**Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos**

**Biodegradação dos pesticidas clorpirifós, metil
paration e profenofós por fungos de origem marinha**

Natália Alvarenga da Silva

São Carlos
2013

Natália Alvarenga da Silva

**Biodegradação dos pesticidas clorpirifós, metil
paration e profenofós por fungos de origem marinha**

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, Célia e Luiz, e a minha irmã,
Aline, que me deram apoio e carinho para que
eu seguisse forte durante este período.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo o carinho e atenção e por terem me apoiado em todas as minhas decisões, e a minha irmã Aline, por sempre ouvir os meus desabafos e me consolar sempre que precisei.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Luiz, pela confiança no meu trabalho e todo o apoio dedicado durante este período.

Ao pessoal do Laboratório, Sandra, Lenilson, Mariana, Yara, Irlon, Alex, Willian, que sempre foram muito companheiros e me ajudaram sempre que precisei, em especial, Ana Maria e Julieta, que dedicaram muitas das suas tardes (e noites) me ajudando com este trabalho.

Ao meu namorado, Mateus, que sempre esteve do meu lado por todo este tempo me incentivando e fazendo com que eu não desanimasse.

As minha amigas de faculdade, Ariane, Bruna, Mel, Ana Sílvia, Sílvia e Thálita que sempre me inspiraram em como ser batalhadora, ter força de vontade para alcançar os meus objetivos e que nunca deixaram de acreditar em mim.

A Carol e Gabi, pelos dois anos de amizades, companheirismo e por assistirem minhas apresentações.

Aos meus amigos Leandro, Geraldo, Igor e Peter, por me fornecerem um café quentinho e me socorrerem sempre que eu precisei.

Aos meus amigos de Votu, Dani, Letícia, Nati, Diego e Nádia, por fazerem parte da minha vida e por, mesmo estando a distância, me fazer sentir que sempre que eu precisar vocês estarão lá por mim.

Ao Isac, que sempre teve boa vontade e paciência, nunca se recusando a dar aquela ajudinha quando eu estava desesperada.

Aos técnicos do Laboratório, Marília e João, por me darem apoio, me ensinarem muitas coisas e terem paciência com a minha bagunça.

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

A Fapesp pelo apoio financeiro recebido através da bolsa de mestrado (Processo 2011/03577-1) e de projetos de auxílio a pesquisa.

A 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.

RESUMO

Neste trabalho, foi realizada uma triagem com os fungos marinhos *Aspergillus sydowii* CBMAI 934, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Aspergillus sydowii* 1241, *Penicillium decaturense* CBMAI 1234, *Penicillium raistrickii* CBMAI 931, *Penicillium raistrickii* CBMAI 1235 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932 com o objetivo de avaliar o potencial enzimático destes micro-organismos frente à biodegradação dos pesticidas organofosforados clorpirifós, metil paration e profenofós. Os fungos selecionados para as reações em meio líquido de malte 2%, que melhor adaptaram-se na presença do pesticida clorpirifós, foram as cepas de *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932, na presença de metil paration foram *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234 e na presença de profenofós foram os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. raistrickii* CBMAI 931. Foram realizadas curvas analíticas com o objetivo de estimar a extensão da biodegradação dos pesticidas clorpirifós, metil paration, profenofós, e seus respectivos produtos de hidrólise, os derivados fenólicos 3,5,6-tricloro-2-piridinol, 4-nitrofenol e 4-bromo-2-clorofenol, respectivamente. As reações de biodegradação em meio líquido de malte 2% foram avaliadas com 10, 20 e 30 dias de reação com concentração inicial dos pesticidas organofosforados de 50 ppm. O pesticida, profenofós, apresentou uma biodegradação completa com o fungo *P.raistrickii* CBMAI 931 com 30 dias de reação, e 70% com o fungo *A. sydowii* CBMAI 935, para o mesmo período. Os fungos também apresentaram potencial para a degradação (ou conjugação) do metabólito, 4-bromo-2-clorofenol. Na presença dos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932, clorpirifós apresentou a menor degradação entre os pesticidas avaliados, com uma taxa de degradação de 63 e 72%, respectivamente, em 30 dias de reação. Os fungos selecionados não foram capazes de promover uma degradação apreciável do 3,5,6-tricloro-2-piridinol. Na presença dos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234, o metil paration apresentou uma degradação de 100% em 20 dias de reação. O 4-nitrofenol apresentou degradação (ou conjugação) de aproximadamente 50 e 40% na presença dos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234, respectivamente. Finalmente, os estudos apresentados comprovam a eficiência dos fungos de ambiente marinhos na biodegradação de pesticidas organofosforados.

ABSTRACT

In this work was performed a screening with the marine fungi *Aspergillus sydowii* CBMAI 934, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Aspergillus sydowii* 1241, *Penicillium decaturense* CBMAI 1234, *Penicillium raistrickii* CBMAI 931, *Penicillium raistrickii* CBMAI 1235 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932 to evaluate the enzymatic potential of these microorganisms in the presence of organophosphate pesticides chlorpyrifos, methyl parathion and profenofos. The selected fungi for the reactions in liquid medium of malt 2%, which demonstrated better adaptation in presence of the pesticide chlorpyrifos, were the strains of *A.sydowii* CBMAI 935 and *Trichoderma* sp. CBMAI 932, in the presence of methyl parathion were *A.sydowii* CBMAI 935 and *P. decaturense* CBMAI 1234 and, in presence of profenofos were the fungi *A. sydowii* CBMAI 935 and *P. raistrickii* CBMAI 931. Analytical curves were performed in order to estimate the extent of biodegradation of the pesticide chlorpyrifos, methyl parathion, profenofos, and their hydrolysis products, 3,5,6-trichloro-2-pyridinol, 4-nitrophenol, 4-bromo-2-chlorophenol, respectively. Biodegradation reactions in liquid medium of malt 2% were evaluated with 10, 20 and 30 days with an initial concentration of 50 ppm of organophosphate pesticides. Profenofos, presented a complete biodegradation (100%) with the fungus *P.raistrickii* CBMAI 931, in 30 days of reaction, and 70% of biodegradation in the presence of the fungus *A. sydowii* CBMAI 935, at the same period. The fungi also showed a potential for degradation (or conjugation) of 4-bromo-2-chlorophenol. In the presence of the fungus *A. sydowii* CBMAI 935 and *Trichoderma* sp. CBMAI 932, chlorpyrifos exhibited the lowest degradation among the evaluated pesticides, presenting a degradation rate of 63 and 72%, respectively, at 30 days of reaction. The selected fungi were not capable of promoting an appreciable degradation of 3,5,6-trichloro-2-pyridinol. In the presence of *A. sydowii* CBMAI 935 and *P. decaturense* CBMAI 1234, methyl parathion showed a degradation of 100%, at 20 days of reaction. The 4-nitrophenol showed a degradation (or conjugation) of approximately 50 and 40% in the presence of the fungus *A. sydowii* CBMAI 935 and *P. decaturense* CBMAI 1234, respectively. Finally, the presented studies demonstrated the efficiency of the marine fungi in biodegradation of organophosphate pesticides.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mercado global das classes de pesticidas – tendências para os anos de 2007 a 2018.	24
Figura 2. Comercialização mundial e brasileira de pesticidas.	25
Figura 3. a) Divulgação da campanha “Agrotóxico Mata - Campanha permanente contra os agrotóxicos e pela vida” e b) Charge sobre a ingestão de agrotóxicos, divulgada na internet.	26
Figura 4. Processos físicos, químicos e biológicos que controlam a persistência ou degradação de pesticidas no ambiente.	27
Figura 5. Estrutura química dos agentes neurotóxicos.	28
Figura 6. Estrutura dos derivativos do ácido fosfórico.	29
Figura 7. Mecanismo de hidrólise da acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase.	32
Figura 8. Mecanismo geral de inibição da acetilcolinesterase por pesticidas organofosforados.	32
Figura 9. Metabolismo do pesticida clorpirifós mediado por CYP.	34
Figura 10. Metabolismo do pesticida metil paration em humanos.	35
Figura 11. Vias metabólicas propostas para o profenofós no solo, plantas e em reações enzimáticas.	36
Figura 12. Hidrólise de pesticidas organofosforados por fosfotriesterases.	37
Figura 13. Catálise metal-dependente de enzimas fosfotriesterases.	38
Figura 14. a) Organofosforados contendo o substituinte 4-nitrofenol. b) Biodegradação do PNF pela <i>Arthrobacter</i> sp.	39
Figura 15. Esquema de ancoramento das enzimas organofosforado hidrolases na superfície da células.	41
Figura 16. a) Estrutura cristalina da enzima OPH. b) Sítio ativo metal-dependente da enzima OPH (esferas cinzas representam os átomos de zinco).	42
Figura 17. Mecanismo de catálise da enzima organofosforado hidrolase.	42
Figura 18. Biodegradação do paraoxon por bactérias geneticamente modificadas.	44
Figura 19. Degradação do metil paration and fenitrothion por <i>P. putida</i> JS444.	45
Figura 20. Possível degradação dos pesticidas pirimifós-metil, pirazofós e malation por <i>A. flavus</i> ou <i>A. sydowii</i> .	46
Figura 21. Degradação de diclorvos por <i>T. atroviride</i> T23.	46
Figura 22. Biodegradação de OP por fração microssomal de <i>Pleurotus ostreatus</i> 7989.	47

Figura 23. Possível biodegradação de pesticidas organofosforados por esterases de <i>L. cuprina</i>	48
Figura 24. Reação de hidrólise das ligações P-F por DFPase.	49
Figura 25. Mecanismo proposto para a reação catalisada por PON1 e DFPase.....	50
Figura 26. Estruturas dos pesticidas clorpirifós, metil paration e profenofós.	53
Figura 27. Tubos inclinados contendo o fungo após 7 dias de crescimento.	57
Figura 28. Sistema para a filtração dos esporos na suspensão.	58
Figura 29. Esquema de ampliação dos blocos de uma câmara de Neubauer.	59
Figura 30. Cultivo do fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 na ausência de clorpirifós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 µL de clorpirifós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.	78
Figura 31. Cultivo do fungo <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931 na ausência de clorpirifós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 µL de clorpirifós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.	78
Figura 32. Cultivo do fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 na ausência de clorpirifós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 µL de clorpirifós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.	79
Figura 33. Cultivo do fungo <i>P. raistrickii</i> CBMAI 1235 na ausência de clorpirifós (placa controle) e com 5,0 10,0 e 15,0 µL de clorpirifós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.	79
Figura 34. Cultivo do fungo <i>P. decaturense</i> CBMAI 1234 na ausência de clorpirifós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 µL de clorpirifós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.	80
Figura 35. Cultivo do fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 1241 na ausência de clorpirifós (placa controle) e com 5,0, 10, e 15,0 µL de clorpirifós/placa em (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.	80
Figura 36. Cultivo do fungo <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932 na ausência de clorpirifós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 µL de clorpirifós/placa em (a) 5 dias de cultivo e b) 10 dias de cultivo.	81
Figura 37. Cultivo do fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 na ausência de metil paration (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 µL de metil paration/placa. (a) 5 dias de cultivo e b)10 dias de cultivo.	83

Figura 38. Cultivo do fungo <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931 na ausência de metil paration (placa controle) e com 5,0 10,0 e 15,0 µL de metil paration/placa. (a) 5 dias de cultivo e b) 10 dias de cultivo.	84
Figura 39. Cultivo do fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 na ausência de metil paration (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 µL de metil paration/placa. (a) 5 dias de cultivo e b) 10 dias de cultivo.	84
Figura 40. Cultivo do fungo <i>P. raistrickii</i> CBMAI 1235 na ausência de metil paration (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 µL de metil paration/placa. (a) 5 dias de cultivo e b) 10 dias de cultivo.	85
Figura 41. Cultivo do fungo <i>P. decaturense</i> CBMAI 1234 na ausência de metil paration (placa controle) e com 5,0, 10,0, e 15,0 µL de metil paration/placa. (a) 5 dias de cultivo e b)10 dias de cultivo.....	85
Figura 42. Cultivo do fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 1241 na ausência de metil paration (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15, µL de metil paration/placa. (a) 5 dias de cultivo e b) 10 dias de cultivo.	86
Figura 43. Cultivo do fungo <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932 na ausência de metil paration (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 µL de metil paration/placa. (a) 5 dias de cultivo e b) 10 dias de cultivo.....	86
Figura 44. Cultivo do fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 934 na ausência de profenofós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 µL de profenofós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.....	88
Figura 45. Cultivo do fungo <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931 na ausência de profenofós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 µL de profenofós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.....	89
Figura 46. Cultivo do fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 na ausência de profenofós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 µL de profenofós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.....	89
Figura 47. Cultivo do fungo <i>P. raistrickii</i> CBMAI 1235 na ausência de profenofós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 µL de profenofós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.....	90
Figura 48. Cultivo do fungo <i>P. decaturense</i> CBMAI 1234 na ausência de profenofós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 µL de profenofós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.....	90

Figura 49. Cultivo do fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 1241 na ausência de profenofós (placa controle) e com 5, 10 e 15 µL de profenofós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.	91
Figura 50. Cultivo do fungo <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932 na ausência de profenofós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 µL de profenofós/placa. (a) 5 dias de cultivo e b) 10 dias de cultivo.	91
Figura 51. Espectro de massas obtido para o profenofós em CG-EM (70 eV).	95
Figura 52. Espectro de massas obtido para o profenofós em CG-EM (70 eV).	96
Figura 53. Espectro de massas obtido para o clorpirifós em CG-EM (70 eV).	97
Figura 54. Curvas analíticas utilizadas para determinar a concentração de a) 4-bromo-2-clorofenol e b) profenofós.	98
Figura 55. Curvas analíticas utilizadas para determinar a concentração de a) 3,5,6-tricloro-2-piridinol e b) clorpirifós.	100
Figura 56. Curvas analíticas utilizadas para determinar a concentração de a) 4-nitrofenol e b) metil paration.	100
Figura 57. Cromatogramas obtidos por CG-EM-SIM da biodegradação de profenofós por <i>A. sydowii</i> CBMAI 935, durante 10 dias. (a) Extração do caldo enzimático e (b) Extração das células úmidas.	105
Figura 58. Cromatogramas obtidos por CG-EM-SIM da biodegradação de profenofós por <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931, durante 10 dias. (a) Extração do caldo enzimático e (b) Extração das células úmidas.	105
Figura 59. Cromatogramas obtidos por em CG-EM-SIM da biodegradação de profenofós, durante 30 dias. (a) Na presença do fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935, (b) Na presença do fungo <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931.	108
Figura 60. Cromatogramas obtidos por CG-EM-SIM da biodegradação do metabólito, durante 30 dias. (a) Na presença do fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935, (b) Na presença do fungo <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931.	109
Figura 61. Cromatogramas obtidos por CG-EM-SIM da biodegradação de profenofós em meio líquido mineral suplementado com KNO ₃ , durante 30 dias. (a) Na presença do fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935, (b) Na presença do fungo <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931.	111
Figura 62. Cromatogramas obtidos por CLAE das reações entre clorpirifós (CP) e <i>A. sydowii</i> CBMAI 935, em 20 dias de reação. a) Padrão TCP, b) Padrão CP, c) Reação CP + <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (caldo enzimático + células), d) Reação CP + <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (caldo enzimático), e) Reação CP + <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (células).	116

Figura 63. Cromatogramas obtidos por CLAE das reações entre clorpirifós (CP) e <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932, em 20 dias de reação. a) Padrão TCP, b) Padrão CP, c) Reação CP + <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932 (caldo enzimático + células), d) Reação CP + <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932 (caldo enzimático), e) Reação CP + <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932 (células).	117
Figura 64. Cromatogramas obtidos por CLAE das reações de controle para o clorpirifós. a) Padrão TCP, b) Padrão CP, c) 10 dias de reação, d) 20 dias de reação, e) 30 dias de reação.	122
Figura 65. Cromatograma obtido por CG-EM da análise para a reação controle do pesticida clorpirifós, em 20 dias.	123
Figura 66. Cromatogramas obtidos por CLAE-EM das análises para, a) reação controle do pesticida clorpirifós, b) reação entre clorpirifós e <i>A. sydowii</i> CBMAI 935, c) controle para o fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935.	125
Figura 67. Cromatogramas obtidos por CLAE-EM das análises para, a) reação entre clorpirifós e <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932 (10 dias), b) reação entre clorpirifós e <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932 (30 dias), e) controle para o fungo <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932.	127
Figura 68. Espectro de massas (70 eV) do 3,5,6-tricloro-2-piridinol.....	129
Figura 69. Cromatograma obtido por CG-EM das análises para a) reação de clorpirifós na presença de <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932, b) reação de controle para o fungo <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932.	129
Figura 70. Cromatograma obtido por CG-EM (70 eV) das análises para a reação de clorpirifós na presença de <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932 em meio mineral suplementado com KNO ₃	131
Figura 71. Cromatograma obtido por CG-EM (70 eV) das análises para a reação de clorpirifós na presença de <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 em meio mineral suplementado com KNO ₃	131
Figura 72. Cromatogramas obtidos por CLAE das reações entre metil paration e <i>A. sydowii</i> CBMAI 935, em 20 dias de reação. a) Padrão PNF, b) Padrão MP, c) Reação MP + <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (caldo enzimático + células), d) Reação MP + <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (caldo enzimático), e) Reação MP + <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (células).	134
Figura 73. Cromatogramas obtidos por CLAE das reações entre metil paration e <i>P. decaturense</i> CBMAI 1234, em 20 dias de reação. a) Padrão PNF, b) Padrão MP, c) Reação MP + <i>P. decaturense</i> CBMAI 1234 (caldo enzimático + células), d) Reação MP + <i>P.</i>	

<i>decaturrense</i> CBMAI 1234 (caldo enzimático), e) Reação MP + <i>P. decaturrense</i> CBMAI 1234 (células).	135
Figura 74. Cromatogramas obtidos por CLAE-EM das análises para a) reações entre metil paration e <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (10 dias), b) reações entre metil paration e <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (30 dias), c) reação entre metil paration e <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 em meio mineral, d) controle para o fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935.	140
Figura 75. Cromatogramas obtidos por CLAE-EM das análises para a) reações entre metil paration e <i>P. decaturrense</i> CBMAI 1234 (10 dias), b) reações entre metil paration e <i>P. decaturrense</i> CBMAI 1234 (30 dias), c) reação entre metil paration e <i>P. decaturrense</i> CBMAI 1234 em meio mineral, d) controle para o fungo <i>P. decaturrense</i> CBMAI 1234.....	141
Figura 76. Espectro de massas obtido por CG-EM (70 eV) para o metil paration.	143
Figura 77. Espectro de massas obtido por CG-EM (70 eV) para o 4-nitrofenol.....	144
Figura 78. Cromatogramas obtidos por CG-EM das análises para, a) reação entre metil paration e <i>P. decaturrense</i> CBMAI 1234, b) controle para o fungo <i>P. decaturrense</i> CBMAI 1234.	145
Figura 79. Cromatogramas obtidos por CG-EM (70 eV) das análises para a reação entre metil paration e o <i>P. decaturrense</i> CBMAI 1234 em meio mineral suplementado com KNO ₃ , em 30 dias.....	146
Figura 80. Exemplos de reações envolvendo a CYP.....	146
Figura 81. Cromatogramas obtidos por CG-EM (70 eV) para a reação de biodegradação do pesticida profenofós com o fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935, em 20 dias.	159
Figura 82. Cromatogramas obtidos por CG-EM (70 eV) para a reação de biodegradação do pesticida profenofós com o fungo <i>A. sydowii</i> CBMAI 935, em 30 dias.	159
Figura 83. Cromatogramas obtidos por CG-EM (70 eV) para a reação de biodegradação do pesticida profenofós com o fungo <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931, em 20 dias.	160
Figura 84. Cromatogramas obtidos por CG-EM (70 eV) para a reação de biodegradação do pesticida profenofós com o fungo <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931, em 30 dias.	160
Figura 85. Cromatogramas obtidos por CG-EM (70 eV) para análises para a reação de clorpirifós na presença de <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932 em meio líquido mineral suplementado com KNO ₃ , em 30 dias	161

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Fluxograma das etapas de preparação da suspensão de esporos.	60
Esquema 2. Fluxograma das etapas de preparação e extração da fase micelial e caldo enzimático das reações de biodegradação de profenofós (extração dos micélios e caldo enzimático separadamente).....	65
Esquema 3. Fluxograma das etapas de preparação e extração da fase micelial e caldo enzimático das reações de biodegradação de profenofós.	66
Esquema 4. Fluxograma das etapas de preparação e extração da fase micelial e caldo enzimático das reações de biodegradação de clorpirifós e metil paration (extração dos micélios e caldo enzimático separadamente).....	70
Esquema 5. Fluxograma das etapas de preparação e extração da fase micelial e caldo enzimático das reações de biodegradação de clorpirifós e metil paration.....	71
Esquema 6. Reações de hidrólise dos pesticidas clorpirifós, metil paration e profenofós.....	93
Esquema 7. Proposta de fragmentação para o profenofós.....	95
Esquema 8. Proposta de fragmentação para o profenofós.....	96
Esquema 9. Proposta de fragmentação para o clorpirifós.	97
Esquema 10. Proposta de fragmentação de clorpirifós.	128
Esquema 11. Sugestão de rota enzimática para a biodegradação do pesticida clorpirifós...	132
Esquema 12. Proposta de fragmentação do metil paration.	143
Esquema 13. Proposta de fragmentação do 4-nitrofenol.....	144
Esquema 14. Sugestão de rota enzimática para a biodegradação do pesticida metil paration	147

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Estrutura geral e várias classes de PO.	30
Tabela 2. Dados para obtenção da curva analítica para o profenofós e 4-bromo-2-clorofenol.	61
Tabela 3. Dados para obtenção da curva analítica para clorpirifós e 3,5,6-tricloro-2-piridinol.	62
Tabela 4. Dados para obtenção da curva analítica para metil paration e 4-nitrofenol.....	63
Tabela 5. Dados para o método das análises no modo SIM em CG-EM.	74
Tabela 6. Gradiente da fase móvel para as análises em CLAE-EM.....	75
Tabela 7. Concentrações de pesticidas nas placas para avaliação do crescimento microbiano em meio de cultura sólido de malte 2%.....	76
Tabela 8. Avaliação do crescimento dos fungos de ambiente marinho com o pesticida clorpirifós em meio de cultura sólido de extrato de malte 2%.	82
Tabela 9. Avaliação do crescimento dos fungos de ambiente marinho com o pesticida metil paration em meio de cultura sólido de extrato de malte 2%.....	87
Tabela 10. Avaliação do crescimento dos fungos de ambiente marinho com o pesticida profenofós em meio de cultura sólido de extrato de malte 2%.....	92
Tabela 11. Análise em duplicata com 20,0 µL de profenofós para determinação da concentração do pesticida na amostra comercial de Polytrin.	101
Tabela 12. Análise em duplicata com 2,0 µL de clorpirifós para determinação da concentração do pesticida na amostra comercial de Lorsban 480 BR.	102
Tabela 13. Análise em duplicata com 2,0 µL de metil paration para determinação da concentração do pesticida na amostra comercial de Folisuper 600 BR.	102
Tabela 14. Quantificação da biodegradação do profenofós por <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 e <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931, em 10 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).	106
Tabela 15. Quantificação da biodegradação de profenofós por <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 e <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931 em 20 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).	107
Tabela 16. Quantificação da biodegradação de profenofós por <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 e <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931, em 30 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).	108
Tabela 17. Quantificação da biodegradação de 4-bromo-2-chlorofenol por <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 e <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931, em 30 dias (32 °C, 130 rpm, pH 7).	109

Tabela 18. Quantificação da biodegradação de profenofós por <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 e <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931, em 30 dias, em meio mineral suplementado com KNO ₃ (32 °C, 130 rpm, pH 7).	111
Tabela 19. Quantificação da biodegradação de profenofós por hidrólise espontânea, em 30 dias (32 °C, 130 rpm, pH 7).	112
Tabela 20. Quantidade de massa micelial produzida por <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 e <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931, na ausência de profenofós, em 30 dias (32 °C, 130 rpm, pH 7).	112
Tabela 21. Quantificação da biodegradação de profenofós por <i>P. raistrickii</i> CBMAI 931 em diferentes concentrações do pesticida (32°C, 130 rpm, pH 7).	113
Tabela 22. Dados obtidos através da contagem de esporos na suspensão das cepas fúngicas utilizadas nas reações de biodegradação.	114
Tabela 23. Quantificação da biodegradação de clorpirifós por <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 e <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932, em 10 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).	115
Tabela 24. Quantificação da biodegradação de clorpirifós por <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 e <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932, em 20 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).	116
Tabela 25. Quantificação da biodegradação de clorpirifós por <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 e <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932, em 30 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).	118
Tabela 26. Quantificação da biodegradação do 3,5,6-tricloro-2-piridinol por <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 e <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932 em 30 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).	119
Tabela 27. Quantificação da biodegradação de clorpirifós por <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 e <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932, em 30 dias, em meio mineral suplementado com KNO ₃ (32 °C, 130 rpm, pH 7).	120
Tabela 28. Quantificação da biodegradação de clorpirifós por hidrólise espontânea, em 10, 20 e 30 dias (32 °C, 130 rpm, pH 7).	121
Tabela 29. Quantidade de massa micelial produzida por <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 e <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932, na ausência de clorpirifós, em 30 dias (32 °C, 130 rpm, pH 7).	123
Tabela 30. Quantificação da biodegradação de metil paration por <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 e <i>P. decaturense</i> CBMAI 1234, em 10 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).	133
Tabela 31. Quantificação da biodegradação de metil paration por <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 e <i>P. decaturense</i> CBMAI 1234, em 20 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).	133
Tabela 32. Quantificação da biodegradação de metil paration por <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 e <i>P. decaturense</i> CBMAI 1234 em 30 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).	136

Tabela 33. Quantificação da biodegradação de 4-nitrofenol por <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 e <i>P. decaturense</i> CBMAI 1234, em 30 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).	137
Tabela 34. Quantificação da biodegradação de metil paration por <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 e <i>P. decaturense</i> CBMAI 1234 em 30 dias, em meio mineral suplementado com KNO ₃ (32 °C, 130 rpm, pH 7).	138
Tabela 35. Quantificação da biodegradação de metil paration por hidrólise espontânea em 30 dias (32 °C, 130 rpm, pH 7).	138
Tabela 36. Quantidade de massa micelial produzida por <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 e <i>P. decaturense</i> CBMAI 1234, na ausência de metil paration, em 30 dias (32 °C, 130 rpm, pH 7).	139

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e Aplicada)
DDT	<i>p</i> -diclorodifeniltricloroetano
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
PO	Pesticidas Organofosforados
AChE	Acetilcolinesterase
OMS	Organização Mundial da Saúde
ACh	Acetilcolina
EPA	Environmental Protection Agency (Agência de Proteção Ambiental)
CYP	Citocromo P450
CP	Clorpirifós
MP	Metil paration
BCF	4-bromo-2-clorofenol
TCP	3,5,6-tricloro-2-piridinol
PNF	4-nitrofenol
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations (Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas)
PTEs	Fosfotriesterases
CBEs	Carboxilesterases
OPH	Organofosforado hidrolase
MPH	Metil paration hidrolase
OPAA	Organofosforado ácido anidrolase
DFPase	Diisopropilfluorofosfatase
PON 1	Paraoxonase 1
DFP	Diisopropilfluorofosfato
HDPCP	<i>O</i> -hexil- <i>O</i> -2,5-dicloro-fenil fosforamidato
PNF	4-nitrofenol
EPN	<i>O</i> -etil- <i>O</i> -4-nitrofenil fenilfosfonotioato
Lpp	Lipoproteína
OmpA	Membrana da proteína A
<i>opd</i>	Organophosphate-degrading (organofosforado-degradante)
DEF	Dietil fosfato
FDE	Fosfodiesterase
PhoA	Fosfatase alcalina
TR	Succinil-CoA transferase
E3	Esterase 3
TH	β -cetoadipil-tiolase
CG-EM	Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas
CBMAI	Coleção Brasileira de Micro-organismos de Meio Ambiente e Indústria
DMSO	Dimetilsulfóxido
ppm	Partes por milhão
MSDS	Material Safety Data Sheet (Ficha de segurança)
PAN	Pesticide Database (Banco de dados de pesticidas)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	22
1.1 Pesticidas – Aspectos Gerais	22
1.1.1 Definição, histórico e comercialização mundial	22
1.1.2 Riscos à saúde e conscientização	25
1.1.3 Destino dos pesticidas no ambiente e biorremediação	26
1.2 Pesticidas Organofosforados	28
1.2.1 Clorpirifós	33
1.2.2 Metil Paration	34
1.2.3 Profenofós	35
1.2.4 Degradação microbiana de pesticidas organofosforados	36
1.2.4.1 Degradação bacteriana dos pesticidas organofosforados	41
1.2.4.2 Degradação fúngica dos pesticidas organofosforados	45
1.2.4.3 Outros tipos de biodegradação dos pesticidas organofosforados	47
1.3 Organismos marinhos como potenciais fontes de enzimas	50
2 OBJETIVOS	52
2.1 Geral	52
2.2 Específicos	52
3 MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1 Reagentes, solventes e meio de cultura	53
3.2 Pesticidas comerciais	53
3.3 Equipamentos	53
3.3.1 Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM)	53
3.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	54
3.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE-EM)	54
3.3.4 Outros equipamentos	54
3.4 Micro-organismos	54
3.4.1 Crescimento dos micro-organismos	55
3.4.1.1 Composição de sais para preparo da água do mar artificial	55
3.4.1.2 Composição e preparo dos meios de cultura	55
3.4.2 Seleção dos fungos em meio de cultura sólido de malte 2% frente aos pesticidas clorpirifós, metil paration e profenofós	56
3.4.3 Padronização dos inóculos dos fungos filamentosos por suspensão de esporos para as reações com o pesticidas clorpirifós e metil paration	56
3.4.3.1 Preparo dos tubos inclinados em meio de cultura sólido de malte 2% para o crescimento dos fungos	56
3.4.3.2 Preparação da suspensão de esporos	57
3.4.3.3 Contagem dos esporos na suspensão	58
3.5 Curvas analíticas para a quantificação dos pesticidas e seus metabólitos	60
3.5.1 Curva analítica de profenofós e 4-bromo-2-clorofenol pela técnica de padronização interna	60
3.5.1.1 Preparo de soluções estoques de 500,0 ppm	60

3.5.1.2 Preparo das soluções de trabalho.....	61
3.5.2 Curva analítica de clorpirifós e 3,5,6-tricloro-2-piridinol pela técnica de padronização externa.....	61
3.5.2.1 Preparo de soluções estoques de 5000,0 ppm	61
3.5.2.2 Preparo das soluções de trabalho.....	62
3.5.3 Curva analítica de metil paration e 4-nitrofenol pela técnica de padronização externa	62
3.5.3.1 Preparo de soluções estoques de 5000,0 ppm	62
3.5.3.2 Preparo das soluções de trabalho.....	62
3.6 Avaliação da concentração do ingrediente ativo dos pesticidas nas amostras comerciais	63
3.6.1 Profenofós	63
3.6.2 Clorpirifós	63
3.6.3 Metil Paration.....	64
3.7 Reações de biodegradação	64
3.7.1 Reação de biodegradação do pesticida profenofós pelos fungos A. sydowii CBMAI 935 e P. raistrickii CBMAI 931	64
3.7.1.1 Reação entre o pesticida comercial profenofós e os fungos A. sydowii CBMAI 935 e P. raistrickii CBMAI 931	64
3.7.1.2 Reação entre o padrão de 4-bromo-2-clorofenol e os fungos A. sydowii CBMAI 935 e P. raistrickii CBMAI 931.....	67
3.7.1.3 Reação entre o pesticida comercial profenofós e os fungos A. sydowii CBMAI 935 e P. raistrickii CBMAI 931 em meio mineral suplementado com nitrato de potássio	67
3.7.1.4 Controle da reação para o pesticida comercial profenofós (estabilidade do pesticida).....	67
3.7.1.5 Controle da reação para os fungos A. sydowii CBMAI 935 e P. raistrickii CBMAI 931(ausência de pesticida).....	68
3.7.1.6 Reação de biodegradação do pesticida profenofós pelo fungo P. raistrickii CBMAI 931 em diferentes concentrações.....	68
3.7.2 Reação de biodegradação do pesticida clorpirifós pelos fungos A. sydowii CBMAI 935 e Trichoderma sp. CBMAI 932.....	69
3.7.2.1 Reação entre o pesticida comercial clorpirifós e os fungos A. sydowii CBMAI 935 e Trichoderma sp. CBMAI 932	69
3.7.2.2 Controle da reação para o pesticida comercial clorpirifós (estabilidade do pesticida).....	71
3.7.2.3 Controle da reação para os fungos A. sydowii CBMAI 935 e Trichoderma sp. CBMAI 932 (ausência do pesticida)	72
3.7.2.4 Reação entre o padrão de 3,5,6-tricloro-2-piridinol e os fungos A. sydowii CBMAI 935 e Trichoderma sp. CBMAI 932	72
3.7.2.5 Reação entre o pesticida comercial clorpirifós e os fungos A. sydowii CBMAI 935 e Trichoderma sp. CBMAI 932 em meio mineral suplementado com nitrato de potássio	72

3.7.3 Reação de biodegradação do pesticida metil paration pelos fungos A. sydowii CBMAI 935 e P.decatuense CBMAI 1234.....	73
3.7.3.1 Reação entre o pesticida comercial metil paration e os fungos A. sydowii CBMAI 935 e P. decaturense CBMAI 1234	73
3.7.3.2 Controle da reação para o pesticida comercial metil paration (estabilidade do pesticida).....	73
3.7.3.3 Controle da reação para os fungos A. sydowii CBMAI 935 e P. decaturense CBMAI 1234 (ausência do pesticida)	73
3.7.3.4 Reação entre o padrão de 4-nitrofenol e os fungos A. sydowii CBMAI 935 e P.decatuense CBMAI 1234	73
3.7.3.5 Reação entre o pesticida comercial metil paration e os fungos A. sydowii CBMAI 935 e P. decaturense CBMAI 1234 em meio mineral suplementado com nitrato de potássio.....	74
3.8 Quantificação e análises das reações entre os pesticidas comerciais e os fungos marinhos.....	74
3.8.1 Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas.....	75
3.8.2 Cromatografia líquida de alta eficiência	75
3.8.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE-EM)	75
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	76
4.1 Seleção dos fungos em meio de cultura sólido de malte 2% frente aos pesticidas clorpirifós, metil paration e profenofós	76
4.1.1 Clorpirifós	77
4.1.2 Metil paration	83
4.1.3 Profenofós	88
4.2 Curvas analíticas para a quantificação dos pesticidas e seus metabólitos	92
4.2.1 Curva analítica para determinação da concentração de profenofós e 4-bromo-2-clorofenol através do método de padronização interna com clorpirifós	94
4.2.2 Curva analítica para determinação da concentração dos pesticidas clorpirifós e metil paration e dos metabólitos 3,5,6-tricloropiridinol e 4-nitrofenol através do método de padronização externa.....	99
4.3 Avaliação da concentração do ingrediente ativo dos pesticidas nas amostras comerciais	101
4.3.1 Profenofós	101
4.3.2 Clorpirifós	102
4.3.3 Metil paration	102
4.4 Reações de biodegradação dos pesticidas organofosforados em meio líquido.....	103
4.4.1 Biodegradação do pesticida profenofós pelos fungos P. raistrickii CBMAI 931 e A. sydowii CBMAI 935	104
4.4.1.1 Avaliação da biodegradação do profenofós com 10 dias de reação	104
4.4.1.2 Avaliação da biodegradação do profenofós com 20 dias de reação	107
4.4.1.3 Avaliação da biodegradação do profenofós com 30 dias de reação	107
4.4.1.4 Reação de biodegradação do pesticida profenofós pelos fungos P. raistrickii CBMAI 931 em diferentes concentrações.....	113

4.4.2 Padronização dos inóculos dos fungos filamentosos por suspensão de esporos para as reações com o pesticidas clorpirifós e metil paration	114
4.4.3 Biodegradação do pesticida clorpirifós pelos fungos <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 e <i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932.....	114
4.4.3.1 Avaliação da biodegradação do clorpirifós com 10 dias de reação.....	114
4.4.3.2 Avaliação da biodegradação do clorpirifós com 20 dias de reação.....	115
4.4.3.3 Avaliação da biodegradação do clorpirifós com 30 dias de reação.....	118
4.4.4 Biodegradação do pesticida metil paration pelos fungos <i>A. sydowii</i> CBMAI 935 e <i>P. decaturense</i> CBMAI 1234.....	132
4.4.4.1 Avaliação da biodegradação do metil paration com 10 dias de reação	132
4.4.4.2 Avaliação da biodegradação do metil paration com 20 dias de reação	132
4.4.4.3 Avaliação da biodegradação do metil paration com 30 dias de reação	136
5 CONCLUSÃO.....	148
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	150
ANEXOS	159

1 INTRODUÇÃO

1.1 Pesticidas – Aspectos Gerais

1.1.1 Definição, histórico e comercialização mundial

Os pesticidas desempenham um papel importante na agricultura moderna, pois são eficazes no controle de pragas, promovendo um aumento na produtividade e qualidade dos alimentos. No entanto, enquanto os pesticidas podem ter um efeito benéfico sobre a produção agrícola, sua utilização indiscriminada provoca graves problemas ambientais e para a saúde humana, uma vez que são tóxicos também para as espécies não alvo.^{1,2}

*Segundo a União Internacional de Química Pura e Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry - IUPAC), os pesticidas são substâncias, ou mistura de substâncias, utilizadas durante a produção, colheita ou armazenamento de alimentos. São compostos bioativos capazes de prevenir, combater ou exterminar espécies que causem danos nas plantações durante as etapas de produção de alimentos. Esta definição também compreende as substâncias utilizadas no combate a insetos domésticos ou agentes preventivos à ação de vetores de doenças.*³

O uso de substâncias capazes de atuar como pesticidas é relatado há milhares de anos. Em 2500 a.C., o enxofre foi utilizado no combate a insetos pelos sumérios. O piretro, proveniente de flores secas de plantas do gênero *Chrysanthemum cinerariaefolium*, foi empregado no controle de piolhos, em 400 a.C. A partir do século XVI, foram relatados o uso de compostos inorgânicos, como mercúrio e arsênio, e também de inseticidas naturais orgânicos, como a nicotina e a rotenona, no combate a piolhos, insetos de jardins e outras pragas.⁴ No entanto, os primeiros efeitos prejudiciais destas substâncias surgiram após o início da revolução industrial, com relatos públicos de intoxicação por arsênio, chumbo, entre outros.

A expansão da aplicação aérea de pesticidas ocorreu aproximadamente na década de 30. Já nesta época, aproximadamente 30 pesticidas estavam em uso, incluindo os derivados de plantas (ex. piretro e nicotina), compostos inorgânicos (ex. arseniato de cálcio e chumbo), fungicidas a base de mercúrio e o herbicida orgânico sintético, dinitro-*o*-cresol.⁵

A era dos pesticidas orgânicos sintéticos iniciou-se em torno dos anos 30. Em 1939, Paul Müller descobriu as propriedades inseticidas do organoclorado *p*-diclorodifeniltricloroetano (DDT), com sua utilização aumentando exponencialmente após a

Segunda Guerra Mundial.⁵ Inicialmente, os efeitos benéficos do DDT causaram uma revolução, devido à alta eficiência no controle de pragas, e seu uso foi incentivado indiscriminadamente. Porém, os efeitos prejudiciais do DDT, em humanos e em animais, só foram percebidos após 20 anos, até que apareceram os primeiros sintomas patogênicos.⁶

Em 1962, Rachel Carson publicou o livro “Silent Spring” (Primavera Silenciosa), colocando em dúvida os benefícios do uso de pesticidas. O livro de Carson foi considerado uma denúncia pública sobre os efeitos do DDT em aves, afirmando que por influência do DDT, as cascas de ovos de aves diminuía de espessura. Apesar das muitas críticas, Carson colocou em debate o uso de pesticidas e foi crucial para a proibição de alguns organoclorados como DDT, aldrin, heptacloro e clordano, nos Estados Unidos, no início da década de 70.^{7,8} Embora tenham sido banidos na agricultura, ainda estes pesticidas são muito estudados, pois devido ao uso abusivo dos organoclorados nas décadas de 1960 a 1980 houve um acúmulo de resíduos tóxicos em vários ecossistemas em todo mundo.^{9,10}

Devido às restrições impostas em relação ao uso dos organoclorados, a ênfase de estudos em buscas de novos pesticidas foi transferida em direção aos organofosforados e carbamatos, por estes apresentarem uma meia-vida menor e, também, porque acreditava-se que estas classes de pesticidas seriam mais “seguras” que a dos organoclorados. No entanto, ambos apresentam-se como potentes inibidores da enzima acetilcolinesterase, e consequentemente, altamente tóxicos a espécies não alvo.⁵

Muitos dos pesticidas modernos foram desenvolvidos a partir dos pesticidas “naturais”. Os piretróides, por exemplo, foram modelados a partir das piretrinas, substâncias naturais derivadas de plantas. Os pesticidas piretróides atingiram seu maior desenvolvimento no início de 1970, deixando de ser um produto doméstico para tornar-se um agente controlador de pragas agrícolas.¹¹ Por apresentarem diversos benefícios em relação a outras classes de pesticidas, os piretróides redefiniram os padrões de inseticidas de contato, uma vez que apresentam amplo espectro de atividade, ação rápida, eficiência em pequenas doses, baixo poder residual e, também, são praticamente atóxicos para mamíferos, quando comparados a outros inseticidas.¹²

Também derivado de um pesticida “natural”, a nicotina, os neonicotinóides são a principal classe de pesticidas desenvolvida nas últimas três décadas. São usados principalmente para aplicações sistêmicas em plantas e, em 2005, já contavam com uma participação de 11 a 15% no mercado mundial de pesticidas. Estes pesticidas apresentam uma toxicidade seletiva, possuindo uma baixa toxicidade aguda e crônica para mamíferos, aves e peixes.¹³

O gráfico da Figura 1 apresenta a distribuição do mercado global de pesticidas. Ainda que banidos, alguns organoclorados são comercializados, apresentando uma quantidade irrisória na comercialização de agrotóxicos. Apesar de altamente tóxicos, os organofosforados e carbamatos ocupam ainda uma importante posição na venda de pesticidas, mas a tendência para os próximos anos é uma redução na comercialização dos mesmos. Os pesticidas de origem “natural”, piretróides e neocotinóides, apresentam-se como a principal tendência de comercialização de pesticidas atualmente e para o futuro.¹⁴

Figura 1. Mercado global das classes de pesticidas – tendências para os anos de 2007 a 2018.

Fonte: Adaptado de HOUSSET, P.; DICKMANN, R. A promise fulfilled–pyrethroid development and the benefits for agriculture and human health. In: **Pyrethroid Scientific Forum 2009**, p.135, 2009.

Segundo dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em 2011, o mercado brasileiro de agrotóxicos já era o maior do mundo, representando 16% do mercado mundial. O Brasil ocupa, também, a sexta posição no ranking mundial de importação de agrotóxicos. A entrada desses produtos em território nacional aumentou 236%, entre 2000 e 2007.¹⁵ A Figura 2, mostra as vendas totais de pesticidas em todo o mundo, de 2000 a 2008, comparando com as vendas somente para o Brasil, indicando a grande contribuição do país para o mercado global.

Figura 2. Comercialização mundial e brasileira de pesticidas.

Fonte: Adaptado de http://www.cpact.embrapa.br/eventos/2010/met/palestras/28/281010_PAINEL3_GIOVANI_THEISEN.pdf, acessado em 11 Out. 2012.

1.1.2 Riscos à saúde e conscientização

O uso pouco criterioso de pesticidas representa um problema muito sério para a saúde humana. Intoxicações por defensivos agrícolas preocupam a sociedade e as autoridades, especialmente pelo fato de que essas intoxicações ocorrem pela ingestão gradativa destes produtos. Muito tempo após o seu uso, os pesticidas permanecem em solos e sedimentos onde eles podem entrar diretamente na cadeia alimentar ou percolar até o lençol freático. No lençol freático esses poluentes podem ser ingeridos juntamente com água potável e causar problemas de saúde.^{10,16}

Doenças associadas aos pesticidas incluem neuroblastoma, leucemia, tumor de Wils, sarcoma de Ewing, linfoma não-Hodgkin, câncer no cérebro, colorretal e testículos.¹⁷ Inúmeras campanhas contra o uso de agrotóxicos e conscientização sobre seu uso indiscriminado são realizadas devido aos riscos destas substâncias à saúde. No Brasil, uma importante campanha é a “*Agrotóxico Mata - Campanha permanente contra os agrotóxicos e pela vida*”, que visa um debate com a população sobre a falta de fiscalização no uso, consumo e venda de agrotóxicos, a contaminação dos solos e das águas, e também, denunciar os impactos dos agrotóxicos na saúde da população (Figura 3 - a).¹⁸ Diversas campanhas também são veiculadas na internet por Blogs e Organizações Não Governamentais, de modo

que, cada vez mais, a população é conscientizada sobre os efeitos prejudiciais e riscos quanto a exposições ocupacional e através de alimentos contaminados com pesticidas (Figura 3 - b).

Figura 3. a) Divulgação da campanha “Agrotóxico Mata - Campanha permanente contra os agrotóxicos e pela vida” e b) Charge sobre a ingestão de agrotóxicos, divulgada na internet.

Fonte: a) <http://www.mabnacional.org.br/?q=campanha/agrot-xico-mata-campanha-permanente-contr-os-agrot-xicos-e-pela-vida>, acessado em 14 jan. 2013; b) <http://guardafogo.blogspot.com.br/2012/02/mais-uma-da-veja-em-defesa-dos.html>, acessado em 14 jan. 2013.

1.1.3 Destino dos pesticidas no ambiente e biorremediação

Milhões de toneladas de pesticidas são aplicados anualmente, mas acredita-se que apenas uma pequena fração destas substâncias efetivamente alcance a espécie-alvo.¹⁹ O destino dos pesticidas no ambiente é influenciado por muito processos que determinam sua persistência e mobilidade.⁸

A interação de pesticidas com solos, águas superficiais e águas subterrâneas é complexa, sendo controlada por diversas reações biológicas, químicas e físicas. Sendo assim, os processos de transformação e degradação de pesticidas dependem tanto das características do solo, quanto do pesticida em questão.^{8,16}

Os processos físicos que controlam o transporte de pesticidas e aos quais é fortemente dependente a persistência destas substâncias, são: sorção/dessorção, lixiviação, volatilização, transporte do pesticida no ar, absorção por plantas e escoamento superficial.¹⁶ As

características do solo, como, acidez, temperatura, conteúdo de matéria orgânica e umidade, também influenciam as taxas de degradação de pesticidas.⁸

A biodegradação é o principal mecanismo de degradação no solo e é resultado do metabolismo microbiano nas moléculas de pesticidas. Processos químicos de degradação como, oxidação/redução, hidrólise, fotólise, entre outros, ocorrem no ambiente e, também, são dependentes das características físico-químicas do pesticida (Figura 4).²⁰

Figura 4. Processos físicos, químicos e biológicos que controlam a persistência ou degradação de pesticidas no ambiente.

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

A destoxificação de pesticidas *in situ* pode ser realizada por tratamento do solo contaminado por determinados micro-organismos ou plantas, uma tecnologia conhecida como biorremediação ou, mais especificamente, fitorremediação, no caso de plantas.²¹ Os micro-organismos são os principais agentes biológicos capazes de remover resíduos e materiais degradantes, permitindo a sua reciclagem no meio ambiente.²² Uma vez que as opções convencionais de tratamento para os resíduos de pesticidas no ambiente incluem a remoção do material contaminado para incineração ou disposição em aterros sanitários, a remediação biológica *in situ* é vista como um tratamento alternativo mais seguro, menos prejudicial e com melhor custo-benefício²³.

Técnicas eficazes para biorremediação do solo são bioaugmentação, bioestimulação, fitorremediação e enzimática. No entanto, as três primeiras técnicas são limitadas pela sua

dependência em relação à taxa de crescimento das plantas remediadoras e micro-organismos, a qual irá variar com nutrientes, pH, aeração e outros fatores relacionados ao solo contaminado.^{23,24} Técnicas de biorremediação bem sucedidas requerem organismos eficientes capazes de degradar os poluentes a um nível mínimo. No caso dos pesticidas, uma taxa adequada de biodegradação é necessária para atingir o nível aceitável para o resíduo de pesticida, ou dos seus metabólitos, no local contaminado em um período de tempo limitado.²⁵

1.2 Pesticidas Organofosforados

Os pesticidas organofosforados (PO) constituem uma categoria heterogênea de compostos químicos. São utilizados mundialmente na agricultura, higiene pública, controle de vetores de doenças e contra pragas domésticas.^{26,27,28} Os organofosforados mais voláteis, como o sarin, soman, tabun, ciclosarin e VX, foram um grupo de compostos usados historicamente como agentes químicos de guerra em virtude da sua elevada toxicidade para o sistema nervoso humano (neurotóxicos) (Figura 5).²⁹

Figura 5. Estrutura química dos agentes neurotóxicos.

Os PO têm sido amplamente utilizados em substituição aos compostos organoclorados, por causa do seu baixo custo, facilidade de síntese, biodegradabilidade aumentada e acumulação limitada nos organismos vivos (comparada aos organoclorados).³⁰ No entanto, os PO são, também, altamente tóxicos, uma vez que são potentes inibidores irreversíveis da acetilcolinesterase (AChE), enzima que têm um efeito sobre o sistema nervoso dos organismos vivos, incluindo o homem.²⁶

Os PO que apresentam principais interesses toxicológicos e comerciais são os ésteres ou tiois derivados dos ácidos fosfórico, fosfônico, fosfínico ou fosforamídico (Figura 6). Os derivados mais utilizados são fosfatos e fosforotioatos (=S e S-substituídos). A estrutura química geral dos PO é um centro fosfato ligado a três grupos R e o átomo de fósforo unido por ligação dupla ao átomo de oxigênio ou enxofre (Tabela 1).^{31,32}

Normalmente, R_1 e R_2 são grupos arilas ou alquilas que são ligados ao átomo de fósforo tanto diretamente (formando fosfinatos), quanto através de um átomo de oxigênio ou enxofre (formando fosfatos ou fosforotioatos). Em outros casos, R_1 está diretamente ligado ao átomo de fósforo, e R_2 está ligado a um átomo de oxigênio ou enxofre (formação de fosfonatos ou fosfonotioatos). Nos fosforamidatos, pelo menos, um destes grupos é um grupo amino (mono ou bi-substituído). Inseticidas tem tipicamente grupos ésteres R_1 e R_2 idênticos, dando origem aos PO aquirais. O grupo L, que pode estar ligado ao átomo de fósforo através de um átomo de oxigênio ou enxofre, é chamado grupo de saída (L – *leaving group*), uma vez que é liberado do átomo de fósforo quando o PO é hidrolisado por enzimas fosfotriesterases. O grupo L pode pertencer a uma ampla gama de halogênios, alifáticos, aromáticos ou heterocíclicos, mas é mais comumente designado como um grupo fenol ou tiol com a cadeia linear, ramificada ou aromática. As estruturas gerais dos diferentes tipos de PO são apresentadas na Tabela 1.^{31,33,32}

Figura 6. Estrutura dos derivados do ácido fosfórico.

Tabela 1. Estrutura geral e várias classes de PO.

Tipo	Estrutura química	Exemplos
Estrutura geral	$\begin{array}{c} \text{O ou S} \\ \parallel \\ \text{R}_1-\text{P}-\text{R}_2 \\ \mid \\ \text{OL} \end{array}$	
Fosfatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{OR} \\ \mid \\ \text{OL} \end{array}$	clorfenvinfós, diclorvos, monocrotofós, tri- <i>o</i> -cresil fosfato
Fosfonatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{R} \\ \mid \\ \text{OL} \end{array}$	triclorfon
Fosfinatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{P}-\text{R} \\ \mid \\ \text{OL} \end{array}$	glufosinato
Fosforotioatos (S=)	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{OR} \\ \mid \\ \text{OL} \end{array}$	bromofós, diazinon, fention, paration, pirimifós-metil
Fosfonotioatos (S=)	$\begin{array}{c} \text{S} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{R} \\ \mid \\ \text{OL} \end{array}$	EPN, leptofós
Fosforotioatos (S-substituídos)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{OR} \\ \mid \\ \text{OL} \end{array}$	demeton-S-metílico, ecotiopato
Fosfonotioatos (S-substituídos)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{R} \\ \mid \\ \text{OL} \end{array}$	VX
Fosforoditioatos	$\begin{array}{c} \text{O} \qquad \text{S} \\ \parallel \qquad \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{SR} \quad \text{ou} \quad \text{RS}-\text{P}-\text{OR} \\ \mid \qquad \mid \\ \text{OL} \qquad \text{OL} \end{array}$	azinfós-etílico, azinfós-metílico, dimetoato, malation
Fosforotritioatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RS}-\text{P}-\text{SR} \\ \mid \\ \text{SL} \end{array}$	
Fosforamidatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{N}(\text{R})_2 \\ \mid \\ \text{OL} \end{array}$	fenamifós
Fosforamidotioatos	$\begin{array}{c} \text{S} \qquad \text{O} \\ \parallel \qquad \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{N}(\text{R})_2 \quad \text{ou} \quad \text{RS}-\text{P}-\text{N}(\text{R})_2 \\ \mid \qquad \mid \\ \text{OL} \qquad \text{OL} \end{array}$	metamidofós, isofenfós
Fosforofluoridatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{OR} \\ \mid \\ \text{F} \end{array}$	diisopropil fluorofosfato (DFP)
Fosfonofluoridatos	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{RO}-\text{P}-\text{R} \\ \mid \\ \text{F} \end{array}$	ciclosarin, sarin, soman

Fonte: Adaptado de BLEECKER, J. L. Organophosphate and carbamate poisoning. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 91, p. 401-432, 2008.

Compostos organofosforados são pulverizados livremente em terras agricultáveis em todo o mundo e, portanto, representam um risco ao meio ambiente e a saúde através da

contaminação da água potável e alimentos destinados ao consumo humano, uma vez que repetidas aplicações para proteção de culturas, seguidas por irrigação, permitem que estes pesticidas escoem para águas subterrâneas.³⁴

Os PO apresentam meia-vida curta no meio ambiente e ação rápida em sua “praga-alvo”, no entanto, a mortalidade tem sido documentada em espécies não alvo da vida selvagem, já que sua toxicidade não é específica. Além das aves, que parece ser a classe de animais mais sensível afetada por estes compostos, os PO também estão envolvidos em intoxicações agudas em humanos.³⁵ A Organização Mundial de Saúde (OMS) informou em 2007 que a exposição a estes pesticidas já resultava em cerca de 3 milhões de casos de envenenamento grave e 220.000 mortes em todo o mundo. Além disso, mais de 0,7 milhões de casos de envenenamento podem ser atribuídas a exposição ocupacional e incidental aos PO.³⁶

Os PO exercem seus principais efeitos toxicológicos pela fosforilação irreversível de esterases no sistema nervoso central. Os efeitos tóxicos agudos estão relacionados com a inibição da AChE.³¹ A AChE é uma enzima muito eficiente, uma molécula desta enzima hidrolisa aproximadamente 5.000 moléculas de acetilcolina (ACh) por segundo (Figura 7).³⁷ ACh é um mediador químico, necessária para a transmissão de impulsos nervosos, presente em mamíferos e insetos.³⁰

A inibição da AChE por PO provoca acumulação rápida de ACh, resultando em super estimulação dos receptores nicotínicos e muscarínicos de acetilcolina.³⁷ O mecanismo de hidrólise catalisada pela AChE depende do ataque nucleofílico de um resíduo de serina em um grupo carbonílico, na Ach, porém, na presença de compostos organofosforados, o resíduo é prontamente fosforilado (Figura 7). Na inibição da AChE, o resíduo de histidina no sítio ativo captura um próton do resíduo de serina, aumentando o caráter nucleofílico desta, a qual em seguida, facilmente ataca o átomo de fósforo eletrofílico, liberando o grupo de saída (-L).³⁰

Ao contrário da enzima acetilada, a enzima fosforilada reage lentamente com água, permitindo a desalquilação de um substituinte alcóxi (R_2) ligado ao átomo de fósforo. Os compostos organofosforados, assim, inativam a AChE pela *fosforilação da serina* no sítio ativo da enzima. O resultado é a formação de uma forte ligação entre o resíduo de histidina protonado do sítio catalítico e o átomo de oxigênio negativamente carregado do organofosforado. A histidina protonada não atua como um catalisador básico para promover a hidrólise da enzima fosforilada, que é um passo crucial para a reativação da AchE (Figura 8).³⁰

Figura 7. Mecanismo de hidrólise da acetilcolina pela enzima acetilcolinesterase.

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

Figura 8. Mecanismo geral de inibição da acetilcolinesterase por pesticidas organofosforados.

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

A inibição da AChE depende da estrutura química do inibidor organofosforado. A interação entre a esterase e os PO parece envolver apenas o sítio ativo, onde um complexo muito estável é formado e, esta estabilidade, está relacionada com a estrutura química específica do inibidor. A inibição da acetilcolinesterase é irreversível, impedindo o substrato ACh de reagir com o sítio da esterase. Como consequência, a acumulação de ACh resulta em todos os sintomas de envenenamento por ACh causada por organofosforados.³⁰ Os sintomas da intoxicação aparecem após cerca de aproximadamente 50% da AChE ser inibida, podendo causar agitação, fraqueza e fasciculação muscular, hipersalivação e suor. Intoxicações graves podem causar insuficiência respiratória, perda de consciência, confusão, convulsões e/ou morte.^{31,38}

1.2.1 Clorpirifós

O clorpirifós (CP), *O,O*-dietil-*O*-3,5,6-tricloro-2-piridinil fosforotioato, é um dos principais pesticida organofosforados comercializados.³⁹ Nos EUA, 10 mil toneladas deste pesticida foram comercializadas entre os anos de 1987 a 1998.⁴⁰ É utilizado para diversas finalidades, como o controle de pragas de uma variedade de culturas alimentares, plantas ornamentais e culturas em estufas; também é aplicado para controle de pragas em ambientes fechados, bem como pragas estruturais (cupins), e até mesmo em coleiras de animais domésticos.⁴¹

Registrado em 1965, o clorpirifós, é um pesticida moderadamente perigoso (Classificação Toxicológica II), com baixa solubilidade em água e alta taxa de sorção em solos.^{42,43,44} Segundo a ANVISA, no Brasil, o clorpirifós apresenta aplicação foliar nas culturas de algodão, batata, café, cevada, citros, feijão, maçã, milho, pastagem, soja, sorgo, tomate e trigo, aplicação localizada na cultura da banana (recipiente para proteção do cacho) e aplicação no solo nas culturas de batata e milho.⁴²

Estudos *in vivo* indicam que a toxicidade deste pesticida é resultado da bioativação pela citocromo P450 (CYP) para a forma mais potente na inibição da AchE, o clorpirifós-oxon. Segundo Tang e colaboradores, o mecanismo possível é a formação de um intermediário fosfoxitirano, que pode resultar em uma reação de dessulfuração, formando o oxon, ou em uma reação de desarilação formando os metabólitos correspondentes (Figura 9).⁴⁵

Figura 9. Metabolismo do pesticida clorpirifós mediado por CYP.

Fonte: TANG, J.; CAO, Y.; ROSE, R. L.; BRIMFIELD, A. A.; DAI, D.; GOLDSTEIN, J. A.; HODGSON, E. Metabolism of chlorpyrifos by human cytochrome P450 isoforms and human, mouse, and rat liver microsomes. *Drug Metabolism and Disposition*, v. 29, n. 9, p. 1201-1204, 2001.

1.2.2 Metil Paration

Metil paration (MP), *O,O*-dimetil-*O*-4-nitrofenil fosforotioato, é um importante pesticida utilizado na agricultura e saúde pública em substituição ao seu análogo etil, o paration, que foi banido em diversos países devido a sua alta toxicidade para mamíferos. No entanto, com Classificação Toxicológica I, o metil paration é, também, classificado como um pesticida altamente tóxico.^{46,47} Devido ao seu alto nível de toxicidade, foi classificado como um pesticida de uso restrito nos Estados Unidos, pela Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency* – EPA).²⁶

Utilizado no controle de insetos, tais como, pulgões, ácaros e cigarrinhas que atacam diversos tipos de culturas, o metil paration, foi primeiramente registrado em 1954.^{46,48} É usado principalmente para o controle do bicudo-do-algodoeiro, em culturas de algodão. No Brasil, apresenta aplicação foliar nas culturas de algodão, alho, arroz, batata, cebola, feijão, milho, soja e trigo.⁴⁹

Assim como o clorpirifós, após absorvido o metil paration pode ser bioativado para a sua forma mais tóxica, o metil paraoxon. O metabolismo subsequente deste pesticida em humanos, pode resultar na excreção urinária do dimetil tiofosfato, dimetil fosfato e *p*-nitrofenol (PNF), na forma de fenol livre, glucuronídeo conjugado ou éster sulfato (Figura 10).⁵⁰

Figura 10. Metabolismo do pesticida metil paration em humanos.

Fonte: BARR, D. B.; TURNER, W. E.; DIPIETRO, E.; MCCLURE, P. C.; BAKER, S. E.; BARR, J. R.; GEHLE, K.; GRISSOM JR, R. E.; BRAVO, R.; DRISKELL, W. J. Measurement of p-nitrophenol in the urine of residents whose homes were contaminated with methyl parathion. *Environmental Health Perspectives*, v. 110, n. 6, p. 1085, 2002.

1.2.3 Profenofós

Profenofós, *O*-4-bromo-2-clorofenil-*O*-etil-*S*-propil fosforotioato, é um inseticida foliar, não sistêmico e acaricida com uma ampla gama de aplicações. É eficaz contra várias espécies de insetos mastigadores/sugadores e ácaros, em diversas culturas.⁵¹ Nos Estados Unidos, profenofós é um pesticida de "uso restrito" pulverizado apenas nas culturas de algodão.^{52,53} No entanto, no Brasil, este pesticida também pode ser usado para aplicação foliar em algodão, amendoim, batata, café, cebola, ervilha, feijão, feijão verde, melancia, milho, pepino, repolho, soja, tomate e trigo.⁴²

Classificado como um pesticida de moderadamente perigoso (Classe Toxicológica II) pela OMS,^{54,55} o profenofós tem uma ordem de toxicidade moderada após administração oral e dérmica.^{53,54} De acordo com a EPA, profenofós foi registrado nos Estados Unidos em 1982 e aproximadamente 352 toneladas de ingrediente ativo são aplicados nas culturas de algodão anualmente.⁵⁶

Algumas vias de degradação para o profenofós são descritas na literatura. A rota metabólica em culturas de algodão foi investigada e envolve a clivagem do éster de

fosforotioato para se obter 4-bromo-2-clorofenol (BCF), seguido de conjugação com a glicose.⁵⁷ Na literatura, existem alguns casos de biodegradação de PO que ocorrem por biotransformações subsequentes, produzindo metabólitos polares, como os derivados glicosilados e sulfatados. De acordo com a Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas (*Food and Agriculture Organization of the United Nations – FAO*), em condições aeróbias, o profenofós é degradado rapidamente até a mineralização do pesticida, formando resíduos de difícil extração. As transformações metabólicas do profenofós em plantas e animais são semelhantes, e o principal produto da hidrólise, o 4-bromo-2-clorofenol, o qual pode ser conjugado por reações enzimáticas.⁵⁸ Na Figura 11 estão apresentadas as diversas biotransformações possíveis para o profenofós.

Figura 11. Vias metabólicas propostas para o profenofós no solo, plantas e em reações enzimáticas.

Fonte: Adaptado de http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation08/Profenofos.pdf, acessado em 25 ago. 2012.

1.2.4 Degradação microbiana de pesticidas organofosforados

A degradação microbiana de pesticidas organofosforados é de especial interesse, pois esta classe de pesticidas é altamente tóxica para mamíferos.⁵⁵ Os PO são metabolizados

principalmente por reações de oxidação e hidrólise. As principais enzimas envolvidas na hidrólise destes compostos são fosfotriesterases (PTEs) e carboxilesterases (CBEs), embora a destoxificação de PO por PTEs seja mais eficiente do que por CBEs. A presença de PTEs já foi descrita em uma grande variedade de tecidos biológicos de mamíferos, peixes, aves, moluscos e bactérias.³¹

Uma grande variedade de enzimas com atividades fosfotriesterases tem sido encontradas, incluindo organofosforado hidrolase (OPH), metil paration hidrolase (MPH), organofosforado ácido anidrolase (OPAA), diisopropilfluorofosfatase (DFPase), e paraoxonase 1 (PON1).³² As PTEs catalisam a hidrólise dos PO, que é o passo mais importante na destoxificação de compostos organofosforados. A hidrólise enzimática de PO por PTEs é considerada uma reação de destoxificação, porque os metabólitos resultantes são, geralmente, menos tóxico do que os pesticidas originais.³¹ A Figura 12 mostra a hidrólise enzimática de diisopropilfluorofosfato (DFP), paraoxon e *O*-hexil-*O*-2,5-dicloro-fenil fosforamidato (HDCP). Normalmente, PTEs são denominados segundo o nome de seu substrato.

Figura 12. Hidrólise de pesticidas organofosforados por fosfotriesterases.

Fonte: SOGORB, M. A.; VILANOVA, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. **Toxicology Letters**, v. 128, n. 1, p. 215-228, 2002.

De acordo com Bigley e Raushel, as reações de hidrólise ocorrem através de um mecanismo enzimático, no sítio ativo da fosfotriesterase. Todas as enzimas PTEs requerem um íon metálico divalente e o sítio ativo é geralmente hidrofóbico e pode ser dividido em três regiões de ligações, em que o grupo de saída e os outros dois substituintes ligam-se para posicionar o átomo de fósforo central para a catálise. Os detalhes mecanísticos da reação enzimática variam de acordo com o sítio ativo da esterase, mas geralmente o íon metálico presente na enzima coordena-se com grupos hidróxidos, favorecendo a hidrólise por meio de

catálise básica intramolecular ou coordenando com moléculas de água numa catálise ácida intramolecular.³²

O íon metálico pode acelerar a velocidade de hidrólise do pesticida pela coordenação com o átomo de oxigênio do grupo fosforilo e o estado de transição envolve a ligação do substrato ao metal e uma distorção do átomo de fósforo central, fazendo com que este se aproxime do grupo hidróxido. O intermediário formado é uma espécie de fósforo pentavalente.^{59,60,32} A Figura 13 mostra como um íon de metal pode promover a reação mediante o posicionamento correto do nucleófilo para atacar o átomo de fósforo. Este arranjo favorece um aumento eletrofílico do átomo de fósforo através de uma coordenação do íon metálico a um átomo de oxigênio do fosfato.⁶⁰

Figura 13. Catálise metal-dependente de enzimas fosfotriesterases.

Fonte: GANI, D.; WILKIE, J. Stereochemical, mechanistic, and structural features of enzyme-catalysed phosphate monoester hydrolyses. *Chemical Society Reviews*, v. 24, n. 1, p. 55-63, 1995.

A hidrólise de PO por PTEs produz compostos mais vulneráveis à degradação subsequente. Lei e colaboradores estudaram a degradação total do 4-nitrofenol (PNF) um grupo substituinte presente nos organofosforados paraoxon, paration, metil paration, *O*-etil-*O*-4-nitrofenil fenifosfonotioato (EPN) e fenitrothion. Segundo este estudo, PNF foi oxidado pela bactéria *Arthrobacter* sp. Que o degrada consumindo oxigênio molecular (Figura 14).⁶¹

Figura 14. a) Organofosforados contendo o substituinte 4-nitrofenol. b) Biodegradação do PNF pela *Arthrobacter* sp.

Fonte: LEI, Y.; MULCHANDANI, P.; CHEN, W.; WANG, J.; MULCHANDANI, A. Whole cell–enzyme hybrid amperometric biosensor for direct determination of organophosphorous nerve agents with *p*-nitrophenyl substituent. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 85, n. 7, p. 706-713, 2004.

A capacidade de alguns micro-organismos em hidrolisar PO depende da atividade da enzima produzida por linhagens específicas de micro-organismos. A engenharia genética está sendo utilizada para melhorar a capacidade de linhagens de bactérias que degradam PO, aumentando a atividade enzimática. Vários estudos têm seguido esta abordagem, uma vez que se espera que a linhagem modificada apresente uma atividade enzimática mais pronunciada do que os genes selvagens. Zheng e colaboradores alcançaram um aumento na capacidade de degradação dos PO por modificações genéticas da bactéria *Escherichia coli*, através da expressão das enzimas OPHs e CBEs intracelularmente. Estas enzimas apresentaram-se como um poderoso agente degradante para os resíduos de PO em vegetais contaminados. Foi demonstrado que a lavagem dos vegetais contaminados por paration, com o extrato de enzimas de células geneticamente modificadas de *Escherichia coli* em pó, produziu uma destoxificação melhor (97%) do que o obtido por lavagem com o produto da enzima comercialmente disponível (86-94%).²⁷

As duas abordagens principais para a destoxificação de pesticidas por micro-organismos são a utilização de células inteiras ou enzimas isoladas. Em alguns casos, a extração e purificação da enzima pode ser difícil e de alto custo, por isso, torna-se necessária a imobilização de células inteiras. Ambas, nativa e recombinante, OPHs podem ser imobilizadas por exemplo em vidro, nylon poroso e grânulos de sílica. As enzimas imobilizadas podem ser utilizadas em reatores para a destoxificação de PO.⁶² No entanto, a

utilização de células imobilizadas num biorreator também têm desvantagens, tais como a membrana externa atuando como uma barreira de permeabilidade, impedindo o PO de interagir com enzimas OPH que residem no interior da célula.²⁸

O processo de degradação depende do transporte do pesticida para dentro das células, onde as enzimas degradantes residem. Mesmo nas linhagens recombinantes com elevada atividade intracelular para degradação de pesticidas, a taxa total de destoxificação pode ser limitada pelo mecanismo de transporte. Para solucionar este problema, OPH tem sido expressa na superfície da célula utilizando várias estratégias de ancoragem, suprimindo, assim, a necessidade de purificação da enzima e facilitando a limitação de transporte.²⁸

Um esquema utilizado para ancorar enzimas na membrana de células de micro-organismos foi descrita por Richins como um sistema de fusão de genes, no qual a sequência de sinal e os primeiros nove aminoácidos da lipoproteína (Lpp) se unem a um domínio de membrana para o exterior da membrana da proteína A (OmpA), o qual foi fundido com a enzima de interesse. Este sistema foi utilizado pela primeira vez para a ancoragem da β -lactamase na superfície de células. Utilizando o mesmo sistema de fusão Lpp-OmpA usado para β -lactamase, a enzima OPH foi ancorada com êxito na superfície de células da *Escherichia coli* (Figura 15).⁶²

Neste estudo foi demonstrado que as culturas de *E. coli* com OPH expressas na superfície degradaram paration e paraoxon de forma muito eficaz, sem a limitação de transporte observada em células que expressam OPH intracelularmente.^{62,63} Células totais de *E. coli* com OPH expressas na superfície apresentaram uma atividade sete vezes maior do que as células totais expressas em quantidades semelhantes de OPH intracelularmente, além disso, as células com enzimas ancoradas demonstraram-se mais estáveis e robustas que enzimas OPHs purificadas, mantendo 100% de atividade ao longo de um período de um mês, quando incubada a 37 °C.⁶³

Figura 15. Esquema de ancoramento das enzimas organofosforado hidrolases na superfície da células.

Fonte: CHEN, W.; MULCHANDANI, A. The use of live biocatalysts for pesticide detoxification. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 71-76, 1998.

1.2.4.1 Degradação bacteriana dos pesticidas organofosforados

A degradação bacteriana dos organofosforados tem sido mais estudada do que a degradação fúngica. A enzima PTE mais explorada, a OPH, é codificada pelo gene *opd* (organophosphate-degrading – organofosforado-degradante) da bactéria *Flavobacterium* sp. ATCC 27551 e *Pseudomonas diminuta* MG.^{64,55,37} A enzima OPH nativa contém dois íons Zn^{2+} , mas ambos os cátions bivalentes podem ser substituídos por Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} ou Mn^{2+} , sem perda de atividade catalítica Figura 16.^{65,24}

O mecanismo catalítico proposto para a enzima é mostrado na Figura 17. Como mencionado anteriormente na Figura 13 o estado de transição deste mecanismo envolve trazer o átomo central de fósforo perto de um grupo hidroxila do sítio ativo e a formação de uma espécie de fósforo pentavalente, com a formação de um complexo entre o metal (Zn^{2+}) e o substrato de organofosfato.³²

Figura 16. a) Estrutura cristalina da enzima OPH. b) Sítio ativo metal-dependente da enzima OPH (esferas cinzas representam os átomos de zinco).

Fonte: BIGLEY, A. N.; RAUSHEL, F. M. Catalytic mechanisms for phosphotriesterases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics**, 2012.

Figura 17. Mecanismo de catálise da enzima organofosforado hidrolase.

Fonte: BIGLEY, A. N.; RAUSHEL, F. M. Catalytic mechanisms for phosphotriesterases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics**, 2012.

OPH tem amplo substrato de atividade hidrolítica para os organofosforados e é capaz de clivar várias ligações fósforo-éster (P-O, P-CN, P-F, P-S).³⁷ Outra enzima altamente similar foi identificada na bactéria do solo, *Agrobacterium radiobacter* (OpdA). Como a OPH, OpdA exibe extraordinária eficiência catalítica para PO, por exemplo, a k_{cat}/K_m da OpdA para o pesticida metil paration é da ordem de $3 \times 10^6 \text{ s}^{-1} \text{ M}^{-1}$.^{24,32}

Algumas espécies bacterianas, como a *Pseudomonas diminuta*, *Flavobacterium* sp. e *Escherichia coli*, possuem a enzima OPH, que desempenha um papel importante na degradação de PO, uma vez que as taxas de hidrólise enzimática são 40-2450 vezes mais

rápida do que a hidrólise química (0,1 N NaOH a 40°C) e a atividade desta enzima é estável a temperaturas de até 45-50°C.^{62,55}

Embora a reação de hidrólise enzimática, na maioria dos casos, reduz a toxicidade dos PO, convertendo-os em metabólitos menos tóxicos, estes metabólitos apresentam, também, uma fonte potencial de contaminação do meio ambiente. Um mecanismo de degradação completa de pesticida muito interessante foi proposta por Matozzi, o qual descreveu a hidrólise do paraoxon e a mineralização dos produtos de hidrólise em fontes de carbono e de fósforo, através de uma estirpe da bactéria geneticamente modificada *Pseudomonas putida*. Estudos anteriores relataram que a hidrólise do paraoxon a PNF e dietil fosfato (DEF), por meio da OPH de uma estirpe da bactéria *Flavobacterium* sp. ATCC 27551, reduziu a toxicidade do pesticida em até 100 vezes.⁶⁶

Embora o PNF seja muito menos tóxico do que paraoxon, este é ainda classificado como um contaminante persistente e tóxico. No ambiente, PNF é degradado por poucos micro-organismos, entre estes, principalmente pela bactéria *Moraxella* sp. e *Pseudomonas* sp. O metabólito DEP tem sido ignorado, porque é relativamente inerte no meio ambiente. A mineralização completa do paraoxon, incluindo a degradação de seus produtos de hidrólise, envolve um mecanismo enzimático complexo e é iniciada com a hidrólise do pesticida a partir da OPH da *Flavobacterium* sp. para os dois intermediários primários, DEF e PNF. DEF é ainda convertido a ortofosfato por uma reação enzimática com a fosfodiesterase (FDE) de *Delftia acidovorans*, seguido por uma reação com uma fosfatase alcalina (PhoA) da *Pseudomonas aeruginosa*. PNF é convertida para β -cetoadipato por um processo que envolve cinco enzimas (codificadas como PNFA, PNFB, PNFC, PNFD e PNFE) da cepa *Pseudomonas* sp. ENV2030. O β -cetoadipato entra no ciclo do ácido tricarboxílico como succinil-CoA e acetil-CoA, após conversão pela *Pseudomonas putida* nativa para β -cetoadipato, succinil-CoA transferase (TR) e β -cetoadipil-tiolase (TH) (Figura 18).⁶⁶

Figura 18. Biodegradação do paraoxon por bactérias geneticamente modificadas.

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

Desta forma, tem-se observado que por diferentes vias as enzimas bacterianas são capazes de degradar completamente os PO. Outras enzimas bacterianas capazes de degradar esta classe de pesticidas incluem a MPH e OPAA. Yang relatou estudos sobre a ancoragem da enzima MPH na superfície de *Pseudomonas putida* JS444. Nestes estudos, as células de *P. putida* JS444 com MPH expressa na superfície apresentaram maior atividade para dimetil-PO, tais como o metil paration e fenitrothion, do que as células contendo enzimas OPH expressas na superfície, demonstrando que a *P. putida* JS444 com MPH expressas na superfície pode ser uma boa opção de baixo custo para a biorremediação de poluição causada por dimetil-PO (Figura 19).²⁸

Figura 19. Degradação do metil paration and fenitrothion por *P. putida* JS444.

Fonte: YANG, C.; CAI, N.; DONG, M.; JIANG, H.; LI, J.; QIAO, C.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Surface display of MPH on *Pseudomonas putida* JS444 using ice nucleation protein and its application in detoxification of organophosphates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 1, p. 30-37, 2008.

1.2.4.2 Degradação fúngica dos pesticidas organofosforados

Os fungos são conhecidos por degradar uma ampla variedade de compostos. Neste processo, conhecido como micodegradação, o composto é degradado em moléculas menores que podem ser tóxicos ou não tóxicos, ou ainda, a molécula de pesticida pode ser removida por um simples mecanismo de absorção ou adsorção.⁶⁷ As bactérias têm sido usadas para quebrar a ligação carbono-fósforo e sua capacidade para a degradação de PO é bem estabelecida. Estudos de degradação bacteriana propuseram mecanismos possíveis para a degradação de PO,⁴⁷ no entanto, o mecanismo de degradação fúngica destes compostos é, ainda, bem menos estabelecido do que com as bactérias, uma vez que há poucos relatos da degradação de PO por fungos.

Os fungos filamentosos do gênero *Aspergillus* foram utilizados na biodegradação de PO. *Aspergillus niger* apresentou alta atividade de biodegradação para o pesticida malation.⁶⁷ *Aspergillus flavus* e *Aspergillus sydowii* foram capazes de degradar malation, pirimifós-metil e pirazofós, mesmo em concentrações elevadas (1000 ppm) e utilizá-los como única fonte de carbono e fósforo, liberando as porções fosfato pela ação das suas enzimas fosfatases. Nestes estudos, as espécies de fungos apresentaram tanto fosfatase alcalina quanto ácida, obtendo-se a destoxificação hidrolítica destes pesticidas (Figura 20).⁶⁸

Figura 20. Possível degradação dos pesticidas pirimifos-metil, pirazofos e malation por *A. flavus* or *A. sydowii*.

Como demonstrado para as bactérias, há estudos em que as espécies de fungos são modificadas geneticamente para promover um aumento das taxas de degradação dos PO. Tang e colaboradores estudaram 247 transformantes de estirpes do fungo *Trichoderma atroviride* T23 para a degradação do pesticida diclorvós. As taxas de degradação de diclorvós com os transformantes variaram entre 81% a 96%, em comparação com 72% para a estirpe nativa (Figura 21).⁶⁹

Figura 21. Degradação de diclorvos por *T. atroviride* T23.

O mecanismo enzimático para a transformação de PO por vários fungos de podridão branca (basidiomicetos), foi estudado por Jauregui. Neste estudo o paration foi totalmente degradado por 18 cepas de fungos de podridão branca produtores de enzimas ligninolíticas e as três melhores linhagens foram selecionadas (*Bjerkandera adusta* 8258, *Pleurotus ostreatus* 7989, *Phanerochaete chrysosporium* 3641) para a degradação de paration, terbufós, azinfós-metil, fosmete e tribufos. Todos os PO avaliados foram degradados pelas três linhagens de fungos, mesmo aqueles contendo ligações tioéter, que tornam o pesticida resistente à biotransformação bacteriana. Frações microsossomais obtidas a partir de *P. ostreatus* 7989 foram utilizados na biodegradação dos vários PO (azinfós-metil, fosmete, malation, terbufos,

triclorfon) e seus produtos de degradação foram identificados por CG-EM (Figura 22). Como discutido anteriormente, alguns PO podem ser transformados por bactérias *Pseudomonas diminuta* e *Flavobacterium* sp., no entanto estas enzimas bacterianas têm uma capacidade limitada para clivar a ligação tioéter presente em vários PO. Para estas e outras categorias de pesticidas, a biotransformação fúngica pode ser uma estratégia mais promissora que a degradação bacteriana.³⁵

Figura 22. Biodegradação de OP por fração microsomal de *Pleurotus ostreatus* 7989.

Fonte: JAUREGUI, J.; VALDERRAMA, B.; ALBORES, A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Microsomal transformation of organophosphorus pesticides by white rot fungi. **Biodegradation**, v. 14, n. 6, p. 397-406, 2003.

1.2.4.3 Outros tipos de biodegradação dos pesticidas organofosforados

Além da degradação por bactérias e fungos, enzimas de outros organismos são capazes de degradar os PO. Na família das carboxilesterases, Esterase 3 (E3) é um enzima α,β -hidrolase obtida a partir da mosca varejeira *Lucilia cuprina*. As espécies *Lucilia cuprina* e *Lucilia sericata* se tornaram ectoparasitas primários de ovelhas ao redor do mundo. Inseticidas organofosforados foram amplamente utilizados para controlá-las, no entanto, elas desenvolveram uma resistência contra esses inseticidas. E3 é responsável pela destoxificação mediada pela resistência a PO em *L. cuprina*. A resistência foi atribuída a recentes mutações na esterase E3, associados com resistência ao diazinon e malation, afetando a atividade da

enzima. A mutação causada por resistência ao diazinon confere uma nova atividade hidrolase para organofosforados sobre a enzima. A mutação também suprime a atividade carboxilesterase da enzima nativa que, em seguida, tem uma maior atividade para os fosfotriésteres dietil-substituídos, como o diazinon, do que os dimetil-substituídos.

Em contraste, a mutação causada por resistência ao malation confere um nível mais baixo de atividade hidrolítica para PO e tem menor efeito sobre a atividade carboxilesterase, apresentando atividade específica contra PO dimetil-substituídos, tais como, malaoxon e malation, apresentando uma k_{cat} de até $0,061 \text{ min}^{-1}$ (Figura 23).^{70,24}

Figura 23. Possível biodegradação de pesticidas organofosforados por esterases de *L. cuprina*.

Paraoxonase/arilesterase de soro humano e de muitas outras espécies de mamíferos catalisam a hidrólise de organofosforados, ácidos carboxílicos aromáticos e, eventualmente, carbamatos.⁷¹ Paraoxonase (PON1), é denominada desta forma porque o paraoxon é o substrato comumente usado para medir sua atividade enzimática.⁷² A estrutura cristalina da família PON1 são hidrolases que contêm cálcio e apresentam ampla especificidade ao substrato, sendo capaz de hidrolisar γ - e δ -lactonas, vários aril ésteres e uma ampla variedade de organofosforados. Entre os organofosforados hidrolisados por PON1 estão os agentes neurotóxicos como sarin, soman, tabun, ciclosarin e VX (Figura 5), e os inseticidas paraoxon, diazinon e clorpirifós. Uma vez que muitos dos compostos que podem ser hidrolisados por PON1 são substratos não fisiológicos, estas atividades não são suscetíveis a ser as funções fisiológicas da PON1. Investigações sugerem que a hidrólise de lactonas é a atividade natural desta enzima.^{73,32}

A diisopropilfluorofosfatase (DFPase) é encontrada em nervos de cefalópodes, hepatopâncreas e salivas de lula.⁷⁴ Estruturalmente semelhante a PON1, a DFPase também é uma hidrolase contendo cálcio e facilmente hidrolisa o organofosforado diisopropilfluorofosfato (DFP), bem como os agentes neurotóxicos como sarin, soman e ciclosarin, além do PO que contém o grupo ciano, o agente neurotóxico tabun (Figura 24). A atividade principal da DFPase inicialmente é a hidrólise de ligações PF e P-CN, sendo inerte frente as ligações P-O ou P-S.³²

Figura 24. Reação de hidrólise das ligações P-F por DFPase.

O mecanismo proposto para a clivagem do fosfotriéster por PON1 e DFPase é mostrado na Figura 25. De acordo com Bigley e Raushel, estas enzimas possuem dois íons cálcio localizados no núcleo da estrutura enzimática. O cálcio localizado mais no interior é comumente referido como cálcio estrutural e é necessário para manter a dobra da enzima, mas acredita-se que não represente nenhum papel na catálise. Este mecanismo é único entre as fosfotriesterases e apenas um único íon metálico do sítio ativo é utilizado, neste caso, o íon cálcio exposto.³²

Os perfis de pH de ambas as enzimas indicam que um único aminoácido da cadeia lateral do grupo carboxilato deve ser desprotonado em pKa de 7 e na proposta para este mecanismo é um simples ataque por uma molécula de íon, tal como observado em OPH. Em seguida, a base desprotonada promove um ataque nucleofílico ao átomo de fósforo. Embora este mecanismo pareça ser o ideal para a atividade de PON1 para esterases e lactonases, em ambos, DFPase e PON1, a base catalítica não é necessária para a atividade fosfotriesterase.

Na Figura 25, o R_1 e/ou R_2 são ésteres ligados a álcool ou grupos metilas. L é um grupo de saída, o qual é um flúor para a DFPase e um flúor, fenol ou tiol para PON1.³²

Figura 25. Mecanismo proposto para a reação catalisada por PON1 e DFPase.

Fonte: BIGLEY, A. N.; RAUSHEL, F. M. Catalytic mechanisms for phosphotriesterases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics**, 2012.

A resistência aos PO associada às enzimas naturais de seres vivos proporcionam uma destoxificação *in vivo*, bem como diversas fontes de enzimas capazes de degradar estes pesticidas. Estas pesquisas são importantes para melhor compreender o mecanismo de envenenamento por PO em seres vivos, a fim de determinar as enzimas e as mutações genéticas envolvidas neste processo. Estes estudos, em conjunto com a biodegradação bacteriana e fúngica, descrita anteriormente, demonstram a existência de várias vias e organismos capazes de degradar os compostos organofosforados em diferentes níveis, desde a hidrólise até a mineralização completa do pesticida, proporcionando várias estratégias para a destoxificação desta classe de compostos.

1.3 Organismos marinhos como potenciais fontes de enzimas

Mares e oceanos constituem um dos maiores ecossistemas do Planeta, cobrindo aproximadamente 75% da superfície terrestre.⁷⁵ O habitat marinho é fonte de produtos naturais e de enzimas capazes de serem utilizadas na indústria farmacêutica ou possuindo características singulares para aplicações biotecnológicas.⁷⁶

Devido a imensa biodiversidade apresentada por este bioma, apenas uma pequena porcentagem do potencial marinho tem sido efetivamente explorada cientificamente. Os organismos marinhos em geral (fungos, bactérias, algas, esponjas, peixes, camarões e outros crustáceos) podem ser fontes ricas de novas enzimas, mas os poucos estudos de atividades de bioprospecção são voltados às enzimas microbianas.^{77,76} O uso de enzimas marinhas de

micro-organismos simbióticos e extremófilos para a utilização em processos biocatalíticos foi relatado na década de 90.⁷⁵

Enzimas de origem marinha apresentam propriedades únicas, uma vez que são derivadas de organismos cujo habitat natural é salino ou de água salobra.^{77,76} Estas enzimas podem ser biocatalisadores, com propriedades únicas, tais como tolerância à elevada salinidade, hipertermoestabilidade, barofilicidade e adaptabilidade ao frio. Os micro-organismos isolados a partir de sedimentos do oceano e água do mar são as fontes mais estudados de enzimas marinhas, especialmente as enzimas proteases, carboidrases e peroxidases.⁷⁸ Enzimas identificadas a partir de micro-organismos extremófilos também incluem enzimas com atividade proteolítica, lipolítica e diferentes álcool-desidrogenases.⁷⁶

Reações enzimáticas catalisadas por fungos marinhos podem ser utilizados quando estes fungos são cultivados em meios que simulam a água do mar. Os fungos marinhos *Aspergillus sydowii* CBMAI 933, *Penicillium raistrickii* CBMAI 931, *Penicillium miczynskii* CBMAI 930 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932, cultivadas em água do mar artificial foram capazes de catalisar a hidrólise do benzil glicidil de éter.⁷⁹ Resultados semelhantes foram observados em um estudo de produção de enzimas ligninolíticas pelos fungos marinhos *Aspergillus sclerotiorum* CBMAI 849, *Cladosporium cladosporioides* CBMAI 857 e *Mucor racemosus* CBMAI 847.⁸⁰ Outros estudos têm mostrado que as bactérias e os fungos marinhos cultivados em laboratório têm exigências específicas para os sais, especialmente os íons sódio, potássio, magnésio e cloreto.^{81,82,83,79}

Estudos na biodegradação de pesticidas por fungos marinhos foram reportados anteriormente pelo Grupo de Química Orgânica e Biocatálise. O pesticida organoclorado, DDT, foi completamente biodegradado pelo fungo de origem marinha *Trichoderma* sp. CBMAI 932 na presença de peróxido de hidrogênio.⁸⁴ Aliado ao potencial de aplicações das enzimas de micro-organismos marinhos e a pouca exploração da biodegradação de pesticidas organofosforados por fungos, este trabalho apresenta uma nova abordagem na degradação dos PO com promissores resultados através da degradação de clorpirifós, metil paration e profenofós por diferentes espécies de fungos marinhos.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estudar a biodegradação dos pesticidas organofosforados clorpirifós, metil paration e profenofós na presença de fungos de origem marinha.

2.2 Específicos

- ❖ Realizar um *screening* com fungos de origem marinha frente aos pesticidas organofosforados clorpirifós, metil paration e profenofós para explorar o potencial biocatalítico destes micro-organismos em meio sólido.
- ❖ Realizar os estudos de biodegradação dos pesticidas organofosforados por fungos marinhos em meio líquido de malte 2% e em meio mineral.
- ❖ Verificar a biodegradação dos possíveis metabólitos dos pesticidas organofosforados na presença de fungos marinhos em meio líquido de malte 2%.
- ❖ Estimar a quantificação da degradação tanto dos pesticidas organofosforados, quanto dos metabólitos fenólicos correspondentes.
- ❖ Propor a rota de biodegradação dos pesticidas organofosforados a partir das análises dos produtos metabolizados por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes, solventes e meio de cultura

Reagentes: profenofós, clorpirifós, metil paration, 4-bromo-2-clorofenol, 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) e 4-nitrofenol (Sigma Aldrich), nitrato de potássio (Cromato Produtos Químicos), sais utilizados para preparação da água do mar artificial (Synth, Merck e/ou Vetec). *Solventes:* Metanol e Acetato de Etila (Synth), Metanol e Acetato de Etila grau cromatográfico (Tedia Brasil). *Meio de cultura:* extrato de malte (Acumedia) e ágar (Himedia).

3.2 Pesticidas comerciais

O pesticida clorpirifós foi obtido comercialmente de Dow AgroSciences sob nome comercial “Lorsban 480 BR”, metil paration foi obtido de Agripec sob nome comercial “Folisuper 600 BR” e profenofós foi obtido de Syngenta sob nome comercial “Polytrin 400/40 CE”. Estes pesticidas comerciais foram gentilmente doados pelo Prof. Dr. Marcos Roberto de Vasconcelos Lanza (Instituto de Química de São Carlos/USP).

Figura 26. Estruturas dos pesticidas clorpirifós, metil paration e profenofós.

3.3 Equipamentos

3.3.1 Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM)

As análises por cromatografia a gás acoplada do 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). 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 µm). O gás de arraste

foi o hélio a 63 kPa. As análises foram feitas, também, em aparelho da mesma marca e modelo no laboratório da Profa. Dra. Maria Olímpia de Oliveira Rezende (IQSC).

3.3.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

As análises por CLAE foram realizadas em aparelho da marca Shimadzu modelo Prominence, equipado com bomba LC-20AT, detector SPD-M20A (UV/VIS), degaseificador DGU-20A₃, central de controle CBM-20AV, injetor automático Sil-20A e forno CTO 20-A.

3.3.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE-EM)

As análises por CLAE-EM foram realizadas no laboratório do Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças (IQSC) em cromatógrafo líquido de alta resolução da marca Shimadzu Prominence modelo 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 Burkholder modelo Microtof-Q, equipado com um detector híbrido quadrupolo/Tof, no modo de ionização eletrospray.

3.3.4 Outros equipamentos

Balança analítica modelo AY-220 da marca Shimadzu, pHmetro modelo 8010 da marca Qualxtron, autoclave vertical modelo Phoenix, capela de fluxo laminar marca Veco, vortex Motion da Logen Scientific, centrífuga da Hermle Z 200 A, rota-evaporadores Fisaton e Tecnal T-210 equipados com bomba de vácuo TE-058 e refrigeração Tecnal Modelo TE-2005, agitadores rotativos modelo Tecnal TE-421, Superohm G-25 ou SI-600R da Analítica, Câmara de Neubauer (*Neubauer Improved bright-line*) da marca HBG.

3.4 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 *Aspergillus sydowii* CBMAI 934, *Penicillium raistrickii* CBMAI 931 e *Aspergillus sydowii* CBMAI 935 foram isolados da esponja *Chelonaplysilla erecta*; *Penicillium*

raistrickii CBMAI 1235, *Penicillium decaturense* CBMAI 1234 e *Apergillus sydowii* 1241 foram isolados da esponja *Dragmacidon reticulata*; *Trichoderma* sp. CBMAI 932 foi isolado da esponja *Geodia corticostylifera*. Os fungos foram identificados e depositados na Coleção Brasileira de Micro-organismos de Meio Ambiente e Indústria (CBMAI – CPQBA/UNICAMP).

3.4.1 Crescimento dos micro-organismos

3.4.1.1 Composição de sais para preparo da água do mar artificial

Para um litro de água do mar artificial: $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (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 (100,0 mg), $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (40,0 mg), H_3BO_3 (30,0 mg).

3.4.1.2 Composição e preparo dos meios de cultura

i) *Meio líquido de malte 2%*: Em um béquer de 2,0 L foram adicionados 1,0 L de água do mar artificial e 20,0 g de extrato de malte. A solução foi submetida a agitação magnética e o pH foi ajustado para 7 com uma solução de HCl 1,0 M.

ii) *Meio sólido de malte 2%*: Em um béquer de 2,0 L foram adicionados 1,0 L de água do mar artificial, 20,0 g de extrato de malte e 20,0 g de ágar. A solução foi submetida a agitação magnética e o pH foi ajustado para 5 com uma solução de HCl 1,0 M.

iii) *Meio líquido mineral suplementado com nitrato de potássio*: Em um béquer de 2,0 L foram adicionados 1,0 L de água do mar artificial e 12,5 mg de nitrato de potássio (12,5 ppm). A solução foi submetida a agitação magnética e o pH foi ajustado para 7 com uma solução de HCl 1,0 M.

iv) *Esterilização dos meios de cultura e preservação das cepas fúngicas*: Os meios de cultura foram submetidos a esterilização em autoclave por 20 minutos (121°C, 1,5 kPa). Em uma capela de fluxo laminar previamente esterilizada com luz ultravioleta e solução de ácido hipocloroso 1%, os meios de cultura foram vertidos em placas de Petri.

As placas com meio sólido de extrato de malte 2% foram utilizadas para a preservação das culturas puras dos fungos para repiques posteriores em meios líquidos frente aos estudos de seleção dos micro-organismos e biodegradação dos pesticidas. Após o cultivo em estufa (até observação de um bom crescimento de cada micro-organismo) as cepas foram estocadas sob refrigeração a 4°C e repiques para manutenção destas foram realizados a cada três meses.

3.4.2 Seleção dos fungos em meio de cultura sólido de malte 2% frente aos pesticidas clorpirifós, metil paration e profenofós

Inicialmente foi realizado um *screening* com os fungos *Aspergillus sydowii* CBMAI 934, *Penicillium raistrickii* CBMAI 931, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Penicillium raistrickii* CBMAI 1235, *Penicillium decaturense* CBMAI 1234, *Apergillus sydowii* CBMAI 1241 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932 na presença e ausência dos pesticidas, e em diferentes quantidades de pesticidas. Para cada fungo, foram preparadas quatro placas, uma na ausência do pesticida (placa controle) e as demais, com diferentes concentrações de pesticida comercial. Após a esterilização do meio, este foi resfriado até 40-50°C e foram adicionados os pesticidas (5,0 µL de pesticida/100,0 µL de DMSO, 10,0 µL de pesticida/200,0 µL de DMSO e 15,0 µL de pesticida/ 300,0 µL de DMSO), em cada placa. Com o meio sólido à temperatura ambiente, foram realizados os repiques, transferindo-se com o auxílio de uma agulha de inoculação os esporos e micélios dos fungos previamente cultivados em placas de Petri com extrato de malte 2% que forneceram as culturas puras. Os repiques foram realizados em 5 pontos diferentes da placa de Petri. A placa permaneceu em estufa a uma temperatura de 35°C por 10 dias, observando-se o crescimento dos fungos na placa controle e nas placas com cada pesticida durante este período. Estes ensaios foram realizados em duplicatas para cada um dos pesticidas utilizados.

3.4.3 Padronização dos inóculos dos fungos filamentosos por suspensão de esporos para as reações com o pesticidas clorpirifós e metil paration

3.4.3.1 Preparo dos tubos inclinados em meio de cultura sólido de malte 2% para o crescimento dos fungos

Para cada fungo *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932 induzido por clorpirifós, *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234 induzido por metil paration, foram preparados 14 tubos de ensaio contendo o meio de cultura de malte 2% na presença do pesticida comercial. Após a esterilização de 120,0 mL de meio, este foi resfriado até 40-50°C e foram adicionados o pesticida comercial (12,3 µL para clorpirifós e 6,5 µL para metil paration), com uma concentração final de 50,0 ppm. Foram vertidos aproximadamente 8,0 mL de meio de cultura em cada tubo de ensaio. Ainda com o meio de cultura quente e

líquido, os tubos foram apoiados em suportes, de modo que, em temperatura ambiente o meio de cultura, já sólido, ficasse inclinado no tubo de ensaio (Figura 27).

Com o meio sólido à temperatura ambiente, foram realizados os repiques, transferindo-se com o auxílio de uma agulha de inoculação os esporos e micélios dos fungos previamente cultivados em placas de Petri com extrato de malte 2% que forneceram as culturas puras. Os repiques foram realizados na forma de estrias pelo meio de cultura no tubo de ensaio. Os tubos permaneceram em estufa a uma temperatura de 35 °C por 7 dias e, em seguida, foi feita a preparação para contagem dos esporos.

Figura 27. Tubos inclinados contendo o fungo após 7 dias de crescimento.

3.4.3.2 Preparação da suspensão de esporos

A preparação da solução de esporos foi realizada individualmente para cada fungo, na presença de clorpirifós e metil paration. A cada tubo de ensaio contendo os fungos previamente cultivados na presença do pesticida comercial foram adicionados 5,0 mL de uma solução de Tween 80 (0,5%). Com o auxílio de uma agulha de inoculação, os esporos e micélios dos fungos foram coletados do meio de cultura sólido, sendo transferidos para a solução de Tween. As soluções de Tween contendo os esporos e micélios foram transferidas para um único frasco Erlenmeyer de 250,0 mL contendo pérolas de vidro.

A solução de esporos foi agitada e em seguida filtrada em um sistema de funil, contendo lã de vidro, acoplado a frascos de penicilina de 10,0 mL (Figura 28). Em cada frasco de penicilina foram adicionados aproximadamente 5,0 mL da solução filtrada e 5,0 mL de água destilada esterilizada. Os frascos foram submetidos a centrifugação em centrífuga da marca Hermle Z 200 A (10 min, 4600 rpm) e o sobrenadante foi descartado. A etapa de lavagem

com água destilada esterilizada, seguida por centrifugação, foi realizada quatro vezes até a remoção completa do Tween da solução de esporos (Esquema 1).

Figura 28. Sistema para a filtração dos esporos na suspensão.

3.4.3.3 Contagem dos esporos na suspensão

Com o auxílio de uma micropipeta, a suspensão de esporos foi transferida para a Câmara de Neubauer (*Neubauer Improved bright-line*) da marca HBG e, em seguida, coberta com lamínula. A contagem foi feita em Microscópio óptico da marca Zeiss modelo Primo-Star no laboratório da Prof. Dra Márcia Nitschke (IQSC). Para garantir a confiabilidade dos dados, a contagem foi realizada em quadrados pré-estipulados para todas as cepas fúngicas. Foram feitas as contagens em 20 quadrados do bloco central (maior número de divisões) para cada uma das duas câmaras contendo a suspensão de esporos, totalizando 40 quadrados contados para cada fungo (Figura 29).

Figura 29. Esquema de ampliação dos blocos de uma câmara de Neubauer.

A densidade, expressa em células/mL pode ser calculada de acordo com a Equação 1.

Equação 1. Equação para o cálculo da densidade de esporos na solução.

$$D = \frac{\text{nº de esporos contados}}{Nq \times 4 \times 10^6}$$

Onde,

Nq = números de quadrados contados nas duas câmaras

4×10^{-6} = volume da amostra sobre a área do quadrado ($0,004 \text{ mm}^3$) expressa em mL (cm^3).

Esquema 1. Fluxograma das etapas de preparação da suspensão de esporos.

3.5 Curvas analíticas para a quantificação dos pesticidas e seus metabólitos

3.5.1 Curva analítica de profenofós e 4-bromo-2-clorofenol pela técnica de padronização interna

3.5.1.1 Preparo de soluções estoques de 500,0 ppm

Solução de clorpirifós (padrão interno): Em um balão volumétrico de 10,0 mL foram solubilizados 5,0 mg (1,43 mmol) de padrão analítico de clorpirifós em acetato de etila grau cromatográfico.

Solução de profenofós: Em um balão volumétrico de 10,0 mL foram solubilizados 3,4 µL (1,32 mmol) de padrão analítico de profenofós em acetato de etila grau cromatográfico.

Solução de 4-bromo-2-clorofenol: Em um balão de volumétrico 10,0 mL foram solubilizados 5,0 mg (2,41 mmol) de padrão analítico 4-bromo-2-clorofenol em acetato de etila grau cromatográfico.

3.5.1.2 Preparo das soluções de trabalho

As soluções de trabalho foram preparadas em balões volumétricos de 10,0 mL a partir das soluções estoques de 500,0 ppm, utilizando como solvente acetato de etila grau cromatográfico. A concentração determinada para o padrão interno (clorpirifós) foi de 30,0 ppm, assim, esta concentração foi fixa para todas as soluções de trabalho. Cinco diferentes concentrações de profenofós e do metabólito (4-bromo-2-clorofenol) foram preparadas: 5,0, 10,0, 20,0, 30,0 e 50,0 ppm.

Tabela 2. Dados para obtenção da curva analítica para o profenofós e 4-bromo-2-clorofenol.

Concentração da solução de trabalho (ppm)	Volume de profenofós (µL)	Volume de 4-bromo-2-clorofenol (µL)	Volume do padrão interno – clorpirifós (µL)
5,0	100,0	100,0	600,0
10,0	200,0	200,0	600,0
20,0	400,0	400,0	600,0
30,0	800,0	800,0	600,0
50,0	1000,0	1000,0	600,0

Cada solução de trabalho foi analisada em triplicata: foram retiradas 3 alíquotas de 1,0 mL e transferidas para 3 vials, respectivamente. As soluções de trabalho foram analisadas em CG-EM-SIM.

3.5.2 Curva analítica de clorpirifós e 3,5,6-tricloro-2-piridinol pela técnica de padronização externa

3.5.2.1 Preparo de soluções estoques de 5000,0 ppm

Solução de clorpirifós: Em um balão volumétrico de 10,0 mL foram solubilizados 50,0 mg (14,26 mmol) de padrão analítico de clorpirifós em metanol grau cromatográfico.

Solução de 3,5,6-tricloro-2-piridinol: Em um balão volumétrico de 10,0 mL foram solubilizados 50,0 mg (25,20 mmol) de padrão analítico de 3,5,6-tricloro-2-piridinol em metanol grau cromatográfico.

3.5.2.2 Preparo das soluções de trabalho

As soluções de trabalho foram preparadas em balões volumétricos de 10,0 mL a partir das soluções estoques de 5000,0 ppm, utilizando como solvente metanol grau cromatográfico. Oito diferentes concentrações de clorpirifós e do metabólito 3,5,6-tricloro-2-piridinol, foram preparadas: 5,0, 50,0, 100,0, 200,0, 300,0, 450,0, 500,0 e 550,0 ppm.

Tabela 3. Dados para obtenção da curva analítica para clorpirifós e 3,5,6-tricloro-2-piridinol.

Concentração da solução de trabalho (ppm)	Volume de clorpirifós (µL)	Volume de 3,5,6-tricloro-2-piridinol (µL)
5,0	10,0	10,0
50,0	100,0	100,0
100,0	200,0	200,0
200,0	400,0	400,0
300,0	600,0	600,0
450,0	900,0	900,00
500,0	1000,0	1000,0
550,00	1100,0	1100,0

Cada solução de trabalho foi analisada em triplicata: foram retiradas 3 alíquotas de 1,0 mL e transferidas para 3 vials, respectivamente. As soluções de trabalho foram analisadas por CLAE.

3.5.3 Curva analítica de metil paration e 4-nitrofenol pela técnica de padronização externa

3.5.3.1 Preparo de soluções estoques de 5000,0 ppm

Solução de metil paration: Em um balão volumétrico de 10,0 mL foram solubilizados 50,0 mg (19,00 mmol) de padrão analítico de metil paration em metanol grau cromatográfico.

Solução de 4-nitrofenol: Em um balão volumétrico de 10,0 mL foram solubilizados 50,0 mg (35,94 mmol) de padrão analítico de 4-nitrofenol em metanol grau cromatográfico.

3.5.3.2 Preparo das soluções de trabalho

As soluções de trabalho foram preparadas em balões volumétricos de 10,0 mL a partir das soluções estoques de 5000,0 ppm, utilizando como solvente metanol grau cromatográfico.

Dez diferentes concentrações de metil paration e do metabólito (4-nitrofenol) foram preparadas: 5,0, 50,0, 100,0, 200,0, 300,0, 450,0, 500,0, 550,0, 600,0 e 650,0 ppm.

Tabela 4. Dados para obtenção da curva analítica para metil paration e 4-nitrofenol.

Concentração da solução de trabalho (ppm)	Volume de metil paration (µL)	Volume de 4-nitrofenol (µL)
5,0	10,0	10,0
50,0	100,0	100,0
100,0	200,0	200,0
200,0	400,0	400,0
300,0	600,0	600,0
450,0	900,0	900,0
500,0	1000,0	1000,0
550,0	1100,0	1100,0
600,0	1200,0	1200,0
650,0	1300,0	1300,0

Cada solução de trabalho foi analisada em triplicata: foram retiradas 3 alíquotas de 1,0 mL e transferidas para 3 vials, respectivamente. As soluções de trabalho foram analisadas por CLAE.

3.6 Avaliação da concentração do ingrediente ativo dos pesticidas nas amostras comerciais

3.6.1 Profenofós

Em um balão volumétrico de 100,0 mL, foram solubilizados 20,0 µL do pesticida comercial profenofós e 60,0 µL (2,40 mmol) da solução estoque 500,0 ppm de clorpirifós (30,0 ppm de padrão interno) em acetato de etila grau cromatográfico. Foram preparadas duplicatas seguindo esta descrição, duas alíquotas de cada duplicata foram transferidas para vials e analisadas por CG-EM-SIM.

3.6.2 Clorpirifós

Em um balão volumétrico de 25,0 mL, foram solubilizados 2,0 µL do pesticida comercial clorpirifós em metanol grau cromatográfico. Foram preparadas duplicatas seguindo esta descrição, duas alíquotas de cada duplicata foram transferidas para vials e analisadas por CLAE.

3.6.3 Metil Paration

Em um balão volumétrico de 25,0 mL foram solubilizados 2,0 µL do pesticida comercial metil paration em metanol grau cromatográfico. Foram preparadas duplicatas seguindo esta descrição, duas alíquotas de cada duplicata foram transferidas para vials e analisadas em CLAE.

3.7 Reações de biodegradação

3.7.1 Reação de biodegradação do pesticida profenofós pelos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. raistrickii* CBMAI 931

3.7.1.1 Reação entre o pesticida comercial profenofós e os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. raistrickii* CBMAI 931

Foram preparados 12 frascos Erlenmeyer contendo 100,0 mL de meio de cultura líquido de malte 2% (pH 7), previamente esterilizado. Em 6 frascos Erlenmeyer, foram adicionados os inóculos do fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 transferindo-se com o auxílio de uma espátula dois fragmentos de ágar padronizados por área (12 x 12 mm) contendo os micélios do fungo previamente cultivados na presença de 4,7 µL pesticida/placa (0,73 mmol mmol, 50,0 ppm, 7 dias). Este procedimento foi repetido para *A. sydowii* CBMAI 935 em outros seis frascos Erlenmeyer. As reações foram submetidas a agitação orbital (130 rpm), em temperatura de 32°C durante 4 dias, para promover o crescimento dos fungos. Após este período foram adicionados 18,5 µL (0,72 mmol, 50,0 ppm) do pesticida profenofós a cada frasco Erlenmeyer e estes foram novamente mantidos sob agitação orbital (130 rpm, 32°C).

Os experimentos foram cessados com 10, 20 e 30 dias de reação, sendo 2 frascos Erlenmeyer na presença de *P. raistrickii* CBMAI 931 e 2 frascos Erlenmeyer na presença do fungo *A. sydowii* CBMAI 935, a cada dez dias de reação. Em seguida, os micélios foram filtrados em funil de Buchner, promovendo a separação do caldo enzimático e as células úmidas dos fungos. Nos experimentos cessados com 10 dias o caldo enzimático e as células úmidas foram analisadas separadamente. O meio reacional foi acidificado com HCl (1 mol/L) para pH 6 e o caldo enzimático foi extraído com acetato de etila (3 x 25,0 mL) com o descarte da fase aquosa, filtrado e rotaevaporado o excesso de solvente, obtendo um volume final de 100,0 mL. As células úmidas dos fungos foram adicionadas em um frasco Erlenmeyer contendo 10,0 mL de água destilada e 10,0 mL de acetato de etila, e então submetidas à

agitação magnética durante 30 min. Em seguida, as células foram filtradas em funil de Buchner, o meio foi acidificado com HCl (1 mol/L) para pH 6 e então, realizou-se as extrações com acetato de etila (3 x 20,0 mL) com descarte da fase aquosa. As células úmidas foram colocadas em estufa para secagem (35°C, 24h) e pesadas. À fase orgânica foi adicionado Na₂SO₄ anidro, seguido de filtração e evaporação do excesso de solvente, obtendo um volume final de 100,0 mL. As amostras do caldo enzimático e da fase micelial foram submetidas a análise por CG-EM-SIM. O Esquema 2 apresenta o fluxograma de preparação e extração da fase micelial e do caldo enzimático em 10 dias de reação.

Esquema 2. Fluxograma das etapas de preparação e extração da fase micelial e caldo enzimático das reações de biodegradação de profenofós (extração dos micélios e caldo enzimático separadamente).

Nos demais experimentos, após as reações serem cessadas, foram filtradas em funil de Buchner, separando o caldo enzimático das células úmidas. As células úmidas foram adicionadas em um frasco Erlenmeyer contendo 10,0 mL de água destilada e 10,0 mL de acetato de etila, e então, foram submetidas à agitação magnética durante 30 min. As células foram filtradas em funil de Buchner e o extrato foi adicionado ao caldo enzimático, o meio foi

acidificado com HCl (1 mol/L) para pH 6 e então, foi realizada uma única extração para extrato das células úmidas e o caldo enzimático com acetato de etila (3 x 25,0 mL) com descarte da fase aquosa. As células úmidas filtradas foram colocadas em estufa para secagem (35°C, 24 h) e então pesadas. À fase orgânica foi adicionado Na₂SO₄ anidro, seguido de filtração e evaporação do excesso de solvente, obtendo um volume final de 100,0 mL, e assim as amostras foram submetidas às análises por CG-EM-SIM. O Esquema 3 apresenta o fluxograma de preparação e extração da fase micelial e caldo enzimático em 20 e 30 dias de reação.

Esquema 3. Fluxograma das etapas de preparação e extração da fase micelial e caldo enzimático das reações de biodegradação de profenofós.

3.7.1.2 Reação entre o padrão de 4-bromo-2-clorofenol e os fungos A. sydowii CBMAI 935 e P. raistrickii CBMAI 931

Foram preparados 2 frascos Erlenmeyer contendo 100,0 mL de meio de cultura líquido de malte 2% em pH 7, seguindo-se os mesmos procedimentos descritos no item 3.4.1.2. Neste caso, foi adicionado 50,0 ppm (0,24 mmol) do padrão 4-bromo-2-clorofenol e não foi adicionado o pesticida profenofós. Após 30 dias de reação, foram extraídos os experimentos. As extrações procederam de acordo com a extração descrita no item 3.7.1.1 (Esquema 3) e as amostras foram submetidas às análises por CG-EM-SIM.

3.7.1.3 Reação entre o pesticida comercial profenofós e os fungos A. sydowii CBMAI 935 e P. raistrickii CBMAI 931 em meio mineral suplementado com nitrato de potássio

Foram preparados 4 frascos Erlenmeyer contendo 100,0 mL de meio de cultura líquido mineral suplementado com nitrato de potássio em pH 7, previamente esterilizado. Após resfriar o meio até 40-50°C, foram adicionados 37,2 µL (1,44 mmol, 100,0 ppm) do pesticida profenofós nos frascos Erlenmeyer. Posteriormente, foram realizados os inóculos dos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. raistrickii* CBMAI 931, respectivamente, transferindo-se com o auxílio de uma espátula dois fragmentos de ágar (aproximadamente 12 x 12 mm) contendo os micélios dos fungos previamente cultivados em meio sólido adaptado ao pesticida profenofós. As condições reacionais e as extrações procederam de acordo com os procedimentos descritos no item 3.7.1.1 (Esquema 3). Em seguida, as amostras foram submetidas às análises por CG-EM-SIM.

3.7.1.4 Controle da reação para o pesticida comercial profenofós (estabilidade do pesticida)

Foram preparados 2 frascos Erlenmeyer contendo 100,0 mL de meio de cultura líquido de malte 2% em pH 7. Após o meio de cultura esterilizado ser resfriado até 40-50°C, foram adicionados 18,5 µL (0,72 mmol, 50,0 ppm) do pesticida profenofós.

Após 30 dias de reação, os experimentos foram extraídos. As extrações procederam de acordo com as extrações descritas na seção 3.7.1.1, não sendo necessária a etapa da filtração já que esta reação não continha o fungo. As amostras foram submetidas às análises por CG-EM-SIM.

3.7.1.5 Controle da reação para os fungos A. sydowii CBMAI 935 e P. raistrickii CBMAI 931 (ausência de pesticida)

Foram preparados 4 frascos Erlenmeyer (duplicatas para cada fungo) contendo 100,0 mL de meio de cultura líquido de malte 2% em pH 7, seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 3.4.1.2, no entanto, não foi adicionado o pesticida profenofós. Após 30 dias de reação, os experimentos foram extraídos. As extrações procederam de acordo com a extração descrita no item 3.8.1.1 (Esquema 3) e as amostras foram submetidas à análise por CG-EM-SCAN.

3.7.1.6 Reação de biodegradação do pesticida profenofós pelo fungo P. raistrickii CBMAI 931 em diferentes concentrações

Foram preparados 8 frascos Erlenmeyer contendo 100,0 mL de meio de cultura líquido de malte 2% em pH 7, previamente esterilizado. Foram realizados os inóculos do fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 transferindo-se com o auxílio de uma espátula dois fragmentos de ágar (aproximadamente 12 x 12 mm) contendo os micélios do fungo previamente cultivados na presença de 4,7 µL pesticida/placa (0,73 mmol, 50,0 ppm). Os frascos Erlenmeyer foram mantidos durante 4 dias em agitação orbital (130 rpm, 32°C) para promover o crescimento dos fungos. Após este período foram adicionados 6,0, 11,0, 18,5 e 22,0 µL do pesticida (15,0, 30,0, 50,0 e 65,0 ppm, respectivamente), em dois frascos Erlenmeyer para cada concentração, e estes foram novamente mantidos em agitação orbital (130 rpm, 32°C). Foi também preparado o controle, em dois frascos Erlenmeyer contendo somente 100,0 mL de meio de cultura líquido de malte 2% e 11,0 µL (30,0 ppm) do pesticida profenofós.

Os experimentos foram cessados com 30 dias de reação e foram extraídos os experimentos. As extrações procederam de acordo com a extração descrita no item 3.7.1.1 (Esquema 3) e as amostras foram submetidas às análises por CG-EM-SIM.

3.7.2 Reação de biodegradação do pesticida clorpirifós pelos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932

3.7.2.1 Reação entre o pesticida comercial clorpirifós e os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932

Foram preparados 12 frascos Erlenmeyer contendo 100,0 mL de meio de cultura líquido de malte 2% (pH 7), previamente esterilizado. Em 6 frascos Erlenmeyer, foram realizados os inóculos do fungo *A. sydowii* CBMAI 935 transferindo-se com o auxílio de uma micropipeta 125,0 μ L da suspensão de esporos dos fungo previamente cultivados na presença de 0,9 μ L pesticida/tubo inclinado (0,035 mmol, 50,0 ppm). Este procedimento foi repetido para *Trichoderma* sp. CBMAI 932 nos outros seis frascos Erlenmeyer, variando-se apenas o volume da suspensão de esporos, que foi de 16,6 μ L para este fungo. As reações foram submetidas a agitação orbital (130 rpm), em temperatura de 32°C, para promover o crescimento dos fungos durante 4 dias. Após este período foram adicionados 10,3 μ L (0,41 mmol, 50,0 ppm) do pesticida clorpirifós a cada frasco Erlemeyer e estes foram novamente mantidos sob agitação orbital (130 rpm, 32°C).

Os experimentos foram cessados com 10, 20 e 30 dias de reação (2 frascos Erlernmeyer na presença de *A. sydowii* CBMAI 935 e 2 frascos Erlernmeyer na presença do fungo *Trichoderma* sp. CBMAI 932). Em seguida, os micélios foram filtrados em funil de Buchner, promovendo a separação do caldo enzimático e as células úmidas do fungo. Nos experimentos cessados com 20 dias o caldo enzimático e as células úmidas foram analisadas separadamente. O meio reacional foi acidificado com HCl (1 mol/L) para pH 6 e o caldo enzimático foi extraído com acetato de etila (3 x 25,0 mL) com descarte da fase aquosa, filtrado e rotaevaporado o solvente, o resíduo foi ressuscendido em metanol e transferido para um balão volumétrico de 10,0 mL. As células úmidas dos fungos foram adicionadas em um frasco Erlenmeyer contendo 10,0 mL de água destilada e 10,0 mL de acetato de etila, e então submetidas à agitação magnética durante 30 min. Em seguida, as células foram filtradas em funil de Buchner, o meio foi acidificado com HCl (1 mol/L) para pH 6 e então, realizou-se as extrações com acetato de etila (3 x 20,0 mL) com descarte da fase aquosa. As células úmidas foram colocadas em estufa para secagem (35°C, 24h) e pesadas. À fase orgânica foi adicionado Na₂SO₄ anidro, seguido de filtração e evaporação do solvente. O resíduo foi ressuscendido em metanol e a solução transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL. As amostras do caldo enzimático e da fase micelial foram submetidas a análise por CLAE e CG-

EM. O Esquema 4 apresenta o fluxograma de preparação e extração da fase micelial e do caldo enzimático em 20 dias de reação.

Esquema 4. Fluxograma das etapas de preparação e extração da fase micelial e caldo enzimático das reações de biodegradação de clorpirifós e metil paration (extração dos micélios e caldo enzimático separadamente).

Nos demais experimentos, após as reações serem cessadas, estas foram filtradas em funil de Buchner, separando o caldo enzimático das células úmidas. As células úmidas foram adicionadas em um frasco Erlenmeyer contendo 10,0 mL de água destilada e 10,0 mL de acetato de etila, e então, foram submetidas à agitação magnética durante 30 min. As células foram filtradas em funil de Buchner e o extrato foi adicionado ao caldo enzimático, o meio foi acidificado com HCl (1 mol/L) para pH 6 e então, foi realizada uma única extração para extrato das células úmidas e o caldo enzimático com acetato de etila (3 x 25,0 mL) e descarte da fase aquosa. As células úmidas foram colocadas em estufa para secagem (35°C, 24 h) e

então pesadas. À fase orgânica foi adicionado Na_2SO_4 anidro, seguido de filtração e evaporação do solvente. O resíduo foi ressuscitado em metanol e a solução transferida para um balão volumétrico de 10,0 mL. As amostras do caldo enzimático e da fase micelial foram submetidas a análise por HPLC e CG-EM. O Esquema 5 apresenta o fluxograma de preparação e extração da fase micelial e do caldo enzimático em 10 e 30 dias de reação.

Esquema 5. Fluxograma das etapas de preparação e extração da fase micelial e caldo enzimático das reações de biodegradação de clorpirifós e metil paration.

3.7.2.2 Controle da reação para o pesticida comercial clorpirifós (estabilidade do pesticida)

Foram preparados 2 frascos Erlenmeyer contendo 100,0 mL de meio de cultura líquido de malte 2% em pH 7. Após o meio de cultura esterilizado ser resfriado até 40-50°C, foram adicionados 10,3 μL (0,41 mmol, 50,0 ppm) do pesticida clorpirifós.

Após 30 dias de reação, os experimentos foram extraídos. As extrações procederam de acordo com as extrações descritas no item 3.7.2.1 (Esquema 5), não sendo necessária a etapa

da filtração já que esta reação não continha o fungo. As amostras foram submetidas às análises por CLAE e CG-EM.

3.7.2.3 Controle da reação para os fungos A. sydowii CBMAI 935 e Trichoderma sp. CBMAI 932 (ausência do pesticida)

Foram preparados 4 frascos Erlenmeyer (duplicatas para cada fungo) contendo 100,0 mL de meio de cultura líquido de malte 2% em pH 7, seguindo os mesmos procedimentos descritos no item 3.7.2.1, no entanto, não foi adicionado o pesticida clorpirifós. Após 30 dias de reação, os experimentos foram extraídos. As extrações procederam de acordo com a extração descrita item 3.7.2.1 (Esquema 5) e as amostras foram submetidas à análise por CLAE e CG-EM.

3.7.2.4 Reação entre o padrão de 3,5,6-tricloro-2-piridinol e os fungos A. sydowii CBMAI 935 e Trichoderma sp. CBMAI 932

Foram preparados 2 frascos Erlenmeyer contendo 100,0 mL de meio de cultura líquido de malte 2% em pH 7, seguindo-se os mesmos procedimentos descritos no item 3.4.1.2. Neste caso, foi adicionado 5,0 mg (0,25 mmol, 50,0 ppm) do padrão 3,5,6-tricloro-2-piridinol e não foi adicionado o pesticida clorpirifós. Após 30 dias de reação, foram extraídos os experimentos. As extrações procederam de acordo com a extração descrita no item 3.7.2.1 (Esquema 5) e as amostras foram submetidas às análises por CLAE e CG-EM.

3.7.2.5 Reação entre o pesticida comercial clorpirifós e os fungos A. sydowii CBMAI 935 e Trichoderma sp. CBMAI 932 em meio mineral suplementado com nitrato de potássio

Foram preparados 4 frascos Erlenmeyer (duplicata para cada fungo) contendo 100,0 mL de meio de cultura líquido mineral suplementado com nitrato de potássio em pH 7, previamente esterilizado. Após resfriar até 40-50°C, foram adicionados 20,6 µL (0,82 mmol, 100,0 ppm) do pesticida nos frascos Erlenmeyer. Posteriormente, foram realizados os inóculos dos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932, transferindo-se com o auxílio de uma micropipeta 125,0 e 16,6 µL, respectivamente, da suspensão de esporos dos fungos previamente cultivados em meio sólido adaptado ao pesticida clorpirifós. As condições reacionais e as extrações procederam de acordo com os procedimentos descritos no item 3.7.2.1 (Esquema 5) e as amostras foram submetidas às análises por CLAE e CG-EM.

3.7.3 Reação de biodegradação do pesticida metil paration pelos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P.decatuense* CBMAI 1234

*3.7.3.1 Reação entre o pesticida comercial metil paration e os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decatuense* CBMAI 1234*

Foi seguido o mesmo procedimento para o clorpirifós descrito no item 3.7.2.1. O volume da suspensão de esporos para *A. sydowii* CBMAI 935 foi de 195,0 µL e para *P. decatuense* CBMAI 1234 de 40,0 µL. O volume de pesticida adicionado em cada frasco Erlenmeyer foi de 5,5 µL (0,28 mmol, 50,0 ppm) (Esquemas 4 e 5).

3.7.3.2 Controle da reação para o pesticida comercial metil paration (estabilidade do pesticida)

Idem ao procedimento descrito no item 3.7.2.2. Foram adicionados 5,50 µL (0,28 mmol, 50,0 ppm) do pesticida metil paration.

*3.7.3.3 Controle da reação para os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decatuense* CBMAI 1234 (ausência do pesticida)*

Idem ao procedimento descrito no item 3.7.2.3. Foram adicionados 195,0 µL da suspensão de esporos de *A. sydowii* CBMAI 935 e 40,0 µL da suspensão de esporos de *P.decatuense* CBMAI 1234.

*3.7.3.4 Reação entre o padrão de 4-nitrofenol e os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P.decatuense* CBMAI 1234*

Idem ao procedimento descrito no item 3.7.2.4. Foi adicionado 5,0 mg (0,36 mmol, 50,0 ppm) do padrão 4-nitrofenol.

3.7.3.5 Reação entre o pesticida comercial metil paration e os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234 em meio mineral suplementado com nitrato de potássio

Idem ao procedimento descrito no item 3.7.2.5. O volume da suspensão de esporos para *A. sydowii* CBMAI 935 foi de 195,0 µL e para *P. decaturense* CBMAI 1234 de 40,0 µL. Foram adicionados 11,0 µL (0,56 mmol, 100,0 ppm) do pesticida comercial metil paration.

3.8 Quantificação e análises das reações entre os pesticidas comerciais e os fungos marinhos

A quantificação do pesticida profenofós e metabólito, 4-bromo2-clorofenol de foi realizada por CG-EM-SIM. As quantificações dos pesticidas clorpirifós e metil paration e seus respectivos metabólitos foram realizadas em CLAE. As análises dos metabólitos produzidos nas reações foram realizadas por CG-EM, e CLAE-EM para os pesticidas clorpirifós e metil paration.

3.8.1 Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas

Para a análise com o profenofós, as temperaturas do injetor e detector foram, ambas de 200°C. A temperatura inicial do forno foi de 100°C, durante 5 min., aumentada até 250°C com uma taxa de aquecimento de 5°C/min, mantendo esta temperatura durante 10 min., totalizando um tempo de corrida de 45 min. A razão de injeção (*split ratio*) foi de 1:1. Os analitos foram primeiro analisados no modo SCAN para selecionar os íons e o tempo de retenção para cada composto. A Tabela 5 mostra o tempo de retenção e os íons selecionados para cada composto para as análises no modo SIM.

Tabela 5. Dados para o método das análises no modo SIM em CG-EM.

Compostos	Tempo de retenção (min)	Íon selecionado (<i>m/z</i>)
4-Bromo-2-clorofenol	10,605	207,85
Clorpirifós	27,730	313,90
Profenofós	31,190	138,95

Nas análises realizadas para os pesticidas clorpirifós e metil paration as temperaturas do injetor e detector foram, ambas a 200°C. A temperatura inicial do forno foi de 50°C até 250°C com uma taxa de aquecimento de 10°C/min., mantendo esta temperatura durante 10 min., totalizando um tempo de corrida de 32 min. Os tempos de retenção para clorpirifós e 3,5,6-

tricloro-2-piridinol foram de 17,7 e 12,4 min., respectivamente. Os tempos de retenção para metil paration e 4-nitrofenol foram de 17,4 e 12,7 min., respectivamente.

3.8.2 Cromatografia líquida de alta eficiência

Para o clorpirifós, empregou-se a fase móvel no modo isocrático com acetonitrila grau cromatográfico/água MQ (75:25), fluxo de 1,0 mL/min e como fase estacionária coluna C18 CLC-ODS(M) OD-H (0.46 x 25 cm) da marca Shimadzu®. A temperatura do forno foi de 40°C, o tempo de corrida de 20 min e o comprimento de onda de detecção de 280 nm. Os tempos de retenção para clorpirifós e 3,5,6-tricloro-2-piridinol foram de 16,5 e 4,4 min, respectivamente.

Para o metil paration, empregou-se a fase móvel no modo isocrático com acetonitrila grau cromatográfica/água MQ (50:50) grau cromatográfica com fluxo de 0,8 mL/min e como fase estacionária coluna C18 CLC-ODS(M) OD-H (0.46 x 25 cm) da marca Shimadzu®. A temperatura do forno foi de 40°C, o tempo de corrida de 25 min e o comprimento de onda de detecção de 278 nm. Os tempos de retenção para metil paration e 4-nitrofenol foram de 19,1 e 5,6 min, respectivamente.

3.8.3 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (CLAE-EM)

As análises foram realizadas no modo de ionização negativo. A fase móvel foi utilizada em gradiente de concentração de acetonitrila grau cromatográfico/água MQ e como fase estacionária coluna C18 CLC-ODS(M) OD-H (0,46 x 25 cm) da marca Shimadzu®, com fluxo de 1,0 mL/min e *splitter* de 0,2 mL/min (Tabela 6). A temperatura do forno foi de 40°C, o tempo de corrida de 30 min e o comprimento de onda de detecção de 280 nm. Os tempos de retenção para o 3,5,6-tricloro-2-piridinol e 4-nitrofenol foram de 12,7 e 11,9 min, respectivamente.

Tabela 6. Gradiente da fase móvel para as análises em CLAE-EM.

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Água (%)
0,1	20	80
15	50	50
25	80	20
27	20	80
30	20	80

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Seleção dos fungos em meio de cultura sólido de malte 2% frente aos pesticidas clorpirifós, metil paration e profenofós

Foram analisadas sete cepas fúngicas (*A. sydowii* CBMAI 934, *P. raistrickii* CBMAI 931, *A. sydowii* CBMAI 935, *P. raistrickii* CBMAI 1235, *P. decaturense* CBMAI 1234, *A. sydowii* CBMAI 1241 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932) na presença dos pesticidas clorpirifós, metil paration e profenofós em meio de cultura sólido de malte 2%, com o objetivo de avaliar o crescimento dos fungos na presença destes pesticidas e, posteriormente, o potencial biocatalítico destes micro-organismos frente aos pesticidas organofosforados.

As cepas fúngicas utilizadas foram de fungos marinhos. Estes micro-organismos são multicelulares e produzem estruturas filamentosas microscópicas, do tipo hifas. Os fungos foram cultivados no meio de cultura em pH 5, que é um valor ótimo para o cultivo da maioria dos fungos, sendo que o pH ideal pode variar de 3,8 a 5,6. Estes valores de pH favorecem o crescimento dos fungos e inibem o crescimento da maioria das bactérias, já que o cultivo bacteriano é ideal em valores de pH mais elevados.⁸⁵

O potencial dos fungos para biodegradar os pesticidas foi avaliado pela comparação entre o crescimento das colônias fúngicas em placas com diferentes concentrações de pesticidas com aqueles cultivados em placa controle (ausência de pesticida). As quantidades de pesticidas empregadas nas triagens foram arbitrárias, com o objetivo de analisar qualitativamente o desenvolvimento dos fungos. Na literatura não há uma relação precisa da concentração de pesticida deve ser utilizado em um estudo de biodegradação.

Pelas informações fornecidas pelos fabricantes, as concentrações estimadas para os pesticidas comerciais utilizados em meio sólido estão sumarizadas na Tabela 7.

Tabela 7. Concentrações de pesticidas nas placas para avaliação do crescimento microbiano em meio de cultura sólido de malte 2%.

Pesticida	Concentração estabelecida pelo fornecedor (g/L)	Concentração de pesticida (ppm) estimada em meio sólido por placa		
		5,0 µL	10,0 µL	15,0 µL
Clorpirifós	480,0	96,0	192,0	288,0
Metil Paratiom	600,0	120,0	240,0	360,0
Profenofós	400,0	80,0	160,0	240,0

O crescimento das colônias fúngicas no meio sólido foram avaliados em 5 e 10 dias. Todas as cepas fúngicas apresentaram um bom desenvolvimento nas placas controle (ausência de pesticida), demonstrando que o meio de cultura sólido de malte 2% é ideal para o crescimento destes micro-organismos, fornecendo os nutrientes necessários para o cultivo fúngico.

Para crescer e desenvolver-se, os fungos necessitam de uma variedade de elementos químicos inorgânicos e orgânicos como nutrientes. O carbono é um dos elementos mais importantes para o crescimento microbiano, fornecendo energia para o crescimento celular e servindo como unidade básica para obtenção do material celular. O nitrogênio também é essencial aos organismos, bem como outros elementos (hidrogênio, oxigênio e fósforo).⁸⁵

Assim, o crescimento dos fungos na presença dos pesticidas pode ser um indicativo de que pode ocorrer uma metabolização do pesticida como um mecanismo de defesa dos micro-organismos eliminando estes xenobióticos, ou até mesmo, de que estes pesticidas possam ser utilizados como fontes de nutrientes para o crescimento dos fungos, já que os pesticidas organofosforados em geral, apresentam em sua estrutura carbono, oxigênio, enxofre e nitrogênio.

4.1.1 Clorpirifós

O *screening* realizado neste trabalho com as diferentes linhagens fúngicas na presença de clorpirifós apresentou resultados satisfatórios, com um crescimento facilmente observável nas placas, como demonstrado pelas Figuras de 30 a 36.

Figura 30. Cultivo do fungo *A. sydowii* CBMAI 934 na ausência de clorpirifós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 μ L de clorpirifós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.

Figura 31. Cultivo do fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 na ausência de clorpirifós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 μ L de clorpirifós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.

Figura 32. Cultivo do fungo *A. sydowii* CBMAI 935 na ausência de clorpirifós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 μL de clorpirifós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.

Figura 33. Cultivo do fungo *P. raistrickii* CBMAI 1235 na ausência de clorpirifós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 μL de clorpirifós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.

Figura 34. Cultivo do fungo *P. decaturense* CBMAI 1234 na ausência de clorpirifós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 μL de clorpirifós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.

Figura 35. Cultivo do fungo *A. sydowii* CBMAI 1241 na ausência de clorpirifós (placa controle) e com 5,0, 10, e 15,0 μL de clorpirifós/placa em (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.

Figura 36. Cultivo do fungo *Trichoderma* sp. CBMAI 932 na ausência de clorpirifós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 μ L de clorpirifós/placa em (a) 5 dias de cultivo e b) 10 dias de cultivo.

Como pode ser observado na placa de Petri com dez dias de crescimento, a maioria dos fungos apresentaram um bom desenvolvimento nas quantidades de 5,0 e 10,0 μ L de pesticida clorpirifós. Com 15,0 μ L, o crescimento foi razoável para todos os pesticidas, exceto para o *A. sydowii* CBMAI 1241, demonstrando que este apresentou maior inibição frente a uma maior concentração do pesticida, em relação aos outros fungos. Foram estimados os halos de crescimento médio das colônias nas placas, tanto na ausência de pesticida quanto com 5,0, 10,0 e 15,0 μ L de clorpirifós/placa, com 10 dias de cultivo (Tabela 8). É importante ressaltar, que esses dados foram qualitativos, já que não foram padronizados os inóculos (item 3.4.2), e há uma certa indefinição na medição dos halos de crescimento frente a alguma cepas, como *A. sydowii* CBMAI 934, *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. raistrickii* CBMAI 1235, que são fungos esporulantes, apresentando um crescimento das colônias de forma aleatórias nas placas. O halo de crescimento foi estimado pela média do diâmetro (cm) das colônias formadas nas placas.

Tabela 8. Avaliação do crescimento dos fungos de ambiente marinho com o pesticida clorpirifós em meio de cultura sólido de extrato de malte 2%.

Código dos fungos	Medida do halo de crescimento (cm) após 10 dias de cultivo (32°C, pH 5)			
	Placa controle	5,0 µL pesticida/ 100,0 µL DMSO	10,0 µL pesticida/ 200,0 µL DMSO	15,0 µL pesticida/ 300,0 µL DMSO
934	2,0 x 2,0	2,0 x 2,0	1,5 x 1,5	1,0 x 1,0
931	3,5 x 3,0	4,0 x 2,5	3,5 x 3,0	3,0 x 2,5
935	Toda a placa	Toda a placa	Toda a placa	2,0 x 1,5
1235	5,0 x 3,0	4,0 x 2,5	3,0 x 2,0	1,5 x 1,5
1234	4,0 x 3,0	4,0 x 2,5	3,0 x 2,5	4,0 x 2,5
1241	5,0 x 3,0	3,5 x 2,5	3,0 x 3,0	1,0 x 1,0
932	Toda a placa	Toda a placa	4,0 x 3,0	4,0 x 3,0

No caso das colônias que não apresentaram um crescimento radial circular os halos de crescimento foram medidos entre as extremidades mais distantes. No crescimento de várias colônias em uma mesma placa de Petri, uma colônia pode inibir o crescimento da outra, como pode ser observado, por exemplo, nas placas controle das Figuras de 30 a 36. Neste experimento em meio sólido o importante foi avaliar o crescimento dos fungos na superfície da placa para detectar a presença ou ausência do crescimento microbiano. A medida dos halos, portanto, não apresentou finalidade quantitativa e foi feita somente para avaliar a habilidade de crescimento dos fungos para, posteriormente, realizar as reações em meio líquido.

Observou-se que as cepas de *P. raistrickii* CBMAI 931, *A. sydowii* CBMAI 935, *P. raistrickii* CBMAI 1235, *P. decaturense* CBMAI 1234 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932 apresentaram os melhores crescimentos nas três concentrações de clorpirifós avaliadas. Em comparação com a placa controle, praticamente não houve inibição do crescimento destes fungos pela adição do pesticida, até mesmo na maior concentração. Estes resultados podem indicar que os fungos são resistentes em altas concentrações de pesticida, sugerindo uma potencial capacidade biocatalítica para se adaptar e, até mesmo, biodegradar o clorpirifós.

O crescimento do fungo *A. sydowii* CBMAI 934 foi razoável, observando uma pequena inibição para a maior concentração de pesticida adicionado (288,0 ppm, 15,0 µL pesticida/placa). O fungo *A. sydowii* CBMAI 1241, apresentou um crescimento muito bom para a concentração 96,0 e 192,0 ppm de clorpirifós (5,0 e 10,0 µL de pesticida, respectivamente). No entanto, na placa com 15,0 µL de pesticida houve uma inibição quase completa do crescimento fúngico, podendo indicar um limite de tolerância do pesticida frente ao micro-organismo.

Após os resultados deste *screening*, as cepas de *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932 foram selecionadas para o desenvolvimento dos experimentos em meio líquido com o pesticida clorpirifós.

4.1.2 Metil paration

No *screening* do crescimento das diferentes cepas fúngicas na presença de metil paration foi observado um menor crescimento dos fungos em comparação às placas controle, como apresentado pelas Figuras 37 a 43.

Figura 37. Cultivo do fungo *A. sydowii* CBMAI 934 na ausência de metil paration (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 μL de metil paration/placa. (a) 5 dias de cultivo e b) 10 dias de cultivo.

Figura 38. Cultivo do fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 na ausência de metil paration (placa controle) e com 5,0 10,0 e 15,0 μL de metil paration/placa. (a) 5 dias de cultivo e b) 10 dias de cultivo.

Figura 39. Cultivo do fungo *A. sydowii* CBMAI 935 na ausência de metil paration (placa controle) e com 5,0 10,0 e 15,0 μL de metil paration/placa. (a) 5 dias de cultivo e b) 10 dias de cultivo.

Figura 40. Cultivo do fungo *P. raistrickii* CBMAI 1235 na ausência de metil paration (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 μL de metil paration/placa. (a) 5 dias de cultivo e b) 10 dias de cultivo.

Figura 41. Cultivo do fungo *P. decaturense* CBMAI 1234 na ausência de metil paration (placa controle) e com 5,0, 10,0, e 15,0 μL de metil paration/placa. (a) 5 dias de cultivo e b) 10 dias de cultivo.

Figura 42. Cultivo do fungo *A. sydowii* CBMAI 1241 na ausência de metil paration (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15, μ L de metil paration/placa. (a) 5 dias de cultivo e b) 10 dias de cultivo.

Figura 43. Cultivo do fungo *Trichoderma* sp. CBMAI 932 na ausência de metil paration (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 μ L de metil paration/placa. (a) 5 dias de cultivo e b) 10 dias de cultivo.

O metil paration apresentou-se como o pesticida mais tóxico frente aos micro-organismos em meio de cultura sólido de extrato de malte 2%. Este pesticida apresenta Classificação

Toxicológica tipo *Classe I*, ou seja, *extremamente tóxico*, de acordo com a ANVISA.⁴⁹ Clorpirifós e profenofós, no entanto, são classificados como *Classe II*, *altamente tóxicos*, e apresentaram um melhor crescimento das colônias fúngicas em relação ao metil paration.^{86,42}

As concentrações referentes as diferentes quantidades de pesticidas foram maiores para o metil paration, comparativamente ao clorpirifós e profenofós, como apresentado na Tabela 7. No entanto, se for comparada a maior concentração para o clorpirifós (placa com 15,0 µL de pesticida) que foi de 288,0 ppm, com a concentração 240,0 ppm de metil paration (placa com 10,0 µL de pesticida), tem-se que o desenvolvimento nas placas de clorpirifós com maiores concentrações foram melhores do que para uma menor concentração do metil paration. Portanto, a concentração no caso do metil paration, não foi o fator determinante para a inibição do crescimento dos fungos nas placas, e sim a toxicidade deste pesticida. Foram medidos os halos de crescimento das colônias na placa tanto na ausência de pesticida quanto com 5,0, 10,0 e 15,0 µL de metil paration/placa, em 10 dias de cultivo (Tabela 9).

Tabela 9. Avaliação do crescimento dos fungos de ambiente marinho com o pesticida metil paration em meio de cultura sólido de extrato de malte 2%.

Código dos fungos	Medida do halo de crescimento (cm) após 10 dias (32°C, pH 5)			
	Placa controle	5,0 µL pesticida/ 100,0 µL DMSO	10,0 µL pesticida/ 200,0 µL DMSO	15,0 µL pesticida/ 300,0 µL DMSO
934	3,0 x 2,5	1,5 x 1,5	1,5 x 1,0	1,0 x 1,0
931	4,0 x 2,5	1,5 x 1,5	1,5 x 1,0	0,5 x 0,5
935	Toda a placa	4,0 x 3,0	3,0 x 1,5	2,0 x 1,5
1235	3,0 x 3,0	0,5 x 0,5	1,0 x 1,0	0,5 x 0,5
1234	3,0 x 3,0	1,5 x 1,5	1,5 x 1,5	1,0 x 1,0
1241	5,0 x 3,0	1,0 x 1,0	Ausente	Ausente
932	4,0 x 2,5	2,0 x 2,0	1,5 x 1,0	0,5 x 0,5

As cepas de *A. sydowii* CBMAI 934, *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234 apresentaram os melhores desenvolvimento nas três concentrações de pesticida avaliados. Em comparação com a placa controle houve uma forte inibição do crescimento dos fungos nas placas contendo o pesticida nas diferentes concentrações avaliadas para *A. sydowii* CBMAI 934 e *P. decaturense* CBMAI 1234. A cepa com maior potencial para a biodegradação do metil paration foi *A. sydowii* CBMAI 935, a qual apresentou a menor inibição de crescimento na presença deste pesticida.

Os fungos *P. raistrickii* CBMAI 931 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932 apresentaram desenvolvimentos semelhantes para os três fungos anteriormente citados. Contudo, na maior concentração pesticida, os fungos apresentaram uma maior inibição, podendo indicar que

estes são menos resistentes a maiores concentrações de metil paration. O fungo *P. raistrickii* CBMAI 1235 apresentou uma maior inibição ao pesticida metil paration em relação aos demais fungos avaliados no *screening*. Enquanto o fungo *A. sydowii* CBMAI 1241 foi completamente inibido em todas as concentrações de pesticida avaliadas, demonstrando que este fungo provavelmente não apresente potencial biocatalítico para degradação de metil paration.

Após os resultados deste *screening*, as cepas de *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234 foram selecionadas para o desenvolvimento dos experimentos em meio líquido com o pesticida metil paration para avaliar quantitativamente sua biodegradação.

4.1.3 Profenofós

No *screening* das cepas fúngicas na presença do pesticida profenofós, com exceção dos fungos *A. sydowii* CBMAI 934 e *P. raistrickii* CBMAI 1235, todos os micro-organismos apresentaram um ótimo crescimento na presença deste pesticida em todas as concentrações durante 10 dias, como pode ser observado pelas Figuras de 44 a 50.

Figura 44. Cultivo do fungo *A. sydowii* CBMAI 934 na ausência de profenofós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 μL de profenofós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.

Figura 45. Cultivo do fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 na ausência de profenofós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 μ L de profenofós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.

Figura 46. Cultivo do fungo *A. sydowii* CBMAI 935 na ausência de profenofós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 μ L de profenofós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.

Figura 47. Cultivo do fungo *P. raistrickii* CBMAI 1235 na ausência de profenofós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 μ L de profenofós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.

Figura 48. Cultivo do fungo *P. decaturense* CBMAI 1234 na ausência de profenofós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 μ L de profenofós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.

Figura 49. Cultivo do fungo *A. sydowii* CBMAI 1241 na ausência de profenofós (placa controle) e com 5, 10 e 15 µL de profenofós/placa. (a) 5 dias de cultivo e (b) 10 dias de cultivo.

Figura 50. Cultivo do fungo *Trichoderma* sp. CBMAI 932 na ausência de profenofós (placa controle) e com 5,0, 10,0 e 15,0 µL de profenofós/placa. (a) 5 dias de cultivo e b) 10 dias de cultivo.

Semelhante ao clorpirifós, o profenofós apresentou um crescimento muito bom para todos os fungos avaliados, com crescimento mais discreto para as linhagens de *A. sydowii* CBMAI 934 e *P. decaturense* CBMAI 1235. As medidas dos halos de crescimento das

colônias nas placas tanto na ausência de pesticida quanto com 5,0, 10,0 e 15,0 µL de profenofós/placa, em 10 dias de cultivo estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Avaliação do crescimento dos fungos de ambiente marinho com o pesticida profenofós em meio de cultura sólido de extrato de malte 2%.

Código dos fungos	Medida do halo de crescimento (cm) após 10 dias (32°C, pH 5)			
	Placa controle	5,0 µL pesticida/ 100,0 µL DMSO	10,0 µL pesticida/ 200,0 µL DMSO	15,0 µL pesticida/ 300,0 µL DMSO
934	4,0 x 3,0	1,0 x 1,5	1,0 x 1,0	1,0 x 1,0
931	3,5 x 3,0	3,0 x 3,0	3,0 x 2,5	2,5 x 2,5
935	Toda a placa	3,0 x 2,5	3,0 x 2,5	3,0 x 2,5
1235	4,0 x 3,0	2,0 x 2,0	1,0 x 1,0	1,5 x 1,0
1234	2,5 x 2,5	1,0 x 1,5	3,0 x 2,0	1,0 x 1,0
1241	3,5 x 2,5	3,0 x 2,5	3,0 x 2,5	2,0 x 2,0
932	Toda a placa	3,5 x 2,5	3,0 x 2,0	2,0 x 2,0

Observou-se que os fungos *P. raistrickii* CBMAI 931, *A. sydowii* CBMAI 935, *P. decaturense* CBMAI 1234, *A. sydowii* CBMAI 1241 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932 apresentaram ótimos crescimentos nas três quantidades de pesticida avaliadas. Em comparação com a placa controle, houve uma pequena inibição para a placa com a maior quantidade de pesticida (15 µL). De acordo com a Tabela 7, para as quantidades de 10,0 e 15,0 µL de profenofós por placa, as concentrações são de 160,0 e 240,0 ppm, respectivamente, e como o crescimento para estes fungos apresentou-se satisfatório até mesmo na maior concentração do pesticida é possível sugerir que estes apresentem um bom potencial para a degradação do profenofós.

Apesar das cepas de *A. sydowii* CBMAI 934 e *P. raistrickii* CBMAI 1235 apresentarem um crescimento discreto em relação aos demais fungos citados, estes também foram capazes de desenvolver-se até em maiores concentrações do pesticida (Figuras 44 e 47).

Após os resultados deste *screening*, as cepas de *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. raistrickii* CBMAI 931 foram selecionadas para o desenvolvimento dos experimentos em meio líquido com o pesticida profenofós.

4.2 Curvas analíticas para a quantificação dos pesticidas e seus metabólitos

As principais enzimas responsáveis pelas reações de degradação de organofosforados são as fosfotriesterases, que catalisam a hidrólise desta classe de pesticidas.³¹ De acordo com a hidrólise para as moléculas de clorpirifós, metil paration e profenofós, os produtos de degradação (metabólitos) esperados são 3,5,6-tricloro-2-piridinol, 4-nitrofenol e 4-bromo-2-

clorofenol, respectivamente (Esquema 6). Caso ocorra a obtenção do metabólito, possivelmente as enzimas fosfotriesterases estão ativas na massa micelial dos fungos selecionados para as reações em meio líquido.

Esquema 6. Reações de hidrólise dos pesticidas clorpirifós, metil paration e profenofós.

A curva analítica, neste caso, é representada pela relação matemática entre o sinal da área e as concentrações conhecidas do analito. A linearidade da curva pode ser determinada através da regressão linear, que irá fornecer uma equação da reta e um coeficiente de correlação (R). Este coeficiente é um parâmetro que permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, sendo que valores mais próximos de 1,0 demonstram uma menor dispersão do conjunto de pontos experimentais.^{87,88}

Para o pesticida profenofós e para o metabólito, 4-bromo-2-clorofenol (BCF), a curva foi preparada através da técnica de padronização interna, assim, foram plotadas as razões das áreas ($A_{\text{analito}}/A_{\text{padrão interno}}$) e das concentrações ($c_{\text{analito}}/c_{\text{padrão interno}}$). As curvas para o clorpirifós, 3,5,6-tricloro-2-piridinol, metil paration e 4-nitrofenol foram preparadas através da técnica de padronização externa, portanto, foram plotadas as áreas e as concentrações dos analitos.

Através dos gráficos plotados, foram obtidas as equações das retas para serem utilizadas na quantificação das reações de biodegradação. A equação da reta é expressa em $Y = A + BX$, onde A = coeficiente linear, B = coeficiente angular, X = concentração do analito (razão das

concentrações, no caso de profenofós e BCF) e Y = área do analito (razão das áreas, no caso de profenofós e BCF).

A recomendação da ANVISA é um valor de coeficiente de correlação igual a 0,99 e do INMETRO um valor acima de 0,90. Assim, os coeficientes de correlação obtidos para as seis curvas analíticas, descritas nas seções seguintes, estão dentro dos parâmetros estabelecidos pela literatura.⁸⁷

4.2.1 Curva analítica para determinação da concentração de profenofós e 4-bromo-2-clorofenol através do método de padronização interna com clorpirifós

A fim de determinar a concentração do pesticida comercial profenofós e do possível produto esperado para degradação, o 4-bromo-2-clorofenol, foi feita uma curva analítica utilizando a técnica de padronização interna em CG-EM-SIM.

O modo SIM (*Single-Ion Monitoring* – monitoramento seletivo de íons) tem grande vantagem em relação ao modo SCAN. No modo *full-scan* (varrimento total), em que os dados são adquiridos através da varredura de uma vasta gama de massas, a sensibilidade da detecção fica significativamente comprometida devido ao analisador realizar a varredura de uma ampla faixa de massas ao mesmo tempo. No modo SIM, o analisador está continuamente analisando um número restrito de íons selecionados. O sistema de dados passa um tempo maior na gravação da corrente de íons com relação m/z dos valores selecionados, conferindo uma melhoria significativa na sensibilidade de detecção. No entanto, são necessárias primeiramente análises dos compostos de interesse, para a identificação e confirmação do íon através da biblioteca, obtenção do padrão de fragmentação e por fim, a seleção dos íons a serem utilizados no modo SIM. Um critério importante utilizado na escolha do íon é a abundância, geralmente o íon escolhido é o íon molecular ou o pico base.^{89,90}

Através da análise no modo SCAN de uma amostra contendo padrão analítico de 4-bromo-2-clorofenol, padrão analítico de clorpirifós (padrão interno) e padrão analítico do pesticida profenofós, foram analisados os padrões de fragmentação destas moléculas e determinado o tempo de retenção para cada substância.

No espectro de massas do profenofós, não foi identificada a presença do íon molecular. O fragmento correspondente ao pico base (**1**), com m/z 337, pode ser correspondente a perda de um radical cloro, o que é condizente com o padrão isotópico X e $X+2$, com intensidade de 100 e 98%, característicos de moléculas contendo um único átomo de bromo. O pico correspondente ao cátion fenila gerado a partir de rearranjo e transferência de próton (**2**),

apresenta maior intensidade em m/z 208 (65%), que é correspondente ao pico X+2. De acordo com a literatura, moléculas contendo um átomo de cloro e um átomo de bromo apresentam as intensidades dos picos de isótopos X, X+2 e X+4 de aproximadamente 78, 100 e 24%.⁹¹ O fragmento com m/z 97 (3), pode ser correspondente a uma série de fragmentações da porção fosforotioato da molécula de pesticida, resultando em um pico com 80% de intensidade. O pico com intensidade de 45% e m/z 297 (4), pode ser resultante da perda de um fragmento – SCH₂CH₃.

Esquema 7. Proposta de fragmentação para o profenofós.

Figura 51. Espectro de massas obtido para o profenofós em CG-EM (70 eV).

O espectro de massas para o 4-bromo-2-clorofenol apresenta o pico do íon molecular intenso (100%), característico dos fenóis. Com a maior intensidade, o pico do íon molecular, é

também, o pico base com fragmento de m/z 208. Assim como na fragmentação do profenofós, o pico correspondente ao BCF, apresenta maior intensidade em m/z 208, que é correspondente ao pico $M+2$, com esta molécula apresentando intensidade dos picos M (m/z 206) (1), $M+2$ e $M+4$ (m/z 210) de aproximadamente 78, 100 e 24%. O pico de baixa intensidade de razão m/z 170 pode ser atribuído a eliminação de HCl (2). Observado o padrão isotópico deste pico, verifica-se a presença do pico $X+2$ com razão de 1:1, coerente com a presença de bromo na molécula e ausência de cloro. Essa característica também é observada para o sinal de m/z 142 (4), proveniente da eliminação de CO, após perda de HCl. O fragmento relativamente intenso de m/z 63 foi atribuído a uma espécie bicíclica (3) que, apesar de sua tensão, possui um sistema ciclopropenila aromático, fornecendo uma estabilidade extra ao cátion. O fragmento pouco intenso de m/z 127 pode ter sido formado após a perda de um radical bromo (6).

Esquema 8. Proposta de fragmentação para o 4-bromo-2-clorofenol.

Figura 52. Espectro de massas obtido para o 4-bromo-2-clorofenol em CG-EM (70 eV).

O espectro de massas para o pesticida clorpirifós apresenta um amplo padrão de fragmentação (Esquema 9). A presença de substituintes que se fragmentam com facilidade faz com que o pico do íon molecular fique pouco intenso, ou inexistente, e os picos dos fragmentos relativamente mais intensos.⁹¹ O pico base (1), m/z 314, pode ser resultante da fragmentação do clorpirifós através da perda de radical cloro e transferência de próton através de rearranjo. A presença de dois átomos de cloro na molécula, faz com que o padrão isotópico apresente X, X+2 (m/z 316) e X+4 (m/z 318) com intensidade de 100, 68 e 13%, respectivamente.

Já o fragmento com m/z 197 (2), com intensidade de 87%, pode ser o pico correspondente ao cátion de TCP. A presença dos três átomos de cloro na molécula faz com que a intensidade relativa dos picos de isótopos (em relação ao íons molecular) X, X+2 e X+4 seja de 100, 96 e 31%, respectivamente. Assim como para a fragmentação do profenofós, o pico de intensidade 78%, com m/z 97 (3), pode ser resultado de uma série de fragmentações da porção fosforotioato.

Esquema 9. Proposta de fragmentação para o clorpirifós.

Figura 53. Espectro de massas obtido para o clorpirifós em CG-EM (70 eV).

Para o 4-bromo-2-clorofenol e clorpirifós foram selecionados os íons moleculares de cada analito, enquanto que para o profenofós foi selecionado o pico base com m/z 337.

A técnica de padronização interna é um método útil para minimizar erros e variações referentes ao aparelho utilizado. A substância empregada como padrão interno deve ser similar ao analito a ser quantificado, ter tempo de retenção próximo a esta substância, não reagir com a substância ou outro componente da matriz, não fazer parte da amostra e, estar separada de todas as demais substâncias presentes na amostra.⁸⁷ Como padrão interno para a análise de profenofós e seu metabólito, foi utilizado o padrão analítico do pesticida clorpirifós.

A curva analítica foi realizada para o 4-bromo-2-clorofenol e para o pesticida profenofós nas concentrações de 5,0, 10,0, 15,0, 20,0, 30,0, 50,0 ppm (Figura 54). Através do gráfico da curva analítica para o metabólito, BCF, obteve-se uma equação da reta $Y = 0,2272 + 3,15088X$ e coeficiente de correlação $R = 0,9981$. Através do gráfico da curva analítica para profenofós obteve-se uma equação da reta $Y = 0,17522 + 1,03965 X$ e coeficiente de correlação $R = 0,9955$.

Figura 54. Curvas analíticas utilizadas para determinar a concentração de a) 4-bromo-2-clorofenol e b) profenofós.

4.2.2 Curva analítica para determinação da concentração dos pesticidas clorpirifós e metil paration e dos metabólitos 3,5,6-tricloropiridinol e 4-nitrofenol através do método de padronização externa

Apesar dos ótimos resultados obtidos através da quantificação do profenofós pela técnica CG-EM-SIM, esta metodologia não pôde ser desenvolvida para os pesticidas clorpirifós e metil paration. A coluna utilizada no equipamento (DB-5 J&W Scientific) apresenta fase estacionária de fenil-metil-siloxano, que é indicada para a análise de composto pouco polares. Nos testes realizados para o desenvolvimento do método de quantificação para os pesticidas clorpirifós e metil paration, seus respectivos metabólitos 3,5,6-tricloropiridinol e 4-nitrofenol, apresentaram uma grande interação com a fase estacionária, impossibilitando uma quantificação satisfatória de ambos, pesticidas e metabólitos. Desta forma, foram desenvolvidos métodos para as análises destes compostos através da técnica da padronização externa por CLAE, em coluna C_{18} . A técnica de padronização externa consiste na comparação da área dos analitos na amostra com áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas, preparadas a partir de um padrão analítico adequado.⁸⁷

De acordo com as especificações da coluna C_{18} , a fase estacionária desta não é adequada ao solvente acetato de etila, o qual foi empregado como solvente nas análises do profenofós, por CG-EM. Assim, o solvente utilizado nas análises de clorpirifós, metil paration, TCP e PNF foi o metanol, e desta forma, ao final de todas as extrações líquido-líquido das reações de biodegradação o solvente utilizado na extração (AcOEt) foi evaporado e a amostra ressuspendida em metanol, assim como descrito nos itens 3.7.2.1 e 3.7.3.1. Para evitar o aumento de resíduos após a ressuspensão da amostra, esta não foi solubilizada em metanol até o volume inicial da reação (100,0 mL), e sim em 10,0 mL, indicando uma concentração em 10 vezes da amostra inicial. Desta forma a curva analítica foi preparada considerando essa concentração para a análise final.

A curva analítica foi realizada para o 3,5,6-tricloropiridinol e para o pesticida clorpirifós nas concentrações de 5,0, 50,0, 100,0, 200,0, 300,0, 450,0, 500,0 e 550,0 ppm (Figura 55). Para a quantificação do metabólito TCP obteve-se a equação da reta $Y = 25159,22 + 5347,99X$ e coeficiente de correlação $R = 0,9961$. Através do gráfico da curva analítica para clorpirifós obteve-se a equação da reta $Y = -26042,35 + 4873,07X$ e coeficiente de correlação $R = 0,9940$.

Figura 55. Curvas analíticas utilizadas para determinar a concentração de a) 3,5,6-tricloro-2-piridinol e b) clorpirifós.

A curva analítica foi realizada para o 4-nitrofenol e para o pesticida metil paration nas concentrações de 5,0, 50,0, 100,0, 200,0, 300,0, 450,0, 500,0, 550,0, 600,0 e 650,0 ppm (Figura 56). Através do gráfico da curva analítica para o PNF obteve-se a equação da reta $Y = 103097,59 + 22138,56X$ e coeficiente de correlação $R = 0,9975$.

Através do gráfico da curva analítica para metil paration obteve-se a equação da reta $Y = -62198,76 + 27275,11X$ e coeficiente de correlação $R = 0,9965$.

Figura 56. Curvas analíticas utilizadas para determinar a concentração de a) 4-nitrofenol e b) metil paration.

4.3 Avaliação da concentração do ingrediente ativo dos pesticidas nas amostras comerciais

Para analisar a quantidade exata do ingrediente ativo presente nas amostras de trabalho e desenvolver as reações com o objetivo de degradar os PO na amostra comercial, fez-se necessário a análise da concentração dos ingredientes ativos de clorpirifós, metil paration e profenofós nestas amostras.

Para determinar o volume necessário de ingrediente ativo do pesticida, para uma reação final com concentração de 50,0 ppm, foi realizada uma análise em duplicata com quantidades arbitrárias de pesticida.

4.3.1 Profenofós

Segundo as informações de Syngenta®,⁹² a composição dos ingredientes ativos do pesticida Polytrin 400/40 CE, estudado neste trabalho é:

Ingredientes inertes: 652,00 g/L (65,2% m/v)

Profenofós: 400,00 g/L (40% m/v)

Cipermetrina: 40,00 g/L (4% m/v).

A quantidade arbitrária utilizada nas análises foi de 20,0 µL de pesticida solubilizado em 100 mL de AcOEt (Tabela 11).

Tabela 11. Análise em duplicata com 20,0 µL de profenofós para determinação da concentração do pesticida na amostra comercial de Polytrin 400/40 CE.

Análise	Concentração do ingrediente ativo (ppm)	
	Amostra 1	Amostra 2
1ª	54,3	53,5
2ª	54,2	53,1

Por estimativa dos resultados destas análises, para obter uma concentração final de 50,0 ppm em 100,0 mL de meio de cultura, para as reações de biodegradação, foram necessários a adição de 18,5 µL de profenofós. De acordo com estes dados, a concentração total do ingrediente ativo de profenofós na amostra de trabalho foi de aproximadamente 320,0 g/L.

4.3.2 Clorpirifós

A composição dos ingredientes ativos do pesticida Lorsban 480 BR, de acordo com Dow Agrosiences®,⁹³ é:

Clorpirifós: 480 g/L (48% m/v)

Ingredientes inertes: 669 g/L (66,9% m/v)

A quantidade arbitrária utilizada nas análises foi de 2,0 µL de pesticida solubilizado em 25 mL de metanol (Tabela 12).

Tabela 12. Análise em duplicata com 2,0 µL de clorpirifós para determinação da concentração do pesticida na amostra comercial de Lorsban 480 BR.

Análise	Concentração do ingrediente ativo (ppm)	
	Amostra 1	Amostra 2
1ª	38,4	40,7
2ª	36,9	38,6

Estimando os resultados das análises das duplicatas e considerando que a amostra foi concentrada em 25 mL de metanol, para obter uma concentração final de 50,0 ppm em 100,0 mL de meio de cultura foram necessários a adição de 10,3 µL de clorpirifós. De acordo com estes dados, a concentração total do ingrediente ativo de clorpirifós na amostra de trabalho foi de aproximadamente 485,0 g/L.

4.3.3 Metil paration

A composição dos ingredientes ativos do pesticida Folisuper 600 BR, de acordo com Agripec®,⁹⁴ é:

Metil paration: 600 g/L (60,0% m/v)

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

A quantidade arbitrária utilizada nas análises foi de 2,0 µL de pesticida solubilizado em 25 mL de metanol (Tabela 13).

Tabela 13. Análise em duplicata com 2,0 µL de metil paration para determinação da concentração do pesticida na amostra comercial de Folisuper 600 BR.

	Concentração do ingrediente ativo (ppm)	
	Amostra 1	Amostra 2
1ª análise	79,2	76,9
2ª análise	77,6	75,7

Estimando os resultados das análises das duplicatas e considerando que a amostra foi concentrada em 25 mL de metanol, para obter uma concentração final de 50,0 ppm em 100,0 mL de meio de cultura foram necessários a adição de 5,5 µL de metil paration. De acordo com estes dados, a concentração total do ingrediente ativo de metil paration na amostra de trabalho foi de aproximadamente 965,0 g/L, demonstrando uma variação muito grande em relação ao informado pelo fabricante. Porém, por se tratar de uma amostra de trabalho e não um padrão analítico, vários fatores podem ter influenciado nesta concentração, como temperatura de estocagem, embalagem, tipo de dispersante utilizado, etc.

4.4 Reações de biodegradação dos pesticidas organofosforados em meio líquido

Alguns pontos relevantes devem ser discutidos anteriormente às reações de biodegradação em meio líquido:

1. Os fungos para os inóculos adicionados ao meio líquido de malte 2% e meio líquido mineral, nas reações de biodegradação, foram ativados em placas e tubos de ensaio com a concentração de 50,0 ppm de pesticida para que houvesse a indução da produção das enzimas fosfotriestases. A indução de enzimas é um processo que ocorre na transcrição dos genes. A transcrição corresponde à primeira etapa no fluxo de informação biológica, e por esta razão, neste ponto a expressão gênica é afetada de maneira relativamente fácil. Na indução enzimática, uma enzima é sintetizada somente quando o seu substrato encontra-se presente na amostra. Assim, para que o micro-organismo já estivesse com as enzimas fosforotriesterases expressas quando inoculados em meio líquido, o fungo foi cultivado na presença do pesticida organofosforado frente à reação correspondente.^{95,96}

2. O pH do meio de cultura líquido foi ajustado para pH 7, devido aos relatos na literatura indicarem que as enzimas fosfotriesterases apresentam uma melhor atividade catalítica em pH de neutro a básico. Segundo Eivazi e Tabatabai, a hidrólise do pesticida paraoxon com enzimas animais apresentam uma atividade catalítica ótima em pH 7,3. Medidas da atividade pelo método de liberação do *p*-nitrofenol mostraram uma atividade ótima em pH de 7 a 11.⁹⁷ A hidrólise dos organofosforados no ambiente (na ausência de enzimas) também é influenciado pelo pH, sendo que, quanto mais alcalino o meio, mais rápida será a hidrólise.⁹⁸

3. As extrações das reações foram realizadas com o volume total da reação, pois para quantificar a biodegradação é importante que seja feita a extração completa de todo o sistema.

Os fungos, assim como as bactérias, absorvem os nutrientes, e esta absorção de compostos é auxiliada por enzimas secretadas no meio, transportando ou quebrando as moléculas orgânicas mais complexas para que estas sejam transferidas para dentro das células.⁸⁵ Assim, a extração em agitação magnética é útil para extrair tanto o pesticida que eventualmente esteja no interior das células (já que esta extração consiste no rompimento das células) quanto as moléculas que possam estar aderidas na superfície da membrana destas células.

4. Os inóculos para as reações com o pesticida profenofós foram padronizados por área (item 3.7.1.1). Para otimizar o método de inoculação, para os pesticidas clorpirifós e metil paration, foram preparadas as suspensão de esporos (3.7.2.1 e 3.7.3.1). Porém, mesmo com a padronização do inóculo, os resultados obtidos quando as reações são realizadas em duplicatas podem apresentar variações, já que o crescimento do fungo pode ocorrer de maneira distinta em cada frasco e vários fatores podem afetar este desenvolvimento, como: agitação orbital, temperatura, tipo de formação das colônias, variação de pH de acordo com o crescimento dos micro-organismos, etc.

5. Anteriormente às etapas de extrações líquido-líquido, o meio foi acidificado para pH 6 para que ocorresse uma extração mais eficiente dos metabólitos referentes aos pesticidas, que são compostos fenólicos ou derivados. Ajustes no pH podem aumentar a eficiência da extração, uma vez que tanto o equilíbrio de dissociação quanto a solubilidade de ácidos e bases são diretamente afetados pelo pH da amostra.⁹⁹ Em pH 7, estes compostos podem, eventualmente estarem em sua forma iônica na solução, não sendo adequadamente extraídos pela técnica de extração líquida.

4.4.1 Biodegradação do pesticida profenofós pelos fungos *P. raistrickii* CBMAI 931 e *A. sydowii* CBMAI 935

4.4.1.1 Avaliação da biodegradação do profenofós com 10 dias de reação

Na primeira extração, em 10 dias, foram separados o caldo enzimático das células úmidas e submetidos às análise em CG-EM-SIM (item 3.7.1.1). Nas Figuras 57 e 58 estão os cromatogramas com sobreposição das extrações em duplicatas. Na Tabela 14, estão sumarizados os dados referentes a biodegradação do profenofós pelas cepas fúngicas de *A. sydowii* CBMAI 935 e *P.raistrickii* CBMAI 931.

Figura 57. Cromatogramas obtidos por CG-EM-SIM da biodegradação de profenofós por *A. sydowii* CBMAI 935, durante 10 dias. (a) Extração do caldo enzimático e (b) Extração das células úmidas.

Condições de análise CG-EM: $T_i = 100^\circ \text{C}$, 5 min; $T_f = 250^\circ \text{C}$, 10 min; $r = 5^\circ \text{C/min}$, $t_c = 45$ min.
Coluna capilar DB-5 da J&W Scientific (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

Figura 58. Cromatogramas obtidos por CG-EM-SIM da biodegradação de profenofós por *P. raistrickii* CBMAI 931, durante 10 dias. (a) Extração do caldo enzimático e (b) Extração das células úmidas.

Condições de análise CG-EM: $T_i = 100^\circ \text{C}$, 5 min; $T_f = 250^\circ \text{C}$, 10 min; $r = 5^\circ \text{C/min}$, $t_c = 45$ min.
Coluna capilar DB-5 da J&W Scientific (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

Tabela 14. Quantificação da biodegradação do profenofós por *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. raistrickii* CBMAI 931, em 10 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).

A. sydowii CBMAI 935 (50.0 ppm de profenofós)				
Reações em duplicata	Massa fúngica seca (g)	c ^a metabolite (ppm)	c ^a profenofós (ppm)	% de profenofós degradado ^b
Reação 1 (caldo enzimático)	-	2,1	2,7 ^c	53,0
Reação 1 (células)	0,96	8,5	20,8	
Reação 2 (caldo enzimático)	-	1,4	2,4 ^c	45,0
Reação 2 (células)	0,64	7,7	25,1	
P. raistrickii CBMAI 931 (50.0 ppm of profenofos)				
Reação 1 (caldo enzimático)	-	8,4	1,1 ^c	81,4
Reação 1 (células)	0,29	1,7	8,2	
Reação 2 (caldo enzimático)	-	9,3	3,0 ^c	48,0
Reação 2 (células)	0,36	1,6	23,0	

^a c = concentração (dados obtidos de duplicatas) determinados por CG-EM-SIM^b total de profenofós degradado (caldo + células)^c concentração estimada

As extrações das reações em duplicatas dos experimentos com o fungo *A. sydowii* CBMAI 935 apresentaram uma boa concordância dos dados de biodegradação, pois os resultados obtidos foram similares (53% e 45% de profenofós degradado). Enquanto que as reações em duplicatas dos experimentos com o fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 apresentaram uma discordância significativa em cada reação. Como o comportamento do crescimento do fungo varia para cada experimento, outros fatores podem ter causado a interferência que causou a discordância entre os resultados. Deve-se também considerar que embora as reações sejam realizadas em duplicatas, elas ocorrem de forma independente e, portanto, são reações únicas. Ressaltando, então, que o mais importante neste caso foi a observação da biodegradação do pesticida.

As concentrações do profenofós para as extrações com o caldo enzimático na presença de ambos os fungos foram estimadas por extrapolação da reta obtida na curva analítica para o profenofós, já que devido a baixa concentração obtida nas análises, a área do pico de profenofós não foi suficiente para ser aplicada a equação da reta. Portanto, estes valores então são somente estimados.

Nas Figura 57 e 58 dos cromatogramas do caldo enzimático e das células úmidas para os dois fungos, foi observado uma maior concentração do pesticida nas células do fungo em relação ao caldo enzimático. Também pode-se notar a maior concentração do metabólito no caldo enzimático em relação as células úmidas. Estes dados podem sugerir, que as células fúngicas estejam absorvendo as moléculas de profenofós e após a metabolização destas,

excretando uma parte do metabólito para o caldo enzimático. Segundo Chen e Mulchandani, a enzima organofosforado-hidrolase encontra-se no interior das células e para que ocorra a biodegradação, o pesticida deve ser transportado para o interior celular. Além da absorção das moléculas do pesticida, também é possível que estas moléculas estejam somente aderidas às membranas das células fúngicas.⁶³

4.4.1.2 Avaliação da biodegradação do profenofós com 20 dias de reação

As reações com 20 dias foram realizadas para a quantificação da extração única do caldo enzimático juntamente com células úmidas e submetidos às análises em CG-EM-SIM (item 3.7.1.1). Na Tabela 15, estão sumarizados os dados referentes à biodegradação do profenofós pelas cepas de *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. raistrickii* CBMAI 931.

Tabela 15. Quantificação da biodegradação de profenofós por *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. raistrickii* CBMAI 931 em 20 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).

<i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (50.0 ppm de profenofós)				
Reações em duplicata	Massa fúngica seca (g)	c ^a metabólito (ppm)	c ^a profenofós (ppm)	% de profenofós degradado
Reação 1	0,36	5,5	13,0	74,0
Reação 2	0,33	4,9	16,3	67,4
<i>P. raistrickii</i> CBMAI 931 (50.0 ppm de profenofós)				
Reação 1	0,19	13,8	11,0	78,0
Reação 2	0,21	11,0	7,4	85,2

^a c = concentração (dados obtidos de duplicatas) determinados por CG-EM-SIM

As extrações das reações com ambos os fungos utilizados apresentaram uma boa porcentagem de biodegradação do pesticida profenofós após 20 dias de reação. Contudo, o fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 mostrou-se mais eficiente na degradação do pesticida que *A. sydowii* CBMAI 935.

4.4.1.3 Avaliação da biodegradação do profenofós com 30 dias de reação

Finalmente, as reações de biodegradação do profenofós foram realizadas em 30 dias de reação (Tabela 16, Figura 59). Também foram analisados os seguintes experimentos:

a) reação contendo somente 4-bromo-2-clorofenol como substrato, com o objetivo de avaliar o potencial biocatalítico para a degradação completa do pesticida em metabólitos não tóxicos (Tabela 17, Figura 60);

b) reação em meio mineral suplementado com KNO_3 , com o objetivo de avaliar se os fungos são capazes de desenvolver-se somente na presença do pesticida (fonte de carbono) e de nitrato (fonte de nitrogênio), utilizando-se destes como nutrientes (Tabela 18, Figura 61);

c) controle para o profenofós, com o objetivo de determinar a hidrólise espontânea do pesticida em meio líquido (Tabela 19);

d) controle para o fungo, realizado com o objetivo de calcular a massa micelial produzida por este fungo em 30 dias de crescimento na ausência do pesticida (Tabela 20).

Tabela 16. Quantificação da biodegradação de profenofós por *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. raistrickii* CBMAI 931, em 30 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).

<i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (50.0 ppm de profenofós)				
Reações em duplicata	Massa fúngica seca (g)	c ^a metabólito (ppm)	c ^a profenofós (ppm)	% de profenofós degradado
Reação 1	0,38	12,0	12,5	75,0
Reação 2	0,39	11,0	16,0	68,0
<i>P. raistrickii</i> CBMAI 931 (50.0 ppm de profenofós)				
Reação 1	0,22	17,8	2,3 ^b	95,4
Reação 2	0,20	21,4	0,6 ^b	98,8

^a c = concentração (dados obtidos de duplicatas) determinados por CG-EM-SIM

^b concentração estimada

Figura 59. Cromatogramas obtidos por em CG-EM-SIM da biodegradação de profenofós, durante 30 dias. (a) Na presença do fungo *A. sydowii* CBMAI 935, (b) Na presença do fungo *P. raistrickii* CBMAI 931.

Condições de análise CG-EM: $T_i = 100^\circ \text{C}$, 5 min; $T_f = 250^\circ \text{C}$, 10 min; $r = 5^\circ \text{C/min}$, $t_c = 45$ min.

Coluna capilar DB-5 da J&W Scientific (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

As concentrações finais de profenofós para as reações de biodegradação na presença de *P. raistrickii* CBMAI 931 foram estimadas, devido aos baixos valores de áreas não poderem ser aplicados à equação da reta. A biodegradação do pesticida na presença deste fungo foi

quase total, indicando um maior potencial biocatalítico que *A. sydowii* CBMAI 935 para a degradação do profenofós.

Todas as amostras foram submetidas às análises em CG-EM-SCAN, porém, pelo método utilizado nenhum metabólito foi identificado, incluindo os metabólitos produzidos pelos fungos. Foram identificados picos referentes a esteróides (provavelmente derivados do metabolismo do fungo) e vários picos correspondentes a hidrocarbonetos derivados de benzeno, pertencentes aos ingredientes inertes do pesticida profenofós que é, também, degradado em 30 dias de reação (Anexos).

Tabela 17. Quantificação da biodegradação de 4-bromo-2-clorofenol por *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. raistrickii* CBMAI 931, em 30 dias (32 °C, 130 rpm, pH 7).

<i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (50.0 ppm de 4-bromo-2-clorofenol)			
Reações em duplicata	Massa fúngica seca (g)	c ^a metabólito (ppm)	% de metabólito degradado
Reação 1	0,39	0,8	98,4
Reação 2	0,37	0,9	98,2
<i>P. raistrickii</i> CBMAI 931 (50.0 ppm de 4-bromo-2-clorofenol)			
Reação 1	0,30	1,8	96,4
Reação 2	0,35	1,2	97,6

^a c = concentração (dados obtidos de duplicatas) determinados por CG-EM-SIM

Figura 60. Cromatogramas referentes à biodegradação do metabólito, durante 30 dias em CG-EM-SIM. (a) Na presença do fungo *A. sydowii* CBMAI 935, (b) Na presença do fungo *P. raistrickii* CBMAI 931.

Condições de análise CG-EM: $T_i = 100^\circ \text{C}$, 5 min; $T_f = 250^\circ \text{C}$, 10 min; $r = 5^\circ \text{C/min}$, $t_c = 45 \text{ min}$. Coluna capilar DB-5 da J&W Scientific (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

De acordo com dados da ficha de segurança, MSDS, (*Material Safety Data Sheet*) para o 4-bromo-2-clorofenol, este é classificado como altamente tóxico.¹⁰⁰ Contudo, nas reações

entre o metabólito e os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. raistrickii* CBMAI 931, houve um desaparecimento praticamente total do 4-bromo-2-clorofenol com ambos os micro-organismos. Duas possibilidades podem estar favorecendo o desaparecimento do metabólito: a biodegradação ou a conjugação do metabólito a compostos mais polares.

De acordo com Derelanko e Hollinger, as reações de biotransformação para compostos xenobióticos em sistemas biológicos podem ser divididas em duas fases: Fase I, reações para modificação dos xenobióticos e Fase II, reações de conjugação. Na fase I, as reações mais prováveis para acontecer são: oxidação, redução, hidrólise e isomerização.¹⁰¹

A hidrólise dos PO promovida pelas enzimas fosfotriesterases é uma importante etapa na Fase I da biotransformação, que é geralmente seguida pela Fase II, as reações de conjugação. A fase II pode ser considerada um mecanismo de destoxificação, uma vez que as moléculas conjugadas formadas são menos tóxicas. Esta fase consiste na adição da molécula de xenobiótico a grupos endógenos, que são geralmente polares e abundantemente disponíveis *in vivo*. Esse processo consiste na formação de uma molécula resultante mais ácida, mais polar, menos solúvel em lipídeos, facilitando assim, a eliminação da molécula xenobiótica. As reações de conjugação mais comuns podem ser acetilação, conjugação com aminoácidos, glucuronidação, conjugação com a glutatona, metilação e sulfatação.¹⁰¹

Assim, não é possível afirmar que os metabólitos formados para as reações de biodegradação dos PO, neste caso o, 4-bromo-2-clorofenol, estejam sendo efetivamente biodegradados. De qualquer forma, a diminuição da toxicidade através da reação de conjugação e a provável excreção do metabólito do meio após esta etapa, tornam o mecanismo enzimático eficiente para qualquer uma dessas possibilidades. Portanto, não foi possível determinar quais os metabólitos formados nesta reação de degradação e/ou conjugação, o que pode ser sugerido como uma etapa adicional para estudos futuros (Anexos).

Para complementar os estudos da biodegradação, foi realizado um experimento em meio mineral suplementado com KNO₃, que demonstrou através da alta porcentagem de degradação do profenofós, que os fungos estão utilizando-se do pesticida como fonte de nutrientes, já que este foi a única fonte de carbono presente no meio reacional.

Tabela 18. Quantificação da biodegradação de profenofós por *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. raistrickii* CBMAI 931, em 30 dias, em meio mineral suplementado com KNO₃ (32 °C, 130 rpm, pH 7).

<i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (100.0 ppm de profenofós)				
Reações em duplicata	Massa fúngica seca (g)	c ^a metabólito (ppm)	c ^a profenofós (ppm)	% de profenofós degradado
Reação 1	*	39,5	3,7	92,6
Reação 2	*	38,0	5,7	88,6
<i>P. raistrickii</i> CBMAI 931 (100.0 ppm de profenofós)				
Reação 1	*	46,3	2,2 ^b	95,6
Reação 2	*	44,8	1,8 ^b	96,4

^a c = concentração (dados obtidos de duplicatas) determinados por CG-EM-SIM

^b concentração estimada

* Não foi obtida massa micelial

Figura 61. Cromatogramas referentes à biodegradação de profenofós em meio líquido mineral suplementado com KNO₃, durante 30 dias em CG-EM-SIM. (a) Na presença do fungo *A. sydowii* CBMAI 935, (b) Na presença do fungo *P. raistrickii* CBMAI 931.

Condições de análise CG-EM: T_i = 100° C, 5 min; T_f = 250° C, 10 min; r = 5° C/ min, t_c = 45 min.

Coluna capilar DB-5 da J&W Scientific (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

É importante destacar que a concentração do pesticida no meio foi de 100,0 ppm, devido a este ser a única fonte de carbono fez-se necessário uma maior concentração deste no meio, assim, observou-se uma maior concentração final do metabólito. O metabólito possivelmente também esteja sendo parcialmente degradado, já que somente 50% do pesticida foi convertido a este produto.

No meio mineral, possivelmente os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. raistrickii* CBMAI 931 podem estar utilizando o profenofós como fonte de nutriente. Se o meio é mínimo, certamente que a massa micelial será produzida em menor quantidade, como demonstrado na Tabela 18, onde não houve a obtenção de células úmidas em quantidade suficiente para serem pesadas e quantificadas.

Através da reação controle de profenofós, pode-se comparar a hidrólise espontânea do pesticida no meio reacional na ausência do fungo, e consequentemente, sem as enzimas que catalisam a degradação do pesticida.

Tabela 19. Quantificação da degradação de profenofós por hidrólise espontânea, em 30 dias (32 °C, 130 rpm, pH 7).

Reações em duplicata	c ^a metabolite (ppm)	c ^a profenofós (ppm)	% de profenofós degradado
Reação 1	3,3	30,2	39,6
Reação 2	4,2	31,0	38,0

^a c = concentração (dados obtidos de duplicatas) determinados por CG-EM-SIM

Através da reação controle de profenofós, pode-se comparar a hidrólise espontânea do pesticida no meio reacional na ausência do fungo, e consequentemente, sem as enzimas que catalisam a degradação do pesticida. Houve uma degradação de aproximadamente 40%, indicando que este pesticida não é persistente no ambiente, já que um tempo de meia vida de aproximadamente um mês é relativamente baixo, comparativamente a outros pesticidas, como os organoclorados. Entretanto, restaram aproximadamente 60% do pesticida, mostrando que o processo enzimático é altamente eficiente para promover a biodegradação do profenofós. Deve-se destacar, ainda, que a hidrólise espontânea não promoveu a degradação do metabólito, como ocorre no sistema enzimático.

Para avaliar a possível inibição do crescimento dos fungos frente aos pesticidas avaliados foi realizada a reação de controle do fungo (ausência do pesticida).

Tabela 20. Quantidade de massa micelial produzida por *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. raistrickii* CBMAI 931, na ausência de profenofós, em 30 dias (32 °C, 130 rpm, pH 7).

<i>A. sydowii</i> CBMAI 935	
Reações em duplicata	Massa fúngica seca (g)
Reação 1	1,50
Reação 2	1,49
<i>P. raistrickii</i> CBMAI 931	
Reação 1	1,40
Reação 2	1,23

Observou-se através da reação de controle dos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. raistrickii* CBMAI 931, que houve um crescimento superior das células na ausência do pesticida, indicando que este pode atuar como um inibidor do crescimento destes fungos, como observado anteriormente pelos *screenings* realizados em meio sólido (Tabela 10).

4.4.1.4 Reação de biodegradação do pesticida profenofós pelos fungos *P. raistrickii* CBMAI 931 em diferentes concentrações

Com o objetivo de avaliar a biodegradação do pesticida profenofós com diferentes concentrações, foi realizado o ensaio com variações das concentrações iniciais para a reação padrão do pesticida (meio de cultura líquido de malte 2% + 50,0 ppm de profenofós + inóculos do fungo) em 30 dias de reações. As reações foram realizadas em duplicatas, e as médias das duplicatas estão apresentadas na Tabela 21, para as concentrações iniciais de 15,0, 30,0, 50,0 e 65,0 ppm e também os dados para o controle do pesticida (meio de cultura líquido de malte 2% + 50,0 ppm de profenofós).

Tabela 21. Quantificação da biodegradação de profenofós por *P. raistrickii* CBMAI 931 em diferente concentrações do pesticida (32°C, 130 rpm, pH 7).

c _i profenofós* (ppm)	c _f profenofós* (ppm)	cmetabólito* (ppm)	profenofós degradado (%)
15,00	0,50	4,9	99,0
30,00	0,60	20,4	98,0
50,00	2,50	24,1	95,0
65,00	3,20	27,9	95,0
30,00 (controle)	14,90	10,8	50,0

*concentração (dados obtidos das duplicatas) determinados por CG-EM-SIM

Observou-se uma biodegradação praticamente completa para as menores concentrações de pesticida. Em maiores concentrações (50,0 e 65,0 ppm) os resultados também foram satisfatórios, apresentando 95% de degradação do profenofós. Este ensaio comprovou, que em meio líquido, assim como em meio sólido, o fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 mostrou-se resistente a maiores concentrações do pesticida e com um excelente potencial de biodegradação para o profenofós.

Com o controle, em concentração inicial de 30,0 ppm na ausência do fungo, observou-se uma degradação de apenas 50% em um período de 30 dias, contribuindo com os dados de que na presença de fungos há uma aceleração na reação, que ocorreu possivelmente devido à presença das enzimas fosfotriesterases. Assim como nos experimentos anteriores, o fungo também promoveu a biodegradação do metabólito, ou houve a conjugação deste com outras moléculas presentes no meio reacional.

4.4.2 Padronização dos inóculos dos fungos filamentosos por suspensão de esporos para as reações com os pesticidas clorpirifós e metil paration

Uma forma de otimizar a inoculação dos fungos é a padronização através da suspensão de esporos. A suspensão de esporos, ao contrário da padronização por área, permite o controle do número de esporos inoculados no meio líquido. Foram preparadas suspensões de esporos para os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932, na presença de 50,0 ppm do pesticida clorpirifós e para os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234 na presença de 50,0 ppm de metil paration.

Todas as suspensões das cepas fúngicas foram 10 vezes diluídas para facilitar a contagem na Câmara de Neubauer, exceto a cepa de *Trichoderma* sp. CBMAI 932, que necessitou de uma diluição de 20 vezes. A concentração de esporos, fixada para as reações, foi de 10^5 esporos/mL e os resultados obtidos estão sumarizados na Tabela 22.

Tabela 22. Dados obtidos através da contagem de esporos na suspensão das cepas fúngicas utilizadas nas reações de biodegradação.

Indutor	Código dos fungos	Nº de esporos na suspensão	Volume na reação (µL)
Clorpirifós	CBMAI 935	$5,01 \times 10^7$	195,0
Clorpirifós	CBMAI 932	$6,03 \times 10^8$	17,0
Metil paration	CBMAI 935	$8,02 \times 10^7$	125,0
Metil paration	CBMAI 1234	$2,49 \times 10^8$	40,0

4.4.3 Biodegradação do pesticida clorpirifós pelos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932

4.4.3.1 Avaliação da biodegradação do clorpirifós com 10 dias de reação

Em 10 dias de reação com os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932 e os pesticidas clorpirifós, foram realizadas as quantificações da extração do caldo enzimático + células úmidas e submetidos às análises em CLAE (item 3.7.2.1). Na Tabela 23, estão sumarizados os dados referentes à biodegradação do clorpirifós pelas cepas fúngicas, durante este período.

Tabela 23. Quantificação da biodegradação de clorpirifós por *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932, em 10 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).

<i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (50,0 ppm de clorpirifós)				
Reações em duplicata	Massa fúngica seca (g)	c ^a metabólito (ppm)	c ^a clorpirifós (ppm)	% de clorpirifós degradado
Reação 1	0,41	3,3 ^b	35,4	29,2
Reação 2	0,40	2,7 ^b	27,1	45,8
<i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932 (50,0 ppm de clorpirifós)				
Reação 1	0,39	-	30,2	39,6
Reação 2	0,40	-	23,9	52,2

^a c = concentração (dados obtidos de duplicatas) determinados por CLAE.

^b concentração estimada

Como citado anteriormente nas análises do pesticida profenofós, as concentrações de metabólito e pesticida que não estão no intervalo dos pontos experimentais da curva analítica, foram estimadas por extrapolação da reta obtida através da curva analítica, tanto para o pesticida quanto para o metabólito.

Em dez dias de reação, ambos os fungos promoveram uma degradação de aproximadamente 30 a 46% para o fungo *A. sydowii* CBMAI 935, e de 40 a 53% para o fungo *Trichoderma* sp. CBMAI 932, com inexistente ou baixa formação do metabólito 3,5,6-tricloro-2-piridinol.

4.4.3.2 Avaliação da biodegradação do clorpirifós com 20 dias de reação

Em 20 dias de experimento, foram realizadas tanto as extrações separadas para o caldo enzimático e as células úmidas, quanto a extração do caldo enzimático + células úmidas, e submetidas a análise em CLAE (item 3.7.2.1). Na Tabela 24 e nas Figuras 62 e 63, estão sumarizados os dados referentes à biodegradação do clorpirifós pelos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932.

Tabela 24. Quantificação da biodegradação de clorpirifós por *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932, em 20 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).

<i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (50,0 ppm de clorpirifós)				
Reações em duplicata	Massa fúngica seca (g)	c ^a metabólito (ppm)	c ^a clorpirifós (ppm)	% de clorpirifós degradado ^b
Reação 1	0,40	6,3	24,6	50,8
Reação 2 (caldo enzimático)		4,9 ^b	1,0 ^b	
Reação 2 (células)	0,38	-	26,0	46,0
<i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932 (50,0 ppm de clorpirifós)				
Reação 1	0,40	-	17,7	64,6
Reação 2 (caldo enzimático)	-	-	2,5 ^b	
Reação 2 (células)	0,39	-	24,6	45,8

^a c = concentração (dados obtidos de duplicatas) determinados por CLAE.^b total de profenofós degradado (caldo + células)^c concentração estimada**Figura 62.** Cromatogramas obtidos por CLAE das reações entre clorpirifós (CP) e *A. sydowii* CBMAI 935, em 20 dias de reação. a) Padrão TCP, b) Padrão CP, c) Reação CP + *A. sydowii* CBMAI 935 (caldo enzimático + células), d) Reação CP + *A. sydowii* CBMAI 935 (caldo enzimático), e) Reação CP + *A. sydowii* CBMAI 935 (células). Condições de análise CLAE: ACN/ H₂O (75:25); fluxo 1,0 mL/ min; 280 nm; t_c = 20 min.

Coluna C18 Shimadzu CLC-ODS(M) OD-H (0,46 x 25 cm).

Figura 63. Cromatogramas obtidos por CLAE das reações entre clorpirifós (CP) e *Trichoderma* sp. CBMAI 932, em 20 dias de reação. a) Padrão TCP, b) Padrão CP, c) Reação CP + *Trichoderma* sp. CBMAI 932 (caldo enzimático + células), d) Reação CP + *Trichoderma* sp. CBMAI 932 (caldo enzimático), e) Reação CP + *Trichoderma* sp. CBMAI 932 (células).

Condições de análise CLAE: ACN/ H₂O (75:25); fluxo 1,0 mL/ min; 280 nm; t_c = 20 min.
Coluna C18 Shimadzu CLC-ODS(M) OD-H (0,46 x 25 cm).

Assim como para o pesticida profenofós, houve uma diferença significativa na concentração de pesticida clorpirifós nas células úmidas e no caldo enzimático. Observou-se uma alta concentração de clorpirifós nas células úmidas do fungo, e uma baixa quantidade no caldo enzimático. O metabólito, 3,5,6-tricloro-2-piridinol, foi detectado no caldo enzimático na presença da cepa fúngica de *A. sydowii* CBMAI 935 e em pequena concentração na presença de *Trichoderma* sp. CBMAI 932, indicando uma possível excreção deste do interior celular.

As duplicatas para os experimentos apresentaram uma discordância significativa nos períodos de 10 e 20 dias de experimentos, mas como citado anteriormente (item 4.4), as reações são independentes e, apesar da padronização do inóculo, cada colônia irá

desenvolver-se de forma diferente em cada frasco Erlenmeyer de acordo com temperatura, agitação orbital, etc.

A média da degradação do clorpirifós na presença de *A. sydowii* CBMAI 935 foi de 49% e na presença do fungo *Trichoderma* sp. CBMAI 932 foi de 55%, indicando que este pesticida apresenta uma meia vida de aproximadamente 20 dias na presença do sistema enzimático dos fungos marinhos selecionados.

4.4.3.3 Avaliação da biodegradação do clorpirifós com 30 dias de reação

Com o objetivo de avaliar variações da reação de biodegradação do clorpirifós com as cepas fúngicas de *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932, foram realizadas as reações entre os fungos e o metabólito (TCP), reações em meio mineral suplementado com KNO₃, controle do pesticida clorpirifós (ausência do fungo) e controle dos fungos analisados (ausência do pesticida).

Tabela 25. Quantificação da biodegradação de clorpirifós por *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932, em 30 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).

<i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (50,0 ppm de clorpirifós)				
Reações em duplicata	Massa fúngica seca (g)	c ^a metabólito (ppm)	c ^a clorpirifós (ppm)	% de clorpirifós degradado
Reação 1	0,36	8,8	16,9	66,2
Reação 2	0,35	9,4	20,2	59,6
<i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932 (50,0 ppm de clorpirifós)				
Reação 1	0,39	4,5 ^b	13,8	72,4
Reação 2	0,37	1,1 ^b	13,9	72,2

^a c = concentração (dados obtidos de duplicatas) determinados por CLAE

^b concentração estimada

Observou-se uma degradação satisfatória para o período de 30 dias de reação. No entanto, quando comparado aos pesticidas profenofós e metil paration, o clorpirifós apresentou a menor biodegradação na presença dos fungos marinhos selecionados.

O pesticida Lorsban é comercializado na forma de concentrado emulsionável para aumentar a solubilidade do ingrediente ativo clorpirifós em água. A solubilidade extremamente baixa em água pode causar o fornecimento limitado da fonte de carbono do pesticidas, tornando sua biodegradação um processo mais difícil.¹⁰²

Com o objetivo de avaliar a biodegradação do 3,5,6-tricloro-2-piridinol com os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932 foram realizadas as reações entre os fungos e o metabólito (Tabela 26).

Tabela 26. Quantificação da biodegradação do 3,5,6-tricloro-2-piridinol por *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932 em 30 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).

<i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (50,0 ppm de 3,5,6-tricloro-2-piridinol)			
Reações em duplicata	Massa fúngica seca (g)	c ^a metabólito (ppm)	% de metabólito degradado
Reação 1	0,34	38,6	22,8
Reação 2	0,33	36,1	27,8
<i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932 (50,0 ppm de 3,5,6-tricloro-2-piridinol)			
Reação 1	0,18	32,2	35,6
Reação 2	0,19	29,2	41,6

^a c = concentração (dados obtidos de duplicatas) determinados por CLAE

Os fungos selecionados não foram capazes de promover uma biodegradação apreciável do metabólito 3,5,6-tricloro-2-piridinol. Apenas traços de TCP foram identificados nas análises com o pesticida clorpirifós na presença do fungo *Trichoderma* sp. CBMAI 932 nos períodos de 10 a 30 dias. Além disso, observou-se um maior desaparecimento do metabólito na presença desta cepa fúngica. Pode-se inferir, que há uma conjugação ou degradação mais rápida do metabólito com moléculas endógenas presentes no meio reacional contendo o fungo *Trichoderma* sp. CBMAI 932, em relação ao fungo *A. sydowii* CBMAI 935.

As análises dos fenóis quando conjugados, podem tornar-se muito expensivas. Uma possível metodologia para a análise eficaz do 3,5,6-tricloro-2-piridinol em matrizes biológicas envolve:

- i) hidrólise ácida para a desconjugação do glucoronídeo;
- ii) derivatização com *N,O*-bis-(trimetilsilil)-acetamida para a proteção do grupo funcional (hidroxila);
- iii) extração com solvente orgânico;
- iv) evaporação até secagem do solvente;
- v) dissolução em um pequeno volume de solvente apropriado, seguido de análise por técnicas cromatográficas.¹⁰³

Apesar de não atuar como inibidor da enzima AchE, o TCP atua, também, como um contaminante. De acordo com a base de dados de pesticidas, PAN (*Pesticides Database*) não existe uma classe toxicológica definida pela WHO ou outros órgãos regulatórios para o 3,5,6-tricloro-2-piridinol.¹⁰⁴ Uma possível razão para a elavada resistência do clorpirifós à biodegradação pode ser atribuída aos efeitos tóxicos do metabólito.

Por apresentar maior solubilidade em água, comparado ao clorpirifós, o TCP pode ser um marcador da contaminação deste pesticida, já que este pode ser mais facilmente transportado

no ambiente. Uma vez no meio, o TCP pode causar contaminações tanto no solo quanto em corpos hídricos. Na presença de fungos, o TCP não somente é resistente frente a biodegradação, como pode, também, limitar a biodegradação do clorpirifós, já que apresenta atividade anti-microbiana.³⁹

Na presença do fungo *Trichoderma* sp. CBMAI 932, o TCP apresentou uma degradação média de aproximadamente 39%. Comparando-se a massa micelial desta cepa em meio líquido de malte 2% na ausência de qualquer xenobiótico (Tabela 29), com a massa obtida para a reação do fungo na presença do TCP, observou-se uma significativa diminuição nos valores da massa celular do fungo produzido frente ao metabólito, podendo evidenciar uma atividade anti-microbiana frente a este fungo. Há, também, a possibilidade do TCP estar sendo degradado a moléculas pontencialmente mais tóxicas, que, conseqüentemente, causaram uma diminuição na massa fúngica. Na presença do fungo *A. sydowii* CBMAI 935, houve uma menor taxa média de degradação (aproximadamente 25%), e não foi observada a diminuição da massa das células úmidas

Para complementar os estudos da biodegradação, foi realizado o experimento em meio mineral suplementado com KNO₃ (Tabela 27).

Tabela 27. Quantificação da biodegradação de clorpirifós por *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932, em 30 dias, em meio mineral suplementado com KNO₃ (32 °C, 130 rpm, pH 7).

<i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (100,0 ppm de clorpirifós)				
Reações em duplicata	Massa fúngica seca (g)	c ^a metabólito (ppm)	c ^a clorpirifós (ppm)	% de clorpirifós degradado
Reação 1	*	5,4	88,2	11,8
Reação 2	*	4,3 ^b	64,7	35,7
<i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932 (100,0 ppm de clorpirifós)				
Reação 1	*	5,3	98,4	1,6
Reação 2	*	2,1 ^b	90,6	9,4

^a c = concentração (dados obtidos de duplicatas) determinados por CLAE

^b concentração estimada

* Não foi obtida massa micelial

Em meio líquido mineral suplementado com KNO₃ a porcentagem de biodegradação foi muito baixa. Como citado anteriormente, a baixa solubilidade do pesticida pode causar a limitação ao fornecimento da fonte de carbono, e uma vez que o clorpirifós é a única fonte de carbono presente no meio reacional, os fungos não dispunham dos nutrientes necessários para que, através de seu metabolismo primário, pudessem degradar de forma satisfatória o pesticida clorpirifós.

Para avaliar a hidrólise espontânea de clorpirifós no meio reacional foi realizado o controle do pesticida, na ausência das cepas fúngicas. Inicialmente, o experimento para o controle do clorpirifós foi realizado em um período de 30 dias, no entanto, houve um desaparecimento completo do pesticida nas análises realizadas neste período. Com o objetivo de avaliar este fenômeno, foram preparadas reações em meio líquido de malte 2% contendo 50,0 ppm de clorpirifós em 10, 20 e 30 dias. Os dados das médias aritméticas das duplicatas das reações estão apresentadas na Tabela 28.

Tabela 28. Quantificação da degradação de clorpirifós por hidrólise espontânea, em 10, 20 e 30 dias (32 °C, 130 rpm, pH 7).

Tempo de reação (dias)	c ^a metabólito (ppm)	c ^a clorpirifós (ppm)	% de clorpirifós degradado
10	1,4	6,0 ^b	88,0
20	-	3,6 ^b	92,8
30	-	-	100,0

^a c = concentração (dados obtidos de duplicatas) determinados por CLAE

^b concentração estimada

Uma vez que, na literatura, é reportada uma meia vida no solo de 10 a 120 dias, podendo variar de 2 meses a 1 ano dependendo das características do solo, a hidrólise espontânea completa em um meio não enzimático é praticamente impossível para um período tão curto de tempo.¹⁰² Em 10 dias de reação, aproximadamente 90% do pesticida já havia desaparecido. O meio de malte 2% é preparado a partir do extrato de malte, um componente rico em nutrientes como, maltose, glicose e oligômeros de glicose (3 a 10 unidades glicosídicas), bem como compostos não carboidratos, como sais inorgânicos, proteínas e vitaminas.¹⁰⁵ A conjugação com açúcares ou outras moléculas presentes no meio, é a hipótese mais provável para o desaparecimento do clorpirifós em um período de tempo tão curto.

Na presença do sistema enzimático dos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932, o desaparecimento do pesticida foi muito mais lento e em menor proporção, fazendo com que a hipótese de hidrólise espontânea seja improvável neste contexto. A possível conjugação do pesticida provavelmente não ocorreu na presença das cepas fúngicas pois estas absorvem o pesticida para o interior celular para que aconteça a metabolização deste xenobiótico, tornando-o menos disponível para a conjugação. Além disso, a quantidade dessas moléculas que possivelmente conjugaram-se com o pesticida na reação controle, na presença do fungo estariam muito menos disponíveis, uma vez que os fungos utilizam estas moléculas como fonte de nutrientes para desenvolver-se.

A Figura 64 apresenta os cromatogramas de CLAE para 10, 20 e 30 dias de experimento. Observou-se um pico muito intenso no início da corrida ($t_r = 2,8$ min), indicando composto altamente polar em relação ao pesticida clorpirifós, que apresenta o $t_r = 16,5$ min. Através das análises em CG-EM para a reação com 20 dias (Figura 65), foi confirmada a existência de clorpirifós no meio, ainda neste período, e não foi possível a identificação do produto de conjugação do clorpirifós, pois, devido a alta polaridade, este composto não é adequado para análise em coluna DB-5.

Figura 64. Cromatogramas obtidos por CLAE das reações de controle para o clorpirifós. a) Padrão TCP, b) Padrão CP, c) 10 dias de reação, d) 20 dias de reação, e) 30 dias de reação.

Condições de análise CLAE: ACN/ H₂O (75:25); fluxo 1,0 mL/ min; 280 nm; $t_c = 20$ min.
Coluna C18 Shimadzu CLC-ODS(M) OD-H (0.46 x 25 cm).

Figura 65. Cromatograma obtido por CG-EM da análise para a reação controle do pesticida clorpirifós, em 20 dias.

Condições de análise CG-EM: $T_i = 50^\circ \text{C}$, 5 min; $T_f = 250^\circ \text{C}$, 10 min; $r = 10^\circ \text{C/min}$, $t_c = 32$ min. Coluna capilar DB-5 da J&W Scientific (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

Para avaliar a possível inibição do crescimento microbiano, foram realizadas as reações controle para os fungos *Trichoderma* sp. CBMAI 932 e *A. sydowii* CBMAI 935. Na Tabela 29 estão apresentadas as massas fúngicas obtidas em 30 dias de crescimento.

Tabela 29. Quantidade de massa micelial produzida por *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932, na ausência de clorpirifós, em 30 dias (32°C , 130 rpm, pH 7).

<i>A. sydowii</i> CBMAI 935	
Reações em duplicata	Massa fúngica seca (g)
Reação 1	0,33
Reação 2	0,34
<i>Trichoderma</i> sp. CBMAI 932	
Reação 1	0,44
Reação 2	0,42

Observou-se através da reação de controle dos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932, que houve uma pequena inibição no crescimento dos fungos na presença do pesticida clorpirifós (50 ppm), quando comparadas as massa das células úmidas obtidas para esta reação e a reação com um período equivalente (30 dias) na ausência de clorpirifós.

Análises em CG-EM e CLAE-EM

Foram realizadas análises em CLAE-EM com o objetivo de uma melhor detecção dos fenóis. Métodos de CLAE-EM são aplicáveis a uma ampla gama de compostos, e tem se tornado, cada vez mais, um bom recurso analítico, apresentando alta sensibilidade, seletividade, velocidade de análise e custo-benefício.¹⁰⁶ Para a detecção dos fenóis presentes

nas amostras, a ionização foi realizada no modo negativo. Nas análises por modo negativo por ionização em eletrospray, o capilar é o eletrodo negativo e a placa de abertura de amostragem é o eletrodo positivo. Este modo faz com que os íons negativos predominem na gotícula pulverizada; este método é utilizado quando os analitos formam ânions em solução, como no caso dos fenóis.¹⁰⁶ Neste caso, os pesticidas avaliados por este tipo de ionização não puderam ser detectados. O método apresentou uma maior sensibilidade tanto aos fenóis presentes no meio reacional, quanto para os metabólitos derivados do crescimento microbiano.

Foram analisadas as reações de controle do pesticida (ausência do fungo) em 10 dias, clorpirifós na presença do fungo *A. sydowii* CBMAI 935 e controle do fungo (ausência do pesticida) em 30 dias.

Figura 66. Cromatogramas obtidos por CLAE-EM das análises para, a) reação controle do pesticida clorpirifós, b) reação entre clorpirifós e *A. sydowii* CBMAI 935, c) controle para o fungo *A. sydowii* CBMAI 935.

Condições de análise CLAE-EM: ACN/ H₂O → 0,1 min (20:80), 15 min (50:50), 25 min (80:20), 27 min (20:80), 30 min (20:80); fluxo 1,0 mL/min; *splitter* 0,2 mL/min; 280 nm; $t_c = 30$ min. Coluna C18 Shimadzu CLC-ODS(M) OD-H (0.46 x 25 cm).

Ao contrário das análises em CLAE, foi observada a presença do pico correspondente ao 3,5,6-tricloro-2-piridinol, com baixa intensidade, em $t_r = 12,8$ min, no controle do pesticida com 10 dias de reação e na reação do pesticida na presença do fungo. Isso pode ocorrer devido a maior sensibilidade do detector em CLAE-EM, em relação ao detector UV na técnica de CLAE. Observou-se a formação de um intenso pico em $t_r = 29$ min em todas as reações, até mesmo no branco, indicando que este pico provavelmente seja correspondente a algum composto presente no meio de malte 2%. Observou-se o efeito do pesticida na matriz biológica através da comparação com a reação entre o fungo e o pesticida e a reação contendo somente o fungo. Quando comparados os picos correspondentes ao mesmo tempo de retenção, é possível observar que há uma diminuição desses picos (que provavelmente são

correspondentes aos metabólitos dos fungos) na presença do pesticida, indicando que este, possivelmente, interfira no crescimento fúngico, inibindo-o e diminuindo seu metabolismo inerente.

Foram analisadas as reações de clorpirifós na presença do fungo *Trichoderma* sp. CBMAI 932 em 10 e 20 dias de experimento, bem como o controle para o fungo (ausência de pesticida) em 30 dias de reação (Figura 67).

Figura 67. Cromatogramas obtidos por CLAE-EM das análises para, a) reação entre clorpirifós e *Trichoderma* sp. CBMAI 932 (10 dias), b) reação entre clorpirifós e *Trichoderma* sp. CBMAI 932 (30 dias), e) controle para o fungo *Trichoderma* sp. CBMAI 932.

Condições de análise CLAE-EM: ACN/ H₂O → 0,1 min (20:80), 15 min (50:50), 25 min (80:20), 27 min (20:80), 30 min (20:80); fluxo 1,0 mL/min; *splitter* 0,2 mL/min; 280 nm; t_c = 30 min. Coluna C18 Shimadzu CLC-ODS(M) OD-H (0.46 x 25 cm).

Observou-se a presença do 3,5,6-tricloro-2-piridinol na reação entre o pesticida e o fungo, fato este, que não foi observado para as reações, no período de 10 dias, nas análises realizadas em CLAE (Tabela 23). Comparando as reações para o período de 30 dias do pesticida na presença do fungo *Trichoderma* sp. CBMAI 932 e o controle para o fungo, foi possível observar o comportamento da matriz biológica na presença do fungo. Assim como para a reação na presença de *A. sydowii* CBMAI 935, também observou-se uma diminuição nos

picos dos metabólitos correspondentes ao fungo, indicando que o pesticida pode interferir no desenvolvimento destes.

Apesar de muito sensível e seletiva, uma limitação da técnica CLAE-EM, é a falta de banco de dados para as massas dos compostos analisados. Em uma matriz biológica, na qual diversos metabólitos podem encontra-se no meio, torna-se quase impossível a identificação de todos os metabólitos. Assim, para a identificação de possíveis metabólitos correspondentes à degradação do pesticida, bem como de metabólitos produzidos pelos micro-organismos, foram realizadas, também, as análises em CG-EM.

Com o objetivo de confirmar os dados fornecidos pelas bibliotecas Nist e Nist5 para as reações em CG-EM, foram estudados os padrões de fragmentação de clorpirifós e 3,5,6-tricloro-2-piridinol. O estudo da fragmentação proposta para clorpirifós foi anteriormente descrito no item 4.2.1.

O espectro de massas para o 3,5,6-tricloro-2-piridinol apresenta o íon molecular como pico base, com m/z 197 (**1**). A presença dos três átomos de cloro na molécula faz com que o padrão isotópico dos picos M, M+2, M+4 e M+6 apresentem intensidade de 100, 96, 30 e 4%, respectivamente. Como característico para os fenóis, há a perda de CO (M-28) com intensidade de 97%, resultando no fragmento com m/z 169 (**2**), seguindo o padrão isotópico para os picos X, X+2, X+4 e X+6. Uma subsequente fragmentação, pode produzir o fragmento com m/z 134 (**3**), com perda de hidrogênio e um átomo de cloro (- HCl). A perda de um radical cloro pode ter produzido o fragmento de m/z 161 (**4**).

Esquema 10. Proposta de fragmentação de clorpirifós.

Figura 68. Espectro de massas (70 eV) do 3,5,6-tricloro-2-piridinol.

Através de análises realizadas em CG-EM, foi possível identificar alguns metabólitos para os fungos. Para ilustrar a relação fungo-pesticida, na Figura 69 estão relacionados os cromatogramas correspondentes a reação de clorpirifós na presença do fungo *Trichoderma* sp. CBMAI 932 e a reação controle para o fungo (ausência de pesticida), ambos com 30 dias de reação. Através dos picos presentes nos cromatogramas, pode-se observar a diminuição de metabólitos referentes ao fungo, quando este encontra-se na presença de clorpirifós. A diminuição dos picos referentes ao metabólito, pode indicar uma toxicidade do pesticida para este micro-organismo, fato que pode ser confirmado pela diminuição da massa micelial do fungo *Trichoderma* sp. CBMAI 932, como discutido anteriormente.

Figura 69. Cromatograma obtido por CG-EM das análises para a) reação de clorpirifós na presença de *Trichoderma* sp. CBMAI 932, b) reação de controle para o fungo *Trichoderma* sp. CBMAI 932.

Condições de análise CG-EM: $T_i = 50^\circ \text{C}$, 5 min; $T_f = 250^\circ \text{C}$, 10 min; $r = 10^\circ \text{C/min}$, $t_c = 32$ min. Coluna capilar DB-5 da J&W Scientific (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

Os metabólitos dos fungos podem ser encontrados tanto no caldo enzimático quanto nos micélios. De uma forma geral, alguns metabólitos extracelulares e intracelulares podem desempenhar um papel de proteção para o micro-organismo.¹⁰⁷ Na reação de controle para o fungo, foi possível a identificação de diversas moléculas referentes ao metabolismo microbiano. O pico mais intenso corresponde ao 5-hidroxi metil-2-furanocarboxaldeído, que é um produto de degradação de hexoses, podendo indicar a metabolização dos açúcares presentes no meio de malte 2% pelo fungo. O 5-hidroxi metil-2-furanocarboxaldeído, também pode ser formado por reações não enzimáticas de escurecimento de açúcares, podendo ser esta a molécula que conjuga-se com o pesticida clorpirifós nas amostras na ausência do fungo, uma vez que esta estava presente nas análises do branco para o pesticida (Figura 69)¹⁰⁸

Existem inúmeros metabólitos fúngicos terpenóides e, além deste metabólitos, vários outros metabólitos contêm unidades de isopreno ligados em outras moléculas que podem ser biossintetizados por outras vias no meio reacional. Também contribuindo para a formação destes metabólitos, o pirofosfato, pode ser uma fonte de unidades de isopreno para terpenóides e esteróides.¹⁰⁷

Vários terpenóides puderam ser indentificados no meio reacional, entre eles o carotol, α -bisabolol, esqualeno e esteróides. O principal esteróide encontrado em sistemas fúngico é o ergosterol, que pode ser identificado em todos os fungos analisados, uma vez que este esteróide é um componente essencial da membrana plasmática dos fungos. Foram identificados, também, o ácido tetradecanóico e o *cis*-9-hexadecenal. Os ácidos carboxílicos e aldeídos podem ser derivados de várias fontes, como a hidrólise de diversas moléculas mais complexas presentes no meio reacional.¹⁰⁷

Em meio mineral na presença de ambos os fungos, não foi observado o aparecimento dos picos correspondentes aos metabólitos dos fungos, evidenciando um não desenvolvimento destes na presença somente do pesticida como fonte de carbono. No entanto, em um pico pouco intenso, foi observado um fragmento que pode corresponder ao metabólito do pesticida clorpirifós (Figuras 70 e 71).

Figura 70. Cromatograma obtido por CG-EM (70 eV) das análises para a reação de clorpirifós na presença de *Trichoderma* sp. CBMAI 932 em meio mineral suplementado com KNO₃.

Condições de análise CG-EM: T_i = 50° C, 5 min; T_f = 250° C, 10 min; r = 10° C/ min, t_c = 32 min.
Coluna capilar DB-5 da J&W Scientific (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

Figura 71. Cromatograma obtido por CG-EM (70 eV) das análises para a reação de clorpirifós na presença de *A. sydowii* CBMAI 935 em meio mineral suplementado com KNO₃.

Condições de análise CG-EM: T_i = 50° C, 5 min; T_f = 250° C, 10 min; r = 10° C/ min, t_c = 32 min.
Coluna capilar DB-5 da J&W Scientific (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

O *O*-etil-*O*-hidrogênio metilfosfonotioato se encontra com baixa intensidade no meio devido a esta molécula ser completamente degradada como fonte fósforo, fato que pode ser confirmado pela ausência deste pico nas reações em meio de malte 2%, as quais o metabolismo do fungo é maior, e provavelmente causa a degradação completa da molécula. O pico pode ser resultante da perda de um grupo etóxi –OCH₂CH₃ e subsequente metilação. A primeira vista esta não é uma reação convencional, mas tratando-se de reações enzimáticas, há

a possibilidade da conversão da porção fosforotioato em fosfonotioato. A rota enzimática proposta, que pode estar ocorrendo através da metabolização do pesticida clorpirifós pelos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932 está descrita no Esquema 11.

Esquema 11. Sugestão de rota enzimática para a biodegradação do pesticida clorpirifós.

4.4.4 Biodegradação do pesticida metil paration pelos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234

4.4.4.1 Avaliação da biodegradação do metil paration com 10 dias de reação

As reações com 10 dias para o pesticida metil paration foram realizadas para a quantificação da extração do caldo enzimático + células úmidas e submetidos às análises por CLAE (item 3.7.3.1). Na Tabela 30, estão sumarizados os dados referentes à biodegradação do metil paration pelas cepas de *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234, durante este período.

Tabela 30. Quantificação da biodegradação de metil paration por *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234, em 10 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).

<i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (50,0 ppm de metil paration)				
Reações em duplicata	Massa fúngica seca (g)	c ^a metabólito (ppm)	c ^a metil paration (ppm)	% de metil paration degradado
Reação 1	0,29	6,5	0,3 ^b	99,4
Reação 2	0,25	6,6	1,6 ^b	96,8
<i>P. decaturense</i> CBMAI 1234 (50,0 ppm de metil paration)				
Reação 1	0,28	3,5 ^b	6,3	87,4
Reação 2	0,29	3,2 ^b	6,6	86,8

^a c = concentração (dados obtidos de duplicatas) determinados por CLAE^b concentração estimada

Nos primeiros dias de reação, já houve a degradação praticamente completa do pesticida metil paration com o fungo *A. sydowii* CBMAI 935 e uma degradação significativa com o fungo *P. decaturense* CBMAI 1234. Um pequeno acúmulo do metabólito, 4-nitrofenol, foi observado para este período, no entanto, não correspondente a total conversão do pesticida, pela reação de hidrólise, proposta para o mecanismo com as enzimas fosfotriesterases, podendo indicar a conjugação do metabólito no meio reacional (Esquema 6).

4.4.4.2 Avaliação da biodegradação do metil paration com 20 dias de reação

Em 20 dias de experimento foram realizadas tanto as extrações separadas para o caldo enzimático e as células úmidas, quanto a extração caldo enzimático + células úmidas, e submetidas à análise em CLAE, (item 3.7.3.1). Na Tabela 31 e Figuras 72 e 71, estão sumarizados os dados referentes à biodegradação do metil paration pelos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234.

Tabela 31. Quantificação da biodegradação de metil paration por *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234, em 20 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).

<i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (50,0 ppm de metil paration)				
Reações em duplicata	Massa fúngica seca (g)	c ^a metabólito (ppm)	c ^a metil paration (ppm)	% de metil paration degradado ^b
Reação 1	0,26	5,7	-	100,0
Reação 2 (caldo enzimático)	-	8,9	-	
Reação 2 (células)	0,27	1,1 ^c	-	100,0
<i>P. decaturense</i> CBMAI 1234 (50,0 ppm de metil paration)				
Reação 1	0,27	3,1 ^c	1,6 ^c	96,8
Reação 2 (caldo enzimático)	-	3,6 ^c	1,0 ^c	
Reação 2 (células)	0,27	0,6 ^c	1,1 ^c	95,8

^a c = concentração (dados obtidos de duplicatas) determinados por CLAE^b total de profenofós degradado (caldo + células)^c concentração estimada

Figura 72. Cromatogramas obtidos por CLAE das reações entre metil paration e *A. sydowii* CBMAI 935, em 20 dias de reação. a) Padrão PNF, b) Padrão MP, c) Reação MP + *A. sydowii* CBMAI 935 (caldo enzimático + células), d) Reação MP + *A. sydowii* CBMAI 935 (caldo enzimático), e) Reação MP + *A. sydowii* CBMAI 935 (células).

Condições de análise CLAE: ACN/ H₂O (50:50); fluxo 0,8 mL/ min; 278 nm; $t_c = 25$ min.
Coluna C18 Shimadzu CLC-ODS(M) OD-H (0,46 x 25 cm).

Figura 73. Cromatogramas obtidos por CLAE das reações entre metil paration e *P. decaturense* CBMAI 1234, em 20 dias de reação. a) Padrão PNF, b) Padrão MP, c) Reação MP + *P. decaturense* CBMAI 1234 (caldo enzimático + células), d) Reação MP + *P. decaturense* CBMAI 1234 (caldo enzimático), e) Reação MP + *P. decaturense* CBMAI 1234 (células).

Condições de análise CLAE: ACN/ H₂O (50:50); fluxo 0,8 mL/ min; 278 nm; t_c = 25 min.
Coluna C18 Shimadzu CLC-ODS(M) OD-H (0,46 x 25 cm).

Devido a concentração de metil paration no meio reacional ser muito baixa não foi impossível avaliar sua concentração no caldo enzimático ou nas células úmidas. Assim como as reações com os pesticidas profenofós e clorpirifós com as cepas fúngicas apresentaram maior concentração nas células, o mesmo era esperado para o metil paration. A concentração de 4-nitrofenol foi maior no caldo enzimático, podendo este, após a degradação do metil paration no interior da célula, ter sido excretado para o meio reacional. Neste período, houve uma total degradação do metil paration na reação com o fungo *A. sydowii* CBMAI 935 e degradação quase completa, também, na reação com o fungo *P. decaturense* CBMAI 1234.

4.4.4.3 Avaliação da biodegradação do metil paration com 30 dias de reação

Com o objetivo de avaliar diferentes parâmetros para a reação de biodegradação do metil paration com as cepas fúngicas de *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234, foram feitas as reações entre as cepas fúngicas e o metabólito, reações em meio mineral suplementado com KNO₃, controle do pesticida metil paration e controle dos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234.

Tabela 32. Quantificação da biodegradação de metil paration por *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234 em 30 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).

<i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (50,0 ppm de metil paration)				
Reações em duplicata	Massa fúngica seca (g)	c ^a metabólito (ppm)	c ^a metil paration (ppm)	% de metil paration degradado
Reação 1	0,24	3,6 ^b	-	100,0
Reação 2	0,24	6,6	-	100,0
<i>P. decaturense</i> CBMAI 1234 (50,0 ppm de metil paration)				
Reação 1	0,26	3,7 ^b	0,3 ^b	99,4
Reação 2	0,25	0,9 ^b	-	100,0

^a c = concentração (dados obtidos de duplicatas) determinados por CLAE

^b concentração estimada

Observou-se a degradação completa na presença de ambos os fungos neste período de tempo, fato este surpreendente, uma vez que no *screening* em meio sólido de malte 2%, o metil paration apresentou-se como o pesticida mais tóxico para todos os fungos avaliados. Assim, o esperado para a reação em meio líquido de malte 2% para este pesticida era de baixa biodegradabilidade. Uma possibilidade, é que devido a alta toxicidade do pesticida, o micro-organismo degrade rapidamente o xenobiótico como um mecanismo de defesa, necessário a sua sobrevivência.

A concentração do 4-nitrofenol no meio reacional manteve-se pequena durante todo o período do experimento, não apresentando variação significativa entre as reações de 10 a 30 dias. Através da comparação da massa micelial obtida para o controle do fungo *A. sydowii* CBMAI 935 (Tabela 36) e a reação de biodegradação contendo fungo e pesticida, foi observada uma pequena diminuição destes valores, indicando uma inibição no crescimento do fungo ou morte celular causada por este pesticida.

Com o objetivo de avaliar a biodegradação do 4-nitrofenol com os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234, foram realizadas as reações entre os fungos e o metabólito (Tabela 33).

Tabela 33. Quantificação da biodegradação de 4-nitrofenol por *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234, em 30 dias de reação (32°C, 130 rpm, pH 7).

<i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (50,0 ppm de 4-nitrofenol)			
Reações em duplicata	Massa fúngica seca (g)	c ^a metabólito (ppm)	% de metabólito degradado
Reação 1	0,25	24,6	50,8
Reação 2	0,26	23,9	52,2
<i>P. decaturense</i> CBMAI 1234 (50,0 ppm de 4-nitrofenol)			
Reação 1	0,22	29,2	41,6
Reação 2	0,23	31,0	38,0

^a c = concentração (dados obtidos de duplicatas) determinados por CLAE

De acordo com a PAN, assim como metil paration, o 4-nitrofenol, apresenta uma toxicidade aguda, no entanto, o metabólito não atua como inibidor da enzima acetilcolinesterase. Segundo a U.S. NTP (*National Toxicology Program* – Programa de Toxicologia Nacional), o 4-nitrofenol é classificado como moderadamente tóxico, já segundo classificação pela EPA, é considerado como um poluente altamente tóxico.¹⁰⁹

Os nitrofenóis estão entre os poluentes orgânicos persistentes mais comuns em indústrias e águas residuais de agricultura. Estes compostos estão presentes em efluentes de indústrias que produzem pesticidas, explosivos, corantes, produtos para tratamento de couro e em efluentes agrícolas de irrigação.¹¹⁰

Assim como para os fenóis correspondentes aos pesticidas profenofós e clorpirifós, o PNP, também, pode sofrer reações de conjugação com moléculas polares presentes na matriz biológica, como a conjugação com glucuronídeos (Figura 10). As conjugações, apesar de não degradarem o analito em questão, o tornam mais suscetível a degradação posterior ou excreção, uma vez que as moléculas conjugadas são muito mais polares que a molécula original, sendo esta, também, uma etapa importante na biodegradação destes compostos.

Através da comparação da massa micelial obtida para o controle das cepas fúngicas (Tabela 36) e as reação de biodegradação contendo fungo e o metabólito, foi observada uma pequena diminuição da massa fúngica em ambas as cepas na presença do PNP, fato este que pode indicar a morte celular causada por este xenobiótico.

Para complementar os estudos da biodegradação, foi realizado o experimento em meio mineral suplementado com KNO₃ (Tabela 34).

Tabela 34. Quantificação da biodegradação de metil paration por *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234 em 30 dias, em meio mineral suplementado com KNO₃ (32 °C, 130 rpm, pH 7).

<i>A. sydowii</i> CBMAI 935 (100,0 ppm de metil paration)				
Reações em duplicata	Massa fúngica seca (g)	c ^a metabólito (ppm)	c ^a metil paration (ppm)	% de metil paration degradado
Reação 1	*	4,4 ^b	17,6	64,8
Reação 2	*	4,6 ^b	22,5	55,0
<i>P. decaturense</i> CBMAI 1234 (100,0 ppm de metil paration)				
Reação 1	*	4,2 ^b	23,2	53,6
Reação 2	*	3,2 ^b	15,3	69,4

^a c = concentração (dados obtidos de duplicatas) determinados por CLAE^b concentração estimada

* Não foi obtida massa micelial

No meio mineral suplementado com KNO₃, avaliou-se a possibilidade dos fungos estarem utilizando o metil paration como fonte de carbono. Houve uma taxa média de degradação de aproximadamente 60% na presença do fungo *A. sydowii* CBMAI 935 e de 62% na presença de *P. decaturense* CBMAI 1234, demonstrando uma baixa biodegradação do pesticida neste meio reacional, quando comparada ao meio líquido de malte 2%. As reações em duplicatas não apresentaram boa concordância, mas como já citado anteriormente, é possível que ocorra diferentes níveis de crescimento em cada frasco Erlenmeyer contendo o mesmo sistema, pois as reações são afetadas por diversos fatores.

Quando comparada ao controle do pesticida (ausência do fungo) (Tabela 35), a reação em meio mineral não se demonstrou eficiente na degradação do metil paration, uma vez que a taxa de hidrólise espontânea do pesticida variou apenas aproximadamente 10% em relação a degradação média observada para o metil paration na presença dos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234.

Tabela 35. Quantificação da degradação de metil paration por hidrólise espontânea em 30 dias (32 °C, 130 rpm, pH 7).

Reações em duplicata	c ^a metabolite (ppm)	c ^a metil parathion (ppm)	% de metil paration degradado
Reação 1	2,3 ^b	26,1	52,2
Reação 2	1,9 ^b	25,9	51,8

^a c = concentração (dados obtidos de duplicatas) determinados por CLAE^b concentração estimada

Para avaliar a possível inibição do crescimento microbiano, foram realizadas as reações controle para os fungos *P. decaturense* CBMAI 1234 e *A. sydowii* CBMAI 935. Na Tabela 36 estão apresentadas as massas fúngicas obtidas em 30 dias de crescimento.

Tabela 36. Quantidade de massa micelial produzida por *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234, na ausência de metil paration, em 30 dias (32 °C, 130 rpm, pH 7).

<i>A. sydowii</i> CBMAI 935	
Reações em duplicata	Massa fúngica seca (g)
Reação 1	0,28
Reação 2	0,29
<i>P. decaturense</i> CBMAI 1234	
Reação 1	0,23
Reação 2	0,25

Através da reação de controle dos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234, observou-se que a massa fúngica não foi alterada significativamente pela presença do pesticida e do metabólito no meio reacional, quando comparada a reação na ausência do pesticida. Confirmando, assim, que metil paration e seu metabólito, 4-nitrofenol, só afetaram em pequena extensão o crescimento do fungo.

Análises em CG-EM e CLAE-EM

Com o objetivo de identificar possíveis metabólitos do pesticida, bem como do fungo, foram realizadas as análises em CG-EM e CLAE-EM. Pela técnica de CLAE-EM, foram analisadas as reações entre metil paration na presença do fungo *A. sydowii* CBMAI 935 (10 e 30 dias), reação entre metil paration na presença do fungo *A. sydowii* CBMAI 935 em meio mineral e controle do fungo (ausência do pesticida) em 30 dias (Figura 74). As reações correspondentes foram analisadas, também, para o pesticida metil paration na presença do fungo e *P. decaturense* CBMAI 1234 (Figura 75).

Figura 74. Cromatogramas obtidos por CLAE-EM das análises para a) reações entre metil paration e *A. sydowii* CBMAI 935 (10 dias), b) reações entre metil paration e *A. sydowii* CBMAI 935 (30 dias), c) reação entre metil paration e *A. sydowii* CBMAI 935 em meio mineral, d) controle para o fungo *A. sydowii* CBMAI 935.

Condições de análise CLAE-EM: ACN/ H₂O → 0,1 min (20:80), 15 min (50:50), 25 min (80:20), 27 min (20:80), 30 min (20:80); fluxo 1,0 mL/min; *splitter* 0,2 mL/min; 280 nm; *t_c* = 30 min. Coluna C18 Shimadzu CLC-ODS(M) OD-H (0.46 x 25 cm).

Figura 75. Cromatogramas obtidos por CLAE-EM das análises para a) reações entre metil paration e *P. decaturense* CBMAI 1234 (10 dias), b) reações entre metil paration e *P. decaturense* CBMAI 1234 (30 dias), c) reação entre metil paration e *P. decaturense* CBMAI 1234 em meio mineral, d) controle para o fungo *P. decaturense* CBMAI 1234.

Condições de análise CLAE-EM: ACN/ H₂O → 0,1 min (20:80), 15 min (50:50), 25 min (80:20), 27 min (20:80), 30 min (20:80); fluxo 1,0 mL/min; *splitter* 0,2 mL/min; 280 nm; $t_c = 30$ min. Coluna C18 Shimadzu CLC-ODS(M) OD-H (0.46 x 25 cm).

Foi observado o pico correspondente ao metabólito, 4-nitrofenol em $t_r = 11,9$ min, nas três reações contendo o pesticida, para as reações com ambos os fungos. Na presença do fungo *A. sydowii* CBMAI 935 foi identificada, além das moléculas mencionadas, a molécula de dimetil-(1-hidroxibutil) fosfonato, em $t_r = 10,7$ min, com m/z 182. Esta molécula foi identificada, também, nas análises por CG-EM, porém, na presença do fungo *P. decaturense* CBMAI 1234 (Figura 79). Sendo assim, possivelmente o mesmo mecanismo de degradação do metil paration esteja ocorrendo na presença de ambos os fungos.

Comparando as reações para o período de 30 dias do pesticida na presença dos fungos com o controle para os fungos (ausência de pesticida), foi possível observar o comportamento da matriz biológica na presença dos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234. Na reação controle do fungo *P. decaturense* CBMAI 1234 não foram observados picos intensos correspondentes aos seus metabólitos, em contraste pode ser observado na reação em 30 dias, na presença do fungo, um pico intenso em $t_r = 19$ min, e a formação de metabólitos referentes ao pesticida, uma vez que os picos correspondentes não estão presentes na reação controle. Na reação controle do fungo *A. sydowii* CBMAI 935, os picos dos metabólitos microbianos não apresentaram-se muito intensos e houve, também, a formação de picos não correspondentes ao metabólito fúngicos, indicando a presença de formação de metabólitos do pesticida, ou que o pesticida tenha induzido a formação de metabólitos não inerentes ao seu crescimento na ausência deste xenobiótico. A confirmação deste fato, pode ser confirmado pelas análises em CG-EM, nas quais pode se observar a expressão de esteróides dos fungos na presença do metil paration (Figuras 78 e 79).

Para a identificação de possíveis metabólitos correspondentes à degradação do pesticida, bem como metabólitos correspondentes aos micro-organismos, foram realizadas, também, as análises em CG-EM. Com o objetivo de confirmar os dados fornecidos pelas bibliotecas Nist e Nist5 para as reações em CG-EM, foram estudados os padrões de fragmentação de metil paration e 4-nitrofenol.

O espectro de massas para o metil paration apresentou um intenso pico íon molecular (**1**), com m/z 263 (65%), no entanto este não foi identificado como pico base. O pico base (**3**), com m/z 109, pode ser resultante da perda de $-CH_2O$ (M-30) do cátion nitrofenila (**2**), com baixa intensidade (6%). O fragmento intenso (80%) com m/z 125 pode ser resultado da formação de um fragmento cátion de fosfonotioato (**4**) (Esquema 12, Figura 76).

Esquema 12. Proposta de fragmentação do metil paration. **Figura 76.** Espectro de massas obtido por CG-EM (70 eV) para o metil paration.

O espectro de massas para o 4-nitrofenol apresentou um pico intenso do íon molecular (1), sendo este, também, o pico base. O fragmento com m/z 93 (3) (25%) pode ser resultante da perda de radical nitro, com formação de cátion fenila. Em fenóis, são usualmente encontrados picos com perda de $-CHO$ (M-29), a perda de $-CHO$ e mais um hidrôgeno resultante de rearranjo (M-30) pode ter resultado no fragmento com m/z 109 (73%) (4). Após a perda de um radical nitro, foi obtido o fragmento do cátion fenila com m/z 65 (95%) (5) (Esquema 13, Figura 77).

Esquema 13. Proposta de fragmentação do 4-nitrofenol. **Figura 77.** Espectro de massas obtido por CG-EM (70 eV) para o 4-nitrofenol.

Através das análises realizadas por CG-EM, foi possível identificar alguns metabólitos para os fungos e um metabólito para o pesticida. Para ilustrar a relação fungo-pesticida, na Figura 78 estão relacionados os cromatogramas correspondentes a reação de clorpirifós na presença do fungo *P. decaturense* CBMAI 1234 e a reação controle para o fungo (ausência de pesticida), ambos com 30 dias de reação. Através dos picos presentes nos cromatogramas, pode-se observar que não houve uma diminuição dos picos referentes aos metabólitos fúngicos, na presença do pesticida metil paration.

Figura 78. Cromatogramas obtidos por CG-EM das análises para, a) reação entre metil paration e *P. decaturense* CBMAI 1234, b) controle para o fungo *P. decaturense* CBMAI 1234.

Os metabólitos fúngicos identificados para o *P. decaturense* CBMAI 1234, foram ácidos carboxílicos e o aldeído *cis*-9-hexadecenal. Assim como mencionado para os metabólitos do fungo *Trichoderma* sp. CBMAI 932, ácidos carboxílicos e aldeídos podem ser derivados da hidrólise de diversas moléculas complexas.¹⁰⁷ O 1,5,9-trimetil-12-(1-metiletil)-4,8,13-ciclotetradecatrieno-1,3-diol, pode ser resultante da redução de lactonas. O licopeno, é derivado dos terpenóides, que existem em abundância no metabolismo fúngico, juntamente com os esteróides. Um fato importante a ser destacado, é uma abundante expressão dos esteróides para a reação contendo o pesticida. Como observado nas Tabelas 32 e 36, não houve uma diminuição de massa micelial do fungo *P. decaturense* CBMAI 1234 na presença do pesticida. Esteróides foram expressos em abundância até mesmo no meio mineral (Figura 79), indicando que o pesticida influenciou o metabolismo do fungo até mesmo em meio pobre de nutrientes. A expressão do esteróides pode ser um indicativo de que o fungo utiliza-se também, do pesticida para seu desenvolvimento, e dessa forma, há uma maior produção de hormônios na presença do pesticida.

Figura 79. Cromatogramas obtidos por CG-EM (70 eV) das análises para a reação entre metil paration e *P. decaturense* CBMAI 1234 em meio mineral suplementado com KNO₃, em 30 dias.

Condições de análise CG-EM: $T_i = 50^\circ \text{C}$, 5 min; $T_f = 250^\circ \text{C}$, 10 min; $r = 10^\circ \text{C/min}$, $t_c = 32$ min.

Coluna capilar DB-5 da J&W Scientific (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

Assim como para as análises em CLAE-EM, em meio líquido mineral, foi observado o pico, com pequena intensidade, referente ao dimetil-(1-hidroxibutil) fosfonato. Esta molécula pode ser resultante da conjugação da porção fosfato com moléculas endógenas presentes no meio reacional. No entanto, para que haja a presença da porção fosfato, provavelmente, o metil paration esteja sendo ativado a sua forma oxon, ocorrendo sua posterior degradação.

A CYP é uma importante enzima para a biotransformação de PO em sistemas biológicos. Dados da literatura indicam que a CYP pode promover a dessulfuração oxidativa, onde o pesticida fosforotioato é oxidado a fosfato. A CYP, pode também, promover a oxidação de grupos metílicos, aumentando assim, a polaridade da molécula, como no caso da oxidação do grupo metila no fenitroton, a um grupo carboxila.¹⁰¹

Figura 80. Exemplos de reações envolvendo a CYP.

A possível rota enzimática para biodegradação do metil paration está descrita no Esquema 14.

Esquema 14. Sugestão de rota-enzimática para a biodegradação do pesticida metil paration.

5 CONCLUSÃO

Através de um *screening* com 7 cepas de fungos de origem marinha em meio sólido de malte 2% na presença dos pesticidas organofosforados avaliados, foi possível selecionar linhagens para as reações de biodegradação em meio líquido de malte 2%. Na presença do pesticida clorpirifós, exceto as linhagens *A. sydowii* CBMAI 934, *P. raistrickii* CBMAI 1235 e *A. sydowii* CBMAI 1241, as outras 4 linhagens apresentaram um excelente desenvolvimento. Na presença de metil paration o crescimento foi mais discreto, comparado às placas controle e ao desenvolvimento dos mesmos fungos nos pesticidas clorpirifós e profenofós. Os fungos com melhor crescimento e com potencial biocatalítico para a biodegradação deste pesticida foram as cepas de *A. sydowii* CBMAI 934, *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. raistrickii* CBMAI 1234. O crescimento das cepas fúngicas foram muito promissoras para o profenofós, até mesmo na maior concentração deste pesticida. *P. raistrickii* CBMAI 931, *A. sydowii* CBMAI 935, *A. sydowii* CBMAI 1241 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932 apresentaram o melhor crescimento, e consequentemente, um bom potencial biocatalítico na presença profenofós.

Através das reações realizadas para o profenofós, foi possível obter uma excelente biodegradação deste pesticida na presença do fungo *P. raistrickii* CBMAI 931 (97,0%, em 30 dias) e uma degradação satisfatória na presença de *A. sydowii* CBMAI 935 (75%, em 30 dias). O potencial biocatalítico do fungo *A. sydowii* CBMAI 935 foi maior em meio líquido mineral (91% de degradação), quando comparado ao meio líquido de malte 2%. Ambos os fungos apresentaram um degradação de 95% do 4-bromo-2-clorofenol, no entanto, não foi possível identificar se houve apenas conjugações com moléculas mais polares presentes no meio reacional, ou se de fato, houve uma biodegradação deste metabólito. Apesar da biodegradação ser mais desejável, a reação de conjugação torna os metabólitos mais suscetíveis a futuras degradações, sendo assim, uma etapa importante nas reações de biodegradação. Quando comparado a estabilidade do pesticida no meio reacional (hidrólise espontânea), foi possível confirmar a eficiência do sistema enzimático dos fungos, uma vez que na ausência deste, a taxa de degradação do profenofós foi de apenas 40%.

No *screening* realizado em meio sólido de malte 2% na presença de clorpirifós, os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932 apresentaram excelentes crescimentos, no entanto, em meio líquido de malte 2%, estes apresentaram a menor taxa de degradação de pesticida, quando comparados ao profenofós e metil paration.

A degradação foi de 63 e 72% para os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932, respectivamente, em um período de 30 dias. Os fungos foram pouco eficientes na degradação ou conjugação do 3,5,6-tricloro-2-piridinol, e, também, na biodegradação em meio mineral, apresentando taxas médias de degradação de 14 e 6% na presença dos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *Trichoderma* sp. CBMAI 932, respectivamente. Foi possível observar uma grande interação do pesticida com a matriz de malte 2%, observada pela conjugação deste pesticida na ausência das cepas fúngicas. Na presença do pesticida, os metabólitos fúngicos foram suprimidos, indicando uma inibição do metabolismo fúngico na presença deste pesticida, e consequentemente indicando a toxicidade deste para os micro-organismos. Através da formação do metabólito *O*-etil-*O*-hidrogênio metilfosfonotioato, foi possível a sugestão da rota enzimática para a degradação do clorpirifós na presença do sistema enzimático dos fungos avaliados.

Oposto ao clorpirifós, o metil paration apresentou desenvolvimentos discretos das cepas selecionadas em meio sólido de malte 2%, no entanto, em meio líquido, já em 10 dias de reação, foram observadas excelentes biodegradações na presença dos fungos *A. sydowii* CBMAI 935 (98%) e *P. decaturense* CBMAI 1234 (87%). A biodegradação (ou conjugação) do metabólito foi relativamente baixa para ambos os fungos, apresentando taxas de 52 e 40% para os fungos *A. sydowii* CBMAI 935 e *P. decaturense* CBMAI 1234, respectivamente. A reação em meio líquido demonstrou-se pouco eficiente, no entanto, através das análises destas reações em CG-EM e CLAE-EM, foi possível a identificação de metabólitos correspondentes a degradação do metil paration. Através dos metabólitos obtidos, pode-se inferir a ativação do metil paration para a forma oxon, com subsequente hidrólise, formando o 4-nitrofenol, e o derivado conjugado da porção fosfato.

Este trabalho é inovador, uma vez que até o presente momento, não há relatos na literatura da biodegradação dos pesticidas organofosforados clorpirifós, metil paration e profenofós na presença de fungos isolados de ambientes marinhos. Aprimoramentos nas metodologias de extração e análises, podem futuramente, possibilitar a identificação de outros metabólitos correspondentes a biodegradação dos pesticidas, possibilitando um melhor estudo das rotas metabólicas. Através de estudos já realizados no Grupo de Química Orgânica e Biocatálise, há também, a possibilidade da imobilização dos fungos com potencial para a degradação destes pesticidas, fazendo com que a eficiência de degradação seja aumentada e, até mesmo, o desenvolvimento de reatores enzimáticos (biorreatores) que possibilitem a descontaminação de águas residuais contaminadas por estas classe de pesticidas.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 COUTINHO, C. F. B.; TANIMOTO, S. T.; GALLI, A.; GARBELLINI, G. S.; TAKAYAMA, M.; AMARAL, R. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas**, v. 15, p. 65-72, 2005.
- 2 DIEZ, M. Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, v. 10, n. 3, p. 244-267, 2010.
- 3 GALLI, A.; DE SOUZA, D.; GARBELLINI, G. S.; COUTINHO, C. F. B.; MAZO, L. H.; AVACA, L. A.; MACHADO, S. A. S. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 105, 2006.
- 4 FORTES, M. E.; ZAPPE, J. A. A química dos agrotóxicos. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 1, p.10-15, 2012. Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc34_1/03-QS-02-11.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2013.
- 5 RATTNER, B. A. History of wildlife toxicology. **Ecotoxicology**, v. 18, n. 7, p. 773-783, 2009.
- 6 FREIRE, R. S.; PELEGRINI, R.; KUBOTA, L. T.; DURÁN, N.; PERALTA-ZAMORA, P. Novas tendências para o tratamento de resíduos industriais contendo espécies organocloradas. **Química Nova**, v. 23, n. 4, p. 504-511, 2000.
- 7 UNIVERSITY OF GEORGIA. **Pesticide usage in the United States: history, benefits, risks, and trends**. Disponível em: <<http://ipm.ncsu.edu/safety/factsheets/pestuse.pdf>>. Acesso em: 24 maio 2012.
- 8 FLORES, A. V.; RIBEIRO, J. N.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, E. L. R. Organoclorados: um problema de saúde pública. **Ambiente & Sociedade**, v. 7, n. 2, p. 125-143, 2004.
- 9 KAYSER, A.; VOIGT, F.; STUBBE, M. First results on the concentrations of some persistent organochlorines in the common hamster *Cricetus cricetus* (L.) in Saxony-Anhalt. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 67, n. 5, p. 712-720, 2001.
- 10 RISSATO, S. R.; LIBÂNIO, M.; GIAFFERIS, G. P.; GERENUTTI, M. Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru (SP). **Química Nova**, v. 27, p. 739-743, 2004.
- 11 CASIDA, J. E.; QUISTAD, G. B. Golden age of insecticide research: past, present, or future? **Annual review of entomology**, v. 43, n. 1, p. 1-16, 1998.
- 12 BARRIONUEVO, W. R.; LANÇAS, F. M. Extração em fase sólida (SPE) e micro extração em fase sólida (SPME) de piretróides em água. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 172-175, 2001.

- 13 TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 45, p. 247-268, 2005.
- 14 HOUSSET, P.; DICKMANN, R. A promise fulfilled—pyrethroid development and the benefits for agriculture and human health. **Bayer Cropscience Journal**, v. 62, p. 135-278, 2009.
- 15 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Estudo traça perfil do mercado de agrotóxicos no Brasil**. Disponível em: <<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/oFb>>. Acesso em: 23 maio 2012.
- 16 GAVRILESCU, M. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. **Engineering in Life Sciences**, v. 5, n. 6, p. 497-526, 2005.
- 17 ZAHM, S. H.; WARD, M. H. Pesticides and childhood cancer. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, n. 3, p. 893, 1998.
- 18 AGROTÓXICO Mata. **Agrotóxico Mata**: campanha permanente contra os agrotóxicos e pela vida. Disponível em: <<http://www.mabnacional.org.br/?q=campanha/agrot-xico-mata-campanha-permanente-contra-os-agrot-xicos-e-pela-vida>>. Acesso em: 17 jan. 2013.
- 19 EERD, L. L. V.; HOAGLAND, R. E.; ZABLOTOWICZ, R. M.; HALL, J. C. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. **Weed Science**, v.51, n. 4, p. 472–495, 2003.
- 20 RAGNARSDOTTIR, K. V. Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides. **Journal of the Geological Society**, v. 157, n. 4, p. 859-876, 2000.
- 21 SUTHERLAND, T.; RUSSELL, R.; SELLECK, M. Using enzymes to clean up pesticide residues. **Pesticide Outlook**, v. 13, n. 4, p. 149-151, 2002.
- 22 CHOWDHURY, A.; PRADHAN, S.; SAHA, M.; SANYAL, N. Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 114-127, 2008.
- 23 SUTHERLAND, T.; HORNE, I.; WEIR, K.; COPPIN, C.; WILLIAMS, M.; SELLECK, M.; RUSSELL, R.; OAKESHOTT, J. Enzymatic bioremediation: from enzyme discovery to applications. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 31, n. 11, p. 817-821, 2004.
- 24 SCOTT, C.; PANDEY, G.; HARTLEY, C. J.; JACKSON, C. J.; CHEESMAN, M. J.; TAYLOR, M. C.; PANDEY, R.; KHURANA, J. L.; TEESE, M.; COPPIN, C. W. The enzymatic basis for pesticide bioremediation. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 65-79, 2008.
- 25 SINGH, D. K. Biodegradation and bioremediation of pesticide in soil: concept, method and recent developments. **Indian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 35-40, 2008.
- 26 EDWARDS, F. L.; TCHOUNWOU, P. B. Environmental toxicology and health effects associated with methyl parathion exposure – a scientific review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 2, n. 3, p. 430-441, 2005.

- 27 ZHENG, Y.; LAN, W.; QIAO, C.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Decontamination of vegetables sprayed with organophosphate pesticides by organophosphorus hydrolase and carboxylesterase (B1). **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 136, n. 3, p. 233-241, 2007.
- 28 YANG, C.; CAI, N.; DONG, M.; JIANG, H.; LI, J.; QIAO, C.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Surface display of MPH on *Pseudomonas putida* JS444 using ice nucleation protein and its application in detoxification of organophosphates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 99, n. 1, p. 30-37, 2008.
- 29 FARIA, A. B. C. Revisão sobre alguns grupos de inseticidas utilizados no manejo integrado de pragas florestais. **Ambiência**, v. 5, n. 2, p. 345-358, 2009.
- 30 SANTOS, V. M. R.; DONNICI, C. L.; DACOSTA, J. B. N.; CAIXEIRO, J. M. R. Compostos organofosforados pentavalentes: histórico, métodos sintéticos de preparação e aplicações como inseticidas e agentes antitumorais. **Química Nova**, v. 30, n. 1, p. 159-170, 2007.
- 31 SOGORB, M. A.; VILANOVA, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. **Toxicology Letters**, v. 128, n. 1, p. 215-228, 2002.
- 32 BIGLEY, A. N.; RAUSHEL, F. M. Catalytic mechanisms for phosphotriesterases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics**, v. 1837, n. 1, p. 443-453, 2013.
- 33 BLEECKER, J. L. Organophosphate and carbamate poisoning. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 91, p. 401-432, 2008.
- 34 ROMYEN, S.; HAWKER, D.; KARNCHANASEST, B. Distribution of organophosphate insecticides in a Thai biomass-water system. **Journal of Environmental Science and Health Part B**, v. 42, n. 8, p. 869-875, 2007.
- 35 JAUREGUI, J.; VALDERRAMA, B.; ALBORES, A.; VAZQUEZ-DUHALT, R. Microsomal transformation of organophosphorus pesticides by white rot fungi. **Biodegradation**, v. 14, n. 6, p. 397-406, 2003.
- 36 MANSEE, A. H.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. Detoxification of the organophosphate nerve agent coumaphos using organophosphorus hydrolase immobilized on cellulose materials. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 32, n. 11, p. 554-560, 2005.
- 37 SCHOFIELD, D.; DINOVO, A. Generation of a mutagenized organophosphorus hydrolase for the biodegradation of the organophosphate pesticides malathion and demeton-S. **Journal of Applied Microbiology**, v. 109, n. 2, p. 548-557, 2010.
- 38 DUYSSEN, E. G.; CASHMAN, J. R.; SCHOPFER, L. M.; NACHON, F.; MASSON, P.; LOCKRIDGE, O. Differential sensitivity of plasma carboxylesterase-null mice to parathion, chlorpyrifos and chlorpyrifos oxon, but not to diazinon, dichlorvos, diisopropylfluorophosphate, cresyl saligenin phosphate, cyclosarin thiocholine, tabun thiocholine, and carbofuran. **Chemico-Biological Interactions**, v. 195, n. 3, p. 189-198, 2011.

- 39 ANWAR, S.; LIAQUAT, F.; KHAN, Q. M.; KHALID, Z. M.; IQBAL, S. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1. **Journal of Hazardous Materials**, v. 168, n. 1, p. 400-405, 2009.
- 40 BASKARAN, S.; KOOKANA, R.; NAIDU, R. Contrasting behaviour of chlorpyrifos and its primary metabolite, tcp (3,5,6-trichloro-2-pyridinol), with depth in soil profiles. **Soil Research**, v. 41, n. 4, p. 749-760, 2003.
- 41 LEE, W. J.; BLAIR, A.; HOPPIN, J. A.; LUBIN, J. H.; RUSIECKI, J. A.; SANDLER, D. P.; DOSEMECI, M.; ALAVANJA, M. C. R. Cancer incidence among pesticide applicators exposed to chlorpyrifos in the agricultural health study. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, n. 23, p. 1781-1789, 2004.
- 42 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Índice monográfico – clorpirifós**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b822400047458d519692d63fbc4c6735/C20%20%20Clorpirif%C3%83%C2%B3s.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 20 maio 2012.
- 43 US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Reregistration eligibility decision for chlorpyrifos. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/chlorpyrifos_red.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2012.
- 44 XU, G.; LI, Y.; ZHENG, W.; PENG, X.; LI, W.; YAN, Y. Mineralization of chlorpyrifos by co-culture of *Serratia* and *Trichosporon* spp. **Biotechnology Letters**, v. 29, n. 10, p. 1469-1473, 2007.
- 45 TANG, J.; CAO, Y.; ROSE, R. L.; BRIMFIELD, A. A.; DAI, D.; GOLDSTEIN, J. A.; HODGSON, E. Metabolism of chlorpyrifos by human cytochrome p450 isoforms and human, mouse, and rat liver microsomes. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 29, n. 9, p. 1201-1204, 2001.
- 46 US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Reregistration eligibility decision for methyl parathion**. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/methyl_parathion_red.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2013.
- 47 KEPRASERTSUP, C.; UPATHAM, E. S.; SUKHAPANTH, N.; PREMPREE, P. Degradation of methyl parathion in an aqueous medium by soil bacteria. **Science Asia - Journal of the Science Society of Thailand**, v. 27, p. 261-270, 2001.
- 48 SHIMAZU, M.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Simultaneous degradation of organophosphorus pesticides and *p*-nitrophenol by a genetically engineered *Moraxella* sp. with surface-expressed organophosphorus hydrolase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 76, n. 4, p. 318-324, 2001.
- 49 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Índice monográfico parationa metilica**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d68e2100474596eb9f0cdf3fbc4c6735/p03.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 20 maio 2012.

- 50 BARR, D. B.; TURNER, W. E.; DIPIETRO, E.; MCCLURE, P. C.; BAKER, S. E.; BARR, J. R.; GEHLE, K.; GRISSOM JR, R. E.; BRAVO, R.; DRISKELL, W. J. Measurement of p-nitrophenol in the urine of residents whose homes were contaminated with methyl parathion. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, n. 6, p. 1085, 2002.
- 51 CHAKRA REDDY, N.; VENKATESWARA RAO, J. Biological response of earthworm, *Eisenia foetida* (savigny) to an organophosphorous pesticide, profenofos. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 71, n. 2, p. 574-582, 2008.
- 52 US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Reregistration eligibility decision for chlorpyrifos**. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/chlorpyrifos_red.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2011
- 53 MCDANIEL, K. L.; MOSER, V. C. Differential profiles of cholinesterase inhibition and neurobehavioral effects in rats exposed to fenamiphos or profenofos. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 26, n. 3, p. 407-415, 2004.
- 54 ABASS, K.; REPONEN, P.; JALONEN, J.; PELKONEN, O. In vitro metabolism and interaction of profenofos by human, mouse and rat liver preparations. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 87, n. 3, p. 238-247, 2007.
- 55 MALGHANI, S.; CHATTERJEE, N.; YU, H. X.; LUO, Z. Isolation and identification of profenofos degrading bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 893-900, 2009.
- 56 US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Reregistration eligibility decision for profenofos**. Disponível em: <http://www.epa.gov/oppsrrd1/REDs/profenofos_red.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2013.
- 57 CAPPS, T. M.; BARRINGER, V. M.; EBERLE, W. J.; BROWN, D. R.; SANSON, D. R. Identification of a unique glucosylsulfate conjugate metabolite of profenofos in cotton. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, n. 8, p. 2408-2411, 1996.
- 58 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATION. **Profenofos (171)**. Disponível em: <http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Evaluation08/Profenofos.pdf>. Acesso em: 25 ago. 2012.
- 59 GANI, D.; WILKIE, J. Stereochemical, mechanistic, and structural features of enzyme-catalysed phosphate monoester hydrolyses. **Chemical Society Reviews**, v. 24, n. 1, p. 55-63, 1995.
- 60 DOMINGOS, J. B.; LONGHINOTTI, E.; MACHADO, V. G.; NOME, F. A química dos ésteres de fosfato. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 745-753, 2003.
- 61 LEI, Y.; MULCHANDANI, P.; CHEN, W.; WANG, J.; MULCHANDANI, A. Whole cell-enzyme hybrid amperometric biosensor for direct determination of organophosphorous nerve agents with p-nitrophenyl substituent. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 85, n. 7, p. 706-713, 2004.

- 62 RICHINS, R. D.; KANEVA, I.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. Biodegradation of organophosphorus pesticides by surface-expressed organophosphorus hydrolase. **Nature Biotechnology**, v. 15, n. 10, p. 984-987, 1997.
- 63 CHEN, W.; MULCHANDANI, A. The use of live biocatalysts for pesticide detoxification. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 71-76, 1998.
- 64 ZHANG, R.; CUI, Z.; JIANG, J.; HE, J.; GU, X.; LI, S. Diversity of organophosphorus pesticide-degrading bacteria in a polluted soil and conservation of their organophosphorus hydrolase genes. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 337-343, 2005.
- 65 BENNING, M. M.; HONG, S. B.; RAUSHEL, F. M.; HOLDEN, H. M. The binding of substrate analogs to phosphotriesterase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 39, p. 30556-30560, 2000.
- 66 MATTOZZI, M. P.; TEHARA, S. K.; HONG, T.; KEASLING, J. D. Mineralization of paraoxon and its use as a sole C and P source by a rationally designed catabolic pathway in *Pseudomonas putida*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 10, p. 6699-6706, 2006.
- 67 RAMADEVI, C.; NATH, M. M.; PRASAD, M. G. Mycodegradation of malathion by a soil fungal isolate, *Aspergillus niger*. **International Journal of Basic and Applied Chemical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 108-115, 2012.
- 68 HASAN, H. A. H. Fungal utilization of organophosphate pesticides and their degradation by *Aspergillus flavus* and *A. sydowii* in soil. **Folia Microbiologica**, v. 44, n. 1, p. 77-84, 1999.
- 69 TANG, J.; LIU, L.; HU, S.; CHEN, Y.; CHEN, J. Improved degradation of organophosphate dichlorvos by *Trichoderma atroviride* transformants generated by restriction enzyme-mediated integration (REMI). **Bioresource Technology**, v. 100, n. 1, p. 480-483, 2009.
- 70 HARTLEY, C.; NEWCOMB, R.; RUSSELL, R.; YONG, C.; STEVENS, J.; YEATES, D.; LA SALLE, J.; OAKESHOTT, J. Amplification of DNA from preserved specimens shows blowflies were preadapted for the rapid evolution of insecticide resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 23, p. 8757-8762, 2006.
- 71 PRIMO-PARMO, S. L.; SORENSON, R. C.; TEIBER, J.; DU, B. N. L. The human serum paraoxonase/arylesterase gene (*PON1*) is one member of a multigene family. **Genomics**, v. 33, n. 3, p. 498-507, 1996.
- 72 MACKNESS, B.; DURRINGTON, P. N.; MACKNESS, M. I. Human serum paraoxonase. **General Pharmacology: The Vascular System**, v. 31, n. 3, p. 329-336, 1998.
- 73 DURRINGTON, P.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M. Paraoxonase and atherosclerosis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 21, n. 4, p. 473-480, 2001.

- 74 ANDERSON, R.; DURST, H.; LANDIS, W. Organofluorophosphate-hydrolyzing activity in an estuarine clam, *Rangia cuneata*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v. 91, n. 2, p. 575-578, 1988.
- 75 ROCHA, L. C.; FERREIRA, H. V.; LUIZ, R. F.; SETTE, L. D.; PORTO, A. L. M. Stereoselective bioreduction of 1-(4-methoxyphenyl) ethanone by whole cells of marine-derived fungi. **Marine Biotechnology**, v. 14, n. 3, p. 358-362, 2012.
- 76 TRINCONE, A. Potential biocatalysts originating from sea environments. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 3, p. 241-256, 2010.
- 77 SARKAR, S.; PRAMANIK, A.; MITRA, A.; MUKHERJEE, J. Bioprocessing data for the production of marine enzymes. **Marine Drugs**, v. 8, n. 4, p. 1323-1372, 2010.
- 78 GHOSH, D.; SAHA, M.; SANA, B.; MUKHERJEE, J. Marine enzymes. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 96, p. 189-218, 2005.
- 79 MARTINS, M. P.; MOUAD, A. M.; BOSCHINI, L.; SELEGHIM, M. H. R.; SETTE, L. D.; PORTO, A. L. M. Marine fungi *Aspergillus sydowii* and *Trichoderma* sp. catalyze the hydrolysis of benzyl glycidyl ether. **Marine Biotechnology**, v. 13, n. 2, p. 314-320, 2011.
- 80 BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; DA SILVA, M.; SETTE, L. D. Production of laccase, manganese peroxidase and lignin peroxidase by brazilian marine-derived fungi. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, n. 1, p. 32-37, 2010.
- 81 MACLEOD, R. A. The question of the existence of specific marine bacteria. **Bacteriological Reviews**, v. 29, n. 1, p. 9, 1965.
- 82 KOGURE, K. Bioenergetics of marine bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 278-282, 1998.
- 83 ROCHA, L. C.; FERREIRA, H. V.; PIMENTA, E. F.; BERLINCK, R. G. S.; SELEGHIM, M. H. R.; JAVAROTI, D. C. D.; SETTE, L. D.; BONUGLI, R. C.; PORTO, A. L. M. Bioreduction of α -chloroacetophenone by whole cells of marine fungi. **Biotechnology Letters**, v. 31, n. 10, p. 1559-1563, 2009.
- 84 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, n. 1, p. 43-50, 2011.
- 85 PELCZAR, M. J. C., E.C.S.; KRIEG, N.R. **Microbiologia**. São Paulo: Makron Books, 1997. 524 p.
- 86 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Índice Monográfico - Profenofos**: Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a88fd880474576798462d43fbc4c6735/P13-Profenof%C3%B3s.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 20 mai. 2012.

- 87 RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.
- 88 ARAGÃO, N. M.; VELOSO, M. C. C.; ANDRADE, J. B. Validação de métodos cromatográficos de análise – um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da “química verde” na determinação de metilxantinas em bebidas. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.
- 89 DASS, C. **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. New Jersey: Wiley-Interscience, 2007. 608 p.
- 90 MCMASTER, M. C. **GC/MS: a practical user's guide**. New Jersey: Wiley-Interscience, 2008. 192 p.
- 91 SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC, 2006. 490 p.
- 92 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Polytrin 400/40 EC**. Disponível em: <<http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/POLYTRIN40040EC.pdf>>. Acesso em: 23 maio 2012.
- 93 MATERIAL Safety Data Sheet (MSDS). **Lorsban 480 BR**. Disponível em: <http://msdssearch.dow.com/PublishedLiteratureDAS/dh_052b/0901b8038052b687.pdf?filepath=br/pdfs/no>. Acesso em: 23 mai. 2012.
- 94 MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Folisuper 600 BR**. Disponível em: <http://www.agricultura.pr.gov.br/arquivos/File/defis/DFI/Bulas/Inseticidas/FOLISUPER_600_BR.pdf>. Acesso em: 23 mai. 2012.
- 95 TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.; JOHNSON, T. R. **Microbiology: an introduction**. San Francisco: Benjamin Cummings, 2004. 812 p.
- 96 MADIGAN, M. T. M., J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. Porto Alegre: Artmed, 2010. 1160 p.
- 97 EIVAZI, F.; TABATABAI, M. Phosphatases in soils. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 9, n. 3, p. 167-172, 1977.
- 98 ZAMY, C.; MAZELLIER, P.; LEGUBE, B. Analytical and kinetic study of the aqueous hydrolysis of four organophosphorus and two carbamate pesticides. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 84, n. 14-15, p. 1059-1068, 2004.
- 99 OLIVEIRA, A. R. M. D.; MAGALHÃES, I. R. D. S.; SANTANA, F. J. M. D.; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (LPME): fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 637-644, 2008.
- 100 MATERIAL Safety Data Sheet (MSDS). **4-Bromo-2-chlorophenol**. Disponível em: <<http://datasheets.scbt.com/sc-232437.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

- 101 DERELANKO, M. J.; HOLLINGER, M. A. **Handbook of toxicology**. New Jersey: Taylor & Francis, 2002. 1440 p.
- 102 XU, G.; ZHENG, W.; LI, Y.; WANG, S.; ZHANG, J.; YAN, Y. Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a newly isolated *Paracoccus* sp. strain TRP. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 62, n. 1, p. 51-56, 2008.
- 103 CHANG, M.; LIN, C.; LO, L.; LIN, R. Biological monitoring of exposure to chlorpyrifos by high performance liquid chromatography. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 56, n. 3, p. 367-374, 1996.
- 104 PESTICIDES database. **3,5,6-trichloro-2-pyridinol**. Disponível em: http://www.pesticideinfo.org/Summary_Chemical.jsp?Rec_Id=PC37647. Acesso em: 16 jan. 2013.
- 105 FLÜCKIGER-ISLER, R.; MÖRIKOFER-ZWEZ, S.; KAHN, J.-M.; WALTER, P. Dietary components of malt extract such as maltodextrins, proteins and inorganic salts have distinct effects on glucose uptake and glycogen concentrations in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 124, n. 9, p. 1647, 1994.
- 106 LEE, M. S.; KERNS, E. H. LC/MS applications in drug development. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 18, n. 3-4, p. 187-279, 1999.
- 107 HANSON, J. R. **The chemistry of fungi**. UK: RSC Publishing, 2008. 240 p.
- 108 RIGAL, L.; GASET, A.; GORRICHON, J. P. Selective conversion of D-fructose to 5-hydroxymethyl-2-furancarboxaldehyde using a water-solvent-ion-exchange resin triphasic system. **Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development**, v. 20, n. 4, p. 719-721, 1981.
- 109 PESTICIDE database. **p-nitrophenol**. Disponível em: http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC34748#ChemID. Acesso em: 16 jan. 2013.
- 110 OTURAN, M. A.; PEIROTEN, J.; CHARTRIN, P.; ACHER, A. J. Complete destruction of *p*-nitrophenol in aqueous medium by electro-Fenton method. **Environmental Science & Technology**, v. 34, n. 16, p. 3474-3479, 2000.

ANEXOS

Figura 81. Cromatogramas obtidos por CG-EM (70 eV) para a reação de biodegradação do pesticida profenofós com o fungo *A. sydowii* CBMAI 935, em 20 dias.

Condições de análise CG-EM: $T_i = 100^\circ \text{C}$, 5 min; $T_f = 250^\circ \text{C}$, 10 min; $r = 5^\circ \text{C/min}$, $t_c = 45 \text{ min}$.

Coluna capilar DB-5 da J&W Scientific (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

Figura 82. Cromatogramas obtidos por CG-EM (70 eV) para a reação de biodegradação do pesticida profenofós com o fungo *A. sydowii* CBMAI 935, em 30 dias.

Condições de análise CG-EM: $T_i = 100^\circ \text{C}$, 5 min; $T_f = 250^\circ \text{C}$, 10 min; $r = 5^\circ \text{C/min}$, $t_c = 45 \text{ min}$.

Coluna capilar DB-5 da J&W Scientific (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

Figura 83. Cromatogramas obtidos por CG-EM (70 eV) para a reação de biodegradação do pesticida profenofós com o fungo *P. raistrickii* CBMAI 931, em 20 dias.

Condições de análise CG-EM: $T_i = 100^\circ \text{C}$, 5 min; $T_f = 250^\circ \text{C}$, 10 min; $r = 5^\circ \text{C/min}$, $t_c = 45 \text{ min}$.

Coluna capilar DB-5 da J&W Scientific (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

Figura 84. Cromatogramas obtidos por CG-EM (70 eV) para a reação de biodegradação do pesticida profenofós com o fungo *P. raistrickii* CBMAI 931, em 30 dias.

Condições de análise CG-EM: $T_i = 100^\circ \text{C}$, 5 min; $T_f = 250^\circ \text{C}$, 10 min; $r = 5^\circ \text{C/min}$, $t_c = 45 \text{ min}$.

Coluna capilar DB-5 da J&W Scientific (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm).

Figura 85. Cromatograma obtido por CG-EM (70 eV) para análises para a reação de clorpirifós na presença de *Trichoderma* sp. CBMAI 932 em meio líquido mineral suplementado com KNO₃, em 30 dias .

Condições de análise CG-EM: $T_i = 50^\circ \text{C}$, 5 min; $T_f = 250^\circ \text{C}$, 10 min; $r = 10^\circ \text{C/min}$, $t_c = 32$ min.

Coluna capilar DB-5 da J&W Scientific (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm).