Foi realizado o cultivo de cada linhagem durante 5 dias em meio líquido e após este período foi adicionado 100 mg.L⁻¹ de EsfCom e após 14 dias de reação o princípio ativo esfenvalerato remanescente (26,4 min) e os metabólitos FBAlc (16,8 min), FBAlc (9,8 min), FBAlc (8,8 min) e ACI (13,5 min) foram quantificados por CLAE-UV (Tabela 9).

Tabela 9 - Quantificação de EsfCom, FBAlc, FBAlc, FBAlc e ACI por CLAE-UV após a biodegradação de EsfCom (100 mg.L⁻¹, durante 14 dias, 32°C e 130 rpm).

Micro-organismos	Conc. EsfCom (mg.mL ⁻¹)	Conc. FBAlc (mg.mL ⁻¹)	Conc. FBAlc (mg.mL ⁻¹)	Conc. ACI (mg.mL ⁻¹)	Conc. FBAlc (mg.mL ⁻¹)
Controle Abiótico	97,8±0,6	0,8±0,1	<0,1 ^a	<0,1 ^a	Nd
<i>Microsphaeropsis</i> sp. Dr(A)6	77,9±4,1	Nd	0,6±0,1	2,7±0,1	0,2 ^a
<i>Westerdykella</i> sp. Dr(M2)4	69,5±3,7	Nd	4,0±1,0	7,4±1,1	Nd
<i>Acremonium</i> sp. Dr(F)1	64,8±8,6	Nd	7,4±0,3	6,3±0,3	Nd
<i>Penicillium raistrickii</i> CBMAI 931	85,4±4,3	Nd	1,9±0,2	0,8±0,2	Nd
<i>Cladosporium</i> sp. Dr(M2)2	95,2±2,2	1,1±0,1	1,4±0,2	<0,1 ^a	Nd
<i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237	83,7±4,5	Nd	1,0±0,2	0,6±0,1	Nd
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 935	89,4±1,7	Nd	0,5±0,0	1,4±0,2	Nd

^aAs curvas padrões obtidas abordam valores até 0,5 mg.L⁻¹. Entre 0,1 mg.L⁻¹ até 0,5 mg.L⁻¹ os valores foram estimados linearmente.

Nd: Não detectado.

Por meio das análises dos resultados obtidos foi possível verificar que todos os micro-organismos empregados no estudo promoveram a degradação do pesticida EfvCom, fato que pode ser comprovado pelas menores concentrações residuais determinada em todas as reações de biodegradação realizadas (independentemente do fungo empregado) quando comparado com o controle abiótico (Tabela 9).

Outra abordagem que comprovou a biodegradação foi a detecção e quantificação dos metabólitos FBAC e ACI, onde se observou uma maior formação destes compostos quando a linhagem fúngica estava presente no sistema. Por exemplo, para a linhagem fúngica de *Acremonium* sp. Dr(F)1, onde se observou uma concentração residual de EsfCom ($64,8 \pm 8,6$ mg.L⁻¹) menor que a encontrada para o controle abiótico ($97,8 \pm 0,6$ mg.L⁻¹) e também uma concentração de FBAC ($7,4 \pm 0,3$ mg.L⁻¹) e de ACI ($6,3 \pm 0,3$ mg.L⁻¹) maiores que no controle abiótico (menores que 0,1 mg.L⁻¹ para o FBAC e o ACI). Para uma melhor observação das presenças dos metabólitos, foi realizado uma comparação entre o cromatograma obtido para o controle fúngico da linhagem e a reação de biodegradação (Figura 31).

Figura 31 – (A) Cromatograma obtido por CLAE-UV para a biodegradação de EsfCom (100 mg.L⁻¹) durante 14 dias em agitador orbital (130 rpm e 32°C) utilizando a linhagem de *Acremonium* sp. Dr(F)1 e o controle abiótico e (B) a ampliação entre 9 e 18 minutos.

Outro importante ponto a ser destacado neste estudo foi a ausência do FBAlD em 6 das 7 linhagens avaliadas (Figura 32). Este composto foi detectado somente na biodegradação empregando o fungo *Cladosporium* sp. Dr(M2)2 (Figura 33). Esta linhagem não apresentou um bom crescimento no cultivo em meio sólido (Seção 4.1.) e no meio líquido (Seção 4.2.2.), de modo que esta não foi capaz de converter completamente o FBAlD. Mesmo com o desenvolvimento insatisfatório da linhagem, foi observado uma maior concentração de FBAlD ($1,1 \pm 0,1$ mg.L⁻¹) e de FBAc ($1,4 \pm 0,2$ mg.L⁻¹) do que no controle abiótico ($0,8 \pm 0,1$ mg.L⁻¹ de FBAlD e $<0,1$ mg.L⁻¹ de FBAc).

Figura 32 – (A) Cromatograma obtido por CLAE-UV para a biodegradação de EsfCom (100 mg.L⁻¹) durante 14 dias em agitador orbital (130 rpm e 32°C) utilizando a linhagem de *Acremonium* sp. Dr(F)1 e o respectivo controle fúngico e (B) a ampliação entre 9 e 19 minutos.

Figura 33 – (A) Cromatograma obtido por CLAE-UV para a biodegradação de EsfCom (100 mg.L⁻¹) durante 14 dias em agitador orbital (130 rpm e 32°C) utilizando a linhagem de *Cladosporium* sp. Dr(M2)2 e o respectivo controle fúngico e (B) a ampliação entre 8 e 18 minutos.

A formação do composto FBAlc foi observada somente para a linhagem *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6 e mesmo assim em baixas concentrações (0,2 mg.L⁻¹). No geral foi observado uma concentração acentuada de FBAlc (0,6±0,1 mg.L⁻¹) e ACI (2,7±0,1 mg.L⁻¹) resultantes da biodegradação (Figura 34).

Figura 34 - (A) Cromatograma obtido por CLAE-UV para a biodegradação de EsfCom (100 mg.L⁻¹) durante 14 dias em agitador orbital (130 rpm e 32°C) utilizando a linhagem de *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6 e o respectivo controle fúngico e (B) a ampliação entre 7 e 13 minutos.

No controle abiótico foi observado que para as condições empregadas a degradação por eventos físico-químicos não foi significativa para o EsfCom, de modo que foi determinado a mesma quantidade de princípio ativo que foi determinado antes da reação. É importante destacar que o FBAl_d (0,8±0,1 mg.L⁻¹) foi o principal metabólito de degradação abiótica e que o FBAC (<0,1 mg.L⁻¹) e o ACI (<0,1 mg.L⁻¹) foram detectados, porém estavam em concentrações bem inferiores do que nas reações de biodegradação (Tabela 9) (Figura 35).

Figura 35 – (A) Cromatograma obtido por CLAE-UV para a degradação de EsfCom (100 mg.L⁻¹) durante 14 dias em agitador orbital (130 rpm e 32°C) abióticamente e o controle do meio de cultura e (B) a ampliação entre 9 e 19 minutos.

A estabilidade hidrolítica do esfenvalerato foi reportada, de modo que o tempo de meia vida determinado foi de 129 dias no pH 5 e 65 dias em pH 9 em condições abióticas. Para o pH 7 uma hidrólise discreta foi observada. Também se observou uma taxa de biodegradação relativamente baixa para o esfenvalerato em sistemas aquáticos aeróbicos, de modo que o tempo de meia-vida observado foi de 72,3 dias em água sem a presença de luz a 10°C por 100 dias (European Commission, 2005). Contudo, foi mostrado que 90% do esfenvalerato foi adsorvido em sedimento em 24 horas após a aplicação (Heinis e Knuth, 1992), portanto, no emprego da formulação comercial emulsionável existem materiais carreadores do princípio ativo, de modo que a maior parte do esfenvalerato pode estar adsorvido nestes compostos e não totalmente disponível na fase aquosa, dificultando a degradação e até mesmo a biodegradação do pesticida.

Estes dados mostram que todos os fungos empregados neste trabalho foram capazes de acelerar a degradação do esfenvalerato. Fato que pode ser considerado importante, pois sugere que uma grande variedade de fungos e gêneros (*Microsphaeropsis*, *Westerdykella*, *Acremonium*, *Penicillium*, *Cladosporium* e *Aspergillus*) podem agir conjuntamente na degradação deste pesticida na natureza. Entretanto, foi observado também que determinadas linhagens apresentaram uma biodegradação mais eficiente nas condições empregadas.

Yu *et al.* realizaram a biorremediação de fenvalerato em solo pela bactéria *Sphingobium* sp. F-7. Apenas 16,9 mg.kg⁻¹ de fenvalerato foi degradado pelos micro-organismos nativos do solo em 10 dias. Enquanto 44,4 mg.kg⁻¹ foi removido quando este foi inoculado com a linhagem *Sphingobium* sp. F-7. Este estudo realizado utilizando bactérias denota que a biodegradação ocorre por diversos micro-organismos presentes no solo e a inoculação de uma linhagem mais eficiente pode acelerar a degradação (Yu *et al.*, 2013). A mesma abordagem pode ser empregada utilizando fungos degradadores, pois foi observado que várias linhagens fúngicas podem agir na biodegradação do esfenvalerato, embora algumas espécies e gêneros apresentem maior eficiência neste processo. Uma outra abordagem que pode ser empregada é a utilização de um consórcio destas espécies, visando uma biodegradação mais eficiente, tanto do princípio ativo Esf quanto dos principais metabólitos de degradação (FBAld, FBAC, FBAlc e ACl).

Para a continuação deste estudo foram selecionadas as três linhagens que apresentaram os melhores resultados biodegradativos na condições utilizadas [*Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6, *Acremonium* sp. Dr(F)1 e *Westerdykella* sp. Dr(M2)4] para avaliações em diferentes tempos de cultivo empregando-se EsfCom e EsfTec.

4.2.2. Avaliação da biodegradação do esfenvalerato de acordo com a massa fúngica e pH do meio reacional

A massa fúngica seca do controle fúngico e da biodegradação do EsfCom foram pesadas para uma estimativa do crescimento microbiano. O pH do meio de cultura também foi avaliado, já que variações de acidez podem exercer grande influência na degradação do pesticida esfenvalerato (Tabela 10).

Tabela 10 – Massa fúngica e pH determinados para a biodegradação de 100 mg.L⁻¹ de EsfCom e o controle fúngico cultivados durante 14 dias (130 rpm e 32°C).

Linhagem fúngica	Biodegradação		Controle fúngico	
	Massa seca ^a (mg)	pH ^a	Massa seca ^a (mg)	pH ^a
Controle Abiótico	-	6,3±0,0	-	6,6±0,0
<i>Microsphaeropsis</i> sp. Dr(A)6	200±9,0	7,3±0,2	194±5,0	6,8±0,1
<i>Westerdykella</i> sp. Dr(M2)4	317±23	7,1±0,1	329±15	7,2±0,2
<i>Acremonium</i> sp. Dr(F)1	393±6	8,3±0,0	399±7	8,3±0,1
<i>Penicillium raistrickii</i> CBMAI 931	263±8	8,1±0,2	253±10	8,3±0,2
<i>Cladosporium</i> sp. Dr(M2)2	40±3	5,4±0,0	36±4	5,6±0,1
<i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237	529±41	6,4±0,3	434±25	6,1±0,2
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 935	235±1	7,4±0,1	245±3	7,0±0,1

^a A massa e o pH foram determinados em triplicatas.

Em geral foi observado que as linhagens que apresentaram uma maior massa seca promoveram uma biodegradação mais eficiente, como é o caso da *Acremonium* sp. Dr(F)1 (393,6±6 mg) e da linhagem *Westerdykella* sp. Dr(M2)4 (317±23 mg). Estas linhagens apresentaram as biodegradações mais eficientes, 35 e 30%, respectivamente do EsfCom inicialmente adicionado (100 mg.L⁻¹). Entretanto, isto não foi uma regra, já que a linhagem de *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6 apresentou uma massa fúngica menor (200±9 mg) quando comparada com a massa média obtida para as linhagens (282 mg) e foi a terceira linhagem mais eficiente na biodegradação (22% de biodegradação). A linhagem *Cladosporium* sp. CBMAI 1237 foi a que apresentou a maior massa seca (529±41

mg), mas degradou apenas 16% do EsfCom durante 14 dias, sendo a quarta linhagem mais eficiente.

Foi observado que o valor inicial de pH 7,0 não permaneceu constante ao longo do cultivo fúngico, de modo que são observados valores de pH entre 5,6-8,3. Nenhuma tendência foi observada entre a eficiência de biodegradação e o pH do meio de cultura, denotando que a acidez do meio não interferiu diretamente na degradação do esfenvalerato. É importante ressaltar que o tempo de meia vida do esfenvalerato foi reportado como 129 dias em pH 5 e 65 dias em pH 9 em água e que para o pH 7 uma hidrólise discreta foi observada (European Commission, 2005). De modo que para o tempo de biodegradação empregado (14 dias) e para os valores de pH medidos não haveria contribuição significativa da hidrólise nos experimentos realizados. É importante destacar que a variação de pH durante o cultivo fúngico é frequente, uma vez que os fungos produzem metabólitos que alteram o pH do meio reacional.

4.3. Biodegradação do princípio ativo esfenvalerato (EsfTec) e sua formulação comercial (EsfCom) com os fungos selecionados

Foram realizados experimentos que visaram a comparação entre a biodegradação do esfenvalerato presente na formulação comercial (EsfCom) e do esfenvalerato puro (EsfTec)

4.3.1. Quantificação do EsfCom e de seus principais metabólitos de degradação

Os experimentos foram realizados em triplicatas independentes, de modo que cada cultivo fúngico constitui uma reação única e apresenta desvios padrões consideráveis nos resultados obtidos, principalmente devido às inúmeras variações que podem ocorrer durante o desenvolvimento de reações utilizando organismos vivos.

Avaliando-se a biodegradação abiótica do EsfCom (Tabela 11), observou-se que a concentração do princípio ativo permaneceu constante ao longo do tempo, para 0 dias de reação foram determinados $96,9 \pm 2,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de EsfCom e

para 28 dias foram determinados $97,1 \pm 0,9 \text{ mg.L}^{-1}$. As concentrações de FBAC e ACI também não apresentaram mudanças significativas nas concentrações, que foram inferiores a $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ de 0 a 28 dias de reação.

Tabela 11 – Resultados da degradação abiótica do EsfCom (100 mg.L^{-1}) observada ao longo do tempo em agitador orbital (32°C e 130 rpm).

Composto	Tempo (dias)				
	0	7	14	21	28
	EsfCom (mg.L^{-1})				
Esf	$96,9 \pm 2,2$	$97,5 \pm 0,8$	$97,6 \pm 0,6$	$97,9 \pm 0,4$	$97,1 \pm 0,9$
FBAlc	$1,1 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,1$
FBAC	$>0,1 \pm 0,0$	$>0,1 \pm 0,0$	$>0,1 \pm 0,0$	$>0,1 \pm 0,0$	$>0,1 \pm 0,0$
FBAlc	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
ACI	$>0,1 \pm 0,0$	$>0,1 \pm 0,0$	$>0,1 \pm 0,0$	$>0,1 \pm 0,0$	$>0,1 \pm 0,0$

Nd= Não detectado

A linhagem fúngica *Acremonium* sp. Dr(F)1 (Tabela 12, Figura 36) apresentou a maior eficiência na degradação do esfenvalerato entre as linhagens avaliadas. A concentração residual do pesticida diminuiu ao longo do tempo, de modo que a concentração final após 28 dias de reação foi de $48,0 \pm 6,7 \text{ mg.L}^{-1}$ de esfenvalerato. Este valor corresponde a uma degradação de 50% do pesticida quando comparado com o valor determinado para 0 dias de reação.

Concomitantemente com a diminuição da concentração de esfenvalerato foi observado um aumento na concentração dos principais metabólitos da degradação, o FBAC e o ACI. Em 28 dias de reação foi observado que a concentração do FBAC aumentou de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ em 0 dias para $16,6 \pm 0,9 \text{ mg.L}^{-1}$ após 28 dias de reação. De forma semelhante o ACI apresentou maiores concentrações ao longo do tempo, de valores inferiores a $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ em 0 dias de reação até $16,6 \pm 0,9 \text{ mg.L}^{-1}$ em 28 dias de reação.

Tabela 12 - Biodegradação do EsfCom (100 mg.L⁻¹) pelo fungo *Acremonium* sp. Dr(F)1 ao longo do tempo em agitador orbital (32°C e 130rpm).

Composto	Tempo (dias)				
	0	7	14	21	28
	EsfCom (mg.L ⁻¹)				
Esf	96,9±2,2	74,3±2,9	64,8±6,7	56,6±6,0	48,0±6,7
FBAlc	1,1±0,1	Nd	Nd	Nd	Nd
FBAlc	0,1±0,0	5,0±0,2	7,4±0,3	11,0±0,6	16,6±0,9
FBAlc	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
ACI	0,1±0,0	4,2±0,2	6,3±0,3	9,7±0,6	13,4±1,1

Nd= Não detectado

Para a linhagem *Westerdykella* sp. Dr(M2)4 (Tabela 13) também foi observado uma biodegradação eficiente do esfenvalerato. A concentração residual do princípio ativo diminuiu ao longo do tempo de reação, onde a concentração residual final após 28 dias de reação foi de 52,6±4,7 mg.L⁻¹, ou seja, uma degradação de 58% quando comparado com o valor determinado para 0 dias de reação. Assim como o observado para a linhagem *Acremonium* sp. Dr(F)1, a diminuição da concentração de esfenvalerato ocorreu concomitantemente ao aumento da concentração dos principais metabólitos de degradação (FBAlc e ACI). Para 28 dias de reação a concentração do FBAlc aumentou de concentrações inferiores a 0,1 mg.L⁻¹ em 0 dias de reação para 6,6±2,4 mg.L⁻¹. Semelhantemente, o ACI apresentou maiores concentrações ao longo do tempo, de valores inferiores a 0,1 mg.L⁻¹ em 0 dias de reação até 9,3±1,1 mg.L⁻¹ em 28 dias de reação.

A linhagem *Westerdykella* sp. Dr(M2)4 apresentou uma menor biodegradação que a linhagem fúngica *Acremonium* sp. Dr(F)1, de modo que foi encontrado uma maior concentração residual de esfenvalerato e também uma menor concentração dos principais metabólitos, FBAlc e ACI.

Figura 36 – Cromatogramas obtidos por CLAE-UV da biodegradação de EsfCom (100 mg.L⁻¹) pela linhagem *Acremonium* sp. Dr(F)1 em (A) 0, (B) 7, (C) 14, (D) 21 e (E) 28 dias.

Tabela 13 - Biodegradação do EsfCom (100mg.L⁻¹) pelo fungo *Westerdykella* sp. Dr(M2)4 ao longo do tempo em agitador orbital (32°C e 130rpm).

Composto	Tempo (dias)				
	0	7	14	21	28
	EsfCom (mg.L ⁻¹)				
Esf	96,9±2,2	84,3±7,4	69,5±3,7	63,9±2,1	56,3±4,7
FBAld	1,1±0,1	Nd	Nd	Nd	Nd
FBAc	0,1±0,0	0,8±0,1	3,1±1,5	5,0±1,1	6,6±2,4
FBAlc	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
ACI	0,1±0,0	2,5±0,3	7,1±1,6	9,4±1,6	9,3±1,1

Nd= Não detectado

O fungo *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6 (Tabela 14) apresentou a biodegradação menos eficiente entre as três linhagens que foram avaliadas ao longo do tempo. A concentração residual do princípio ativo diminuiu ao longo do tempo, de modo que após 28 dias de reação foi determinado 52,2±2,5 mg.L⁻¹ de Esf, logo, uma degradação de 54% do pesticida quando comparado com o valor determinado para 0 dias de reação.

Assim, como o observado para as linhagens *Acremonium* sp. Dr(F)1 e *Westerdykella* sp. Dr(M2)4, a diminuição da concentração de esfenvalerato ocorreu concomitantemente ao aumento da concentração dos principais metabólitos de degradação (FBAc e ACI). Para 28 dias de reação a concentração do FBAc aumentou de concentrações inferiores a 0,1 mg.L⁻¹ em 0 dias de reação para 2,7±0,4 mg.L⁻¹ ao longo do tempo. Esta concentração foi inferior às encontradas para as outras linhagens analisadas, sugerindo que esta linhagem possa ser mais eficiente na conversão do metabólito FBAc. Semelhantemente, o ACI apresentou maiores concentrações ao longo do tempo, de valores inferiores a 0,1 mg.L⁻¹ em 0 dias de reação até 6,6±0,6 mg.L⁻¹ em 28 dias de reação.

Tabela 14 - Biodegradação do EsfCom (100 mg.L⁻¹) pelo fungo *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6 ao longo do tempo em agitador orbital (32°C e 130rpm).

Composto	Tempo (dias)				
	0	7	14	21	28
	EsfCom (mg.L ⁻¹)				
Esf	96,9±2,2	91,5±2,6	77,9±4,1	66,9±5,4	52,2±2,5
FBAld	1,1±0,1	Nd	Nd	Nd	Nd
FBAc	0,1±0,0	0,6±0,1	0,6±0,2	1,2±0,1	2,7±0,4
FBAlc	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
ACI	0,1±0,0	1,0±0,1	2,7±0,1	5,4±0,2	6,6±0,6

Nd= Não detectado

Verificou-se que a biodegradação do esfenvalerato foi efetiva ao longo dos 28 dias de experimento (Figura 37), observando-se uma diminuição da concentração de pesticida concomitantemente à formação de FBAc (Figura 38) e ACI (Figura 39).

Figura 37 – Biodegradação de EsfCom (100 mg.L⁻¹) ao longo do tempo sem a presença de micro-organismos (controle abiótico) e utilizando-se as linhagens *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6, *Acremonium* sp. Dr(F)1 e *Westerdykella* sp. Dr(M2)4.

Figura 38 - Determinação do FBAC resultante da biodegradação do EsfCom (100 mg.L⁻¹) ao longo do tempo sem a presença de micro-organismos (controle abiótico) e utilizando-se as linhagens *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6, *Acremonium* sp. Dr(F)1 e *Westerdykella* sp. Dr(M2)4.

Figura 39 - Determinação do ACI resultante da biodegradação do EsfCom (100 mg.L⁻¹) ao longo do tempo (0,7,14,21 e 28 dias) sem a presença de micro-organismos (controle abiótico) e utilizando-se as linhagens *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6, *Acremonium* sp. Dr(F)1 e *Westerdykella* sp. Dr(M2)4.

Vale a pena ressaltar a eficiência da linhagem fúngica *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6 na biodegradação do FBAC, o qual não apresentou concentrações superiores a 3 mg.L⁻¹ independentemente do tempo de reação.

O FBAlD que foi observado na amostra de pesticida antes da reação de biodegradação foi completamente consumido por todas as linhagens fúngicas e a presença deste composto não foi detectada em nenhum dos experimentos de biodegradação. Este metabólito foi observado somente nas amostras de controle abiótico e em pequenas concentrações (inferiores a 1,0 mg.L⁻¹) que foram decaindo ao longo do tempo mesmo sem a presença de micro-organismos, o que sugere uma oxidação espontânea do aldeído ao respectivo ácido carboxílico.

A biotransformação dos metabólitos é importante, pois estes compostos também são considerados tóxicos e capazes de produzir diversos malefícios à saúde humana e ao meio ambiente. Estudos na literatura mostram que estes compostos podem ser mais tóxicos que os piretróides de quem são gerados. O metabólito FBAlC apresentou efeitos em receptores de estrogênio e portanto pode interferir no sistema endócrino estrogênico, podendo causar alterações na fertilidade masculina (Taylor *et al.*, 2010). Zhang *et al.* mostraram que os metabólitos de piretróides FBAlD, FBAlC e FBAC apresentam citotoxicidade, já que estes inibem a viabilidade celular, induzem apoptose, liberam interleucinas e aumentam a necrose de tumores, mais que o piretróide que deu origem aos metabólitos (Zhang *et al.*, 2010). Vadhana *et al.* mostraram também que os metabólitos encontrados neste estudo (FBAlD, FBAlC e FBAC) podem interferir na membrana plasmática do coração de ratos, induzindo peroxidação lipídica e danos às proteínas (Vadhana *et al.*, 2011).

O FBAC foi o principal metabólito de degradação observado para o esfenvalerato em nosso estudo e recentemente foi relatado como o xenobiótico mais detectado na urina humana (Ueyama *et al.*, 2009, Barr *et al.*, 2010, Ahn *et al.*, 2011, Egeghy *et al.*, 2011). Este metabólito possui atividade desreguladora do sistema endócrino maior do que o próprio pesticida, ou seja, este metabólito simula ou interfere na função de hormônios no corpo ativando ou desativando

sinais hormonais, afetando as funções de tecidos e órgãos (Tyler *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2007; Jin *et al.*, 2010). Substâncias que possuem este tipo de atividade estão associadas a problemas de crescimento e nos sistemas reprodutivos, neural e imune em organismos vivos, incluindo no homem (National Institute of Environmental Health Sciences, 2010).

No ambiente natural o FBAC é persistente e recalcitrante à degradação. O tempo de meia vida dependendo do tipo de solo, clima e outras condições varia entre 120 e 180 dias. Este composto pode ser transportado pela água, mas tende a ser absorvido por sedimentos aumentando ainda mais o seu tempo de meia vida. A acumulação e dispersão do FBAC resultou na presença e contaminação de ambientes urbanos e da água de superfície gerando preocupação ambiental e com a saúde pública (Tyler *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2012).

O ACI é denotado como um dos principais metabólitos da degradação do esfenvalerato e do fenvalerato em solo por micro-organismos (Ohkawa, 1978), em plantas (Lee *et al.*, 1988) e em humanos (Arrebola *et al.*, 1999). O fenvalerato e o seu metabólito ACI foram denotados como indutores de danos oxidativos significantes em eritrócitos de ratos, o qual também é associado a danos às proteínas da membrana causando estresse oxidativo (Prasanthi *et al.*, 2005)

4.3.2. Quantificação do EsfTec e de seus principais metabólitos de degradação

Avaliando-se a biodegradação abiótica do EsfTec (Tabela 15), observou-se que a concentração do princípio ativo permaneceu constante ao longo do tempo, para 0 dias de reação foram determinados $92,5 \pm 1,5$ mg.L⁻¹ de EsfTec e para 28 dias foram determinados $92,0 \pm 1,6$ mg.L⁻¹. As concentrações de FBAC e ACI também não apresentaram mudanças significativas nas concentrações, que foram inferiores a 1,0 mg.L⁻¹ de 0 a 28 dias de reação.

Tabela 15 – Resultados da degradação abiótica do EsfTec (100mg.L⁻¹) observada ao longo do tempo em agitador orbital (32°C e 130rpm).

Composto	Tempo (dias)				
	0	7	14	21	28
	EsfTec (mg.L ⁻¹)				
Esf	92,5±1,5	91,0±1,4	90,5±2,1	90,5±0,8	92,0±1,6
FBAld	1,0±0,2	1,1±0,1	1,1±0,1	1,3±0,2	1,3±0,2
FBAc	0,1±0,0	0,4±0,1	0,6±0,1	0,6±0,1	0,7±0,1
FBAlc	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
ACI	>0,1±0,0	>0,1±0,0	>0,1±0,0	>0,1±0,0	>0,1±0,0

Nd= Não detectado

O fungo *Acremonium* sp. Dr(F)1 (Tabela 16, Figura 40) apresentou melhor eficiência na biodegradação do EsfTec, pois a concentração residual do pesticida diminuiu mais rápido ao longo do tempo em comparação com outras espécies. A concentração final de esfenvalerato após 28 dias de reação foi de 26,5±5,6 mg.L⁻¹ de Esf, representando uma degradação de 71% do pesticida quando comparado com o valor determinado para 0 dias de reação.

Além da diminuição da concentração de esfenvalerato foi observado um aumento da concentração dos principais metabólitos de degradação (FBAc e ACI). Em 28 dias de reação foi observado que a concentração do FBAc aumentou de concentrações inferiores a 0,1 mg.L⁻¹ em 0 dias de reação para 20,4±3,1mg.L⁻¹ ao longo do tempo. De maneira semelhante o ACI apresentou maiores concentrações ao longo do tempo, de valores inferiores a 0,1 mg.L⁻¹ em 0 dias de reação até 18,5±3,0 mg.L⁻¹ em 28 dias de reação.

Para a linhagem *Westerdykella* sp. Dr(M2)4 (Tabela 17) também foi observado uma degradação eficiente do EsfTec. A concentração residual do princípio ativo diminuiu ao longo do tempo de reação, onde a concentração final após 28 dias de reação foi de 30,6±3,3 mg.L⁻¹ de Esf, ou seja, uma degradação de 67% quando comparado com o valor determinado para 0 dias de reação.

Tabela 16 - Biodegradação do EsfTec (100 mg.L⁻¹) pelo fungo *Acremonium* sp. Dr(F)1 em agitador orbital (32°C e 130rpm).

Composto	Tempo (dias)				
	0	7	14	21	28
	EsfTec (mg.L ⁻¹)				
Esf	92,5±1,5	36,5±5,2	34,4±3,6	33,8±0,9	26,5±5,6
FBAld	1,0±0,2	Nd	Nd	Nd	Nd
FBAc	0,1±0,0	10,1±1,5	13,0±0,4	17,5±1,2	20,4±3,1
FBAlc	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
ACI	0,1±0,0	9,3±0,4	12,1±0,3	16,4±0,6	18,5±3,0

Nd= Não detectado

Tabela 17 - Biodegradação do EsfTec (100mg.L⁻¹) por fungo *Westerdykella* sp. Dr(M2)4 em agitador orbital (32°C e 130rpm).

Composto	Tempo (dias)				
	0	7	14	21	28
	EsfTec (mg.L ⁻¹)				
Esf	92,5±1,5	51,6±3,3	45,0±6,4	31,7±1,9	30,6±3,3
FBAld	1,0±0,2	Nd	Nd	Nd	Nd
FBAc	0,1±0,0	1,0±0,1	2,3±0,5	4,9±2,0	6,3±1,1
FBAlc	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
ACI	0,1±0,0	4,2±0,2	7,1±1,6	11,5±2,9	11,6±1,1

Nd= Não detectado

Assim, como já observado para a linhagem *Acremonium* sp. Dr(F)1, a diminuição da concentração de esfenvalerato ocorreu concomitantemente ao aumento da concentração dos principais metabólitos de degradação (FBAc e ACI). Para 28 dias de reação a concentração do FBAc aumentou de concentrações inferiores a 0,1 mg.L⁻¹ em 0 dias de reação para 6,3±1,1 mg.L⁻¹ ao longo do tempo. Semelhantemente, o ACI apresentou maiores concentrações ao longo do tempo, de valores inferiores a 0,1 mg.L⁻¹ em 0 dias de reação até 11,6±1,1 mg.L⁻¹ em 28 dias de reação.

A linhagem *Westerdykella* sp. Dr(M2)4 apresentou uma menor biodegradação que a linhagem fúngica *Acremonium* sp. Dr(F)1, de modo que foi encontrado uma maior concentração residual de esfenvalerato e também uma menor concentração dos principais metabólitos.

Figura 40 – Cromatogramas obtidos por CLAE-UV da biodegradação de EsfTec pela linhagem *Acremonium* sp. Dr(F)1 por (A) 0, (B) 7, (C) 14, (D) 21 e (E) 28 dias.

O fungo *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6 (Tabela 18) foi o que apresentou a biodegradação menos eficiente entre as três linhagens que foram avaliadas ao longo do tempo. A concentração residual do princípio ativo após 28 dias de reação foi de $52,2 \pm 2,5$ mg.L⁻¹ de Esf, logo, uma degradação de 54% do pesticida quando comparado com o valor determinado para 0 dias de reação. Assim, como o observado para as linhagens de *Acremonium* sp. Dr(F)1 e *Westerdykella* sp. Dr(M2)4, a diminuição da concentração de esfenvalerato ocorreu concomitantemente ao aumento da concentração dos principais metabólitos de degradação (FBAc e ACl). Para 28 dias de reação a concentração do FBAc aumentou de concentrações inferiores a 0,1 mg.L⁻¹ em 0 dias de reação para $1,9 \pm 0,1$ mg.L⁻¹ após 28 dias de biodegradação. Esta concentração foi bem inferior às determinadas para as outras linhagens analisadas. Outro fato importante deste experimento foi a menor concentração em 28 dias de biodegradação de FBAc ($3,0 \pm 0,2$ mg.L⁻¹) quando comparado com o valor determinado para 21 dias, denotando que o acúmulo deste metabólito foi menor após este período.

Semelhantemente, o ACl apresentou maiores concentrações ao longo do tempo, de valores inferiores a 0,1 mg.L⁻¹ em 0 dias de reação até $2,9 \pm 0,5$ mg.L⁻¹ em 28 dias de reação. A concentração também foi menor que a determinada para o metabólito em 21 dias de reação ($3,4 \pm 0,3$ mg.L⁻¹).

As menores concentrações dos metabólitos em 28 dias quando comparado com 21 dias sugerem a não acumulação destes metabólitos no meio, denotando a sua conversão em outros produtos de biotransformação como o ácido 3-(hidroxifenoxi)benzoico resultante da *fase I* da biodegradação (mostrado na seção 5.4.), ou em produtos da *fase II* que são reações de conjugações e tornam os compostos solúveis em meio aquoso.

Tabela 18 - Biodegradação do EsfTec (100mg.L⁻¹) pelo fungo *Microsphaeropsis* sp. Dr(A) em agitador orbital (32°C e 130rpm).

Composto	Tempo (dias)				
	0	7	14	21	28
	EsfTec (mg.L ⁻¹)				
Esf	96,9±2,2	62,8±2,5	60,5±2,4	47,8±9,2	41,5±2,4
FBAld	1,0±0,2	Nd	Nd	Nd	Nd
FBAc	0,1±0,0	0,8±0,2	2,1±0,5	3,0±0,2	1,9±0,1
FBAlc	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
ACI	0,1±0,0	6,6±0,8	3,3±1,1	3,4±0,3	2,9±0,5

Nd= Não detectado

Assim como para o EsfCom, o FBAld que foi encontrado na amostra de pesticida antes da reação de biodegradação foi completamente consumido pelas três linhagens fúngicas. A presença deste metabólito não foi detectada em nenhum dos experimentos de biodegradação, o qual foi observado somente nas amostras de controle abiótico e em baixas concentrações (inferiores a 1,0 mg.L⁻¹) e que foram decaindo ao longo do tempo mesmo sem a presença de micro-organismos.

Verificou-se que a biodegradação do esfenvalerato foi efetiva ao longo dos 28 dias de experimento (Figura 41), observando-se uma diminuição da concentração de pesticida concomitantemente à formação de FBAc (Figura 42) e ACI (Figura 43).

Figura 41 – Biodegradação de EsfTec (100 mg.L⁻¹) ao longo do tempo sem a presença de micro-organismos (controle abiótico) e utilizando-se as linhagens de *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6, *Acremonium* sp. Dr(F)1 e *Westerdykella* sp. Dr(M2)4.

Figura 42 - Determinação do FBAC resultante da biodegradação de EsfTec (100 mg.L⁻¹) ao longo do tempo sem a presença de micro-organismos (controle abiótico) e utilizando-se as linhagens de *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6, *Acremonium* sp. Dr(F)1 e *Westerdykella* sp. Dr(M2)4

Figura 43 - Determinação do ACL resultante da biodegradação de EsfTec (100 mg.L⁻¹) ao longo do tempo sem a presença de micro-organismos (controle abiótico) e utilizando-se as linhagens *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6, *Acremonium* sp. Dr(F)1 e *Westerdykella* sp. Dr(M2)4.

Foi possível observar que a espécie fúngica mais eficiente na biodegradação do esfenvalerato foi a *Acremonium* sp. Dr(F)1, independentemente do emprego do EsfCom ou do EsfTec. Portanto, esta espécie fúngica pode ser empregada em uma possível aplicação em biorremediação, uma vez que uma rápida degradação do esfenvalerato foi observado.

O emprego do fungo *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6 seria uma melhor opção, uma vez que este mantém a concentração de FBAC e ACL muito baixa, sugerindo que esta linhagem pode apresentar melhores resultados na mineralização do esfenvalerato. Outra possível abordagem seria o emprego concomitante das duas linhagens fúngicas, que tornaria possível uma rápida biodegradação do esfenvalerato e de seus metabólitos.

A biodegradação mais eficiente do princípio ativo pode ser causada por diversos motivos, mas é suposto que esta diferença ocorra devido à toxicidade observada quando a biodegradação foi realizada na presença de xileno e/ou devido à menor disponibilidade do pesticida na formulação comercial, pois se trata de um produto emulsionável biodegradação.

É importante destacar a realização da seleção de micro-organismos empregando a formulação comercial deste pesticida, já que uma grande diferença foi observada entre o princípio ativo esfenvalerato e a sua formulação comercial.

As determinações da presença dos metabólitos de degradação mostram que nas condições empregadas neste estudo o tempo de 28 dias pode ser considerado pouco para uma completa mineralização dos metabólitos produzidos.

4.4. Identificação de metabólitos da biodegradação por CLAE-EM

A identificação dos metabólitos foi realizada através da comparação entre os cromatogramas obtidos para o extrato da biodegradação do esfenvalerato e o controle fúngico através das análises por CLAE-EM.

Para a linhagem *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6 foram observados a presença de 5 picos na amostra que continha pesticida esfenvalerato e que estavam ausentes no controle fúngico (Figura 44). Os picos foram identificados como: A (4,6 min), B (9,2min), C (9,7min), D (12,9 min) e E (15,8 min). Desta maneira foram selecionados os compostos que teriam seu espectro de massas interpretados e quando possível comparado com padrões analíticos.

Figura 44 – Cromatogramas obtidos por CLAE-EM da biodegradação de EsfTec (100 mg.L⁻¹) pela linhagem *Microsphaeropsis* sp Dr(A)6 e o respectivo controle fúngico.

O espectro do composto A não apresentou massas condizentes com produtos de degradação do pesticida esfenvalerato, uma vez que foi observado picos com m/z maior que 1200 e com 3 cargas. Sendo assim, sugere-se que o composto A trata-se de uma macromolécula desconhecida que foi induzida pela presença do pesticida, possivelmente uma proteína.

O composto B apresentou o íon m/z $213,07 \pm 0,05$, massa e padrão isotópico referente à fórmula molecular $C_{11}H_{14}ClO_2$, referente ao ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico protonado. A identidade do composto foi confirmada utilizando-se padrão analítico, onde se observou tempo de retenção cromatográfico e espectro de massas similares (Figura 45).

Figura 45 - Espectro de massas do (A) ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico (composto B) e (B) padrão analítico do ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico.

Figura 46 - Espectro de massas do (A) composto C e (B) padrão analítico do ácido 3-fenoxibenzoico.

O pico C apresentou o íon m/z $215,07 \pm 0,05$ de massa e padrão isotópico referente à fórmula molecular $C_{13}H_{11}O_3$, referente ao ácido 3-fenoxibenzoico protonado. A identidade do composto foi confirmada utilizando-se padrão analítico, onde também se observou tempo de retenção cromatográfico e espectro de massas similares (Figura 46).

O pico D apresentou o íon m/z $183,07 \pm 0,05$, massa e padrão isotópico referente à fórmula molecular $C_{13}H_{13}O_2$, referente ao álcool 3-fenoxibenzílico. A identidade do composto foi confirmada utilizando-se padrão analítico, onde se observou tempo de retenção cromatográfico e espectro de massas similares.

No caso do pico E foi obtida uma maior intensidade da amostra de biodegradação em relação ao controle fúngico. Foi observado a presença do íon m/z $231,06 \pm 0,05$ (Figura 47), massa e padrão isotópico (Figura 48) referente à fórmula molecular $C_{14}H_{15}O_4$, que corresponde ao ácido 3-(hidroxifenoxi)benzoico (hidroxiFBAC) protonado. O ácido hidroxiFBAC já foi relatado na biodegradação por bactérias (Wang *et al.*, 2011), mas é a primeira vez que este é relatado na biotransformação por fungos.

Figura 47 – Espectro de massas obtido para o ácido 3-(hidroxifenoxi)benzoico.

Figura 48 – Padrão isotópico do íon m/z 231,06±0,05.

O mesmo método de CLAE-EM foi empregado para a demais linhagens fúngicas e para o controle abiótico, visando a identificação de metabólitos (Tabela 19). Foi observado que quase todas as linhagens fúngica foram capazes de converter completamente o FBAlD formado, de modo que este foi detectado somente para o controle abiótico e para a linhagem *Cladosporium* sp. Dr(M2)2 que apresentou crescimento lento no meio de cultura empregado.

Também foi observado a presença dos metabólitos FBAC e ACI em todas as amostras, mesmo no controle abiótico. A biodegradação promoveu um aumento da concentração de FBAC, porém este não se acumulou, pois foi biotransformado no hidroxifBAC em todas as linhagens utilizadas.

Tabela 19 – Metabólitos detectados por CLAE-EM nas amostras de biodegradação de EsfCom (100 mg.L⁻¹) durante 14 dias utilizando-se de diferentes fungos e na degradação abiótica.

Amostras	ACI	FBAld	FBAc	FBAlc	HidroxiFBAc
Controle Abiótico	Detectado	Detectado	Detectado	Nd	Nd
<i>Microsphaeropsis</i> sp. Dr(A)6	Detectado	Nd	Detectado	Detectado	Detectado
<i>Westerdykella</i> sp. Dr(M2)4	Detectado	Nd	Detectado	Nd	Detectado
<i>Acremonium</i> sp. Dr(F)1	Detectado	Nd	Detectado	Nd	Detectado
<i>Penicillium</i> <i>raistrickii</i> CBMAI 931	Detectado	Nd	Detectado	Nd	Detectado
<i>Cladosporium</i> sp. Dr(M2)2	Detectado	Detectado	Detectado	Nd	Detectado
<i>Cladosporium</i> sp. CBMAI 1237	Detectado	Nd	Detectado	Nd	Detectado
<i>Aspergillus sydowii</i> CBMAI 935	Detectado	Nd	Detectado	Nd	Detectado

Nd=Não detectado.

4.5. Proposta de rota de biodegradação do esfenvalerato

Inicialmente, o esfenvalerato pode sofrer uma reação de hidrólise por carboxilesterases dando origem ao ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico que foi detectado e ao composto 2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila, o qual não foi detectado nas reações com os fungos marinhos.

O padrão da 2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila sintetizado foi analisado por CLAE-TOF apresentando tempo de retenção de 9,3 min. Entretanto não foi confirmada a presença deste composto nas reações de biodegradação, denotando que esta substância é rapidamente biotransformada pela linhagem fúngica ou é instável no meio de cultivo (Esquema 4). Carboxilesterases são enzimas que realizam a hidrólise de ligações de ésteres, dando origem ao ácido e ao álcool, correspondentes.

Esquema 4 – Hidrólise do esfenvalerato por carboxilesterase de fungos de ambiente marinho.

O 2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila pode ser convertido bioticamente ao FBAc pela ação de uma enzima oxinitrilase, a qual converte cianoidrinas a aldeídos e ácido cianídrico (Esquema 5).

Esquema 5 – Biotransformação do 2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila ao 3 fenoxibenzaldeído que pode ocorrer pela ação de uma enzima oxinitrilase de fungos marinhos.

O 3-fenoxibenzaldeído pode ser convertido ao ácido 3-fenoxibenzoico pela ação de uma aldeído-desidrogenase, que oxida aldeídos aos ácidos carboxílicos correspondentes (Esquema 6). Neste trabalho também foi observado a conversão abiótica do FBAlc em FBAc, porém menos eficiente que a biotransformação obtida com fungos marinhos.

Esquema 6 – Oxidação do 3-fenoxibenzaldeído ao ácido 3-fenoxibenzoico pela ação de uma aldeído-desidrogenase de fungos marinhos.

No caso da linhagem *Microsphaeropsis* Dr(A)6 diferentemente das outras cepas avaliadas foi observado o 3-FBAc e também o FBAlc, que pode ter sido originado pela ação de uma aldeído redutase, que é uma oxidorreductase

dependente de cofator NADH ou NADPH que catalisa a redução de aldeídos aos álcoois correspondentes (Esquema 7).

Esquema 7 – Redução do 3-fenoxibenzaldeído ao álcool 3-fenoxibenzílico por aldeído redutase de fungos marinhos.

O FBAC pode ser hidroxilado por uma mono-oxigenase dando origem ao ácido 3-(hidroxifenoxi)benzoico que foi observado nos experimentos de biodegradação com todas as linhagens fúngicas (Esquema 8).

Esquema 8 – Hidroxilação do ácido 3-fenoxibenzoico ao ácido 3-(hidroxifenoxi)benzoico que pode ocorrer pela ação de uma mono-oxigenase de fungos marinhos.

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. Esta fase usualmente introduz grupos polares nos compostos, como nos metabólitos observados para o esfenvalerato, permitindo posteriormente a *fase II*, que são reações de conjugações. Embora nenhum metabólito de conjugação foi observado, sugere-se que em alguns casos devem ter ocorrido.

O estudo de biodegradação realizado neste trabalho possibilitou a identificação de metabólitos da biodegradação/biotransformação do esfenvalerato, onde foi proposta uma rota biodegradativa deste pesticida (Figura 49). Durante a biodegradação, a formação de compostos mais polares foi obtido, aumentando assim a possibilidade de excreção destes compostos do sistemas metabólico dos fungos.

Figura 49 – Proposta de rota biodegradativa do esfenvalerato a partir dos metabólitos detectados neste estudo por fungos de ambiente marinho.

5. CONCLUSÃO

Neste estudo foi avaliada a eficiência de fungos de ambiente marinho na degradação do pesticida piretróide esfenvalerato. Observou-se que o esfenvalerato e seus principais metabólitos de degradação causam efeitos inibitórios significativos no crescimento fúngico, mas não o suficiente para inviabilizar a biodegradação fúngica.

Os resultados obtidos sugerem que a capacidade de degradação do pesticida piretróide esfenvalerato por fungos é comum, entretanto a eficiência da degradação deste composto varia muito entre linhagens. Os metabólitos identificados tornaram possível a elaboração de uma proposta de rota biodegradativa, onde se observou metabólitos cada vez mais polares, aumentando a possibilidade de carreamento pela água.

Constatou-se na biodegradação que no geral ocorre um acúmulo dos metabólitos FBAC e ACL, composto considerados tóxicos e podem causar efeitos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente. Deste modo, para emprego em biorremediação é mais interessante o uso de linhagens que biotransformem estes metabólitos rapidamente, como a *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6.

O esfenvalerato foi biodegradado mais eficientemente quando foi adicionado puro ao meio de cultura do que quando estava presente na formulação comercial, possivelmente devido à adsorção às partículas da formulação emulsionável, dificultando assim a ação enzimática. Para uma biodegradação do esfenvalerato até a mineralização seria necessário à realização de reações em períodos de tempo mais longos, uma vez que os metabólitos gerados são muito resistentes à biodegradação devido à estabilidade dos anéis aromáticos.

REFERÊNCIAS

- AHN, K.C.; GEE, S.; KIM, H.; ARONOV, P.A.; VEJA, H.; KRIEGER, R.I.; HAMMOCK, B.D. Immunochemical analysis of 3-phenoxybenzoic acid, a biomarker of forestry worker exposure to pyrethroid insecticides. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 401, p. 1285-1293, 2011.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Programa de análises de resíduos de agrotóxicos em alimentos: Relatório de atividades 2010**. Brasília, 2011 (Relatório técnico). Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Agrotoxicos+e+Toxicologia/Assuntos+de+Interesse/Programa+de+Analise+de+Residuos+de+Agrotoxicos+em+Alimentos>>. Acesso em: 06 mar 2012.
- ARREBOLA, F.J.; MARTÍNEZ-VIDAL, J.L.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ A.; AKHTAR, M.H. Monitoring of pyrethroid metabolites in human urine using solid-phase extraction followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 401, p. 45-54, 1999.
- BARR, D.B.; OLSSON, A.O.; WONG, L.; UDUNKA, S.; BAKER, S.E.; WHITEHEAD, J.R.; MAGSUMBOL, M.S.; WILLIAMS, B.L.; NEEDHAM, L.L. Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in the general u.s. population: National health and nutrition examination survey 1999-2002. **Environmental Health Perspectives**, v. 118, p. 742-748, 2010.
- BARROT, R. Critical comment on the symptomatology of pyrethroid poisoning. **Arbeitsmedizin Sozialmedizin Umweltmedizin**, v. 31, p. 196-203, 1996.
- BARMAN, T.E. **Enzyme handbook**. New York: Springer, 1969. v. 2, p. 501 -513.
- BRADBERRY, S.M.; CAGE, S.A.; PROUDFOOT, A.T.; ALLISTER, V.J. Poisoning due to pyrethroids. **Toxicological Reviews**, v. 24, p. 93-106, 2005
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Lei nº 7802 de 11 de julho de 1989. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 jul 1989. Seção 1, p. 11459. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L7802.htm>. Acesso em: 25 maio 2010.
- CHEN, S.; LAI, K.; LI, Y.; HU M.; ZHANG, Y.; ZENG, Y. Biodegradation of deltamethrin and its hydrolysis product 3-phenoxybenzaldehyde by a newly isolated *Streptomyces aureus* strain HP-S-01. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1471-1483, 2011a.
- CHEN, S.; YANG, L.; HU, M.; LIU, J. Biodegradation of fenvalerate and 3-phenoxybenzoic acid by a novel *Stenotrophomonas* sp. strain ZS-S-01 and its use in bioremediation of contaminated soils. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 755-767, 2011b.

- CHEN, S.; LUO, J.; HU, M.; LAI, K.; GENG, P.; XIAO, Y. Isolation, identification, degradation characteristics and pathway of a pyrethroid-degrading bacterial strain. **Huanjing Kexue Xuebao/ Acta Scientiae Circumstantiae**, v. 31, p. 1616-1626, 2011c.
- CHEN, S.; HU, Q.; HU, M.; LUO, J.; WENG, Q.; LAI, K. Isolation and characterization of a fungus able to degrade pyrethroids and 3-phenoxybenzaldehyde. **Bioresource Technology**, v.102, p. 8110-8116, 2011d.
- CHEN, S.; HU, W.; XIAO, Y.; DENG, Y.; JIA, J.; HU, M. Degradation of 3-Phenoxybenzoic Acid by a *Bacillus* sp. **Plos One**, v. 7, e50456, 2012.
- DASH, H.R.; MANGWANI, N.; CHAKRABORTY, J.; KUMARI, S.; DAS, S. Marine bacteria: Potential candidates for enhanced bioremediation. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 561-571, 2013.
- DE VITA-MARQUES, A.M.; LIRA, S.P.; BERLINCK, R.G.S.; SELEGHIM, M.H.R.; SPONCHIADO, S.R.P.; TAUKE-TORNISIELO, S.M.; BARATA, M.; PESSOA, C.; DE MORAES, M.O.; CAVALCANTI, B.C.; NASCIMENTO, G.G.F.; DE SOUZA, A.O.; GALETTI, F.C.S.; SILVA, C.L.; SILVA, M.; PIMENTA, E.F.; THIEMANN, O.; PASSARINI, M.R.Z.; SETTE, L.D. A multi-screening approach for marine-derived fungal metabolites and the isolation of cyclodepsipeptides from *Beauveria felina*. **Quimica Nova**, v. 31, p. 1099-1103, 2008.
- DERELANKO, M.J.; HOLLINGER, M.A. **Handbook of toxicology**. New Jersey: Taylor & Francis, 2002. v. 1, p. 1440.
- EGEGHY, P.P.; COHEN HUBAL, E.A.; TULVE, N.S.; MELNYK, L.J.; MORGAN, M.K.; FORTMANN, R.C.; SHELDON, L.S. Review of pesticide urinary biomarker measurements from selected US EPA children's observational exposure studies. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 8, p. 1727-1754, 2011.
- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **About pesticides**. Washington, 2012. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>>. Acesso em: 20 nov. 2013.
- EUROPEAN COMMISSION. Directorate-general health & consumer protection. **Review report for the active substance esfenvalerate**. Brussels, 2005. 1v. (Relatório técnico)
- FEYEREISEN, R. Insect cytochrome P450. In: GILBERT, L.I.; LATROU, K.; GILL S.S. **Comprehensive molecular insect science**. Amsterdam: Elsevier, 2005. v. 4, p. 1-77.
- GANAPATI, D. Y.; YOGEEETA, B. J. Cascade engineered phase transfer catalysis: a novel concept in green chemistry. **Clean Technologies and Environmental Policy**, v. 6, p 32-42, 2003.

GEBLER, L. **Banco de informações ambientais e toxicológicas dos agrotóxicos utilizados até a safra 2002/2003 na produção integrada de maçãs no Brasil.**

Bento Gonçalves: 2004. v. 48, p. 3. (Relatório técnico). Disponível em: <<http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/circular/cir048.pdf>>. Acesso em: 15 maio 2013.

GUO, P.; WANG, B.Z.; HANG, B.J.; LI, L.; ALI, S.W.; HE, J.; LI, S.P. Pyrethroid-degrading *Sphingobium* sp. JZ-2 and the purification and characterization of a novel pyrethroid hydrolase. **Internation Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 1107-1112, 2009.

HAVENS, P.L.; SIMS, G.K.; ERHARDT-ZABIK, S. Fate of herbicides in the environment. In: SMITH, A. **Handbook of weed management systems**. New York: John Wiley, 1995. p. 245-278.

HEINIS, L.J.; KNUTH, M.L. The mixing, distribution and persistence of esfenvalerate within littoral enclosures. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 11, p. 11-25, 1992.

HOUSSET, P.; DICKMAN, R. A promise fulfilled – pyrethroid development and the benefits for agriculture and human health. **Bayer CropScience Journal**, v. 62, p.135-144, 2009.

JIN, M.; LI, L.; XU, C.; WEN, Y.; ZHAO, M. Estrogenic activities of two synthetic pyrethroids and their metabolites. **Journal of Environmental Sciences**, v.22, p. 290-296, 2010.

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.

KOSSUGA, M.H.; ROMMINGER, S.; XAVIER, C.; MILANETTO, M.C.; DO VALLE, M.Z.; PIMENTA, E.F.; MORAIS, R.P.; DE 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.; GONÇALVES, 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.

LEE, P.W.; STEARNS, S.M.; POWELL, W.R. Metabolic fate of fenvalerate in wheat plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 36, p. 189-193, 1988.

LI, X.C.; SCHULER, M.A.; BERENBAUM, M.R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annual Review of Entomology**, v. 52, p. 231-253, 2007.

LIANG, W.Q.; WANG, Z.Y.; LI, H.; WU, P.C.; HU, J.R.M.; LUO, N.; CAO, L.X.; LIU, Y.H. Purification and Characterization of a Novel Pyrethroid Hydrolase from *Aspergillus niger* ZD11. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 7415-7420, 2005.

LIN, Q.S.; CHEN, S.H.; HU, M.Y.; UL HAQ, M.R.; YANG, L.; LI, H. Biodegradation of cypermethrin by a newly isolated actinomycetes HU-s-01 from wastewater sludge. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 8, p. 45-56, 2011.

LIU, W.; GAN, J.; LEE, S.; WERNER, I. Isomer selectivity in aquatic toxicity and biodegradation of bifenthrin and permethrin. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, p.1861-1866, 2005

LIU, S.L.; YAO, K.; JIA, D.Y.; LAI, W.; ZHAO, N.; YUAN, H.Y. Study on pre-treatment method for HPLC analysis of cypermethrin in *Aspergillus Oryzae* degradation system. **Sichuan Daxue Xuebao/Journal of Sichuan University**, v. 43, p. 179-183, 2011.

MALONEY, S.E.; MAULE, A.; SMITH, A.R.W. Microbial transformation of the pyrethroid insecticides: permethrin, deltamethrin, fastac, fenvalerate, and fluvalinate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 2874-2876, 1988.

MALONEY, S.E.; MAULE, A.; SMITH, A.R.W. Purification and preliminary characterization of permethrinase from a pyrethroid-transforming strain of *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2007-2013, 1993.

MIKATA, K.; ISOBE, N.; KANEKO, H. Biotransformation and enzymatic reactions of synthetic pyrethroids in mammals. **Topics in Current Chemistry**, v. 314, p. 113-136, 2012.

MUKHERJEE, I.; MITTAL, A. Dissipation of β -cyfluthrin by two fungi *Aspergillus nidulans* var. *dentatus* and *Sepedonium maheswarium*. **Toxicological and Environmental Chemistry**, v. 89, p. 319-326, 2007.

MÜLLER, P.; WARR, E.; STEVENSON, B.J.; PIGNATELLI, P.M.; MORGAN, J.C.; STEVEN, A.; YAWSON, A.E.; MITCHELL, S.N.; RANSON, H.; HEMINGWAY, J.; PAINE, M.J.I.; DONNELLY, M.J. Field-caught permethrin-resistant *Anopheles gambiae* overexpress CYP6P3, a P450 that metabolises pyrethroids. **Plos Genetics**, v. 4, p. 1-10, e1000286, 2008.

NATIONAL INSTITUTE OF ENVIRONMENTAL HEALTH SCIENCES (NIEHS). **Endocrine disruptors**. Maryland, 2010. Disponível em: <http://www.niehs.nih.gov/health/materials/endocrine_disruptors_508.pdf> Acesso em: 09 out. 2013.

OHKAWA, H.; NAMBU, K.; INUI, H.; MIYAMOTO, J. Metabolic fate of fenvalerate (Sumicidin) in soil and by soil microorganisms. **Nippon Noyaku Gakkaishi**, v. 3, p. 129-41, 1978.

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.

PAINGANKAR, M.; JAIN, M.; DEOBAGKAR, D. Biodegradation of allethrin, a pyrethroid insecticide, by an *Acidomonas* sp. **Biotechnology Letters** v. 27, p. 1909-1913, 2005.

PASSARINI, M.R.Z.; RODRIGUES, M.V.N.; DA 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.

PRASANTHI, K.; MURALIDHARA, RAJINI, P.S. Morphological and biochemical perturbations in rat erythrocytes following in vitro exposure to Fenvalerate and its metabolite. **Toxicology in Vitro**, v. 19, p. 449-456, 2005.

RADOSEVICH, S. R.; HOLT, J.; GHERSA, C. **Weed ecology**. New York: John Wiley, 1997. p. 472-495.

REBELO, R.M.; VASCONCELOS, R.A.; CORMICK BUYS, B.D.M.; REZENDE, J.A.; DE MORAES, K.O.C.; OLIVEIRA R.P. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: uma abordagem ambiental**. 2010.

Disponível em:

<http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/produtos_agrotoxicos_comercializados_brasil_2009.pdf>. Acesso em: 08 mar. 2012.

ROSS, M.K.; BORAZJANI, A.; EDWARDS, C.C.; POTTER, P.M. Hydrolytic metabolism of pyrethroids by human and other mammalian carboxylesterases. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 657-669, 2006.

RUSSEL, R.J.; SCOTT, C.; JACKSON, C.J.; PANDEY, R.; PANDEY, G.; TAYLOR, M.C. The evolution of new enzyme function: lessons from xenobiotic metabolizing bacteria versus insecticide-resistant insects. **Evolutionary Applications**, v. 4, p. 225-248, 2011.

SAIKIA, N.; GOPAL, M. Biodegradation of β -Cyfluthrin by Fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 1220-1223, 2004.

SAIKIA, N.; DAS, S.K.; PATEL, B.K.C.; NIWAS, R.; SINGH, A.; GOPAL, M. Biodegradation of beta-cyfluthrin by *Pseudomonas stutzeri* strain S1. **Biodegradation**, v.16, p. 581-589, 2005.

SANTOS, M.A.T.; AREAS, M.A.; REYES, F.G.R. Piretróides - uma visão geral. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 18, p. 339-349, 2007.

- SATOH, T.; HOSOKAWA, M. Structure, function and regulation of carboxylesterases. **Chemical Biology Interact**, v. 162, p. 195–211, 2006.
- SCHNEIDERS, G.E. **Acceptability of fenvalerate confined crop rotation and field studies to support esfenvalerate uses**. Wilmington: E.I. duPont de Nemours and Company, 1994. 1v. (Relatório técnico).
- SCHONNOOR, J. L. Chemical fate and transport in the environment. In: SCHONNOOR, J. L. **Fate of pesticides & chemicals in the environment**. New York: John Wiley, 1992. cap. 1, p. 1-25.
- SCHROLL, R.; BRAHUSHI, R.; DORFLER, U.; KUHN, S.; FEKETE, J.; MUNCH, J.C. Biomineralization of 1,2,4-trichlorobenzene in soils by an adapted microbial population. **Environmental Pollution**, v. 127, p. 395-401, 2004.
- SILVA, N.A.; BIROLI, W.G.; SELEGHIM, M.H.R.; PORTO, A.L.M. Biodegradation of the organophosphate pesticide profenofos by marine fungi. In: PATIL, Y. (Ed.). **Applied bioremediation: active and passive approaches**. Morn Hill: InTech, 2013. v. 1, p. 149-180. Disponível em: <www.intechopen.com/books/applied-bioremediation-active-and-passive-approaches/biodegradation-of-the-organophosphate-pesticide-profenofos-by-marine-fungi>. Acesso em: 20 nov. 2013.
- SODERLUND, D.M.; CLARK, J.M.; SHEETS, L.P.; MULLIN, L.S.; PICCIRILLO, V.J.; SARGENT, D.; STEVENS, J.T.; WEINER, M.L. Mechanisms of pyrethroid Neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 171, p. 3-59, 2002.
- SUN, H.; XU, X.L.; XU, L.C.; SONG, L.; HONG, X.; CHEN, J.F.; CUI, L.B.; WANG, X. Antiandrogenic activity of pyrethroid pesticides and their metabolite in reporter gene assay. **Chemosphere**, v. 66, p. 474-479, 2007.
- TALLUR, P.N.; MEGADI, V.B.; NINNEKAR, H.Z. Biodegradation of cypermethrin by *Micrococcus* sp. strain CPN 1. **Biodegradation**, v. 19, p. 77–82, 2008.
- TAYLOR, J.S.; THOMSON, B.M.; LANG, C.N.; SIN F.Y.T.; PODIVINSKY, E. Estrogenic pyrethroid pesticides regulate expression of estrogen receptor transcripts in mouse sertoli cells differently from 17-estradiol. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 73, p. 1075-1089, 2010.
- TYLER, C.R.; BERESFORD, N.; VAN DER WONING, M.; SUMPTER, J.P.; THORPE, K. Metabolism and environmental degradation of pyrethroid insecticides produce compounds with endocrine activities. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, p. 801-809, 2000.

UEYAMA, J.; KIMATA, A.; KAMIJIMA, M.; HAMAJIMA, N.; ITO, Y.; SUZUKI, K.; INOUE, T.; YAMAMOTO, K.; TAKAGI, K.; SAITO, I.; MIYAMOTO, K.; HASEGAWA, T.; KONDO, T. Urinary excretion of 3-phenoxybenzoic acid in middle-aged and elderly general population of Japan. **Environmental research**, 109, p. 175-180, 2009

VADHANA, D.; CARLONI, M.; FEDELI, D.; NASUTI, C.; GABBIANELLI R. Perturbation of rat heart plasma membrane fluidity due to metabolites of permethrin insecticide. **Cardiovascular Toxicology**, v.11, p. 226-234, 2011.

VERMA, A.K.; RAGHUKUMAR, C.; VERMA, P.; SHOUCHE, Y.S.; NAIK, C.G. Four marine-derived fungi for bioremediation of raw textile mill effluents. **Biodegradation**, v. 21, p. 217-233, 2010.

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.

VERMA, A.K.; RAGHUKUMAR, C.; PARVATKAR, R.R.; NAIK, C.G. A rapid two-step bioremediation of the anthraquinone dye, Reactive Blue 4 by a marine-derived fungus. **Water, air, and soil pollution**, v.223, p. 3499-3509, 2012.

WANG, B.; MA, Y.; ZHOU, W.; ZHENG J.; ZHU, J.; HE, J.; LI, S. Biodegradation of synthetic pyrethroids by *Ochrobactrum tritici* strain pyd-1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2315-2324, 2011.

WHEELLOCK, G.D.; SCOTT, J.G. The role of cytochrome- P450IPR in deltamethrin metabolism by pyrethroid-resistant and susceptible strains of house-flies. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 43, p. 67-77, 1992.

WHEELLOCK, G.D.; SHAN, G.; OTTEA, J. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. **Journal of Pesticide Science**, v. 30, p. 75-83, 2005.

WIRTZ, K.; BALA, S.; AMANN, A.; ELBERT, A. A promise extended – future role of pyrethroids in agriculture. **Bayer CropScience Journal**, v. 62 p.145-158, 2009.

WOLFE, N. L. Abiotic transformations of pesticide in natural waters and sediments. In: SCHNOOR, J. L. **Fate of pesticides & chemicals in the environment**. New York: John Wiley, 1992. p. 93-104.

YANG, D.; WANG, X.; CHEN, Y.; DENG, R.; YAN, B. Pyrethroid insecticides: isoform-dependent hydrolysis, induction of cytochrome P450 3A4 and evidence on the involvement of the pregnane X receptor. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 237, p. 49-58, 2009.

YU, F.B.; SHAN, S.D.; LUO, L.P.; GUAN, L.B.; QIN, H. Isolation and characterization of a *Sphingomonas* sp. strain F-7 degrading fenvalerate and its use in bioremediation of contaminated soil. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 48, p. 198-207, 2013.

ZHAI, Y.; LI, K.; SONG, J.; SHI, Y.; YAN, Y. Molecular cloning, purification and biochemical characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing carboxylesterase gene from *Ochrobactrum anthropi* YZ-1. **Journal of Hazardous Materials**, v. 221- 222, p. 206-212, 2012.

ZHANG, Y.; ZHAO, M.; JIN, M.; XU, C.; WANG, C.; LIU, W. Immunotoxicity of pyrethroid metabolites in an in vitro model. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, p. 2505-2510, 2010.