

PATRÍCIA MAIA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FUNGOS NA DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA
ATRAZINA**

**PPGVS/INCQS
FIOCRUZ
2011**

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE FUNGOS NA DEGRADAÇÃO DO HERBICIDA ATRAZINA

PATRÍCIA MAIA PEREIRA

Mestrado Acadêmico
Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Fundação Oswaldo Cruz

Orientadoras: Dr^a Manuela da Silva

Dr^a Viridiana Santana Ferreira-Leitão

Rio de Janeiro

2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

Avaliação do potencial de fungos na degradação do herbicida atrazina.

Patrícia Maia Pereira

Dissertação submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre.

Aprovada:

Prof^a. Dr^a. Isabella Fernandes Delgado
(INCQS/FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Leda Maria Fortes Gottschalk
(Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA)

Prof^a. Dr^a. Lara Durães Sette
(Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP)

Orientadora: _____
Prof^a. Dr^a. Manuela da Silva
(INCQS/Fiocruz)

Orientadora: _____
Prof^a. Dr^a. Viridiana Santana Ferreira-Leitão
(Instituto Nacional de Tecnologia - INT)

Rio de Janeiro
2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Pereira, Patrícia Maia

Avaliação do potencial de fungos na degradação do herbicida atrazina./ Patrícia Maia Pereira. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2011.

Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2011. Orientadoras; Manuela da Silva e Viridiana Santana Ferreira-Leitão

1. Fungos 2. Biodegradação 3. *Pleurotus ostreatus* 4. Atrazina 5.
Planejamento experimental

“Evaluation the potential of fungi in the degradation of the herbicide atrazine”

Dedico esse trabalho
Ao meu amado marido Fernando,
por toda ajuda, cumplicidade e amor
e a minha orientadora D^{ra} Viridiana Ferreira-Leitão
pelo incentivo, amizade e valiosos ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo Dom da vida e a Nossa Senhora Aparecida por atender meus apelos nos momentos difíceis, clareando meus caminhos.

À minha orientadora D^{ra} Manuela da Silva, pela oportunidade, confiança, ensinamentos e pela dedicada orientação.

À minha amada irmã Priscila por toda paciência, amizade, apoio e dedicação.

À minha mãe Marisa por todas as renúncias que possibilitaram o início de tudo.

Ao programa de Pós-graduação do INCQS, por acreditar na importância desse trabalho.

Ao querido Carlos por toda a ajuda com a preservação dos fungos.

Ao amigo Ricardo Sposina por sua amizade e por toda ajuda com o planejamento experimental.

À querida Márcia Jusan pelas caronas que tornavam mais agradáveis as minhas idas à FIOCRUZ.

A todos os amigos do curso e também aqueles conquistados durante essa etapa, Daniele, Sarah, Valerinha, Nelson e Tatiane pela grande amizade.

À amiga Anna Maria pelos agradáveis momentos no café e pelas divertidas “estatísticas”.

À querida Ludmila por todo carinho e amizade.

Ao laboratório de Cogumelos Comestíveis do Setor de Microbiologia Agrícola da UFLA- Universidade Federal de Lavras por ter gentilmente cedido o *Pleurotus ostreatus*

Ao Setor de Fungos de Referência do INCQS por ter gentilmente cedido os fungos *Candida rugosa* INCQS 71011, *Lentinula edodes* INCQS 40220 e *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211.

A todos da Divisão de Catálise e Processos Químicos –DCAP- em especial aos meus queridos companheiros de trabalho do Laboratório de Biocatálise – LABIC – pelo incentivo, compreensão e colaboração na realização deste trabalho.

À D^{ra} Claudete Kunigami por toda presteza nos ensaios de cromatografia gasosa.

À amiga Lívian Ribeiro, por seu carinho, incentivo e por me ajudar a desvendar “os segredos da cromatografia”.

À amiga Michelle Reis por sempre me entender e estar disposta a ouvir e ajudar.

À amiga Fabiana Mendes por todos os conselhos e por todo carinho dedicado a mim.

À querida Maria Alice por sua alegria radiante e por deixar o ambiente sempre mais descontraído.

Às minhas queridas amigas Angélica, Renata, Sabrina, Flávia e Bianca por entenderem minhas ausências e nunca desistirem da minha amizade.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“...Aprendi que se depende sempre
De tanta muita diferente gente
Toda a pessoa sempre é as marcas
Das lições diárias de outras tantas pessoas
E é tão bonito quando a gente entende
Que a gente é tanta gente
Onde quer que a gente vá
É tão bonito quando a gente sente
Que nunca está sozinho.
Por mais que pense estar...”

(Caminhos do Coração, verso de Luiz Gozaga Junior)

RESUMO

No Brasil, a expansão de área plantada de cana-de-açúcar, impulsionada pela demanda crescente do etanol como combustível que compõe a matriz energética nacional, é acompanhada pelo aumento no consumo de insumos específicos para a cultura, incluindo os herbicidas. Dentre os herbicidas mais utilizados na agricultura, a atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-s-triazina), um herbicida da classe dos triazínicos, é usada intensivamente no controle de ervas daninhas em pré ou pós-emergência. Devido a sua estrutura química representada por um anel triazínico substituído com cloro, etilamina e isopropilamina, a atrazina se mostra uma substância altamente recalcitrante para a degradação biológica no ambiente. A aplicação de fungos para biodegradação de substâncias químicas recalcitrantes vem sendo amplamente estudada. Portanto, o presente estudo teve como objetivo testar a tolerância de *Candida rugosa* INCQS 71011, *Lentinula edodes* INCQS 40220, *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211 e *Pleurotus ostreatus* UFLA ao herbicida atrazina na concentração final de 10 mgL⁻¹ e a partir desses resultados, os fungos que se apresentaram tolerantes foram selecionados e utilizados para os testes de degradação de atrazina e o melhoramento da composição do meio de cultivo visando um maior percentual de degradação. Foi constatado que a tolerância não se mostrou relacionada à degradação. Embora todos os fungos estudados tenham se mostrado tolerantes à presença de atrazina, somente *Pleurotus ostreatus* UFLA foi capaz de degradá-la e produzir a enzima lacase. Nos experimentos de degradação, o fungo *Pleurotus ostreatus* UFLA avaliado por 15 dias atingiu um percentual máximo de 39% no 15º dia de cultivo, produzindo os metabólitos desetilatrazina e deisopropilatrazina. A atividade máxima da enzima lacase foi 0,533 U/mL, no entanto não foi possível correlacionar degradação e atividade enzimática. Após esses experimentos, foi realizado um planejamento experimental para maximizar a degradação de atrazina. Foi realizado um delineamento fatorial fracionado 2⁸⁻⁴ com 20 ensaios. Com esses experimentos foi possível aumentar os níveis de degradação para 65% em 15 dias e aumentar também a diversidade dos metabólitos formados. Além de desetilatrazina e deisopropilatrazina, formou-se também desetilhidroxiatrazina, deisopropilhidroxiatrazina e desetildeisopropilatrazina. Com base nestes resultados, *Pleurotus ostreatus* UFLA apresenta grande potencial para

ser utilizado na biorremediação de ambientes contaminados por atrazina, minimizando os impactos deste herbicida na saúde pública.

ABSTRACT

In Brazil, the expansion of the cultivated area with sugar cane, driven by a growing demand for ethanol as fuel, is accompanied by an increase in consumption of specific inputs for the crop, including herbicides. Among the herbicides used in agriculture, atrazine (2-chloro-4-ethylamine-6-isopropylamine-s-triazina), an herbicide of the triazine class, is used extensively in weed control in pre or post emergence. Due to its chemical structure represented by a triazine ring substituted with chlorine, ethylamine and isopropylamine, atrazine proves to be a highly recalcitrant substance to biological degradation in the environment. The application of fungi for biodegradation of recalcitrant chemical substances has been widely studied. In this study, fungi were selected from the Culture Collection Reference *Candida rugosa* INCQS 71011, *Lentinula edodes* INCQS 40220, *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211 and *Pleurotus ostreatus* UFLA based on their tolerance to the herbicide atrazine at a final concentration of 10 mgL⁻¹, to perform a comprehensive study of degradation potential and of the role of ligninolytic enzymes in the process. The tolerance to the herbicide did not prove to be related to degradation. Although all the fungi studied have proven to be tolerant to the presence of atrazine, only *Pleurotus ostreatus* was capable to degrade it and produce the enzyme laccase. The degradation of atrazine mediated by *Pleurotus ostreatus* was monitored for 15 days and reached a maximum degradation level of 39% on day 15, producing the metabolites deethylatrazine and deisopropylatrazine. The maximum activity of laccase enzyme was 0.533 U/mL and it was not possible to correlate enzyme activity and degradation. After these experiments, an experimental planning was designed to maximize the degradation of atrazine. A fractional factorial design 2⁸⁻⁴ was performed with 20 assays. With these experiments it was possible to increase the levels of degradation to 65% in 15 days and also to increase the diversity of the metabolites formed. In addition to deethylatrazine and deisopropylatrazine, three other products were also formed deethylhydroxyatrazine, deisopropylhydroxyatrazine and deethyldeisopropylatrazine. Based on these results, *Pleurotus ostreatus* UFLA has great potential to be used in bioremediation of environments contaminated by atrazine, minimizing the impact of this herbicide on the public health.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Movimento dos agrotóxicos no ambiente por caminhos abióticos e bióticos (Hayes & Laws, 1997).....	3
Figura 2 - Comercialização de defensivos agrícolas no Brasil no ano de 2009 (SINDAG 2009).....	5
Figura 3 - Estrutura química da atrazina	7
Figura 4 - Principais produtos de degradação da atrazina	9
Figura 5 – Rota de degradação de atrazina no solo (Kruger <i>et al.</i> , 1993).....	11
Figura 6 – Rota de degradação da atrazina por bactérias	12
Figura 7 – Mecanismo de degradação primário (abiótico) da atrazina (MUDHOO & GARG,2011)	13
Figura 8 – Ciclo catalítico da lignina peroxidase (LiP) (CAMERON <i>et al.</i> , 2000).....	18
Figura 9 – Estrutura da lacase de <i>Trametes versicolor</i>	19
Figura 10 – Mecanismo de reação lacase-mediador (FABBRINI <i>et al.</i> , 2002)	20
Figura 11 - Aparelho de extração em fase sólida (marca J.T. Baker)	26
Figura 12 - Procedimento de extração em fase sólida utilizando o cartucho Oasis [®] MCX. (BALESTEROS, 2009).....	27
Figura 13 – Estratégia realizada no planejamento fatorial fracionado 2 ⁸⁻⁴	33
Figura 14 – Representação esquemática das etapas descritas na metodologia.....	39
Figura 15 - Placas com o crescimento dos fungos aos 15 dias de incubação. (a) <i>Pleurotus ostreatus</i> UFLA (b) <i>Candida rugosa</i> INCQS 71011 (c) <i>Penicillium simplicissimum</i> INCQS 40211 (d) <i>Lentinula edodes</i> INCQS 40220.....	40
Figura 16 - Perfis cromatográficos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência para a avaliação da degradação de atrazina em meio estático após 15 dias de incubação. (a) <i>Lentinula edodes</i> INCQS 40220 (b) <i>Candida rugosa</i> INCQS 71011 (c) <i>Penicillium simplissicum</i> INCQS 40211 (d) <i>Pleurotus ostreatus</i> UFLA	42
Figura 17 - Perfis cromatográficos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência para a avaliação da degradação de atrazina em meio agitado (200 rpm) após 15 dias de incubação. (a) <i>Lentinula edodes</i> INCQS 40220 (b) <i>Candida rugosa</i> INCQS 71011 (c) <i>Penicillium simplissicum</i> INCQS 40211	44
Figura 18 - Crescimento dos fungos em presença de atrazina após 15 dias sob agitação. (a) <i>Lentinula edodes</i> INCQS 40220 (b) <i>Candida rugosa</i> INCQS 71011 (c) <i>Penicillium simplicissimum</i> INCQS 40211 e (d) <i>Pleurotus ostreatus</i> UFLA	45
Figura 19 - Perfis cromatográficos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência para a avaliação da degradação de atrazina e formação de desetilatrizona (DEA) e deisopropilatrizona (DIA). (a) 5 dias de incubação, (b) 10 dias de incubação e (c) 15 dias de incubação	47
Figura 20 – Perfil cromatográfico obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas para a confirmação dos produtos de degradação da atrazina e formação de desetilatrizona (DEA) e deisopropilatrizona (DIA)	48
Figura 21 - Atividade enzimática da enzima lacase produzida por <i>Pleurotus ostreatus</i> ao longo de 15 dias.....	52
Figura 23 – Percentual de degradação de atrazina nos diferentes meios utilizados no planejamento fatorial fracionado para otimização da degradação de atrazina	55

Figura 24 - Diagrama de Pareto construído através da análise estatística da degradação da atrazina dos 20 ensaios. (a) 5 dias de cultivo (b) 10 dias de cultivo, (c) 15 dias de cultivo e (d) 20 dias de cultivo	58
Figura 25 – Determinação da atividade enzimática para a enzima lacase nos diferentes ensaios.....	60
Figura 26 - Curvas analíticas utilizadas para determinação das concentrações da atrazina e de seus metabólitos formados no processo de degradação.	76
Figura 27 - Porcentagem de recuperação obtida para todos os compostos analisados após extração em cartuchos Oasis MCX.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Casos registrados de intoxicação humana, de intoxicação animal e de solicitação de informação por agente tóxico no ano de 2009	2
Tabela 2 - Composição do Meio Nutritivo Básico. (GORBATOVA <i>et al.</i> , 2006)	24
Tabela 3 - Composição do pré-inóculo utilizado.....	24
Tabela 4 - Gradiente de eluição para separação de atrazina e derivados com a coluna shimpack.	27
Tabela 5 - Composição do meio reacional utilizado na determinação enzimática de lacase.....	29
Tabela 6 - Composição do meio reacional utilizado na determinação enzimática de manganês peroxidase.....	30
Tabela 7 - Composição do meio reacional utilizado na determinação enzimática de lignina peroxidase	31
Tabela 8 - Variáveis e faixa de concentração dos componentes do meio de cultivo.	34
Tabela 9 – Matriz do delineamento fatorial fracionado 2^{8-4} , mostrando os níveis do planejamento a cada ensaio	34
Tabela 10 – Matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , mostrando a concentração das variáveis em cada ensaio	36
Tabela 11 Tempo de retenção da atrazina e de seus derivados com a metodologia utilizada.....	41
Tabela 12 - Determinação das atividades das enzimas ligninolíticas nos meios de cultivos contendo atrazina a 10 mgL^{-1} ao longo de 15 dias. Atividade enzimática expressa em U/mL.....	51
Tabela 13 – Percentual de degradação de atrazina e seus metabólitos formados para os resultados mais expressivos após o planejamento experimental.....	54
Tabela 14 - Comparação dos estudos de degradação de atrazina descritos na literatura.....	57
Tabela 15 – Estimativas por ponto, por intervalo e testes de hipóteses para os efeitos após 5 dias de cultivo. Em vermelho as variáveis estatisticamente significativas	59
Tabela 16 - Estimativas por ponto, por intervalo e testes de hipóteses para os efeitos após 10 dias de cultivo. Em vermelho as variáveis estatisticamente significativas	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2,4-DCP - 2,4-diclorofenol

A - Atrazina

ABTS – Ácido 2,2-azino-bis-(3-etilbenzotiazolona-6-sulfônico)

ACN – Acetonitrila

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CG – Cromatografia Gasosa

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente

ϵ - Coeficiente de extinção molar

DCAP – Divisão de Catálise e Processos Químicos

DEA – Desetilatrazina

DEDIA – Desetildeisopropilatrazina

DEHA – Desetilhidroxiatrazina

DIA – Deisopropilatrazina

DIHA – Deisopropilhidroxiatrazina

HA – Hidroxiatrazina

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

INT – Instituto Nacional de Tecnologia

MND – Meio Nutritivo Básico

PDA – Ágar Batata Dextrose

OA – Agar Aveia

SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas

UFLA – Universidade Federal de Lavras

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Saúde e Ambiente.....	1
1.2 Agrotóxicos	4
1.3 Classificação dos Agrotóxicos	5
1.3.1 Organoclorados	5
1.3.2 Organofosforados	6
1.3.3 Carbamatos	6
1.3.4 Piretróides.....	6
1.3.5 Triazinas	6
1.3.5.1 Atrazina	7
1.3.5.1.1 Degradação da atrazina	8
1.3.5.1.1.1 Biodegradação de atrazina.....	10
1.4 Biodegradação de Poluentes Químicos Recalcitrantes por Fungos	14
1.5 Enzimas Ligninolíticas.....	16
1.5.1 Lignina Peroxidase (LiP) (EC 1.11.1.14)	17
1.5.2 Lacase (EC 1.10.3.2).....	18
2. Objetivos	22
2.1 Objetivos Específicos.....	22
3. Materiais e Métodos	23
3.1 Fungos e Meios de Cultura	23
3.2 Avaliação da Tolerância à Atrazina pelos Fungos.....	24
3.3 Degradação de Atrazina pelos Fungos e Análise dos Produtos de Degradação.....	25
3.3.1 Extração em fase sólida	25
3.3.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	27
3.3.3 Padrões dos herbicidas	28
3.3.4 Curva analítica	28
3.3.5 Cálculo de recuperação	28
3.3.6 Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas	29
3.4 Determinação das Atividades Enzimáticas.....	29
3.4.1 Lacase	29
3.4.2 Manganês Peroxidase (MnP)	30
3.4.3 Lignina Peroxidase (LiP).....	30
3.5 Testes de Adsorção	31
3.6 Maximização da degradação de atrazina por planejamento estatístico.....	33
4. Resultados e Discussão	40
4.1 Seleção de Fungos Tolerantes ao Herbicida Atrazina	40
4.2 Degradação de Atrazina e Análise dos Produtos de Degradação	41
4.2.1 Determinação da atividade enzimática nos estudos preliminares de degradação de atrazina	49
4.2.2 Maximização da degradação de atrazina por planejamento estatístico	53
5. CONCLUSÃO.....	61
6. PERSPECTIVAS.....	63
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 Saúde e Ambiente

O uso de pesticidas tem se difundido muito na agricultura nos últimos 30 anos, especialmente no Brasil, que se tornou um dos maiores consumidores desses produtos xenobióticos, ficando atrás somente do Japão e dos Estados Unidos (DAMS, 2006)

Os pesticidas químicos além de serem utilizados para controle de pragas na agricultura, também têm sido aplicados no controle de vetores causadores de doenças (malária, dengue, etc.) no setor da saúde humana (BHATNAGAR *et al.*, 2001; REKHA *et al.*, 2006).

O uso indiscriminado e intensivo de pesticidas tem sido responsável pelo desenvolvimento de resistência a estes produtos químicos por parte das pragas alvo, resultando na sua utilização em maiores concentrações e, conseqüentemente, causando graves prejuízos à saúde pública e ao ambiente (AGNIHOTRI,1999; ABHILASH& SINGH, 2009).

O risco de efeitos adversos à saúde humana relacionados ao uso de pesticidas depende fundamentalmente do perfil toxicológico do produto, do tipo e da intensidade da exposição experimentada pelos indivíduos e da susceptibilidade da população exposta (DELGADO & PAUMGARTTEN, 2004).

A exposição humana aos pesticidas (encontrados em meios como solo, água, ar e alimentos) pode ocorrer de diferentes modos, tais como inalação, ingestão e contato com a pele, resultando em problemas de saúde agudos e crônicos (REKHA *et al.*, 2006).

O aumento de incidência de câncer, doenças crônicas nos rins, supressão do sistema imune, esterilidade entre homens e mulheres, disfunções endócrinas, disfunções neurológicas e comportamentais, principalmente entre crianças, têm sido atribuídos a envenenamento crônico por pesticidas (AGNIHOTRI, 1999; ABHILASH& SINGH, 2009).

O Brasil é considerado um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo. Segundo o Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas –

SINITOX no ano de 2009, foram registrados 4056 casos de intoxicação humana, por agente tóxico presente nos agrotóxicos de uso agrícola (SINITOX, 2009) (Tabela 1).

Tabela 1 - Casos registrados de intoxicação humana, de intoxicação animal e de solicitação de informação por agente tóxico no ano de 2009

Agente	Vítima	Humana	Animal	Informação	Total	
		nº	nº	nº	nº	%
Medicamentos		21582	160	838	22580	27,35
Agrotóxicos/Usos Agrícola		3813	72	171	4056	4,91
Agrotóxicos/Usos Doméstico		2448	249	139	2836	3,43
Produtos Veterinários		748	147	29	924	1,12
Raticidas		2182	208	77	2465	2,99
Domissanitários		9588	253	185	10026	12,14
Cosméticos		909	9	50	968	1,17
Produtos Químicos Industriais		4284	89	173	4546	5,51
Metais		276	4	31	311	0,38
Drogas de Abuso		4074	7	445	4526	5,48
Plantas		932	94	65	1091	1,32
Alimentos		692	4	22	718	0,87
Animais Peç./Serpentes		2807	28	109	2944	3,57
Animais Peç./Aranhas		3028	10	311	3349	4,06
Animais Peç./Escorpiões		8306	4	218	8528	10,33
Outros Animais Peç./Venenosos		4337	29	265	4631	5,61
Animais não Peçonhentos		3147	14	190	3351	4,06
Desconhecido		1735	77	59	1871	2,27
Outro		2570	41	234	2845	3,45
Total		77458	1497	3611	82566	100
%		93,81	1,81	4,37	100	

Fonte: MS / FIOCRUZ / SINITOX

Sinais convencionais utilizados:

... Dado numérico não disponível

- Dado numérico igual a zero não resultante de arredondamento

A aplicação inapropriada de pesticida afeta o ecossistema como um todo, por seus resíduos entrarem na teia alimentar e por serem poluentes do solo, ar e águas superficiais e subterrâneas (ABHILASH & SINGH, 2009). Na Figura 1, é apresentado o movimento dos pesticidas após serem introduzidos no solo e na água (HAYES & LAWS, 1997).

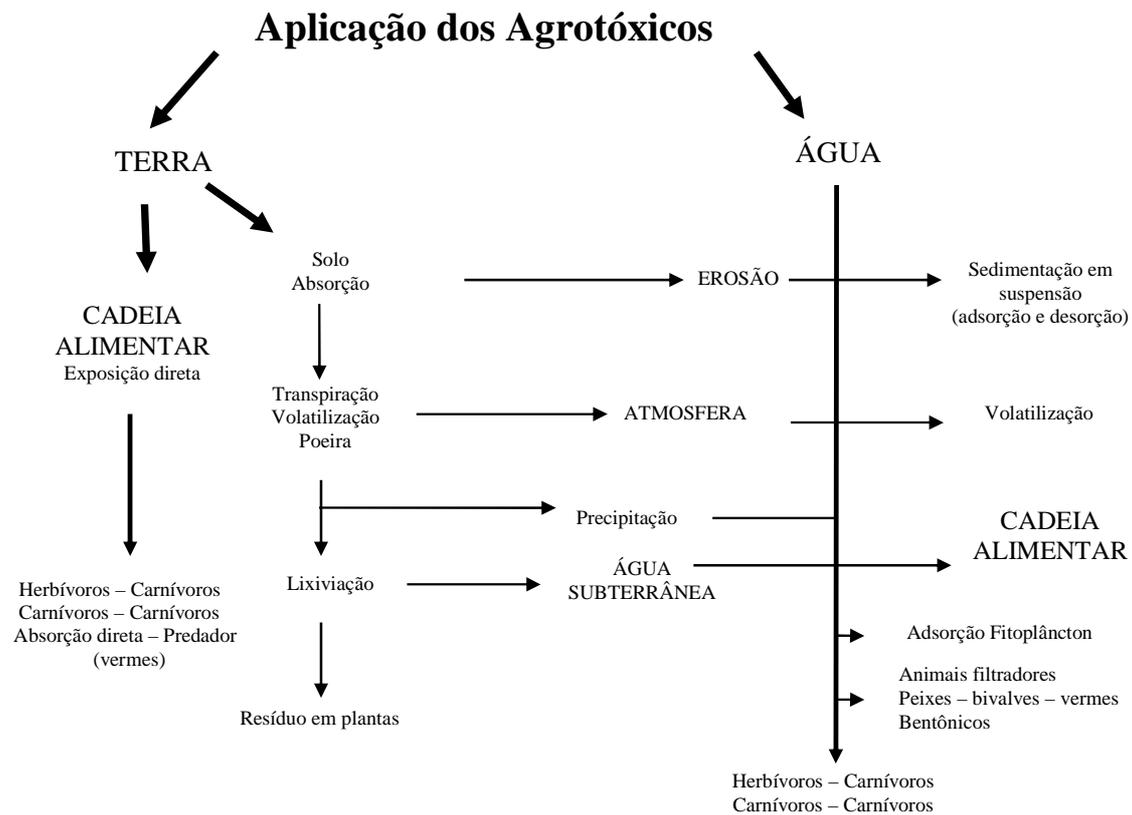


Figura 1 - Movimento dos agrotóxicos no ambiente por caminhos abióticos e bióticos (Hayes & Laws, 1997).

Sem dúvida, a contaminação de águas naturais tem sido um dos grandes problemas da sociedade moderna. A economia de água em processos produtivos vem ganhando especial atenção devido ao valor agregado que tem sido atribuído a este bem, através de princípios como consumidor pagador e poluidor pagador, incorporados em nossa legislação (KUNZ *et al.*, 2002).

A aplicação de ações ao ambiente está claramente incluída na definição de Vigilância Sanitária estabelecida pela Lei Orgânica da Saúde (BRASIL, 1990) como “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir, ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde”.

No Brasil vem crescendo entre os profissionais da área de saúde coletiva o conhecimento sobre a relação entre a categoria ambiente e o padrão de saúde/doenças das populações. A área de saúde coletiva incorporou a saúde ambiental entre suas questões prioritárias, coincidindo com uma maior preocupação nos meios acadêmicos com problemas de saúde relacionados ao ambiente, além do

crescimento e maior visibilidade dos movimentos ecológicos (TAMBELLINI & CÂMARA, 2002).

O aumento da conscientização ecológica, iniciado no final do século XX, deixou claro que o grande desafio da humanidade para as próximas décadas é equilibrar a produção de bens e serviços, crescimento econômico, igualdade social e sustentabilidade ambiental (PINTO *et al.*, 2005).

Para prevenir os riscos à saúde é necessário conhecimento das possíveis causas das doenças e os mecanismos pelos quais os indivíduos se defrontam com os elementos causais. Este conhecimento pode levar a um processo de recomendação de ações sanitárias que prevê medidas e atividades fundamentadas cientificamente para a prevenção de doenças (TAMBELLINI & CÂMARA, 2002).

1.2 Agrotóxicos

A Lei Federal nº 7.802 de 11/07/89, regulamentada através do Decreto 98.816, no seu Artigo 2º, Inciso I, define o termo agrotóxico da seguinte forma:

“Os produtos e os componentes de processos físicos, químicos ou biológicos destinados ao uso nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas ou implantadas e de outros ecossistemas e também em ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-la da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento”.

Segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Defesa Agrícola (SINDAG), a comercialização de defensivos agrícolas no Brasil, em 2009, foi de 725 mil toneladas de produtos formulados. As principais classes são os herbicidas com 59% (429.693 toneladas), seguido por inseticidas e acaricidas com 21% (150.189 toneladas), fungicidas com 12% (89.889 toneladas) e outros com 8% (55.806 toneladas).

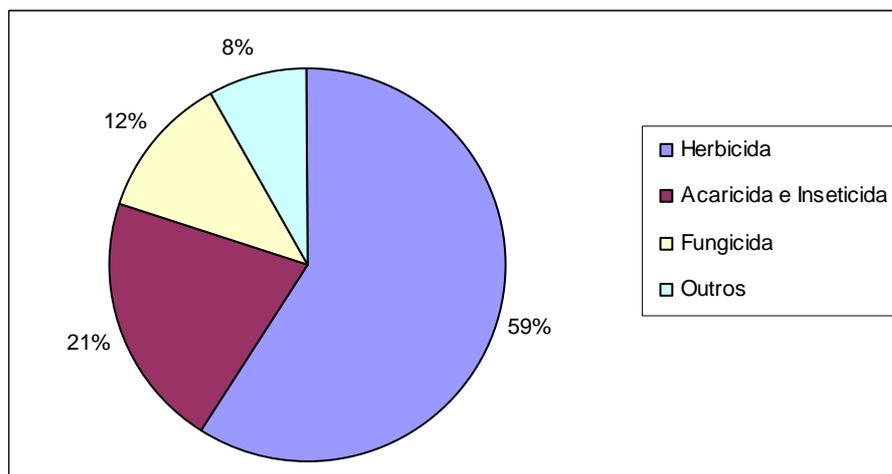


Figura 2 - Comercialização de defensivos agrícolas no Brasil no ano de 2009 (SINDAG 2009)

No Brasil, a expansão de área plantada de cana-de-açúcar, impulsionada pela demanda crescente do etanol como matriz energética nacional, é acompanhada pelo aumento do consumo de insumos específicos para a cultura. Conforme destacam Armas e colaboradores (2005) os herbicidas compõem a classe de agroquímicos mais utilizada na cultura de cana-de-açúcar. Um estudo realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) mostrou que em 2009 a área total plantada era de 9.671.546 hectares, um crescimento de 2,7% em relação a 2008.

Dentre os herbicidas mais utilizados na agricultura, a atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-s-triazina), um herbicida da classe dos triazínicos, é usada intensivamente no controle de ervas daninhas em pré ou pós emergência, principalmente em culturas de cana-de-açúcar, milho, e soja (ANVISA).

1.3 Classificação dos Agrotóxicos

Os agrotóxicos podem ser classificados em duas categorias básicas, quanto à classe química que pertencem ou quanto a seu organismo alvo. Quanto à estrutura química são classificados como: Carbamatos, piretróides, organofosforados, organoclorados e as triazinas, quanto à sua ação, são classificados como: Inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, etc.

1.3.1 Organoclorados

Os organoclorados são compostos orgânicos que contém o elemento cloro. Com relação a outros grupos químicos, estes compostos são geralmente menos tóxicos em termos de toxicidade aguda, porém são mais persistentes no corpo

humano e no ambiente, podendo permanecer ativo em longo prazo. Os organoclorados podem ser absorvidos por vias orais, respiratórias ou dérmicas. Com mecanismo de ação pouco conhecido, estes compostos agem no sistema nervoso central e periférico. Eles são armazenados na gordura do organismo e por isso são cumulativos e potencialmente teratogênicos, mutagênicos e carcinogênicos.

1.3.2 Organofosforados

Organofosforados são compostos orgânicos à base de fósforo. São mais tóxicos que os organoclorados em termos de toxicidade aguda, no entanto, possuem rápida degradabilidade no ambiente e não se acumulam nos tecidos gordurosos (GOLDMAN & GILMAN, 1990).

Estes compostos são inibidores de acetilcolinesterase (enzima que torna possível a transmissão de impulsos nervosos no organismo), o que provoca a alteração de glândulas, músculos e sistema nervoso (GOLDMAN & GILMAN, 1990).

1.3.3 Carbamatos

Carbamatos são compostos orgânicos derivados do ácido carbâmico (ARRUDA, 1990). São menos tóxicos que os fosforados e mais tóxicos que os clorados (contaminação aguda), degradam-se relativamente rápido e não se acumulam em tecidos gordurosos. Possuem ação mais curta que os organofosforados com relação à função reguladora da acetilcolinesterase, porém, vários produtos deste grupo químico foram banidos em outros países pelos seus efeitos cancerígenos (ARRUDA, 1990).

Compostos originários deste grupo químico como os ditiocarbamatos, causam reações alérgicas cutâneas e neoplasia em animais de laboratório.

1.3.4 Piretróides

Possuem estruturas semelhantes às piretrinas, ou seja, ésteres dos ácidos crisantêmicos.

Seus efeitos ainda não são totalmente conhecidos, mas alguns autores afirmam que este grupo é um dos menos tóxicos ao homem.

1.3.5 Triazinas

Dentre as classes de herbicidas existentes, as triazinas possuem maior destaque compondo cerca de 30% da produção mundial (FERREIRA, 2005).

A classificação dos mecanismos de ação dos herbicidas depende do risco de desenvolvimento de resistência pelas espécies alvo. Considerando que os produtos são comercializados há mais de 40 anos, seu mecanismo de ação tornou-se menos suscetível ao desenvolvimento de resistência (CHRISTOFFOLET *et al.*, 2004).

As triazinas pertencem ao grupo de herbicidas inibidores do fotosistema II. Atuam na membrana do cloroplasto em que ocorre a fase luminosa da fotossíntese, mais especificamente no transporte de elétrons (CHRISTOFFOLET *et al.*, 2004). As plantas que recebem esse tratamento apresentam clorose foliar e tem seu crescimento inibido.

1.3.5.1 Atrazina

A atrazina [2-cloro-4(etilamino)-6-(isopropilamino)-s-triazina, CAS N° 1912-24-9, pertence à classe química das triazinas, sua estrutura química é representada por um anel triazínico substituído com cloro, etilamina e isopropilamina, que a torna recalcitrante para a degradação biológica no ambiente (COLLA *et al.*, 2008). A Figura 3 apresenta a estrutura química da atrazina.

A atrazina apresenta baixa solubilidade em água (33 mg/L a 27°C), porém solúvel em muitos solventes orgânicos (360 a 183.000 mg/L) (MUDHOO & GARG,2011). Devido ao baixo coeficiente de partição octanol-água, não se adsorve substancialmente ao solo, sendo freqüentemente encontrada acima dos níveis toleráveis pelas agências de controle ambiental em águas superficiais e lençóis freáticos (ABATE & MASINI, 2005; ARMAS *et al.*, 2005).

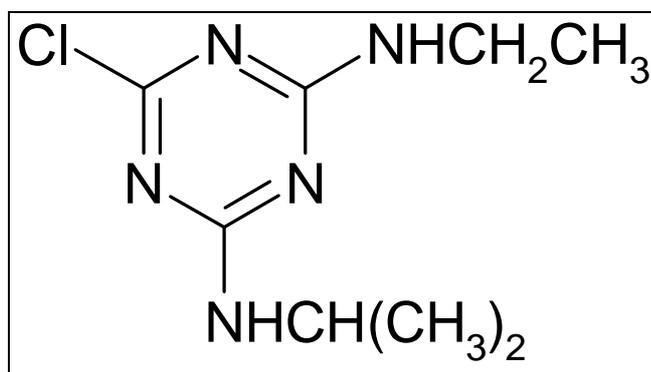


Figura 3 - Estrutura química da atrazina

Jablonowski e colaboradores (2009) conduziram estudos de persistência de atrazina e passados 22 anos da última aplicação deste herbicida ainda foram detectadas concentrações em média quatro vezes maiores em subsuperfície comparado a superfícies do solo (0-10 cm), indicando elevado risco de contaminação de águas subterrâneas, mesmo após 22 anos de exposição desse herbicida.

Segundo a resolução CONAMA n ° 357 de 17 de Março de 2005 (BRASIL, 2005), o limite máximo permitido para atrazina em águas doces é $2,0 \mu\text{gL}^{-1}$, além disso, a legislação determina que os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água, após o devido tratamento e o efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos. Assim, é muito importante encontrar métodos eficientes de degradação dessa substância.

1.3.5.1.1 Degradação da atrazina

A degradação e mineralização da atrazina podem ocorrer por processos físico-químicos ou bioquímicos. Mais de 15 metabólitos resultantes da degradação já foram identificados e descritos na literatura (RADOSEVICH *et al.*, 1995).

Os principais produtos de degradação da atrazina são compostos hidroxilados e clorados. São eles: Desetilatrazina (2-cloro-4-amino-6-isopropilamino-s-triazina - DEA), Deisopropilatrazina (2-cloro-4-etilamino-6-amino-s-triazina - DIA), Desetildeisopropilatrazina (2-cloro-4,6-amino-s-triazina - DEDIA), Desetilhidroxiatrazina (2-hidroxi-4-amino-6-isopropilamino-s-triazina - DEHA), Deisopropilhidroxiatrazina (2-hidroxi-4-etilamino-6-amino-s-triazina - DIHA) e Hidroxiatrazina (2-hidroxi-4-etilamino-6-isopropilamino-s-triazina - HA) (Figura 4).

Segundo Eisler (1989), há um consenso geral de que os produtos de degradação da atrazina são substancialmente menos tóxicos e normalmente não estão presentes no ambiente em concentrações inibidoras de algas, bactérias, plantas ou animais.

Solomon e colaboradores (1996) em seus estudos de avaliação de risco da atrazina testaram a toxicidade da atrazina e de quatro de seus produtos de degradação (DEA, DIA, HA e DEDIA). Os autores verificaram que a atrazina é capaz de inibir mais efetivamente a fotossíntese do que qualquer um de seus produtos de

degradação. DEA e DIA se mostraram os metabólitos mais tóxicos dos quatro testados. Em testes de toxicidade com algas azuis, a atrazina apresentou toxicidade de 7 a 10 vezes maior que a DEA e em testes com algas verdes, a atrazina foi de 4 a 6 vezes mais tóxica. Com relação ao metabólito DIA, a atrazina foi 20 a 50 vezes mais inibitória a algas azuis e 7 a 13 vezes mais inibitória a algas verdes. DEDIA e HA foram considerados neste estudo como não tóxicos a essas algas.

Essa conclusão foi apoiada por um estudo de toxicidade do metabólito DEA por macrófitas submersas em que a atrazina produziu uma inibição fotossintética com uma concentração 5 vezes maior da concentração necessária para DEA (JONES & WINCHELL, 1984).

Muitos estudos têm sido realizados com o intuito de verificar os possíveis danos da atrazina e de seus metabólitos em animais e seres humanos.

Estudos em seres humanos mostraram que a atrazina é um potente desregulador endócrino que aumenta a expressão da enzima aromatase em alguns tipos de câncer. Esse mecanismo está envolvido com a inibição da enzima fosfodiesterase pela atrazina não havendo degradação de cAMP. O aumento nos níveis de cAMP ativa a expressão da enzima aromatase, que age como mediadora da aromatização de andrógenos em estrógenos, aumentando assim a produção de estrogênio (FAN *et al.*, 2007) A atrazina também foi associada a um aumento de 8,4 vezes os riscos de câncer de próstata em homens que trabalhavam com esse herbicida em San Gabriel, Lousiana, EUA (MACLENNAN *et al.*, 2002).

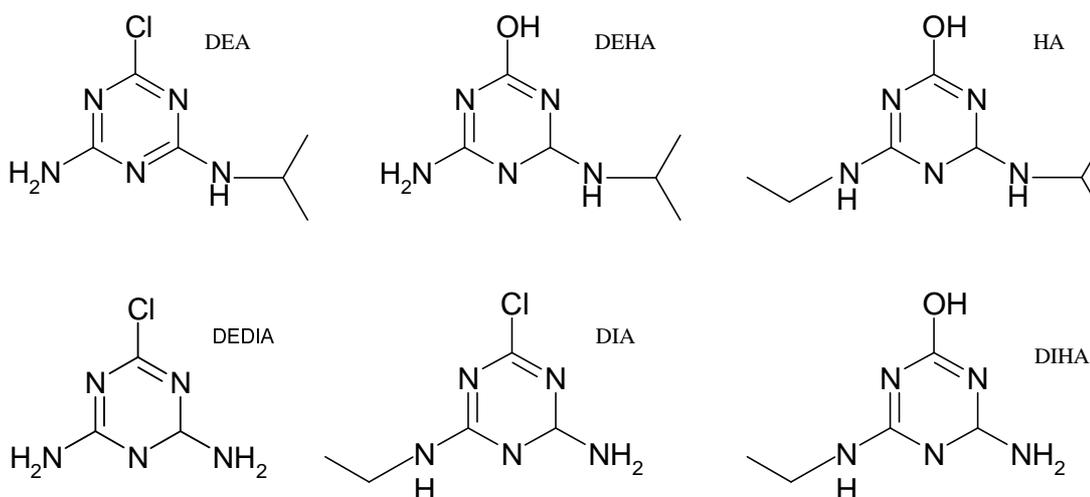


Figura 4 - Principais produtos de degradação da atrazina

1.3.5.1.1 Biodegradação de atrazina

A biorremediação é definida como um processo tecnológico pelo qual sistemas biológicos são utilizados para tratar a poluição e restaurar a qualidade ambiental, reduzindo a concentração dos poluentes a níveis considerados seguros, por meio da degradação destes compostos. Os sistemas biológicos mais utilizados na biorremediação são os microbiológicos, principalmente bactérias, fungos filamentosos e leveduras (DA SILVA & ESPOSITO, 2004).

A biorremediação vem sendo desenvolvida visando explorar a diversidade genética e a versatilidade metabólica microbiana para a transformação de contaminantes em produtos menos tóxicos, que podem ser integrados aos ciclos biogeoquímicos naturais (UETA *et al.*, 1999). Entretanto, a biodegradação de substratos imiscíveis em água é limitada, pela dificuldade da sua utilização pelos micro-organismos (PARASZKIEWICZ *et al.*, 2002).

No solo, a degradação da atrazina é resultado principalmente da atividade microbiana. Uma grande variedade de micro-organismos é capaz de degradar a atrazina levando à formação e acumulação de seus metabólitos (SCHEUNERT, 1992; HICKEY *et al.*, 1994), enquanto outros micro-organismos obtêm nutrientes e energia pela completa mineralização da atrazina a dióxido de carbono e água, incluindo diversas bactérias como espécies de *Nocardia* (TOPP *et al.*, 2000), *Pseudomonas* (YANZE-KONTCHOU & GSCHWIND, 1994) e agrobactérias (STRUTHERS *et al.*, 1998).

A degradação da atrazina por fungos geralmente segue vias bioquímicas que envolvem a remoção seqüencial de substituintes do anel aromático, iniciando pela dealquilação, primeiro e principal passo da via metabólica do composto (MOUGIN *et al.*, 1994; 1997), embora estudos evidenciem a liberação de ^{14}C em moléculas de atrazina marcadas na forma de CO_2 . Tais estudos foram conduzidos usando palha de trigo pasteurizada como substrato para crescimento, o que torna impossível excluir a participação também das bactérias (MASAPHY *et al.*, 1996).

Kruger e colaboradores (1993) sugeriram uma rota metabólica de degradação de atrazina em solos com C^{14} marcado radioativamente (Figura 5). Esse estudo foi realizado com amostras de solo sob condições saturadas e insaturadas, com profundidades de até 120 cm. Em amostras de solo saturadas, o metabólito

deisopropilatrazina (DIA) mostrou ser o metabólito menos persistente com meia-vida igual a 58 dias. Os autores também observaram que a degradação microbiana de atrazina é mais favorecida à formação de desetilatrazina (DEA) do que deisopropilatrazina (DIA).

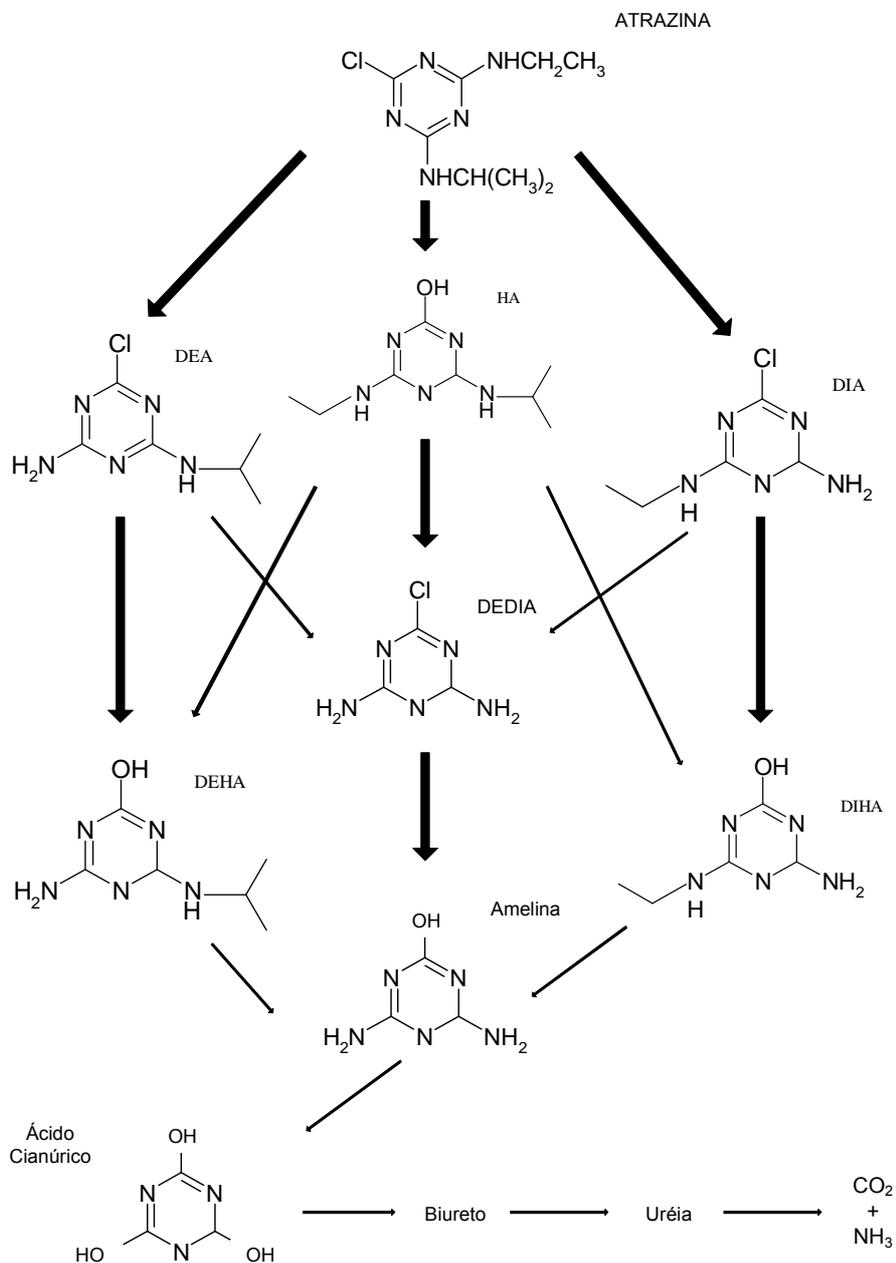


Figura 5 – Rota de degradação de atrazina no solo (Kruger *et al.*, 1993)

Nos solos que recebem aplicações de atrazina, o principal metabólito encontrado é geralmente a hidroxiatrazina, composto desclorado, resultante de reações abióticas ou anaeróbias, porém outros compostos são encontrados em culturas de fungos e bactérias que não possuem enzimas para o catabolismo

completo da molécula, como linhagens de *Rhodococcus* sp., capazes de catalisar a remoção de grupos etil e isopropil da molécula da atrazina (BEHKI *et al.*, 1995).

Em estudos envolvendo bactérias, as linhagens de *Pseudomonas* sp. ADP são consideradas referências nos estudos das rotas de degradação da atrazina. Essas bactérias possuem genes denominados *atzA*, *atzB*, *atzC* e *atzD*, que codificam enzimas responsáveis pela mineralização do composto (MANDELBAUM *et al.*, 1995; RALEBITSO *et al.*, 2002), conforme representado na Figura 6.

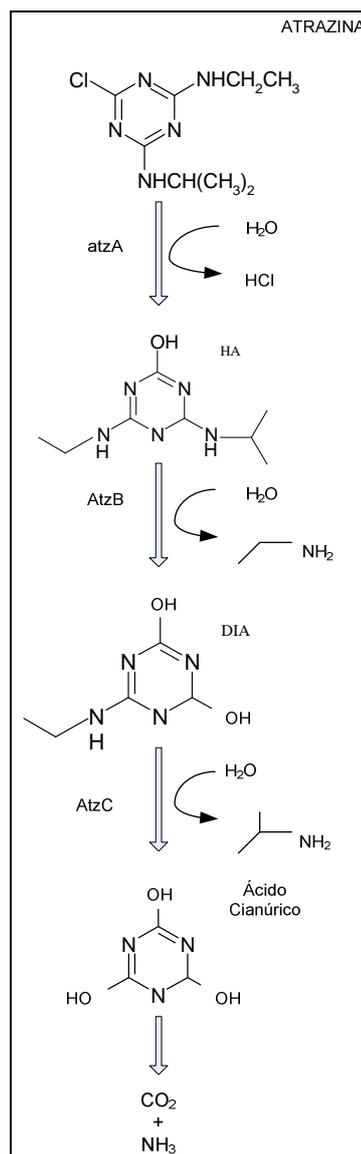


Figura 6 – Rota de degradação da atrazina por bactérias

Estudos relatados por Senesi (1992) mostraram que a adsorção, retenção e degradação de herbicidas pelo solo é influenciada pelo pH, umidade, capacidade de troca catiônica e temperatura.

A biota do solo pode afetar direta ou indiretamente os produtos de degradação formados. Um interessante estudo relata o papel das minhocas como organismos chave que podem afetar significativamente as propriedades físico-químicas do solo e, posteriormente favorecer o desempenho das comunidades microbianas na degradação de moléculas orgânicas (BINET *et al.*, 2006).

Em estudos de degradação da atrazina nos solos, Prata e colaboradores (2003) conduziram ensaios de sorção de atrazina sob sistema de cultivo direto e convencional e também em solo de clima tropical. Os autores mostraram a hidroxiatrazina como o metabólito mais importante da atrazina apresentando maior retenção que os outros metabólitos, sendo DEA e HA os produtos de degradação que mais prevaleceram no solo, embora isso dependa da profundidade do solo e do período de incubação.

Mudhoo e Garg (2011) sugerem um mecanismo de degradação primário (abiótico) que provoca a hidrólise da atrazina gerando o metabólito hidroxiatrazina e a N-alquilação das cadeias laterais da atrazina, produzindo os metabólitos desetilatrazina e deisopropilatrazina conforme descrito na Figura 7.

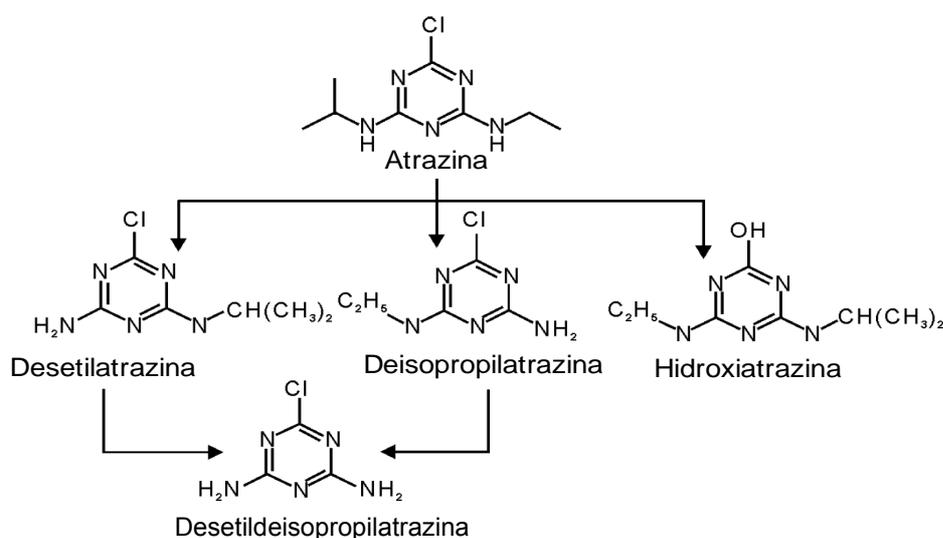


Figura 7 – Mecanismo de degradação primário (abiótico) da atrazina (MUDHOO & GARG,2011)

A hidrólise química da atrazina, seguida de biodegradação deve ser a rota mais importante de desaparecimento do composto (COUTINHO *et al.*, 2005).

Os estudos sobre a degradação microbiana de atrazina têm sido direcionados ao isolamento e a caracterização das linhagens de ocorrência natural em ambientes

contaminados com esse herbicida. De acordo com Rhine e colaboradores (2003), as repetidas exposições de atrazina podem aumentar a biodegradação, que pode ser também reforçada como resultado da limitada disponibilidade de nitrogênio. Silva e colaboradores (2004) demonstraram a ocorrência da rápida mineralização da atrazina por *Pseudomonas* sp. após o período de aclimatação por aproximadamente 28 dias.

Barriuso e Houot (1996) realizaram um estudo comparativo entre a mineralização de atrazina em solos com a microbiota adaptada (com histórico de aplicação) e não-adaptada (sem histórico de aplicação) concluindo que a taxa de mineralização foi sempre inferior na situação não-adaptada. Hang e colaboradores (2007) avaliaram a mineralização de atrazina em superfície e sub-superfície em solos com aplicações prévias de atrazina. De acordo com os resultados, os autores sugerem que os micro-organismos responsáveis pela mineralização da atrazina ficam distribuídos tanto em superfície como em subsuperfície em solos adaptados, indicando que a aplicação freqüente de atrazina aumenta a mineralização em sub-superfície sendo considerado um mecanismo natural de biorremediação.

1.4 Biodegradação de Poluentes Químicos Recalcitrantes por Fungos.

A aplicação de fungos para biodegradação de substâncias químicas recalcitrantes vem sendo amplamente estudada (FERREIRA-LEITÃO *et al.*, 2008, BALESTEROS, 2009, BERGSTEN-TORRALBA *et al.*, 2009, PASSARINI *et al.*, 2010, TEIXEIRA *et al.*, 2010). Esse interesse baseia-se na capacidade desses organismos em degradar diversas moléculas de poluentes orgânicos e outras substâncias tóxicas persistentes, como por exemplo: compostos organofosforados, DDT, dioxinas, pentaclorofenol e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (DA SILVA *et al.*, 2003a, 2004, MARCIAL *et al.*, 2006, PURNOMO *et al.*, 2008, KRÜGENER *et al.*, 2009, TROVALEST-LEROY *et al.*, 2010).

Alguns exemplos de fungos degradadores de triazinas são *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus flavipes*, *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium roseum*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium decumbens*, *Penicillium janthinellum*, *Penicillium rugulosum*, *Penicillium luteum*, *Phanerochaete cryosporium* e *Trichoderma viride* (SENE *et al.*, 2010).

Donelly e colaboradores (1993) testaram a capacidade de nove fungos de classes diferentes, entre eles: actinomicetos, basideomicetos e fungos micorrízicos, em degradar dois herbicidas diferentes (atrazina e ácido 2,4 diclorofenoxiacético) em concentrações distintas de nitrogênio. Neste trabalho, os autores observaram que não há relação entre a degradação dos herbicidas com as classes dos fungos (micorrízicos ou de vida livre), embora estes apresentem mecanismos diferentes.

No ambiente, os fungos são responsáveis pela maioria das transformações que caracterizam as ciclagens de matéria orgânica. A capacidade dos fungos de adaptar rapidamente o seu metabolismo a diferentes fontes de carbono e energia é um fator essencial para a sua sobrevivência, além disso, são capazes de crescer sob as condições de estresse ambiental que limitam o crescimento bacteriano. E ainda, o modo de crescimento dos fungos – induzido quimioestaticamente em direção à fonte de carbono orgânico, através do alongamento e ramificação das hifas – permite a colonização de grandes áreas. Desta forma, o contato superficial com o contaminante é amplo, aumentando sua biodisponibilidade e, conseqüentemente, podendo ter sua biodegradação aumentada (DUPONT *et al.*, 1997).

A degradação de moléculas complexas por fungos se dá através de dois sistemas enzimáticos, um extracelular, envolvendo enzimas ligninolíticas e outra intracelular, envolvendo o sistema enzimático citocromo P-450 monooxigenase e a epóxido hidrolase (ATLAS & CERNIGLIA, 1995). Também já foram observadas enzimas hidrolíticas como: amilases, glicoamilases, lipases, pectinases e proteases envolvidas em processos de biodegradação de biopolímeros relativamente simples pelos fungos (BENNET *et al.*, 2002).

Alguns sistemas enzimáticos, principalmente as oxidoredutases intra e extracelulares, apresentam ação mais generalizada. As oxidoredutases intracelulares, com destaque para o sistema citocromo P450, são responsáveis por reações de detoxificação de compostos que atingem o interior da célula e defendem o organismo do estresse toxicológico (EERD *et al.*, 2003).

Alguns fungos da classe dos basidiomicetos, chamados fungos de podridão branca, são capazes de realizar a degradação de materiais lignocelulósicos por meio de um complexo enzimático lignocelulolítico extracelular (RAJARATHNAM *et al.*, 1992).

Além dos fungos de podridão branca, outros grupos de fungos também apresentam capacidade degradativa de pesticidas. Qing e colaboradores (2003) realizaram a purificação e a caracterização de uma hidrolase obtida do fungo filamentosos *Aspergillus niger* PY 168, responsável pela degradação de carbamatos, que são inseticidas desenvolvidos para substituir pesticidas organoclorados. Similarmente, Liu e colaboradores (2004) realizaram a purificação e caracterização de outra hidrolase responsável pela degradação de pesticidas organofosforados, a partir de *Penicillium lilacinum* BP303.

Já a eficiência de fungos não ligninolíticos, cujo sistema enzimático envolvido na degradação de compostos xenobióticos é intracelular, tem sido menos avaliada. Entretanto, alguns estudos vêm obtendo resultados promissores com esses fungos.

As leveduras também exibem características atraentes quando comparadas com as bactérias e os fungos filamentosos. Embora seu crescimento não seja tão rápido como o das bactérias, as leveduras podem crescer mais rápido que a maioria dos fungos filamentosos e, como eles, têm a capacidade para resistir a ambientes desfavoráveis (PAJOT *et al.*, 2007).

1.5 Enzimas Ligninolíticas

Enzimas são proteínas globulares que atuam como catalisadores biológicos conduzindo as reações bioquímicas nas células dos organismos vivos. Estão largamente distribuídas na natureza.

Quimicamente, as enzimas contêm uma ou mais cadeias de centenas de aminoácidos numa complexa estrutura tri-dimensional, que é muito importante para a sua ação. Como em toda a catálise, uma catálise enzimática é definida como uma reação que aumenta a velocidade de uma reação química, sem que o catalisador sofra mudanças em todo o processo. Esta definição implica que uma única molécula de enzima é capaz de converter muitas moléculas de substrato durante o seu tempo de vida.

Segundo Call e Muccke, (1997) as enzimas diferem dos catalisadores químicos em muitos aspectos, tais como: Altas taxas de reação; condições de reação não agressivas e baixa especificidade de reação.

Muitas vezes, as enzimas responsáveis pela degradação de um determinado composto podem ser induzidas em condições específicas e aplicadas para degradar

outro poluente. Dentre a grande variedade de enzimas, diferentes combinações de lignina peroxidases (EC 1.11.1.14), lacases (EC 1.10.3.2) e manganês peroxidases (1.11.1.13) constituem a base do sistema enzimático dos fungos ligninolíticos (RITTMANN & McCARTY, 2001, MACCHEERONI *et al.*, 2004).

1.5.1 Lignina Peroxidase (LiP) (EC 1.11.1.14)

A LiP é uma glicoproteína portadora de grupo prostético ferro-protoporfirina IX (heme) exibindo atividade dependente de H_2O_2 que catalisa uma variedade de compostos fenólicos, não fenólicos, hidratos de carbono aromáticos e outros compostos que são resistentes ao ataque microbiano (TIEN & KIRK, 1984, GARG & MODI, 1999). Com massa molar variando entre 38 e 45 kDa, são muito semelhantes às peroxidases dependentes de manganês (MnP) em estrutura e função (KUWAHARA *et al.*, 1984). A especificidade catalítica inerente a cada uma delas seria resultante de diferenças sutis nos sítos de ligação aos substratos (CAMERON *et al.*, 2000, MACCHERONI *et al.*, 2004).

O perfil catalítico da lignina peroxidase é apresentado na Figura 8. O ciclo reacional é iniciado pela oxidação da enzima e do ferro contido no sítio ativo de Fe^{3+} para Fe^{4+} por parte do H_2O_2 , gerando água e a enzima no seu estado oxidado, chamado composto I. Nesta condição, o álcool veratrílico ou outro substrato reduzem o composto I a composto II, forma da enzima que ainda apresenta Fe^{4+} . Uma segunda redução por um elétron, efetuada por um substrato que pode ser novamente o álcool veratrílico, retorna a enzima ao seu estado nativo.

O excesso de H_2O_2 , associado à ausência de um substrato redutor ocasionam a oxidação do composto II a composto III, forma inativa da enzima (POINTING, 2001, MACCHERONI *et al.*, 2004, SILVA & GOMES, 2004).

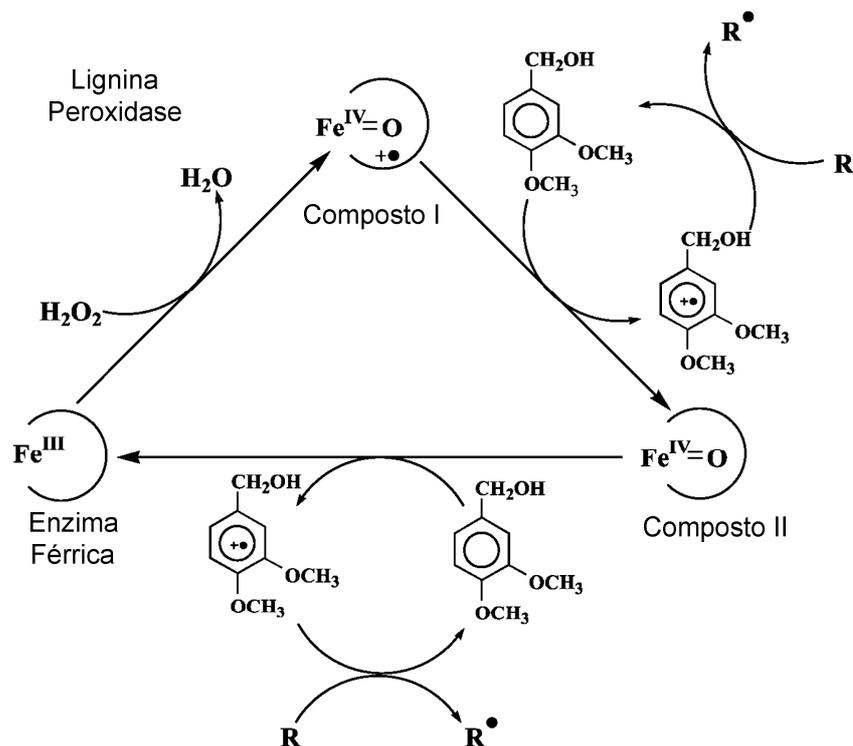


Figura 8 – Ciclo catalítico da lignina peroxidase (LiP) (CAMERON *et al.*, 2000)

Uma das peculiaridades da lignina peroxidase em relação a outras peroxidases é a sua capacidade de oxidar substratos aromáticos não fenólicos, produzindo radicais catiônicos arílicos que convergem para oxidações de alcoóis benzílicos, clivagem de ligações carbono-carbono, hidroxilações, demetilações, abertura de anéis aromáticos e dimerizações ou polimerizações entre fenóis (PONTING, 2000; MACCHERONI *et al.*, 2004).

1.5.2 Lacase (EC 1.10.3.2)

Dentre as enzimas extracelulares produzidas por fungos de podridão branca, as lacases são as mais estudadas (CALL & MUCCKE, 1997, Li *et al.*, 2010, TEIXEIRA *et al.*, 2010, YUECHUN *et al.*, 2010).

A baixa especificidade destas enzimas permite a sua utilização em várias aplicações, incluindo degradação de compostos recalcitrantes e remediação de solos e águas contaminadas (MAGAN *et al.*, 2009, MAJEU *et al.*, 2010, POZDNYAKOVA *et al.*, 2010).

As lacases (*p*-difenoil:oxigênio oxidorredutases) são glicoproteínas formadas por 520 e 550 resíduos de aminoácidos, exibindo peso molecular médio de 60 a 80

kDa. São chamadas de oxidases multicobre por possuírem 4 átomos de cobre distribuídos em 3 domínios de seu sítio ativo (T1, T2 e T3), que são identificados por densidade eletrônica. O cobre é coordenado por duas histidinas e uma cisteína, que se encontra em um arranjo triangular plano. Cada íon de cobre parece desempenhar um papel importante no mecanismo catalítico (THURSTON, 1994, SOLOMON *et al.*, 1996). O primeiro sítio, tipo 1 (T1), é responsável pela cor azul da enzima devido à máxima absorvância a 605 nm e é coordenado com a cisteína; o tipo 2 (T2) não exibe sinal no visível e funciona como acceptor de um elétron e o tipo 3 (T3) incorpora dois centros de cobre fortemente acoplados, sendo responsável pela banda a 330 nm e funciona como acceptor de dois elétrons (SOLOMON *et al.*, 1996). Diferentemente das outras oxidases de cobre, o quarto ligante é substituído pela fenilalanina. Ela está organizada em três domínios arranjados seqüencialmente. A Figura 9 mostra a estrutura tridimensional da lacase obtida pelo *Trametes versicolor*.

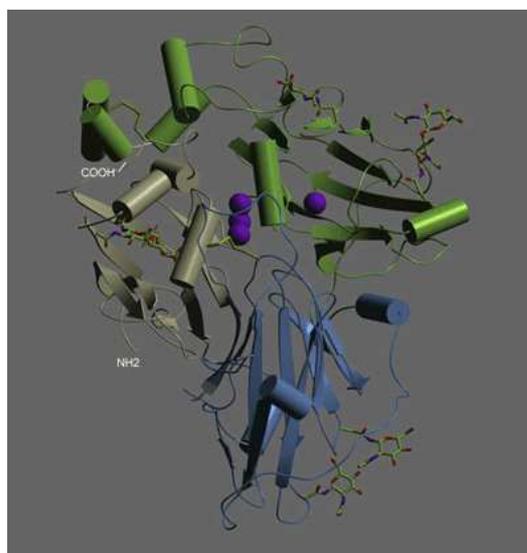


Figura 9 – Estrutura da lacase de *Trametes versicolor*¹

As oxidações resultantes da atividade das lacases podem ocorrer diretamente, por interação enzima-substrato, quando se trata de compostos fenólicos. Em razão do baixo potencial de oxidorredução das enzimas (450-800 mV), as lacases são incapazes de atuar sobre moléculas aromáticas não-fenólicas. No entanto, em trabalho realizado com lacases purificadas de *Coriolus versicolor*, Bourbonnais e Paice (1990) evidenciaram a atuação das lacases sobre substratos não fenólicos,

¹ Os três domínios (T1, T2 e T3) estão mostrados em cores diferentes. Os átomos de cobre são as esferas azuis e a porção de hidrato de carbono são os modelos em bola e bastão. A parte cinzenta é o N-terminal e a verde o C-terminal. O sítio T1 é a esfera isolada (PIONTEK *et al.*, 2002).

quando em presença de uma molécula mediadora. Os mediadores, substâncias de baixo peso molecular secretadas pelo fungo, quando oxidados pelas lacases são capazes de oxidar compostos que não seriam alvos diretos da enzima.

O fenômeno da mediação (Figura 10) amplia significativamente a gama de substratos das lacases (MACCHERONI *et al.*, 2004).

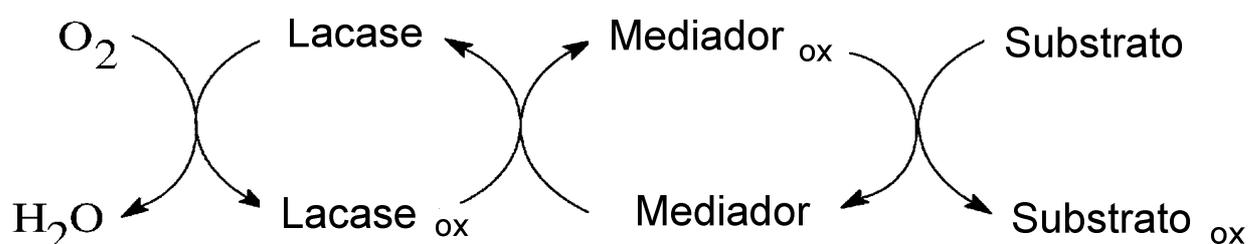


Figura 10 – Mecanismo de reação lacase-mediador (FABBRINI *et al.*, 2002)

As lacases apresentam expressão muitas vezes constitutiva, que aliada à indução em presença de compostos recalcitrantes no meio de crescimento dos micro-organismos, confirmam as potencialidades destas enzimas como ferramentas voltadas para a biorremediação (GORBATOVA *et al.*, 2006).

A aplicação de enzimas livres em ambientes contaminados ainda não é viável. O custo da produção, isolamento e a pouca estabilidade das enzimas nos solos sugerem que para remoção efetiva do poluente é necessária a introdução do micro-organismo produtor da enzima de interesse diretamente no sítio contaminado (GIANFREDA & RAO, 2004). A resistência ao composto recalcitrante é um dos pré-requisitos básicos para sua utilização em processos de biorremediação; o crescimento diante de elevadas concentrações do composto tóxico revela se o micro-organismo dispõe de capacidade de se estabelecer com sucesso no material ou ambiente contaminado (VOGEL, 1996, BONONI, 1998; MEYSAMI & BAHARI, 2003; RIGAS *et al.*, 2003). Dessa forma, a seleção de micro-organismos capazes de tolerar altas concentrações do poluente e com elevada capacidade de produção de enzimas são etapas importantes no processo de biorremediação.

Nesse contexto, a tolerância ao herbicida atrazina por dois fungos basidiomicetos de podridão branca, *Lentinula edodes* INCQS 40220 e *Pleurotus ostreatus* UFLA, por uma levedura, *Candida rugosa* INCQS 71011, e por um fungo

filamentoso anamórfico, *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211, foi avaliada. Os fungos que se mostraram tolerantes foram selecionados e utilizados para os testes de degradação de atrazina e melhoramento da composição do meio de cultivo visando um maior percentual de degradação.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a avaliação da degradação da atrazina, um herbicida triazínico por fungos da Coleção de Micro-organismos de Referência do INCQS/FIOCRUZ *Candida rugosa* INCQS 71011, *Lentinula edodes* INCQS 40220, *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211 e por *Pleurotus ostreatus* UFLA proveniente do Setor de Microbiologia Agrícola da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e o melhoramento da composição do meio de cultivo desses fungos durante o processo de degradação, a fim de estabelecer maiores percentuais de degradação.

2.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a tolerância dos fungos *Candida rugosa* INCQS 71011, *Lentinula edodes* INCQS 40220, *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211 e *Pleurotus ostreatus* UFLA quanto à presença do herbicida atrazina;
- A partir do estudo de tolerância à atrazina, monitorar a produção de enzimas extracelulares (LiP, MnP e lacase) e realizar testes de degradação de atrazina;
- Melhorar a composição do meio de cultivo para a degradação da atrazina pelo fungo mais eficiente, a fim de obter maiores percentuais de degradação;
- Avaliar a atividade enzimática das enzimas envolvidas no processo de degradação com o meio de cultivo melhorado e verificar se existe correlação com o processo de degradação;
- Quantificação do percentual de degradação da atrazina e identificação dos produtos formados.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

As atividades de pesquisa foram realizadas no Laboratório de Biocatálise (LABIC) da Divisão de Catálise e Processos Químicos (DCAP) do Instituto Nacional de Tecnologia – INT.

Esse projeto faz parte da continuação de estudos realizados em nosso grupo de pesquisa, quando resultados preliminares mostraram o potencial de *Pleurotus ostreatus* UFLA na degradação da atrazina em meio estático ao longo de 15 dias, com formação do metabólito desetilatrazina (BALESTEROS, 2009).

Os fungos utilizados no presente trabalho apresentam comprovado potencial de degradação de poluentes orgânicos, já tendo sido estudados anteriormente. A linhagem *Candida rugosa* INCQS 71011 apresentou importantes resultados de descoloração e detoxificação de três corantes têxteis (vermelho reativo 198, azul reativo 214 e vermelho reativo 141) quando comparado com a linhagem de referência *Lentinula edodes* INCQS 40220 (NASCIMENTO, 2008). A linhagem *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211 apresentou descoloração completa dos corantes V198, A21, A214 e MXC, sendo capaz de reduzir 87% da toxicidade do corante V198 e 94% de A21. A linhagem *Pleurotus ostreatus* apresentou alto potencial na produção de grandes quantidades da enzima lacase, e na eficiência de remoção de cor da mistura de quatro corantes têxteis (TEIXEIRA *et al.*, 2010).

O projeto conta também com a colaboração do Setor de Fungos de Referência do Departamento de Microbiologia do INCQS/Fiocruz.

3.1 Fungos e Meios de Cultura

O fungo *P. ostreatus* UFLA, obtido do Laboratório de Cogumelos Comestíveis do Setor de Microbiologia Agrícola da UFLA – Universidade Federal de Lavras, e os fungos *C. rugosa* INCQS 71011, *L. edodes* INCQS 40220, *P. simplicissimum* INCQS 40211, provenientes da Coleção de Micro-organismos de Referência do INCQS, foram cultivados em meio de cultura PDA (Agar Batata Dextrose), e preservados a 4°C e congelados em glicerol a -70°C, procedimento normalmente realizado para os fungos da Coleção de Micro-organismos de Referência do INCQS/FIOCRUZ.

Para os experimentos de avaliação de tolerância à atrazina pelos fungos foi utilizado o Meio Nutritivo Básico em pH 6,0, descrito na Tabela 2 (GORBATOVA *et*

al., 2006), acrescido de 15% de ágar e suplementado com o substrato atrazina. Para os experimentos de degradação da atrazina foi utilizado um pré-inóculo descrito na Tabela 3, além do Meio Nutritivo Básico.

Tabela 2 - Composição do Meio Nutritivo Básico. (GORBATOVA *et al.*, 2006)

Reagente	Concentração (g/L)
KH ₂ PO ₄	0,6
K ₂ HPO ₄	0,4
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	0,001
FeSO ₄ .7 H ₂ O	0,0005
MnSO ₄	0,05
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,25
FeSO ₄ .7H ₂ O	0,005

Tabela 3 - Composição do pré-inóculo utilizado

Reagente	Concentração (g/L)
Glicose	5,0
Peptona	3,0
Extrato de Levedura	5,0

3.2 Avaliação da Tolerância à Atrazina pelos Fungos

Os fungos foram testados quanto à sua tolerância ao herbicida atrazina na concentração final de 10 mg.L⁻¹, conforme reportado em outros trabalhos da literatura (BENDING *et al.*, 2002). Os fungos após serem inoculados, foram incubados a 28°C por 7 dias. Como controle, as linhagens foram cultivadas sem a

presença da atrazina, tendo a glicose como fonte de carbono na mesma concentração.

A tolerância foi determinada pelo crescimento apresentado pelas culturas até o 7º dia de incubação. Para isso, ao final dos 7 dias, as colônias tiveram seu diâmetro medido e aquelas que apresentaram colônias com diâmetro maior do que 4 cm foram consideradas tolerantes (DA SILVA *et al.*, 2003b).

As linhagens que se mostraram tolerantes na concentração de 10 mgL⁻¹, foram, a partir destes cultivos, avaliados quanto à capacidade de degradação de atrazina.

3.3 Degradação de Atrazina pelos Fungos e Análise dos Produtos de Degradação

Foram inoculados em 50 mL de pré-inóculo descrito no item 3.1, três discos obtidos da margem da colônia do fungo (5 mm) de cada fungo estudado *Candida rugosa* INCQS 71011, *Lentinula edodes* INCQS 40220, *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211 e *Pleurotus ostreatus* UFLA, previamente crescido em PDA por 7 dias a temperatura de 30°C ± 2. A inoculação procedeu-se por 3 dias a temperatura de 30°C ± 2 sob agitação (200 rpm). Após os três dias de cultivo, foram adicionados 250 mL do Meio Nutritivo Básico descrito no item 3.1 e a atrazina na concentração final de 10 mgL⁻¹. Em seguida os frascos foram incubados em meio estático e sob agitação (200 rpm) por 15 dias a 30°C ± 2. Amostras foram coletadas em triplicatas a cada 5 dias a partir do 5º dia de incubação, extraídas em cartuchos Oasis[®] MCX conforme descrito no item 3.3.1 e analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) conforme descrito no item 3.3.2.

3.3.1 Extração em fase sólida

Segundo Lanças (2004), para analisar qualitativa e quantitativamente analitos de interesse em amostras complexas usando técnicas cromatográficas, é necessário que seja feita a extração e o isolamento do composto desejado.

A extração em fase sólida é uma técnica de separação líquido-sólido. Do ponto de vista prático, a extração em fase sólida em sua forma mais simples, pode ser descrita como uma cromatografia líquida, onde se usa uma pequena coluna aberta, denominada cartucho de extração, que contém a fase sólida (o correspondente à

fase estacionária em cromatografia). O cartucho de extração utilizado foi o Oasis[®] MCX e a Figura 11 ilustra o aparelho onde foi realizada a extração.



Figura 11 - Aparelho de extração em fase sólida (marca J.T. Baker)

As etapas de condicionamento e eluição do cartucho estão descritas no esquema da Figura 12. Antes de iniciar a etapa de extração, as amostras foram acidificadas com ácido clorídrico (pH~1,5). Essa etapa inicia-se com o condicionamento do cartucho com acetonitrila e água. Posteriormente, passa-se a amostra e condiciona-se novamente o cartucho com ácido clorídrico e com acetonitrila, esse eluato é chamado de solvente de condicionamento. Para a eluição, passa-se acetonitrila com 4% (v/v) de hidróxido de amônio, esse eluato é chamado solvente de extração.

Por esse cartucho ser de troca iônica, faz-se necessário a adição de HCl após a adição da amostra para ativar os sítios que por ventura não estejam ligados a nenhum dos analitos. A segunda adição de acetonitrila é para a retirada de qualquer resíduo da amostra que tenha ficado adsorvido no cartucho e evitar assim uma interferência na análise por CLAE.

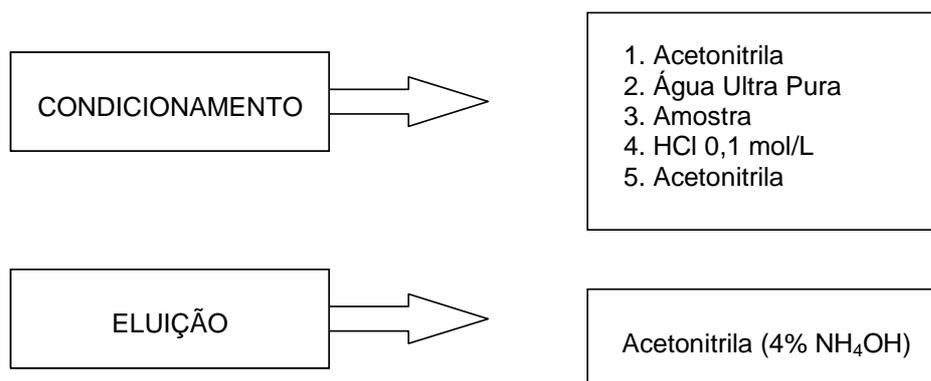


Figura 12 - Procedimento de extração em fase sólida utilizando o cartucho Oasis[®]MCX. (BALESTEROS, 2009)

O procedimento de extração foi realizado conforme descrito pelo fabricante. A única modificação implementada foi a troca do solvente orgânico de metanol para acetonitrila. Essa modificação foi realizada em virtude de se utilizar acetonitrila como solventes dos padrões.

3.3.2 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Após a extração em fase sólida, o extrato [no próprio solvente de eluição ACN (4% NH₄OH)] foi analisado no cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC 10 AT, equipado com detector UV-Vis, autoinjeter, programa de controle e aquisição dos dados Class VP 6.1. A coluna utilizada foi a Shimpack C18 (250 x 4,6 mm 4,6 µm) e a fase móvel utilizada composta de ACN e tampão fosfato pH 7,2 em um gradiente de eluição segmentado (BALESTEROS, 2009) (Tabela 4).

Tabela 4 - Gradiente de eluição para separação de atrazina e derivados com a coluna shimpack.

Tempo (minutos)	Acetonitrila (%)	Tampão fosfato de sódio (%)
0 - 15	0 - 10	100 - 90
15 - 45	10 - 70	90 - 30
45 - 60	70 - 0	30 - 100
60 - 70	0	100

3.3.3 Padrões dos herbicidas

Para monitorar a degradação de atrazina e a formação de produtos de degradação da atrazina, foram utilizados padrões que também foram analisados por CLAE nas mesmas condições descritas acima. Para isso foram preparadas soluções concentradas destes compostos. A atrazina (A), desetilatrizona (DEA) e deisopropilatrizona (DIA) foram solubilizados em acetonitrila. Deisopropilhidroxiatrizona (DIHA), desetilhidroxiatrizona (DEHA) e desetildeisopropilatrizona (DEDIA) foram solubilizados em 20% HCl 0,1 mol/L e 80% acetonitrila, e a hidroxiatrizona (HA) foi solubilizada em 20% HCl 0,1 mol/L e 80% água ultra pura. A partir destas soluções foram preparadas as soluções de trabalho.

Os padrões de A, (98,4% de pureza), e seus produtos de degradação DIA, (98,0% de pureza), DEA, (98,5% de pureza), HA, (96,0% de pureza), DEDIA, (95,7% de pureza), foram obtidos da empresa Dr. Ehrenstorfer GmbH, o padrão DEHA, (98,7% de pureza) e DIHA, (95,0% de pureza) foram obtidos da empresa Riedel-de-Haën.

3.3.4 Curva analítica

As curvas analíticas foram preparadas nas concentrações de 1,50; 2,50; 5,00; 7,50 e 10,00 mg/L para a atrazina e 1,00; 2,00; 4,00; 6,00 e 8,00 mg/L para DEA, DIA, DEDIA, DIHA, DEHA e HA. As curvas foram realizadas em triplicatas e as concentrações quantificadas a partir delas.

3.3.5 Cálculo de recuperação

A recuperação é obtida pela porcentagem calculada que expressa a quantidade de analito recuperada em uma matriz fortificada após um procedimento de extração. Determinada pela equação:

$$R = \frac{\text{massa obtida}}{\text{massa real}} \times 100\%$$

Para os cálculos de recuperação foi utilizado o terceiro ponto de cada curva analítica.

3.3.6 Análise por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas

Com intuito de se confirmar as estruturas químicas dos metabólitos detectados por CLAE, foi utilizada a técnica da cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM). Essa análise complementar foi realizada pela analista do laboratório de Química Analítica e Metrologia Química, na Divisão de Química Analítica do Instituto Nacional de Tecnologia.

A confirmação das estruturas químicas dos produtos de degradação formados foi realizada em cromatógrafo gasoso de alta resolução modelo série 6890N acoplado a um detector seletivo de massas 5973N Hewlett-Packard (Agilent Technologies). As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna capilar de sílica fundida HP-5 (30m x 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25µm de espessura de filme); gás de arraste: hélio a 1 mL/min; volume de injeção de 1µL no modo splitless; temperatura do injetor: 280°C; temperatura do forno: 70°C (2 min) - 25°C/min a 150°C - 3°C/min até 200°C - 8°C/min - 280°C (10 min) - 15°C/min - 300°C (2,5 min). Condições do detector de massas: temperatura de interface a 300°C; fonte de íon; 230°C; quadrupolo: 150°C; elétron multiplicado r a 70 eV, modo Scan e faixa de massas: 30 a 500 u.m.a. Consulta à biblioteca de espectros de massas da WileyNist05.

3.4 Determinação das Atividades Enzimáticas

3.4.1 Lacase

A atividade enzimática da lacase foi determinada utilizando metodologia descrita por NIKU-PAVAVOLA e colaboradores (1990), baseada na oxidação do substrato sintético ABTS (2,2'-azino-bis-etilbentiazolina). A composição do meio reacional para a determinação enzimática está descrita na Tabela 5:

Tabela 5 - Composição do meio reacional utilizado na determinação enzimática de lacase

Reagente	Concentração	Volume (µL)
Tampão Succinato de Sódio pH 4,5	0,2 M	1500
ABTS	3 mM	400
Meio Reacional		100

A leitura do ensaio foi realizada a 420nm. O branco consistiu do sistema de reação descrito acima, substituindo o meio reacional por água destilada. Alíquotas de 1 mL foram recolhidas diariamente e todas as leituras foram realizadas em triplicatas. Uma unidade de atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μ mol de ABTS por minuto, considerando ϵ - para o ABTS de 36.000 M⁻¹cm⁻¹.

3.4.2 Manganês Peroxidase (MnP)

A atividade enzimática foi determinada através da reação de oxidação do vermelho de fenol na presença de manganês e peróxido de hidrogênio (KUWAHARA *et al.*, 1984). O branco consistiu do sistema de reação descrito na Tabela 6, substituindo o meio reacional por água destilada. Alíquotas de 1 mL foram recolhidas diariamente e todas as leituras foram realizadas em triplicatas. Uma unidade de atividade enzimática corresponde à formação de 1 μ mol/min do produto, considerando ϵ = 44.600 M⁻¹ cm⁻¹ (YEE *et al.*, 2006). A leitura do ensaio foi realizada a 610nm.

Tabela 6 - Composição do meio reacional utilizado na determinação enzimática de manganês peroxidase

Reagente	Concentração	Volume (μ L)
Lactato de Sódio	0,25 M	100
Albumina Bovina	0,5%	200
MnSO ₄	2,0 mM	50
Meio Reacional	-	500
Vermelho de Fenol	0,1%	100
H ₂ O ₂	2,0 mM	500

3.4.3 Lignina Peroxidase (LiP)

A atividade enzimática da lignina peroxidase foi determinada através da oxidação do álcool veratrílico a aldeído veratrílico. A quantificação do produto formado foi calculada utilizando-se o coeficiente de extinção molar do aldeído veratrílico a 310nm, ϵ = 9200 M⁻¹cm⁻¹. (Tien & Kirk, 1984). O branco consistiu do

sistema de reação descrito na Tabela 7, substituindo o meio reacional por água destilada. Alíquotas de 1 mL foram recolhidas diariamente e todas as leituras foram realizadas em triplicatas. Uma unidade de atividade enzimática corresponde à formação de 1 μmol/min do produto.

Tabela 7 - Composição do meio reacional utilizado na determinação enzimática de lignina peroxidase

Reagente	Concentração	Volume (mL)
Tampão tartarato de sódio pH 3,0	50 mM	0,5
Álcool Veratrílico	50 mM	0,1
H ₂ O ₂	10 mM	0,1
Meio Reacional	-	1,8

Todos os resultados de atividade enzimática foram calculados a partir da fórmula:

$$\text{Atividade enzimática} = \frac{\Delta \text{ABS} * 10^6}{\epsilon * R * t}$$

Onde:

R = Volume (mL)

ε = Coeficiente de absorção molar

10⁶ = Conversão da medida para litro

Δ ABS = Abs final – Abs inicial

T = tempo de reação (min)

3.5 Testes de Adsorção

Foram realizados experimentos para verificar se a diminuição da concentração de atrazina no meio reacional estava realmente relacionada à degradação do composto estudado e não devido ao seqüestro do composto pela biomassa.

Após cinco dias, as células dos cultivos sem atrazina, como descrito no item 3.1, foram separadas da fração líquida por filtração no papel de filtro Whatman nº42.

A fração líquida foi incubada com atrazina na concentração final de 10 mgL^{-1} nas mesmas condições de incubação descritas no item 3.3. Alíquotas foram recolhidas após 2 h e após 24 h e analisadas no cromatógrafo líquido.

A fração sólida foi lavada por três vezes com 100 mL do tampão de cultivo (tampão fosfato de sódio 5,0 mM pH: 6,0). As células foram ressuspendidas em 300 mL desse tampão e a atrazina (10 mgL^{-1}) foi adicionada.

Após o tempo de contato de 15 minutos sob agitação (200 rpm), recolheu-se a fração líquida e realizou-se a extração em fase sólida e posteriormente, análise em CLAE. O mesmo procedimento foi repetido após 24 h.

As etapas descritas estão representadas na Figura 13

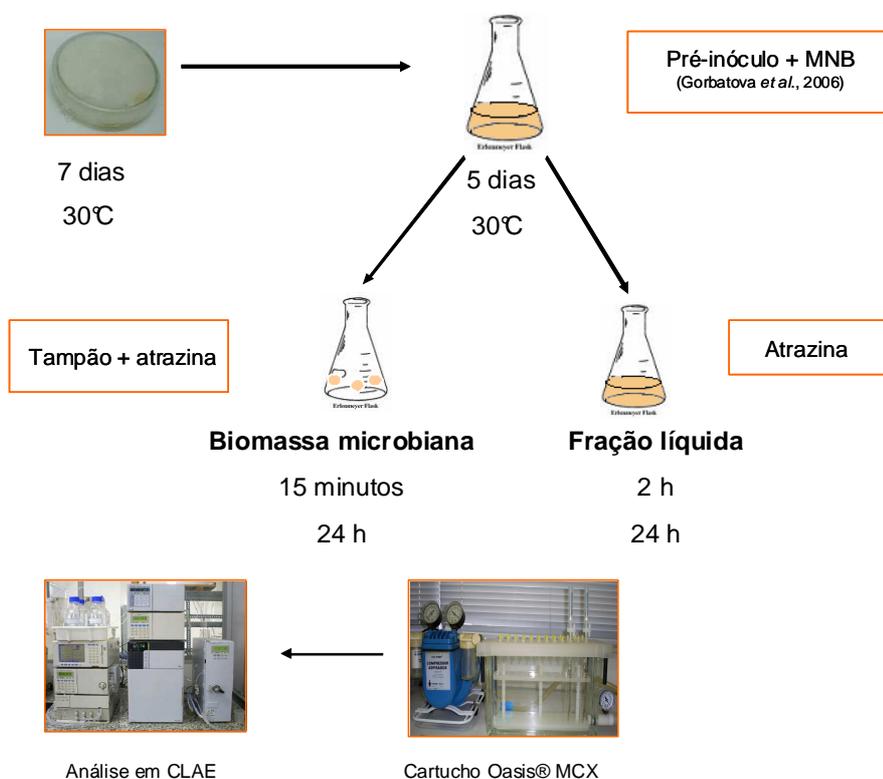


Figura 13 - Esquema representativo das etapas do teste de adsorção

3.6 Maximização da degradação de atrazina por planejamento estatístico

A maximização da degradação do herbicida foi realizada com o fungo que apresentou os melhores resultados nos testes de degradação de atrazina descrito no item 3.3.

Para determinar a importância de variáveis dentro de um problema, é necessário montar um experimento anterior à otimização do sistema, e usando os resultados obtidos, retirar a maior quantidade de informações. Para tanto, foi utilizada a técnica de planejamento experimental fatorial fracionado, como apresentada por MONTGOMERY (2005).

Os componentes do meio de cultivo, utilizados nos testes de degradação de atrazina, descritos no item 3.3 foram avaliados utilizando a ferramenta estatística do planejamento experimental visando o maior percentual de degradação nas melhores condições reacionais. Foi avaliada a interferência de oito variáveis independentes utilizando um delineamento fatorial fracionado 2^{8-4} , adicionando-se quatro repetições no ponto central. As variáveis dependentes selecionadas para este estudo foram a degradação de atrazina, expressa em percentual e atividade enzimática de lacase, expressa em UmL^{-1} . A estratégia realizada está esquematizada na Figura 14.

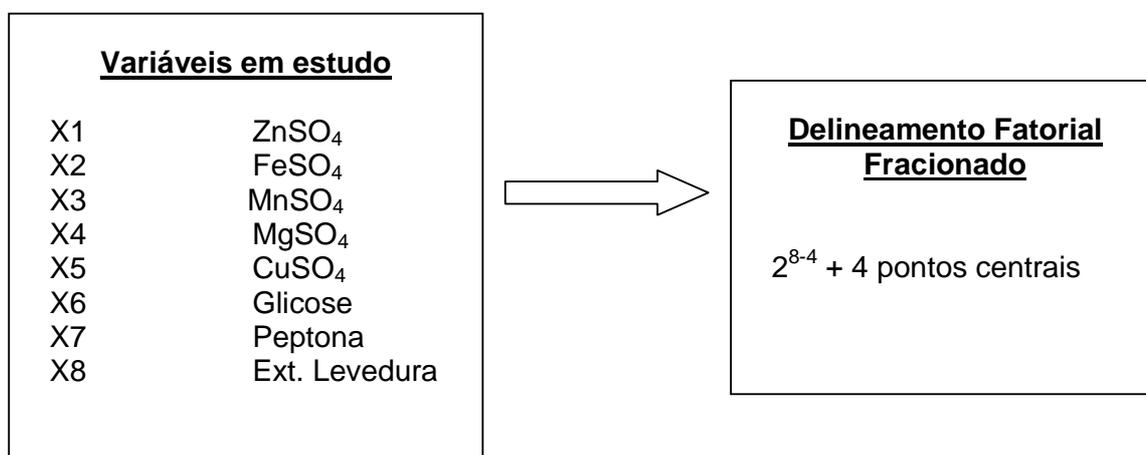


Figura 14 – Estratégia realizada no planejamento fatorial fracionado 2^{8-4}

Foram testadas as seguintes variáveis independentes: (X_1) sulfato de zinco, (X_2) sulfato de ferro, (X_3) sulfato de manganês, (X_4) sulfato de magnésio, (X_5) sulfato de cobre, (X_6) glicose, (X_7) peptona e (X_8) extrato de levedura.

Nesses novos experimentos, não foi realizada a etapa do pré-inóculo para que essas variáveis possam ser também estudadas. As concentrações dos componentes

pertencentes ao meio nutritivo básico, foram também avaliados no planejamento experimental. A Tabela 8 apresenta as concentrações correspondentes em cada variável do delineamento fatorial fracionado 2^{8-4} .

Tabela 8 - Variáveis e faixa de concentração dos componentes do meio de cultivo

Variáveis independentes	Código	Concentração (g/L)		
		-1	0	+1
ZnSO ₄	X ₁	0	0,001	0,002
FeSO ₄	X ₂	0	0,0005	0,001
MnSO ₄	X ₃	0	0,05	0,1
MgSO ₄	X ₄	0	0,5	1,0
CuSO ₄	X ₅	0	0,25	0,5
Glicose	X ₆	2	5	8
Peptona	X ₇	1	3	5
Extrato de levedura	X ₈	2	5	8

Para a triagem dos componentes do meio de cultivo, foram realizados 20 ensaios. Esses experimentos foram realizados seguindo a matriz gerada pelo *software* Statistica 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) para delineamento fatorial fracionado 2^{8-4} (Tabela 9).

Tabela 9 – Matriz do delineamento fatorial fracionado 2^{8-4} , mostrando os níveis do planejamento a cada ensaio

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
2	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
3	-1	+1	-1	-1	+1	+1	-1	+1
4	+1	+1	-1	-1	-1	-1	+1	+1

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈
5	-1	-1	+1	-1	+1	-1	+1	+1
6	+1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
7	-1	+1	+1	-1	-1	+1	+1	-1
8	+1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
9	-1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1
10	+1	-1	-1	+1	+1	-1	-1	+1
11	-1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
12	+1	+1	-1	+1	-1	+1	-1	-1
13	-1	-1	+1	+1	+1	+1	-1	-1
14	+1	-1	+1	+1	-1	-1	+1	-1
15	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
16	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
17	0	0	0	0	0	0	0	0
18	0	0	0	0	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0

X₁ – ZnSO₄; X₂- FeSO₄; X₃ - MnSO₄; X₄ - MgSO₄; X₅ - CuSO₄; X₆ – glicose; X₇ – peptona; X₈ – Extrato de levedura.

Para análise do delineamento estatístico não foram levadas em consideração as variáveis físicas como: rotação, temperatura, tempo de incubação e pH. Essas variáveis foram estudadas tal como se encontram na literatura, pois geralmente os efeitos calculados para tais variáveis do planejamento experimental são tão significativos, que podem interferir na significância dos efeitos dos componentes do meio de cultivo (TEIXEIRA, 2010). A concentração mínima de alguns componentes foi igualada a zero, com a finalidade de retirá-las da composição do meio. A Tabela 10 mostra as concentrações correspondentes de cada variável para cada nível do planejamento fatorial fracionado 2⁸⁻⁴.

Tabela 10 – Matriz do planejamento fatorial fracionado 2^{8-4} , mostrando a concentração das variáveis em cada ensaio

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈
1	0	0	0	0	0	2,0	1,0	2,0
2	0,002	0	0	0	0,5	8,0	5,0	2,0
3	0	0,001	0	0	0,5	8,0	1,0	8,0
4	0,002	0,001	0	0	0	2,0	5,0	8,0
5	0	0	0,1	0	0,5	2,0	5,0	8,0
6	0,002	0	0,1	0	0	8,0	1,0	8,0
7	0	0,001	0,1	0	0	8,0	5,0	2,0
8	0,002	0,001	0,1	0	0,5	2,0	1,0	2,0
9	0	0	0	1,0	0	8,0	5,0	8,0
10	0,002	0	0	1,0	0,5	2,0	1,0	8,0
11	0	0,001	0	1,0	0,5	2,0	5,0	2,0
12	0,002	0,001	0	1,0	0	8,0	1,0	2,0
13	0	0	0,1	1,0	0,5	8,0	1,0	2,0
14	0,002	0	0,1	1,0	0	2,0	5,0	2,0
15	0	0,001	0,1	1,0	0	2,0	1,0	8,0
16	0,002	0,001	0,1	1,0	0,5	8,0	5,0	8,0
17	0,001	0,0005	0,05	0,5	0,25	5,0	3,0	5,0
18	0,001	0,0005	0,05	0,5	0,25	5,0	3,0	5,0
19	0,001	0,0005	0,05	0,5	0,25	5,0	3,0	5,0
20	0,001	0,0005	0,05	0,5	0,25	5,0	3,0	5,0

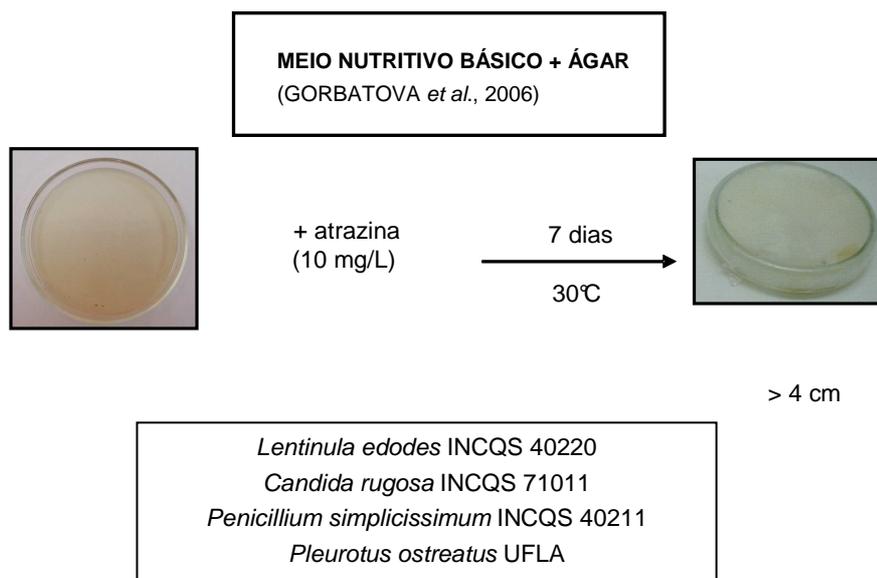
X₁ – ZnSO₄; X₂- FeSO₄; X₃ - MnSO₄; X₄ - MgSO₄; X₅ - CuSO₄; X₆ – glicose; X₇ – peptona; X₈ – Extrato de levedura.

Nesses experimentos, foram retiradas amostras de cada ensaio a partir do 5º dia de incubação. Essas amostras foram extraídas em cartucho Oasis[®] MCX e analisadas em CLAE, conforme descrito no item 3.3. A atividade enzimática da enzima lacase também foi avaliada, conforme descrito no item 3.4 para verificação

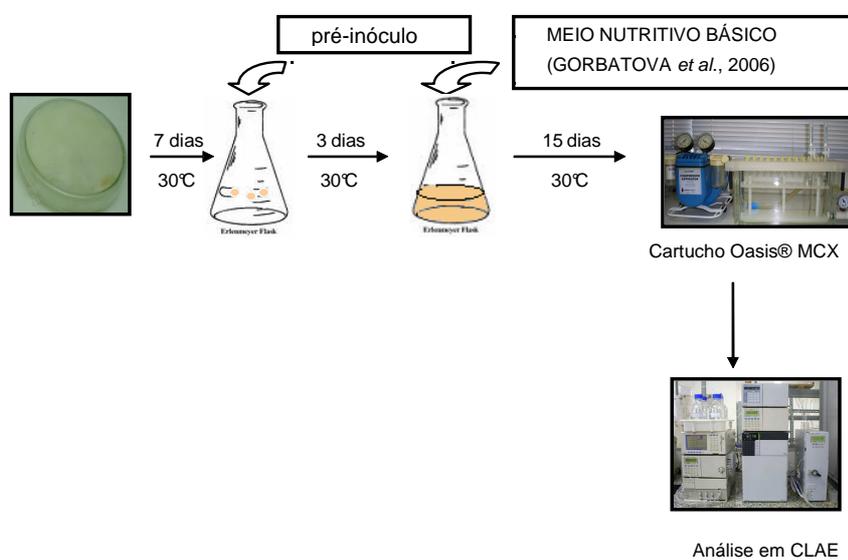
da correlação entre atividade enzimática e percentual de degradação. Devido à grande variabilidade inerente aos bioprocessos que envolvem enzimas e microorganismos, foram consideradas significativas as variáveis com p-valores menores que 10% ($p < 0,1$).

A Figura 15 apresenta de forma esquemática todas as etapas e metodologias seguidas durante a execução deste trabalho.

1) SELEÇÃO DOS FUNGOS

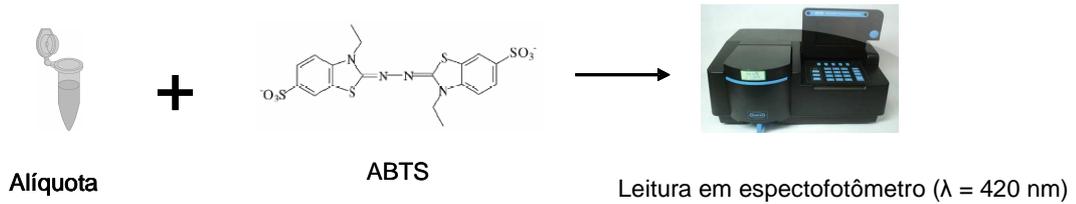


2) TESTE DE DEGRADAÇÃO DE ATRAZINA

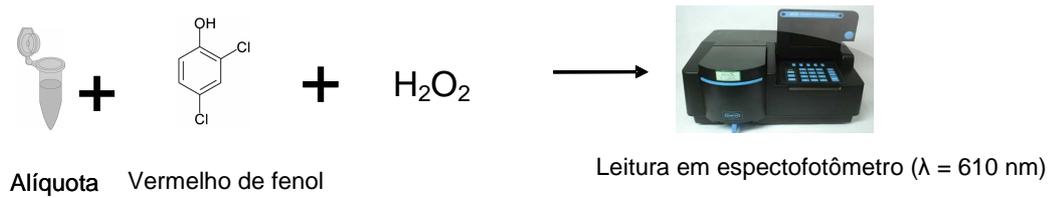


3) DETERMINAÇÃO DAS ATIVIDADES ENZIMÁTICAS

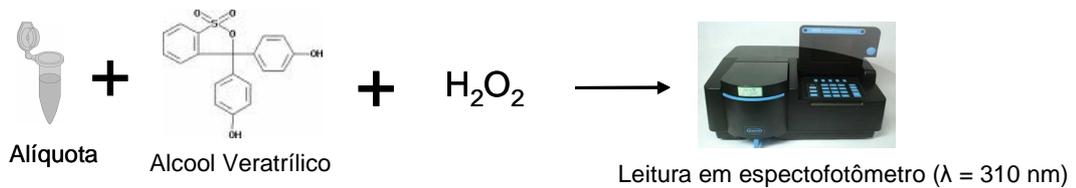
• Lacase



• Manganês Peroxidase



• Lignina Peroxidase



4) MELHORAMENTO DO MEIO DE CULTIVO

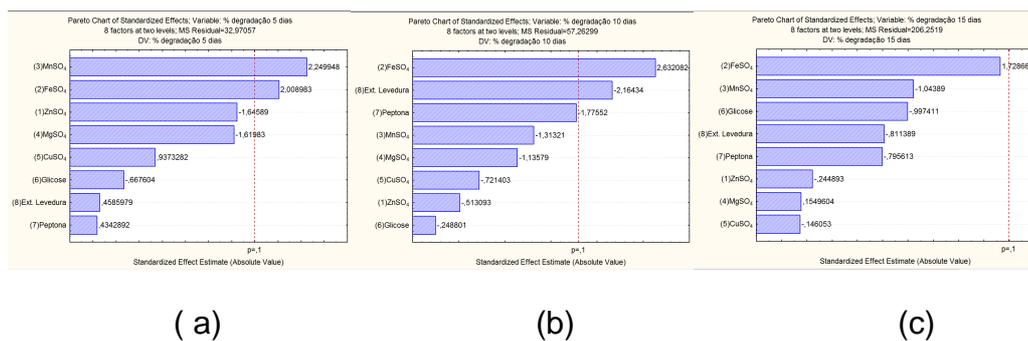


Figura 15 – Representação esquemática das etapas descritas na metodologia.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção de Fungos Tolerantes ao Herbicida Atrazina

Os fungos *Candida rugosa* INCQS 71011, *Lentinula edodes* INCQS 40220, *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211 e *Pleurotus ostreatus* UFLA foram avaliados quanto à tolerância ao herbicida atrazina.

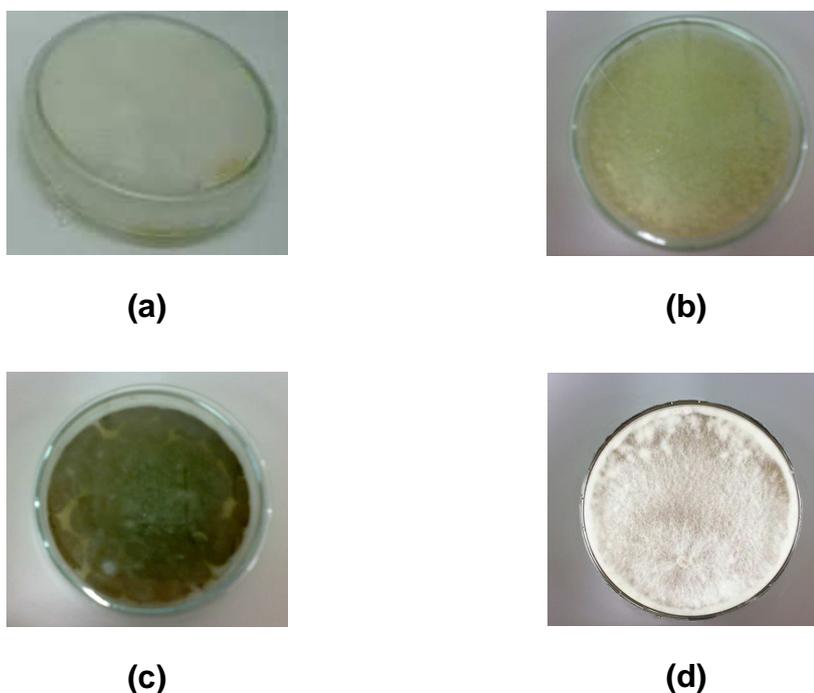


Figura 16 - Placas com o crescimento dos fungos aos 15 dias de incubação. (a) *Pleurotus ostreatus* UFLA (b) *Candida rugosa* INCQS 71011 (c) *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211 (d) *Lentinula edodes* INCQS 40220

Os quatro fungos testados apresentaram colônias com diâmetro superior a 4 cm após 7 dias (Figura 16) e nenhuma alteração na sua morfologia foi observada, portanto todos os fungos se mostraram tolerantes ao herbicida atrazina na concentração final de 10 mgL^{-1} e foram selecionados para os estudos de degradação da atrazina em meio líquido.

Fatores de estresse são reconhecidos por alterar o desenvolvimento dos fungos de diversas maneiras, o que pode ser evidenciado como mudanças na forma de crescimento da colônia, na pigmentação e na esporulação (CARLILE *et al.*, 2001). Em trabalho de seleção de fungos tolerantes ao herbicida linuron, da classe das feniluréias, Wilkinson e Lucas (1969) observaram, além da inibição do

crescimento, redução da esporulação e restrição da mesma a algumas áreas concêntricas em *Trichoderma viride* cultivado em meio PDA com 100 ppm do pesticida. Tais observações também devem ser levadas em consideração durante a seleção do fungo, já que podem interferir na sua capacidade de colonização, sobrevivência e dispersão.

UETA *et al.*, 1999 selecionaram fungos com capacidade de degradar atrazina a partir de amostras de solo contaminado com este herbicida e não observaram nenhuma alteração na morfologia dos fungos selecionados, corroborando com os nossos resultados

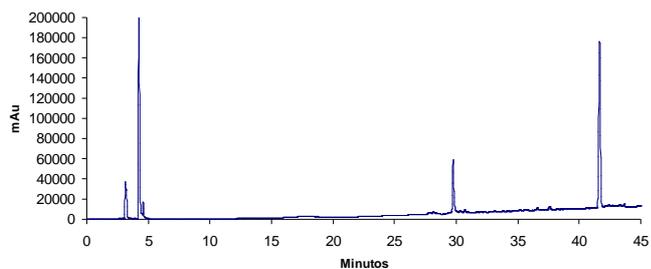
4.2 Degradação de Atrazina e Análise dos Produtos de Degradação

No presente estudo, a degradação de atrazina foi avaliada sob agitação (200 rpm) e em meio estático ao longo de 15 dias. No cultivo estático não foi observado a degradação de atrazina por nenhum dos fungos estudados (Figura 17). Embora nesses perfis cromatográficos tenha aparecido um pico próximo ao tempo de retenção referente ao metabólito hidroxiatrazina, esse pico não se refere a esse metabólito, pois perfis semelhantes foram encontrados também em todos os controles.

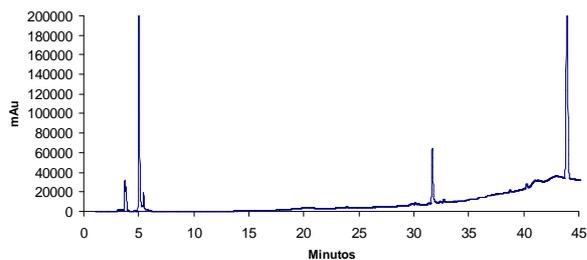
A Tabela 11 apresenta os tempos de retenção da atrazina e de seus derivados com a metodologia utilizada que está descrita no item 3.3.2.

Tabela 11 - Tempo de retenção da atrazina e de seus derivados com a metodologia utilizada.

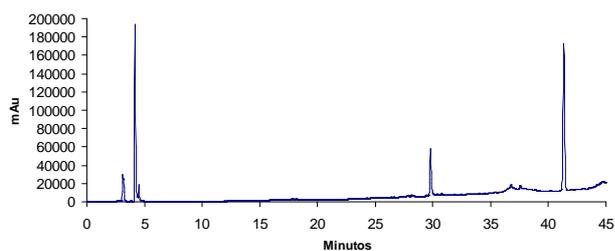
	A	DEA	DIA	DEDIA	DEHA	DIHA	HA
TR (min)	40,95	31,90	27,40	15,25	19,10	14,45	30,92



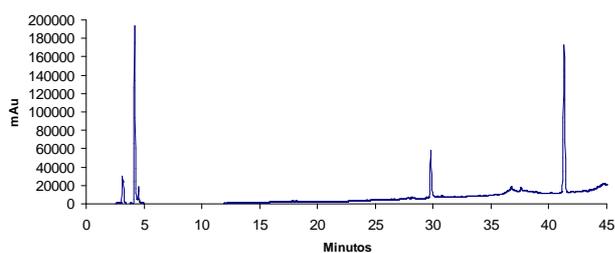
(a)



(b)



(c)



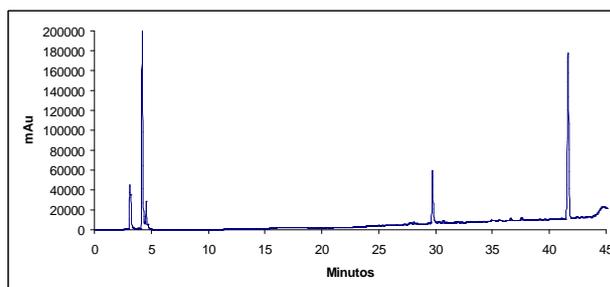
(d)

Figura 17 - Perfis cromatográficos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência para a avaliação da degradação de atrazina em meio estático após 15 dias de incubação. (a) *Lentinula edodes* INCQS 40220 (b) *Candida rugosa* INCQS 71011 (c) *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211 (d) *Pleurotus ostreatus* UFLA

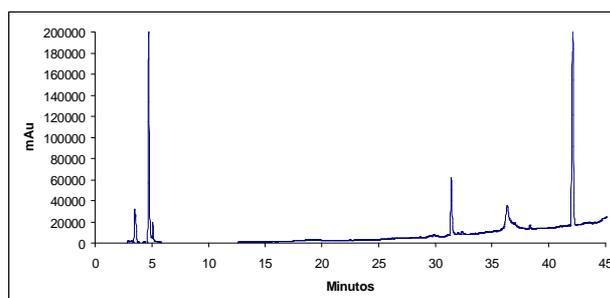
Todos os fungos apresentaram crescimento na presença da atrazina (10 mgL^{-1}) sob agitação, a exemplo do verificado para *Mycelia sterilia* INBI 2-26 em presença do mesmo herbicida na concentração de $20 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ (VASIL'CHENKO *et al.*,2002). Tal comportamento provavelmente faz parte da resposta fisiológica ao estresse ocasionado em função do contato com compostos tóxicos.

Segundo Bononi, 1998 a capacidade de crescer na presença do composto supostamente tóxico é uma característica fundamental para os estudos de degradação, e muitas vezes relacionada à capacidade de detoxificação do mesmo.

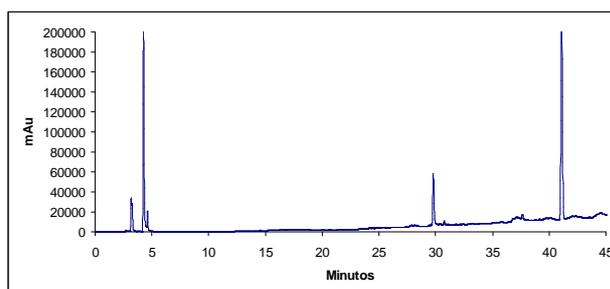
No estudo sob agitação, os fungos *C. rugosa* INCQS 71011, *L. edodes* INCQS 40220, *P. simplicissimum* INCQS 40211 não tiveram a capacidade de degradar atrazina (Figura 18), apesar de apresentarem crescimento na presença do herbicida (Figura 19), ao contrário de *P. ostreatus* UFLA que degradou a atrazina (Figura 20).



(a)



(b)



(c)

Figura 18 - Perfis cromatográficos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência para a avaliação da degradação de atrazina em meio agitado (200 rpm) após 15 dias de incubação. (a) *Lentinula edodes* INCQS 40220 (b) *Candida rugosa* INCQS 71011 (c) *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211

É importante destacar que não foi possível identificar nenhuma diminuição na concentração inicial da atrazina no meio de cultivo, ao longo dos 15 dias, nos experimentos envolvendo os fungos *C. rugosa* INCQS 71011, *L. edodes* INCQS 40220, *P. simplicissimum* INCQS 40211. Este resultado mostra claramente que não houve degradação da atrazina e também indica que a atrazina não foi significativamente adsorvida na biomassa microbiana.

Testes de adsorção foram realizados conforme descrito no item 3.5 nos experimentos envolvendo *P.ostreatus* UFLA. Nesses testes, separamos a fração líquida e a biomassa microbiana e as duas frações foram incubadas com a atrazina a 10 mgL^{-1} separadamente. Os resultados mostraram que a adsorção ocorrida pela biomassa após 24 h foi de apenas 2%, enquanto que na incubação com a fração líquida após 24 h ocorreu uma redução de 4% na concentração inicial de atrazina.

Esses resultados mostram um discreto envolvimento das enzimas extracelulares atuando no processo de degradação de atrazina em 24 h e pouco seqüestro da atrazina pela biomassa, atestando a atividade biológica envolvida no processo.

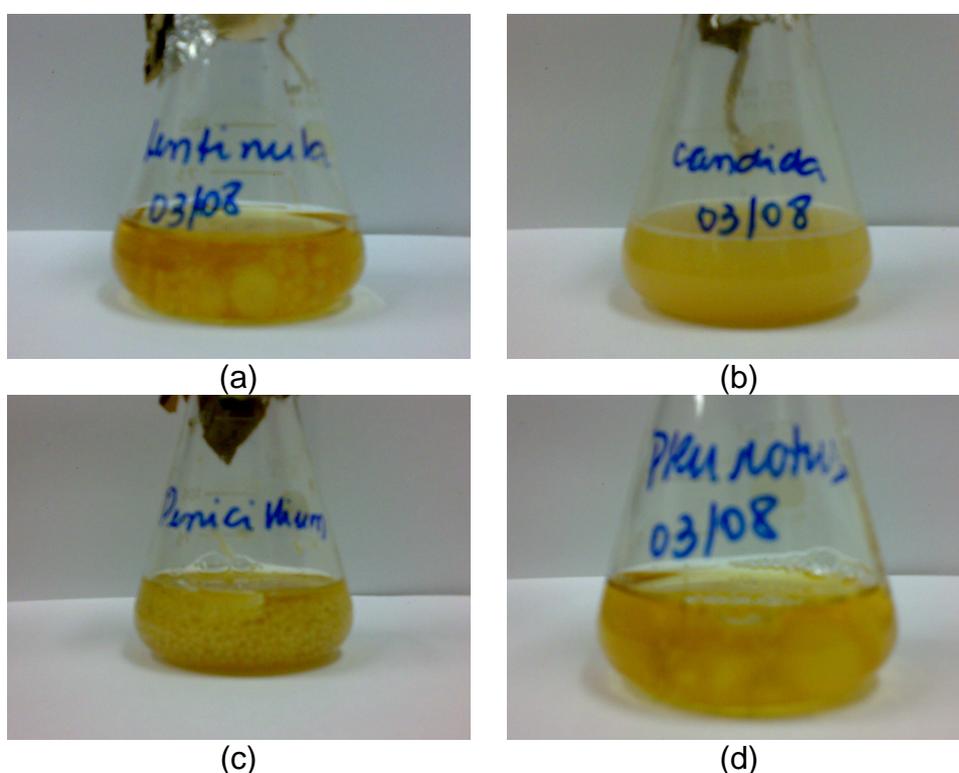


Figura 19 - Crescimento dos fungos em presença de atrazina após 15 dias sob agitação. (a) *Lentinula edodes* INCQS 40220 (b) *Candida rugosa* INCQS 71011 (c) *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211 e (d) *Pleurotus ostreatus* UFLA

A degradação da atrazina foi observada após o quinto dia de cultivo sob agitação, no experimento envolvendo o fungo *P. ostreatus*. Houve formação de metabólitos que apresentaram picos no mesmo tempo de retenção dos padrões de

desetilatrazina (DEA) e deisopropilatrazina (DIA) (Figura 20). Tais picos não foram identificados nos controles.

Após 10 dias de cultivo, o mesmo procedimento para análise da atrazina e dos metabólitos em CLAE foi realizado. O mesmo perfil de eluição foi mantido, apresentando aumento das áreas dos picos referentes aos mesmos metabólitos encontrados no quinto dia de cultivo, desetilatrazina (DEA) e deisopropilatrazina (DIA) (Figura 20). Comportamento semelhante foi encontrado após 15 dias (Figura 20) indicando um aumento gradativo na formação desses compostos e uma degradação de atrazina no meio correspondendo a 39% (Figura 21).

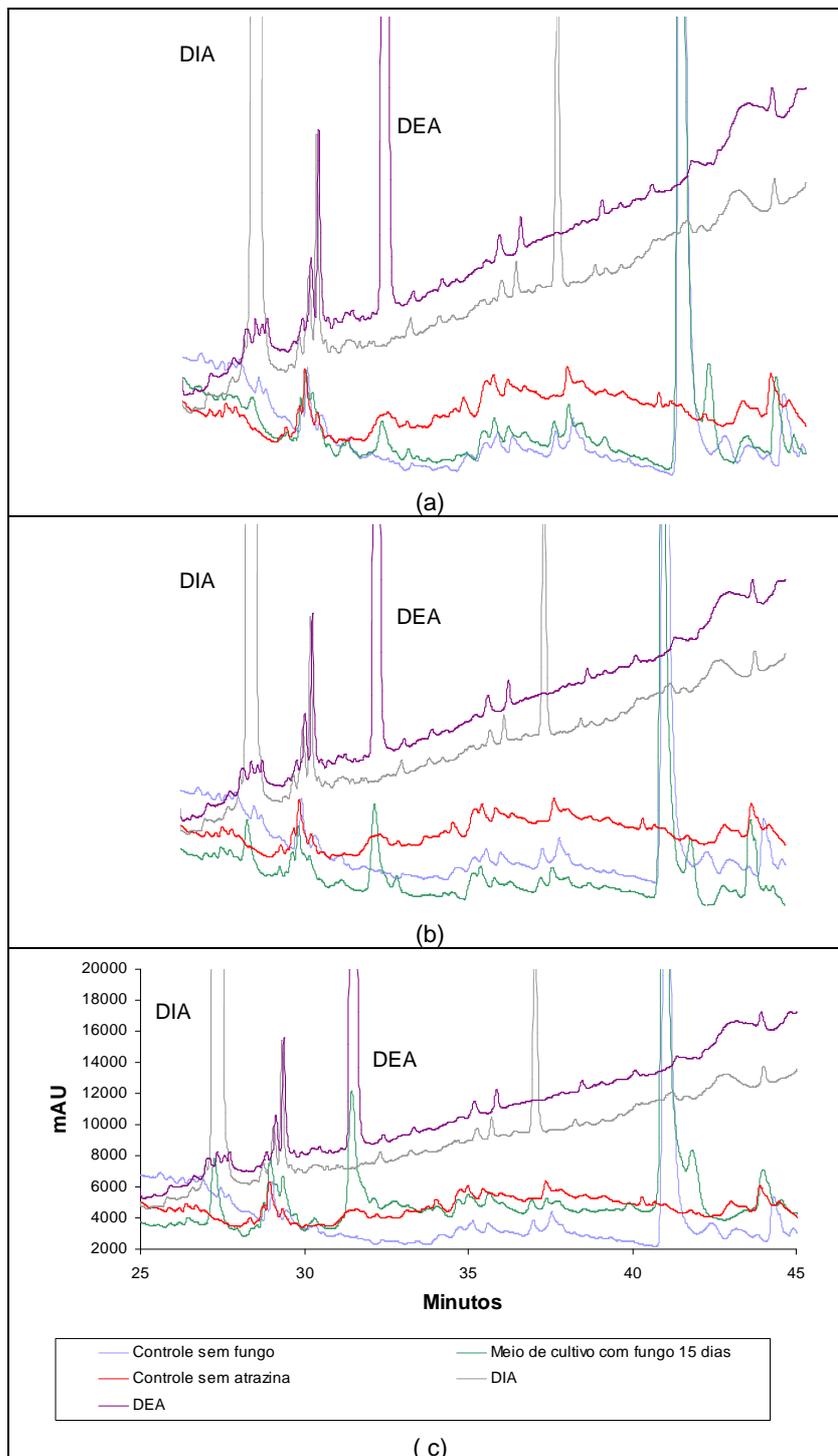


Figura 20 - Perfis cromatográficos obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência para a avaliação da degradação de atrazina e formação de desetilatrazina (DEA) e deisopropilatrazina (DIA). (a) 5 dias de incubação, (b) 10 dias de incubação e (c) 15 dias de incubação

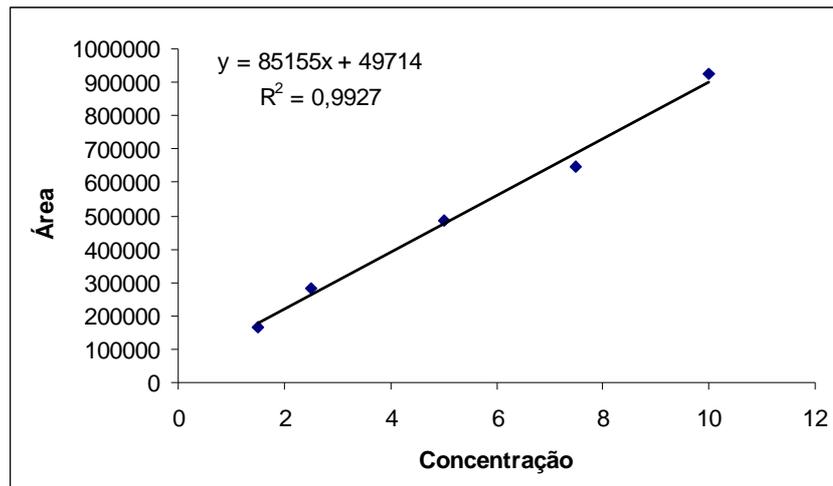


Figura 21 – Curva analítica utilizada para determinação da concentração de atrazina.

Os resultados obtidos por CG-EM confirmaram a presença de DEA e DIA (Figura 22).

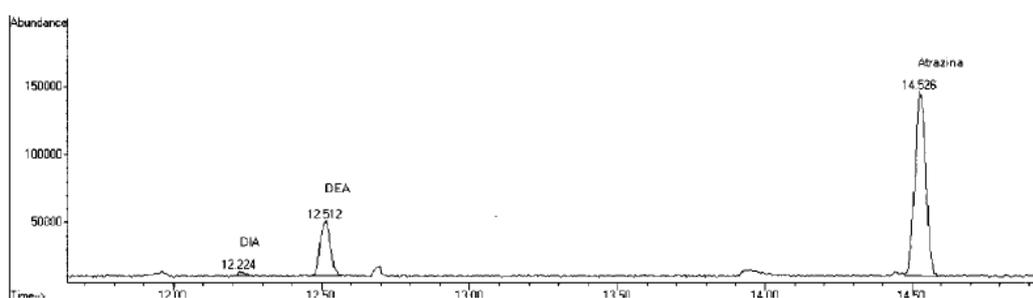


Figura 22 – Perfil cromatográfico obtido por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas para a confirmação dos produtos de degradação da atrazina e formação de desetilatrizona (DEA) e deisopropilatrizona (DIA)

Alguns trabalhos apresentados na literatura descrevem a degradação de atrazina por fungos ligninolíticos. Dentre esses fungos, *Pleurotus pulmonarius* e *Phanerochaete chrysosporium* representam os fungos mais estudados no que concerne ao metabolismo da atrazina (BENDING *et al.*, 2002, RIBAS *et al.*, 2009, MAGAN *et al.*, 2009).

Mougin e colaboradores (1994) descreveram a degradação de atrazina em fermentação submersa por 16 dias, mediada por *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767. Os autores conseguiram um decréscimo de 48% da concentração inicial de atrazina (2 µm/L) com a identificação de quatro metabólitos formados

(Hidroxiatrazina - HA, desetilatrazina - DEA, desetilhidroxiatrazina - DEHA e deisopropilatrazina - DIA).

Bending e colaboradores (2002) estudaram a degradação de atrazina na concentração inicial de 10 mg/L pelo fungo *Pleurotus ostreatus* por fermentação submersa de modo estático, após o período de 42 dias de incubação a porcentagem remanescente de atrazina no meio reacional foi de 84,5%. Entretanto, os metabólitos formados não foram identificados.

Na degradação da atrazina pelo fungo *Pleurotus pulmonarius* em fermentação submersa sob agitação, Masaphy e colaboradores (1996) identificaram os metabólitos gerados (DEA, DIA, desetildeisopropilatrazina - DEDIA e desetildeisopropilhidroxiatrazina). A adição de indutores no meio reacional, no caso o manganês, foi responsável por aumentar a taxa de degradação de atrazina como também a atividade enzimática de oxidases e peroxidases.

4.2.1 Determinação da atividade enzimática nos estudos preliminares de degradação de atrazina

No presente trabalho, apesar de apenas o fungo *P. ostreatus* UFLA ter apresentado a capacidade de degradar a atrazina, a determinação da atividade enzimática das enzimas lacase, manganês peroxidase, lignina peroxidase (enzimas ligninolíticas extracelulares) nos meios de degradação de atrazina foi acompanhada diariamente ao longo de 15 dias para todos os fungos estudados.

A Tabela 12 mostra os resultados obtidos para a determinação das atividades das enzimas lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase nos meios para avaliação da degradação de atrazina.

Como pode ser visto nesta tabela, os fungos não apresentaram produção de enzimas ligninolíticas., contrariamente ao que foi observado em outros estudos. No caso de *L. edodes* e *P. simplicissimum* a produção de lacase já foi demonstrada em estudos anteriores. Lakhtar e colaboradores, 2010 estudaram a degradação de polifenóis mediado por *L.edodes* e observaram que na presença deste composto a atividade de lacase foi estimulada obtendo como atividade máxima 1,5 U/mL em 15 dias. Zeng e colaboradores, 2006 observaram que a produção de lacase por *P.simplicissimum* H5 aumentava significativamente quando a fonte de carbono estava escassa.

No entanto, em relação a *C. rugosa*, não há estudos anteriores comprovando a produção destas enzimas ligninolíticas corroborando com o presente estudo.

P. ostreatus UFLA, que foi o único fungo que produziu enzimas ligninolíticas, produziu apenas lacase, cujos valores não foram significativos. Na Tabela 12 estão apresentados os valores determinados para o sétimo dia (0,533 U/mL) e décimo quinto dia (0,119 U/mL) de cultivo, respectivamente, o maior valor de atividade de lacase e a atividade no dia de maior degradação da atrazina (Figura 23).

Contrariando o presente estudo, em estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa, o fungo *P. ostreatus* UFLA produziu grandes quantidades da enzima lacase. A eficiência desta enzima no tratamento de remoção de cor de quatro corantes têxteis de diferentes classes químicas foi avaliada e comparada com uma formulação comercial (NOVOZYM 51003). O extrato enzimático rico em lacase produzido por *P. ostreatus* foi mais eficiente na remoção de cor na mistura desses quatro corantes que a formulação comercial com a lacase purificada de *Aspergillus oryzae* (NOVOZYM 51003). Esses resultados mostram que a aplicação de um pool enzimático na biodegradação de compostos recalcitrantes, além de menos dispendioso, pode ser mais eficiente que a aplicação de uma enzima comercial (TEIXEIRA *et al.*, 2010).

Embora a literatura reporte a ocorrência de atuação de compostos recalcitrantes como indutores de ligninases (GORBATOVA *et al.*, 2006), somente a enzima lacase foi identificada no meio reacional contendo o fungo *P. ostreatus* UFLA (Tabela 12).

Tabela 12 - Determinação das atividades das enzimas ligninolíticas nos meios de cultivos contendo atrazina a 10 mgL⁻¹ ao longo de 15 dias. Atividade enzimática expressa em U/mL

Fungos	Lacase U/mL		Lignina Peroxidase	Peroxidases
	7 dias	15 dias		
<i>Lentinula edodes</i> INCQS 40220	-	-	-	-
<i>Candida rugosa</i> INCQS 71011	-	-	-	-
<i>Penicillium simplicissimum</i> INCQS 40211	-	-	-	-
<i>Pleurotus ostreatus</i> UFLA	0,533	0,119	-	-

Pozdnyakova e colaboradores (2009) estudaram a habilidade de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) em estimular a produção de lacase e peroxidase produzidas pelo fungo *Pleurotus ostreatus* D1. Esse estudo mostra a produção da enzima lacase principalmente entre o 7^o e 10^o dia de cultivo, enquanto que a produção de peroxidase começou após 5 a 7 dias de cultivo. A diferença no tempo de produção dessas enzimas pode refletir o envolvimento da peroxidase no primeiro estágio de degradação de HAPs e a lacase atuando na oxidação dos produtos de degradação. Analisando a Figura 23, podemos observar uma discreta diferença entre os níveis de produção de lacase no meio com e sem atrazina. Este resultado indica que a atrazina não atuou como indutor da produção de lacase.

Os resultados de degradação apresentados na Figura 20 mostram que a degradação de atrazina foi maior no 15^o dia não mostrando correlação com a atuação da enzima lacase que foi maior no 7^o dia (Tabela 12).

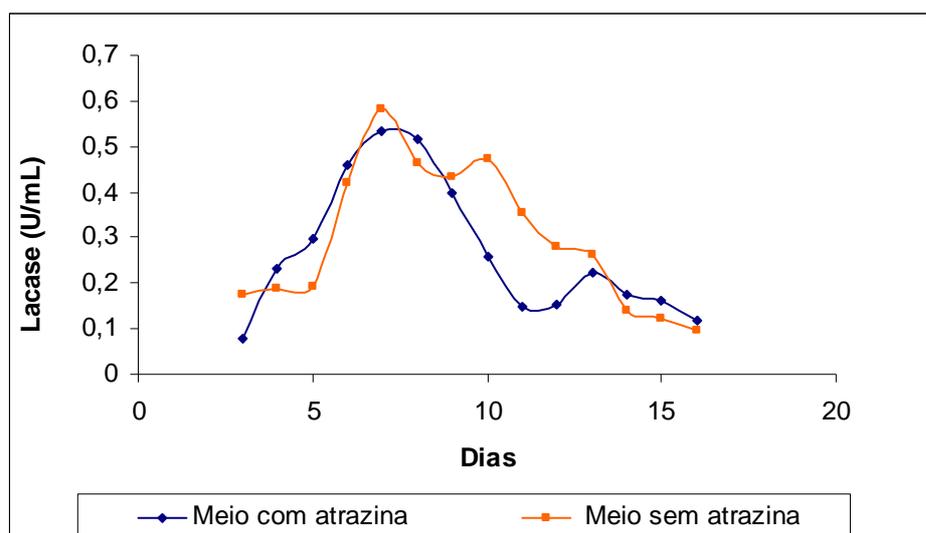


Figura 23 - Atividade enzimática da enzima lacase produzida por *Pleurotus ostreatus* ao longo de 15 dias

Lakhtar e colaboradores (2010) estudaram a degradação de polifenóis por quatro linhagens diferentes de *Lentinula edodes* (Le 118, Le 119, Le 120 e Le 121) crescidas em efluentes de fábrica de azeite e conseguiram relacionar a porcentagem de degradação à maior produção de lacase, obtendo 75% de degradação e atividade de lacase de $1,5 \text{ U mL}^{-1}$ em 15 dias.

Gorbatova e colaboradores (2006) estudaram o efeito de dois indutores de oxiredutases (siringaldazina e guaiacol) na degradação de atrazina por *Coriolus hirsutus*, *Coriolopsis fulvocinerea*, *Cerrena máxima* e um cultivo misto de *Coriolus hirsutus*/*Cerrena máxima* e verificaram que a degradação de atrazina foi maior nas culturas onde havia os indutores (77-98% vs 68-74%). Os resultados obtidos demonstraram uma participação efetiva da lacase neste processo.

Karas e colaboradores (2011) estudando a degradação de seis diferentes pesticidas por *Phanerochaete chrysosporium* DSMZ 6909, *Trametes versicolor* DSMZ 11309, *Pleurotus ostreatus* DSMZ 1020 e *Aspergillus niger* DSMZ 11167 perceberam a relação linear entre enzimas ligninolíticas (manganês peroxidase e lacase) e degradação de pesticidas, porém essa relação não ocorreu para todos os pesticidas testados evidenciando também o envolvimento de outras enzimas.

A literatura também relata estudos onde não existe nenhuma correlação entre degradação de pesticidas e enzimas ligninolíticas. Hiratsuka e colaboradores (2001)

relatam que *Trametes versicolor* IFO 30340 foi capaz de degradar uma série de herbicidas difenil-éter sem o envolvimento de enzimas ligninolíticas. Porém, enzimas intracelulares como citocromo P 450 monoxigenase foram responsáveis por mediar a hidroxilação inicial desse herbicida.

Magan e colaboradores (2009) estudaram a degradação do herbicida atrazina em solo pelo fungo *Trametes versicolor* ao longo de 24 semanas e verificaram um papel pouco expressivo da enzima lacase nesta degradação.

HOU *et al.*, (2004) e KAAL *et al.*, (1995) obtiveram resultados contraditórios com duas linhagens diferentes de *P. ostreatus* (cepa 32, CIMW 492), indicando que a expressão de lacase pode variar dependendo das condições de crescimento, composição do meio de cultivo, fonte de nitrogênio e linhagens do micro-organismo.

Embora o *P. ostreatus*, nos estudos de degradação no presente estudo, tenha demonstrado capacidade de degradar a atrazina e produzir lacase; não foi possível correlacionar a produção desta enzima e a degradação do herbicida. Conforme apresentado na Figura 23, a atividade enzimática máxima de lacase ocorreu no 7º dia e a degradação máxima de atrazina ocorreu no 15º dia (Figura 20).

A não correlação entre degradação e produção de lacase já foi anteriormente observada para outra linhagem de *Pleurotus ostreatus* 3004. Em estudos de degradação do corante sintético laranja reativo (RO16), Novotny e colaboradores, 2004 conseguiram degradar 95% do corante em 7 dias e nenhuma atividade para a enzima lacase foi detectada.

Schützendübel e colaboradores, 1999 em seus estudos de degradação de HPAs também não observaram relação entre produção de enzimas extracelulares e degradação.

Assim sendo, estes resultados reforçam a escolha do *P. ostreatus* UFLA para os estudos posteriores de otimização do meio de cultivo e maximização da degradação de atrazina.

4.2.2 Maximização da degradação de atrazina por planejamento estatístico

Nesse estudo, foram realizados 20 ensaios com diferentes concentrações de cada componente do meio de cultivo de acordo com o obtido na matriz gerada pelo *software* Statistica (Tabela 9). Esse estudo nas concentrações dos componentes do

meio de cultivo permitiu aumentar a porcentagem de degradação de atrazina, e também a variedade dos metabólitos formados.

A Figura 24 apresenta os percentuais de degradação de atrazina nos diferentes ensaios. Diferentes resultados foram encontrados em função da variação das concentrações dos componentes do meio de cultivo.

Analisando a figura, pode-se observar que o maior percentual de degradação ocorreu no ensaio 12, quando foi conseguida uma degradação de 65% em apenas 15 dias. Nesse ensaio, foi possível aumentar em 1,7 vezes o percentual de degradação de atrazina inicialmente obtido (39%), e observar a formação de metabólitos não detectados nos experimentos anteriores. Além da formação de DEA e DIA, também foi constatada a formação de DIHA, DEDIA e DEHA (Tabela 13).

Tabela 13 – Percentual de degradação de atrazina e seus metabólitos formados para os resultados mais expressivos após o planejamento experimental

Ensaio	Degradação (%)	Metabólitos Formados
1	36	DIA, DEA
4	56	DIHA, DEDIA, DIA, HA, DEA
12	65	DIHA, DEDIA, DEHA, DIA, DEA
13	34	DIA, HA, DEA, MNI*
16	22	DEHA, DEA, MNI*

*MNI – metabólitos não identificados

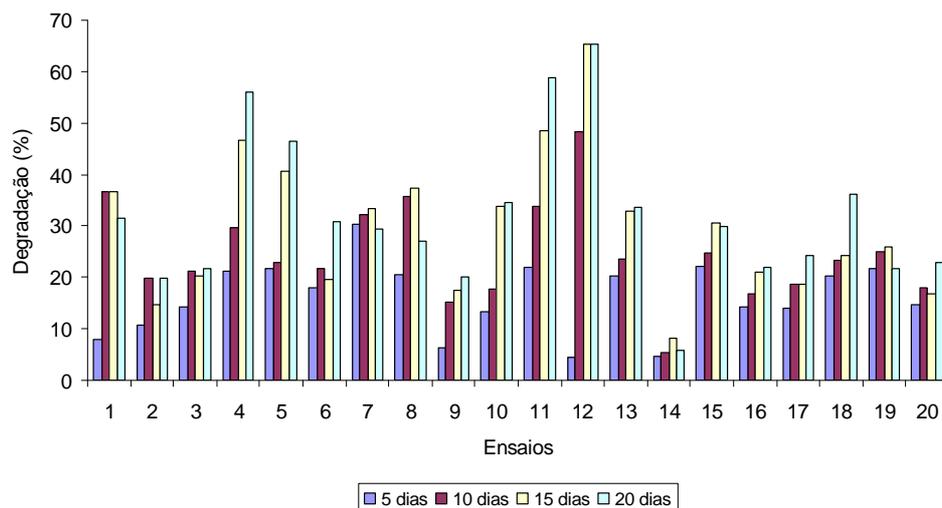


Figura 24 – Percentual de degradação de atrazina nos diferentes meios utilizados no planejamento fatorial fracionado para otimização da degradação de atrazina

A formação de uma maior variedade de metabólitos foi verificada quando comparada com o estudo de degradação anterior (Tabela 13), mesmo nos ensaios onde os níveis de degradação não foram elevados, como no caso dos ensaios 13 e 16, em que foram alcançados percentuais de degradação de atrazina de 34% e 22%, respectivamente, em 20 dias. Dentre os metabólitos obtidos nos ensaios 13 e 16, verificou-se a presença de DIA, HA e DEA. Adicionalmente, ocorreu também a formação de picos com intensidades significativas em tempos de retenção diferentes dos padrões disponíveis (DIA, DIHA, DEDIA, DEA, DEHA e HA), indicando a formação de metabólitos diferentes daqueles considerados como principais produtos da degradação de atrazina pela literatura (Tabela 13).

O meio de cultivo utilizado no ensaio 4 promoveu 56% de degradação de atrazina ao final de 20 dias com formação dos metabólitos DIHA, DEDIA, DIA, HA e DEA. Este é um percentual de degradação bastante elevado quando comparado com outros resultados da literatura (BENDING *et al.*, 2002, RIBAS *et al.*, 2009).

Nas condições de cultivo utilizadas no ensaio 1 foi possível obter 36% de degradação de atrazina ao final de 10 dias (Figura 24). Esse resultado merece ser destacado, pois nesse ensaio todos os componentes utilizados no meio de cultivo estavam na menor concentração estabelecida no planejamento fatorial (nível -1,

Tabela 8 e Tabela 9).

A Tabela 14 apresenta a comparação de alguns estudos de degradação de atrazina por fungos, mostrando as condições de cada estudo e os metabólitos formados.

O melhor resultado obtido no presente estudo em relação à degradação de atrazina está apresentado no ensaio 12 (65% de degradação em 15 dias com a formação dos metabólitos DEA, DIA, DEHA, DIHA e DEDIA).

No ensaio anterior, embora só tenha ocorrido a formação dos metabólitos DEA e DIA, estes foram formados em concentrações capazes de serem detectados por CG-EM. Os metabólitos formados após o planejamento experimental (DEA, DIA, DEHA, DIHA e DEDIA) não puderam ser confirmados nas análises por CG-EM, pois as baixas concentrações obtidas não foram detectadas.

É relevante destacar também o elevado percentual de degradação de atrazina obtido no presente trabalho (ensaio 12), além do curto espaço de tempo e diversidade de metabólitos produzidos que extremamente significativos aos comparados em estudos anteriores descritos na literatura (MASAPHY *et al.*, 1993, MOUGIN *et al.*, 1994; BENDING *et al.*, 2002, RIBAS *et al.*, 2009).

Tabela 14 - Comparação dos estudos de degradação de atrazina descritos na literatura

Fungos Utilizados	Tempo (dias)	Concentração	Metabólitos formados	Degradação (%)	Referência
<i>Phanerochaete crhyso sporium</i> BKM-F-1767	16	2 µm/L	HA, DEA, DEHA e DIA	48	(MOUGIN <i>et al.</i> , 1994)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	42	10 mg/L	N.I*	15,5	(BENDING <i>et al.</i> , 2002)
<i>Pleurotus pulmonaris</i>	25	20 mg/L	DEA, DIA, DEDIA e 2-cloro-4- etilamino-6-(1- hidroxisopropil) amino-1,3,5 triazina	50	(MASAPHY <i>et al.</i> , 1993)
<i>Lentinula edodes</i>	30	10 µg/mL	N.I*	26	(RIBAS <i>et al.</i> , 2009)
<i>Agaricus subrufescens</i>	30	10 µg/mL	N.I*	35	(RIBAS <i>et al.</i> , 2009)
<i>Pleurotus ostreatus</i>	15	10 mg/L	DEA e DIA	39	Neste trabalho
<i>Pleurotus ostreatus</i>	15	10 mg/L	DIHA, DEDIA, DEHA, DIA e DEA	65	Neste trabalho

* N.I – Não identificado

Para as análises estatísticas foi utilizado o programa Statistica 7.0. Os valores do teste *t-student* (t_{calc}) e as variáveis estatisticamente significativas no nível de significância de 10% estão apresentados nos diagramas de Pareto (Figura 25).

Na Figura 25, as letras a, b, c e d estão relacionadas ao percentual de degradação da atrazina ao final de 5, 10, 15, e 20 dias, respectivamente. De acordo com *p*-valor estabelecido, representado no diagrama de Pareto pela linha vermelha,

as variáveis estatisticamente significativas apresentam diferentes comportamentos ao longo do período de estudo, conforme esperado.

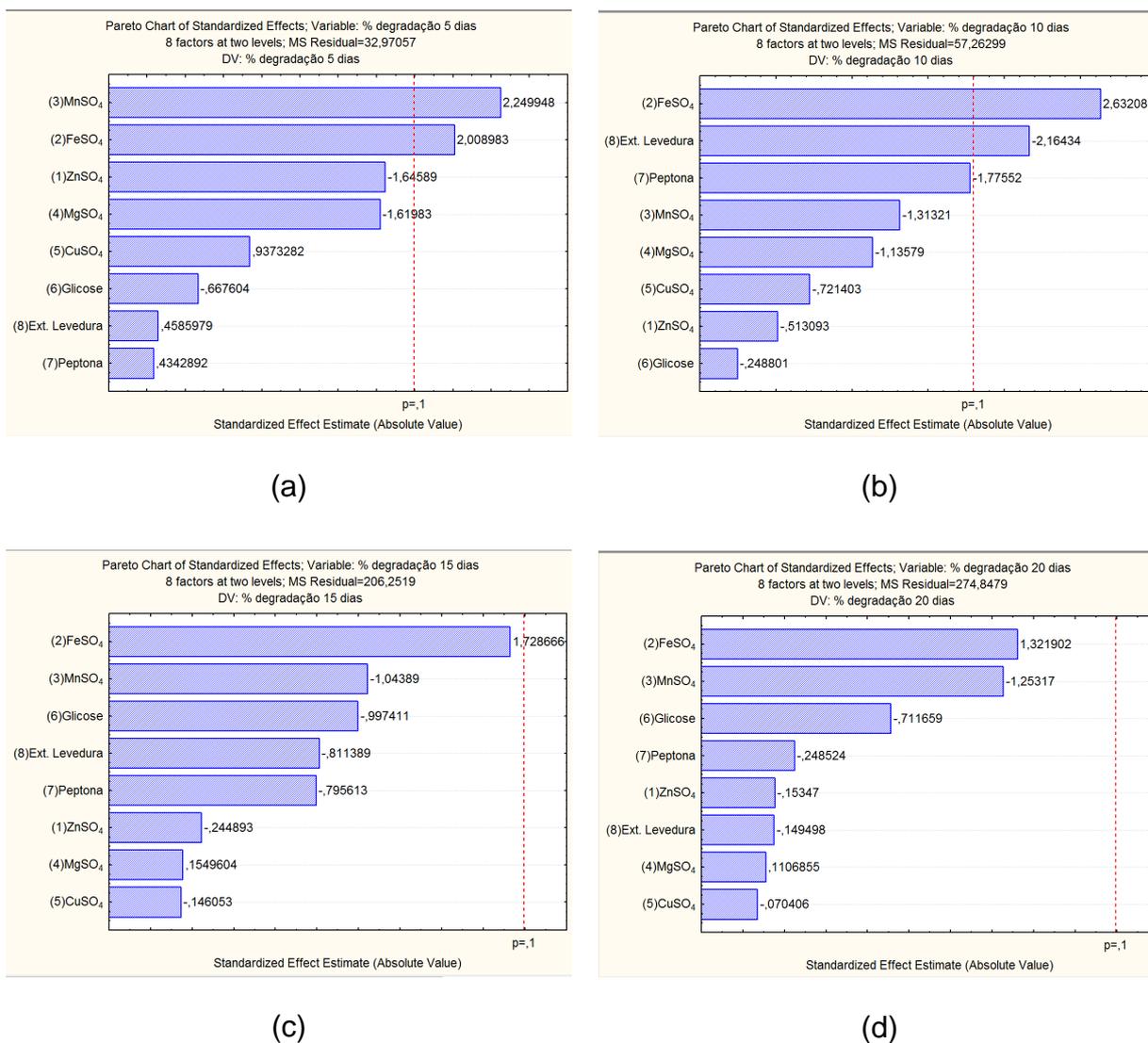


Figura 25 - Diagrama de Pareto construído através da análise estatística da degradação da atrazina dos 20 ensaios. (a) 5 dias de cultivo (b) 10 dias de cultivo, (c) 15 dias de cultivo e (d) 20 dias de cultivo

Para uma melhor avaliação dos resultados apresentados no diagrama de Pareto, os efeitos das variáveis e outros dados da análise estatística estão apresentados nas Tabela 15 e Tabela 16, respectivamente para 5 ou 10 dias de cultivos. Os resultados referentes a 15 e 20 dias de cultivo não estão apresentados pois nenhuma das variáveis foi estatisticamente significativa.

Tabela 15 – Estimativas por ponto, por intervalo e testes de hipóteses para os efeitos após 5 dias de cultivo. Em vermelho as variáveis estatisticamente significativas

Variáveis	Efeitos	Erro Padrão	t _{calc} *	p-valor**	Estimativas por intervalo (90%)	
					L. inferior	L. superior
Média	16,14	1,28	12,57	0,00	13,83	18,44
Sulfato de Zinco	-4,72	2,87	-1,64	0,12	-9,88	0,43
Sulfato de Ferro	5,76	2,87	2,00	0,06	0,61	10,92
Sulfato de Manganês	6,45	2,87	2,24	0,04	1,30	11,65
Sulfato de Magnésio	-4,654	2,870	-1,61	0,13	-9,80	0,50
Sulfato de Cobre	2,69	2,87	0,93	0,36	-2,46	7,84
Glicose	-1,91	2,87	-0,66	0,51	-7,07	3,23
Peptona	1,24	2,87	0,43	0,67	-3,90	6,40
Extrato de Levedura	1,31	2,87	0,45	0,65	-3,83	6,47

*t_{calc} é o valor encontrado no teste *T-student* do programa Statistica 7.0.

****p-valor** é a probabilidade de significância do teste de hipóteses realizado pelo programa Statistica 7.0. Se *p-valor* for menor que o nível de significância (α), este é estatisticamente significativo.

No presente trabalho, $\alpha = 0,1$.

Tabela 16 - Estimativas por ponto, por intervalo e testes de hipóteses para os efeitos após 10 dias de cultivo. Em vermelho as variáveis estatisticamente significativas

Variáveis	Efeitos	Erro Padrão	t _{calc} *	p-valor**	Estimativas por intervalo (90%)	
					L. inferior	L. superior
Média	24,50	1,69	14,48	0,00	21,46	27,54
Sulfato de Zinco	-1,94	3,78	-0,51	0,61	-8,73	4,85
Sulfato de Ferro	9,95	3,78	2,63	0,02	3,16	16,75
Sulfato de Manganês	-4,97	3,78	-1,31	0,21	-11,76	1,82
Sulfato de Magnésio	-4,29	3,78	-1,13	0,28	-11,09	2,49
Sulfato de Cobre	-2,73	3,78	-0,72	0,48	-9,52	4,06
Glicose	-0,94	3,78	-0,25	0,81	-7,73	5,85
Peptona	-6,71	3,78	-1,77	0,10	-13,51	0,08
Extrato de Levedura	-8,19	3,78	-2,16	0,05	-14,98	-1,39

*t_{calc} é o valor encontrado no teste *T-student* do programa Statistica 7.0.

****p-valor** é a probabilidade de significância do teste de hipóteses realizado pelo programa Statistica 7.0. Se *p-valor* for menor que o nível de significância (α), este é estatisticamente significativo.

No presente trabalho, $\alpha = 0,1$.

De acordo com a Tabela 15, as variáveis independentes sulfato de manganês e sulfato de ferro se mostraram estatisticamente significativas (*p-valor* encontrado menor que o nível de significância $\alpha = 0,1$). Essas variáveis apresentaram efeitos

positivos, indicando a importância destes componentes no meio de cultivo e sugerindo a sua utilização em nível +1.

O percentual de degradação de atrazina no meio de cultivo utilizado no ensaio 7 em 5 dias de cultivo foi de 30% (Figura 24). Esse experimento exemplifica a significância estatística dos componentes sulfato de manganês e sulfato de ferro em suas maiores concentrações (nível +1). Sugerindo que a concentração destes componentes pode ser maior que 0,1 e 0,001, respectivamente, em experimentos futuros.

Já na análise dos dados obtidos na degradação em 10 dias (Tabela 16), a variável independente extrato de levedura, foi estatisticamente significativa. Porém neste caso, essa variável apresentou efeito negativo, sugerindo que nos experimentos futuros, a concentração de extrato de levedura utilizada seja menor que 2g/L (nível -1).

Em paralelo e de forma complementar aos estudos de degradação, avaliou-se a atividade da enzima lacase em todos os 20 meios estudados. A Figura 26 apresenta as atividades enzimáticas da enzima lacase nos diferentes ensaios em 3, 6, 10, 15 e 20 dias.

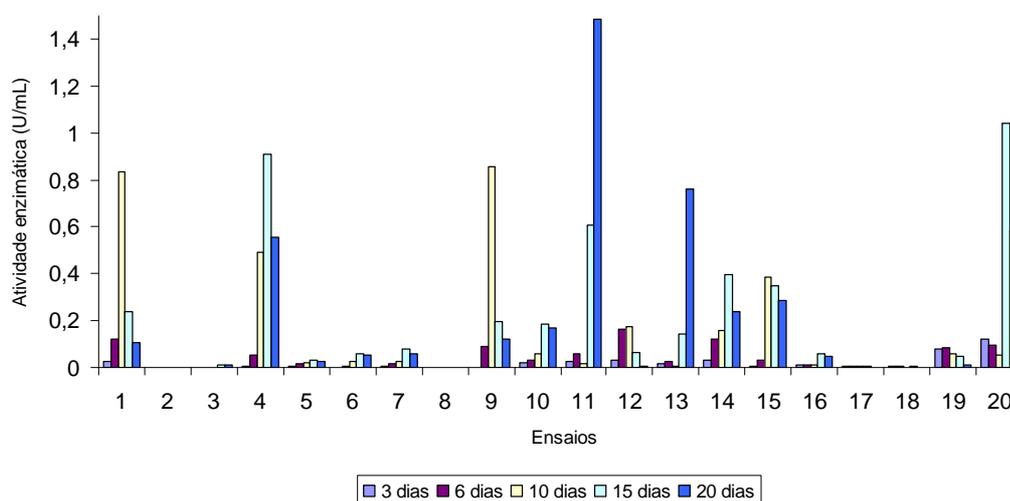


Figura 26 – Determinação da atividade enzimática para a enzima lacase nos diferentes ensaios

O meio de cultivo empregado no ensaio 11 apresentou maiores resultados de atividade enzimática para a lacase (1,4 U/mL) (Figura 26). Embora o maior percentual de degradação da atrazina tenha sido encontrado no ensaio 12 (65% em

15 dias), os 59% de degradação encontrados no ensaio 11, após 20 dias, são extremamente significativos.

No presente trabalho os ensaios que produziram maiores concentrações de lacase não foram os que apresentaram os melhores resultados de degradação de atrazina, indicando que um sistema enzimático ou metabólico mais complexo participa da degradação de atrazina.

A atividade enzimática da lacase, mesmo após o melhoramento do meio de cultivo, que visava maior degradação da atrazina, mostrou-se baixa. Estudos posteriores serão realizados com esse mesmo meio de cultivo, porém sem atrazina. Também serão realizados estudos para avaliação do possível envolvimento de enzimas intracelulares no processo de degradação.

Outros estudos de produção de lacase podem também utilizar o nível -1 (Tabela 8 e Tabela 9) como o nível máximo de concentração numa futura otimização visando o aumento da atividade. Novos estudos objetivam um aumento da produção dessa enzima para uma possível aplicação direta deste biocatalisador na degradação do herbicida atrazina.

Os resultados obtidos nesta dissertação demonstram o potencial do fungo *Pleurotus ostreatus* UFLA em degradar o herbicida atrazina, com formação de metabólitos que também vão sendo consumidos ao longo do tempo. Estudos mais minuciosos serão realizados com intuito de se inferir sobre a possível rota fúngica utilizada para a metabolização deste composto.

Pleurotus ostreatus UFLA será depositado na Coleção de Fungos de Referência do INCQS, ficando assim disponível para estudos posteriores nesta área de biorremediação.

Estudos nesta área apresentam grande importância à vigilância sanitária, uma vez que a prática mundial indiscriminada do uso de agrotóxicos por longos períodos, vem trazendo preocupações aos envolvidos com saúde pública e sustentabilidade dos recursos naturais, em consequência da contaminação ocupacional e ambiental.

5. CONCLUSÃO

Apesar dos fungos avaliados *Candida rugosa* INCQS 71011, *Lentinula edodes* INCQS 40220, *Penicillium simplicissimum* INCQS 40211 e *Pleurotus ostreatus* UFLA terem se mostrado tolerantes ao herbicida atrazina, somente *Pleurotus ostreatus* UFLA foi capaz de realizar a degradação de atrazina em meio líquido, e na avaliação das enzimas envolvidas, somente a enzima lacase foi detectada.

Nenhuma correlação entre a degradação de atrazina e a produção de lacase pôde ser feita, uma vez que a atividade de lacase não mostrou níveis significativos e não ocorreu no mesmo intervalo do maior percentual de degradação.

Com o planejamento experimental, que objetivou maiores níveis de degradação de atrazina, foi possível obter 65% de degradação de atrazina (ensaio 12). Havendo um aumento de 1,7 vezes em relação aos experimentos anteriores (39%). Verificou-se também uma maior diversidade nos metabólitos formados, além de DEA e DIA, também foram gerados DIHA, DEDIA e DEHA.

Além do melhor percentual de degradação encontrado (65%, ensaio 12, 15 dias), outros resultados de degradação também se mostraram bastante relevantes, tais como: 56% (ensaio 4, 20 dias), 59% (ensaio 11, 20 dias) e 46% (ensaio 5, 20 dias). Apresentando níveis de degradação superiores aos encontrados na maioria dos estudos previamente descritos na literatura.

A adsorção da atrazina ao micélio fúngico mostrou-se insignificante, indicando a capacidade e a eficiência de *P. ostreatus* UFLA na degradação deste herbicida.

Assim, o presente estudo demonstra um elevado potencial do fungo filamentosso *Pleurotus ostreatus* UFLA, para utilização em processos de biorremediação.

6. PERSPECTIVAS

- Realizar um estudo complementar com análises de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (CL-EM) para identificação dos produtos de degradação não esperados, ou seja, aqueles dos quais os padrões não estavam disponíveis durante a realização deste trabalho;
- Complementar os experimentos de otimização do meio de cultivo para a degradação da atrazina realizando um delineamento composto central rotacional (DCCR);
- Realizar os estudos de toxicidade nos metabólitos formados;
- Realizar estudos para a otimização do meio de cultivo dos fungos para a produção de lacase e avaliar a utilização de lacase diretamente na degradação do herbicida atrazina.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABATE, G., MASINI, J., C. Adsorption of atrazine, hydroxyatrazine, deethylatrazine, and deisopropylatrazine onto poly (hydroxy iron) cations intercalated vermiculite and montmorillonite. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. n 53, v.5, p.1612–1619. 2005.
- ABHILASH, P.C; SINGH, N. Pesticide use and application: An Indian scenario. **Journal of Hazardous Materials** v.165 p. 1-12.2009.
- AGNIHOTRI, N. P. Pesticide safety evaluation and monitoring. All India co-ordinated research project on pesticides residues. **Indian Agricultural Research Institute**. New Delhi, India. p.119-146. 1999.
- ARMAS, E. D., MONTEIRO, R. T. R., AMÂNCIO, A. V., CORREA, R. M. L.; GUERCIO, M. A. Uso de agrotóxicos em cana-de-açúcar na bacia do rio Corumbataí e o risco de poluição hídrica. **Química Nova**, v. 28, n. 6, p. 975-982, 2005.
- ARRUDA, H. P. DE. Receituário agrônômico. In: **Compêndios de defensivos agrícolas**. São Paulo : Andrei, 1990.
- ATLAS, R.M.; CERNIGLIA, C.E. Bioremediation of petroleum pollutants. Diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. **BioScience**. v. 45, p. 332-338,1995.
- BALESTEROS,M.R. Desenvolvimento e otimização de metodologia para análise de atrazina e seus produtos de degradação por cromatografia líquida de alta eficiência e eletroforese capilar. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora, 2009.
- BARRIUSO, E. & HOUOT, S. Rapid mineralization of the s-triazine in soils in relation to soil management. **Soil Biology & Biochemistry**, Oxford, v.28, p.1341-1348,1996.
- BEHKI, R.M. & SHAHAMAT, U., K. Degradation of Atrazine and Simazine by Rhodococcus Strain B-30. **J. Agric. Food Chem**, n. 5, v. 42, p. 1237-1241,1994.
- BENDING, G. D.; FRILLOUX, M., WALKER, A. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential; **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, p. 59-63, 2002.

- BENNET, J.W.; WUNCH, K.G.; FAISON, B.D. Use of fungi biodegradation. **Manual of Environmental Microbiology**. ASM Press Washington, D. C., 960-971. 2002.
- BERGSTEN-TORRALBA, L.R.; NISHIKAWA, M.M.; BAPTISTA, D.F.; MAGALHÃES, D.P.; DA SILVA, M. Decolorization of different textile dyes by *Penicillium simplicissimum* and toxicity evaluation after fungal treatment. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 40 p. 808-817, 2009.
- BHATNAGAR, V.K. Pesticide pollution: trends and perspectives. **ICMR Bull.** v. 31 p. 87-88, 2001.
- BINET, F., KERSANT'É, A., MUNIER-LAMY, C., LE BAYON, R.-C., BELGY, M.-J. & SHIPITALO, M. J. Lumbricid macrofauna alter atrazine mineralization and sorption in a silt loam soil. **Soil Biol. Biochem.** v.38 p 1255–1263, 2006.
- BONONI, V. L. R. (org.). Zigomicetos, basidiomicetos e deuteromicetos: noções básicas de taxonomia e aplicações biotecnológicas. São Paulo: Secretaria do Estado de Meio Ambiente, 1998.
- BOURBONNAIS, R. & PAICE, M. G. Oxidation of non-phenolic substrates – an expanded role for laccase in lignin biodegradation. **FEBS**, v.267, n.1, p. 99-102, 1990.
- BRASIL. Lei nº 7802, de 11 de Julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos de embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Brasília, 1989. Disponível em www.anvisa.gov.br. Acesso em: 29 de Maio. 2009.
- CALL, H.P. & MÜCKE, I. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozym[®]-process). Minireview. **Journal of Biotechnology**, v.53, p.163-202,1997.
- CAMERON, M. D., TIMOFEEVSKI, S., AUST, S. D. Enzimology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, p. 751-758, 2000.

- CARLILE, M. J., WATKINSON, S. C., GOODAY, G. W. **The fungi**. 2. Ed., London: Academic Press, 2001.
- CHRISTOFFOLET, P. J.; OVEREJO, R. F. L.; CARVALHO, J. C. Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. 2. ed., Campinas: **Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas aos Herbicidas**, 2004.
- COLLA, L.M.; PRIMAZ, A.L.; DE LIMA M.; BERTOLIN, T.E.; COSTA, J.A.V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciênc. Agrotec. Lavras**, V.32, n 3, p. 809-813, 2008.
- CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, de 17/03/2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Ministério do Meio Ambiente** (MMA). Brasília, DF. 2005.
- COUTINHO, F.B., TANIMOTO, S.T., GALLI, A., GARBELLINI, G.S., TAKAYAMA, M., DO AMARAL, R.B.; MAZO, L.H.; AVACA, L.A.; MACHADO, S.A.S. Pesticidas: Mecanismo de ação, degradação e toxidez. Pesticidas: r. ecotoxicol e meio ambiente. Curitiba. v.15. p. 65-72, 2005.
- DAMS, R.I. Pesticida: Usos e perigos à saúde e ao meio ambiente. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, n. 2, 2006.
- DA SILVA, M; CERNIGLIA, CARL E.; POTHULURI, JAIRAJ V.; CANHOS, VANDERLEI P.; ESPOSITO, ELISA. Screening filamentous fungi isolated from estuarine sediments for the ability to oxidize polycyclic aromatic hydrocarbons. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, v. 19, p. 399-405, 2003a
- _____.; UMBUZEIRO, G.A; PFENNING, L.H.; CANHOS, V.P. & ESPOSITO, E. Filamentous fungi isolated from estuarine sediments contaminated with industrial discharges. **Soil and Sediment Contamination**. v. 12, n. 3, p. 345-356, 2003b.
- _____.; ESPOSITO, E.; MOODY, J ; CANHOS, V ; CERNIGLIA, C . Metabolism of aromatic hydrocarbons by the filamentous fungus *Cylothyrrium* sp.. *Chemosphere*, v. 57, p. 943-952, 2004.
- _____.; ESPOSITO, E. Utilização de fungos na recuperação ambiental. Em: ESPOSITO, E.; de AZEVEDO J.L., eds. *Fungos: Uma Introdução a Biologia*,

- Bioquímica e Biotecnologia. Caxias do Sul: Editora da Universidade de Caxias do Sul, p. 337-378. 2004.
- DELGADO, I.F.; PAUMGARTTEN, F.J.R. Intoxicações e uso de pesticidas por agricultores do município de Paty do Alferes, Rio de Janeiro, Brasil. **Cad Saúde Pública**. V.20, n 1, p. 180-183, 2004.
- DUPONT, R.R.; BRUELL, C.J.; MARLEY, M.C.; DOWNEY, D.C.; NORRIS, R.D.; HULLING, S.G. & PIVETS, B. Bioremediation. Annapolis: American Academy of Environmental Engineers and USEPA. p 596, 1997.
- EERD, L.L.V., HOAGLAND, R.E., ZABLOTOWICZ, R.M., HALL, J.C. pesticide metabolism in plants and microorganism. **Weed Sciences**, v.51, p. 472-495, 2003.
- EISLER, R. Atrazine hazards to fish, wildlife and invertebrates a synoptic review. **Biological Report**. v 85 p. 1-18, 1989.
- FAN, W.; YANASE, T.; MORINAGA, H.; GONDO, S.; OKABE, T.; NOMURA, M.; KOMATSU, T.; MOROHASHI, K.I.; HAYES, T.B.; TAKAYANAGI, R.; NAWATA, H. Atrazine-induced aromatase expression is SF-1 dependent implications for endocrine disruption in wildlife and reproductive cancers in humans. *Environmental Health Perspectives*. V.115, n5, p.720-727, 2007.
- FERREIRA, C.R.R.P.T. Defensivos agrícolas: expectativas de vendas menores em 2005. **Instituto de economia agrícola**. APTA. Secretaria de agricultura e abastecimento. Disponível em: <http://www.iea.sp.gov.br>. Acesso em 27/01/2011.
- FERREIRA-LEITÃO, V.S.; BOM, E.P.S.; FERRARA, .A. Importância ambiental da biocatálise. In: Itamar Soares de Melo; João Lúcio de Azevedo. (org) *Microbiologia Ambiental*, 2-ed. Jaguariúna. Embrapa, p 185-198, 2008.
- GARG, S.K., MODI, D.R. Decolorization of pulp-paper mill effluents by white-rot fungi. **Critical Reviews in Biotechnology** v.19 n.2: 85-112, 1999.
- GIANFREDA L, RAO M., A. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: A review. **Enzyme Microb. Technol.** 35: 339-354, 2004.
- GOODMAN & GILMAN, A G. As bases farmacológicas da terapêutica. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan, 1990. p.7-29.

- GORBATOVA, O. N.; KOROLEVA, O. V.; LANDESMAN, E. O.; STEPANOVA, E. V.; ZHERDEV, A. V. Increase of detoxification potential of basidiomycetes by induction of laccase biosynthesis. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 414-419, 2006.
- HANG, S.; HOUOT, S.; BARRIUSO, E. Vertical variation of atrazine mineralization capacity in soils. **Agriscientia**, Córdoba, v.24, n.2, p.87-95, 2007.
- HAYES, W.J.; LAWS, E.R. **Handbook of pesticides toxicology**. 1a. ed. Academic Press, San Diego, 1997.
- HICKEY W. J., FUSTER D. J., and LAMAR R. T. Transformation of atrazine in soil by *Phanerochaete chrysosporium*. **Soil Biology and Biochemistry** 26, 1655-1671, 1994.
- HIRATSUKA, N.; WARIISHI, H.; TANAKA, H. Degradation of diphenyl ether herbicides by the lignin-degrading basidiomycete *Coriolus versicolor*. **Appl Microbiol Biotechnol** v. 57, p.563–571, 2001.
- HOU, H., ZHOU, J., WANG, J., DU, C. & YAN, B. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. **Process Biochemistry**. v.39 p. 1415- 1419, 2004.
- INDICADORES, IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da produção agrícola
www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/htm. Acesso em 29 de Junho de 2010.
- JABLONOWSKI, N.D.; KÖPPCHEN, S.; HOFMANN, D.; SCHÄFFER, A.; BURAUER, P. Persistence of ¹⁴C-labeled atrazine and its residues in a field lysimeter soil after 22 years. **Environmental Pollution**, Massachusetts, v.157p.2126-2131, 2009.
- JONES, T.W. & WINCHELL, L. Uptake and photosynthetic inhibition by atrazine and its degradation products on four species of submerged vascular plants. **J. Environ. Qual.** v. 13 p.243–247, 1984.
- KAUFMAN, D.D.; BLACK, J. Degradation of atrazine by soil fungi. **Soil Biology and Biochemistry** , v.2, p.73-80, 1970.

- KARAS, A.P.; PERRUCHON, C.; EXARHOU, K.; EHALIOTIS, C.; KARPOUZAS, D.G. Potential for biodegradation of agro-industrial effluents with high loads of pesticides by selected fungi. **Biodegradation**. V. 22 p. 215-228, 2011
- KRUGER, E.L.; SOMASUNDARAM, L.; KANWAR, R.S.; COATS, J.R. Persistence and degradation of [¹⁴C]atrazine and deisopropilatrazine as affected by soil depth and moisture conditions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, Pensacola, v.12, p.1959-1967, 1993.
- KRÜGENER, S.; SCHAPER, C.; KRINGS, U.; BERGER, R.G. Pleurotus species convert monoterpenes to furanoterpenoids through 1,4-endoperoxides. **Bioresource Technology**.v. 100. p. 2855-2860.2009.
- KUWAHARA M., GLENN J.K., MORGAN M.A. and GOLD M.H., Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaste chrysosporium*. **FEBS Letters**, v.169, p.247-250, 1984.
- KUNS, A.; PERALTA-ZAMORA P.; DE MORAES, G.S.; DURÁN, N. Novas tendências para o tratamento de efluentes têxteis. **Química Nova**. v.25 p. 78-82. 2002.
- LANÇAS, F.M. Validação de métodos cromatográficos de análise. São Carlos. **Rima**. P.46, 2004.
- LAKHTAR, H.; ISMAILI-ALAOUI, U.; PHILIPPOUSSIS, A.; PERRAUD-GAIME, I.; ROUSSOS, S. Screening of strains of *Lentinula edodes* grow on model olive mill wastewater in solid and liquid state culture for polyphenol biodegradation. **International Biodeterioration & Biodegradation** v. 64 p. 167-172. 2010.
- LIU, Y-H.; LIU, Y.; CHEN, Z-S.; LIAN, J.; HUANG, X.; CHUNG Y-C. Purification and characterization of a novel organophosphorus pesticide hydrolase from *Penicillium lilacinum* BP 303. **Enzyme and Microbial Technology**. V. 34 p. 297-303. 2004.
- MACCHERONI, J.; ARAUJO, W.L.; LIMA, A.O.S. Ecologia: Habitat e interações fúngicas com plantas, animais, fungos e bactérias. In: ESPOSITO, E.; AZEVEDO, J.L. Fungos: Uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. Caxias do Sul. EDUCS, 2004.

- MACCLENNAN, P.A.; DELZELL, E.; SATHIAKUMAR, N.; MYERS, S.L.; CHENG, H.; GRIZZLE, W.; CHEN, V.W.; WU, X.C. Cancer incidence among triazine herbicide manufacturing workers. *Journal of Occupation and Environmental Medicine*, v.44, p.1048-1058, 2002.
- MAGAN, N.; BASTOS, A. C. *Trametes versicolor*. Potential for atrazine bioremediation in calcareous clay soil, under low water availability conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v.63 p. 389-394. 2009.
- MANDELBAUM, R.T., DEBORAH, A.L., WACKETT, P., L. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. That mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. **Applied and Environmental Microbiology**. v.61, n.4, p.1451-1457, 1995.
- MARCIAL, J.; BARRIOS-GONZA'LEZ, J.; TOMASINI, A. Effect of medium composition on pentachlorophenol removal by *Amylomyces rouxii* in solid state culture. *Process. Biochemistry*. v. 41 p. 496-500, 2006.
- MASAPHY, S.; LEVANON, D.; VAYA, J.; HENIS, Y. Isolation and characterization of a novel atrazine metabolite produced by the fungus *Pleurotus pulmonarius*, 2-chloro-4- ethylamino-6-(1-hydroxyisopropyl)amino-1,3,5-triazine. **Applied and Environmental Microbiology**, v.59, n.12, p. 4342-4346, 1993.
- MEYSAMI, P.; BAHERI, H. Pre-screening of fungi and bulking agents for contaminated soil bioremediation. **Advances in Environmental Research**, v. 7, p. 881-87, 2003.
- MONTGOMERY, D.C. Design and Analysis of Experiments, **John Wiley & Sons**, 2005.
- MOUGIN, C.; LAUGERO, C.; ASTHER, M.; DOBROCA, J.; FRASSE, P.; ASTHER, M. Biotransformation of the herbicide atrazine by the white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n.2, p. 705-708, 1994.
- MUDHOO, A. AND GARG, V.K. Sorption, Transport and Transformation of atrazine in soils minerals and composts: a review. **Pedosphere** v.21 n.1: p. 11–25, 2011.
- NIKU-PAAVOLA, M. L.; RAASKA, L.; ITÄVAARA, M. Detection of white-rot fungi by a non-toxic stain. **Mycological Research**. v 94 p.27-31.1990.

- NOVOTNÝ, C.; SVOBODOVÁ, K.; ERBANOVÁ, P.; CAJTHAML, T.; KASINATH, A.; LANG, E.; ŠAŠEK, V. Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 36, p. 1545-1551, 2004.
- PAJOT, H.F.; DE FIGUEROA, L.I.C.; FARINA, J.I. Dye-decolorizing activity in isolated yeast from the ecoregion of las Yungas (Tucumám, Argentina). *Enzyme and Microbial Technology*. v.40, p.1503-1511, 2007.
- PASSARINI, M.R.Z.; RODRIGUES M.V.N.; DA SILVA.; SETTE, L.D. Marine-derived filamentous fungi and their potential application for polycyclic aromatic hydrocarbon bioremediation. **Marine Pollution Bulletin** v. 62 p. 364-370, 2010.
- PARASZKIEWICZ, K.; KANWAL, A.; PDLUGONSKI, J. Emulsifier production by steroid transforming filamentous fungus *Curvularia lunata* growth and product characterization. **Journal of Biotechnology**, [S.l.], v. 92, p. 287-294, 2002.
- PIONTEK, K., ANTORINI, M., CHOINOWSKI, T. Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. **The journal of Biological Chemistry**.v.277, p. 37663-37669.
- POINTING, S. B.; VRJIMOED, L. L. P. Decolorization of azo and triphenylmethane dyes by *Pycnoporus sanguineus* producing laccase as the sole phenoloxidase. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v. 16, p. 317-318, 2000.
- POINTING, S. B. Feasibility of bioremediation by white-rot fungi. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 57, p. 20-33, 2001.
- POZDNYAKOVA, N.N.; NIKIFOROVA, S.V.; TURKOVSKAYA, O.V. Influence of HPAs on ligninolytic enzymes of the fungus *Pleurotus ostreatus* D1. **Cent. Eur. J. Biol.** V.5, n.1, p. 83-94, 2010.
- PRATA, F., LAVORENTO, A., VANDERBORGHT, J., BURAUDEL, P., VEREECKEN, H. Miscible displacement, sorption and desorption of atrazine in a Brazilian oxisol. **Valdese Zone J.** v. 2, p. 728-738, 2003.
- PURNOMO, A.S.; KAMEI, I.; KONDO, R. Degradation of 1,1,1-trichloro-2,2-bis (4-chlorophenyl)ethane (DDT) by brown-rot fungi. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 105, n. 6, p. 614-621, 2008.

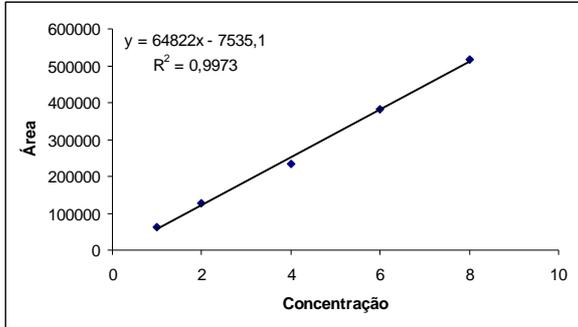
- QING, Z.; YANG, L.; YU-HUAN, L. Purification and characterization of a novel carbaryl hydrolase from *Aspergillus niger* PY168. **FEMS Microbiology Letters**,v.228, p.39-44, 2003.
- RADOSEVICH, M.; TRAINA, S.J.;HAO, Y-L.; TUOVINEN, O.H. Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. *Applied and Environmental Microbiology*. p. 297-302, 1995.
- RAJARATHNAM, S.; SHASHIREKA, M.N.; BANO, Z. Biopotentialities of the basidiomycetes. **Advances in Applied Microbiology**. v.37 p. 233-361. 1992.
- RALEBITSO, T.K., SENIOR, E., HENK, W.V.V. Microbial aspects of atrazine degradation in natural environments. **Biodegradation**. v. 13,p. 11-19, 2002.
- REKHA, S.; NAIK, R ; PRASAD. Pesticide residue in organic and conventional food-risk analysis. **Chemical Health Safety**. v.13 p.12-19. 2006.
- RIBAS, L.C.C.; DE MENDONÇA, M.M.; CAMELINI, C.M.; SOARES, C.H.L. Use of spent mushroom substrates from *Agaricus subrufescens* (syn *A. blazei*, *A. brasiliensis*) and *Lentinula edodes* productions in the enrichment of a soil-based potting media for lettuce (*Lactuca sativa*) cultivation:Growth promotion and soil bioremediation. **Bioresource Technology**. v.100 p.4750-4757. 2009.
- RIGAS, F.; MARCHANT, R.; DRITSA, V.; KAPSANAKI-GOTSI, E.; GONOU-ZAGOU, Z.; AVRAMIDES, J. Screening of wood rotting fungi potentially useful for the degradation of organic pollutants. **Water, air and soil pollution: focus**, v 3, p. 201-210, 2003.
- RITTMANN, B.E., McCARTY, P.L. Environmental biotechnology: principles and applications. **New York: Mc Graw-Hill**, 2001.
- RHINE, E.D.; FUHRMANN, J.J.; RADOSEVICH, M. Microbial community responses to atrazine exposure and nutrient availability linking degradation capacity to community structure. **Microb. Ecol.** n.46,p.145-160, 2003.
- SCHEUNERT, I. Transformation and degradation of pesticides in soil. In: EBING, W. ed **Terrestrial Behaviour of Pesticides**. Springer verlag, p.25-75, 1992.
- SCHÜTZENDÜBEL, A.; MAJCHERCZYK, A.; JOHANNES, C.; HÜTTERMANN, A. Degradation of fluorene, anthracene, phenanthrene, fluoranthene, and pyrene lacks connection to the production of extracellular enzymes by *Pleurotus*

- ostreatus* and *Bjerkandera adusta*. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v.43, p. 93-100, 1999.
- SENE, L., CONVERTI, A., SECCHI, G.A.R., SIMÃO, R.C.G. New aspects on atrazine biodegradation. **Brazilian Archives of Biology and Technology na International Journal**. v.53, n2, p. 487-496,2010.
- SENESI, N. Binding mechanisms of pesticides to soil humic substances. **Science of Total Environment**. v.123 p. 63-76, 1992.
- SILVA, E.; FIALHO, A.M.; AS-CORREIA, I.; BURNS, R.G.; SHAW, L.J. Combined bioaugmentation and biostimulation to cleanup soil contaminated with high concentrations of atrazine. **Environ. Sci. Technol.** V.38 p.632-637, 2004.
- SILVA, R.; GOMES, E. Ligninases. In: SAID, S.; PIETRO, R. C. L. R. (Org.). *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto: Legis Summa. cap. 19, p. 349 – 379, 2004.
- SINDAG. Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola. www.sindag.com.br. Acesso em: 05 Ago. 2009.
- SINITOX. Sistema Nacional de Informações Toxicofarmacológicas. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox>. Acesso em: 07 de Janeiro de 2011.
- SOLOMON, E.I., SUNDARAM, U.M., MACHONKIN, T.E. Multicopper oxidases and oxygenases. **Chem Ver**, v.96, p. 2563-2605, 1996.
- SOLOMON, K.R., BAKER, D.B., RICHARDS, R.P., DIXON, K.R., KLAINE, S.J., LA POINT, T.W., KENDALL, R.J., WEISSKOPF, C.P., GIDDINGS, J.M., GIESY, J.P., HALL, L.W., WILLIAMS, W.M. Ecological risk assessment of atrazine in North American surface waters. Annual Review. **Environmental Toxicology and Chemistry**. v. 15, n.1 p. 31-76, 1996.
- STRUTHERS, J.K.; JAYACHANDRAN, K.; MOORMAN, T.B.. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology** v.64, p. 3368–3375, 1998.
- TAMBELLINI, A.T.; CÂMARA, V.M. Vigilância Ambiental em Saúde: conceitos, caminhos e interfaces com outros tipos de vigilância. *Caderno Saúde Coletiva*. v.10 p.77-93.2002.

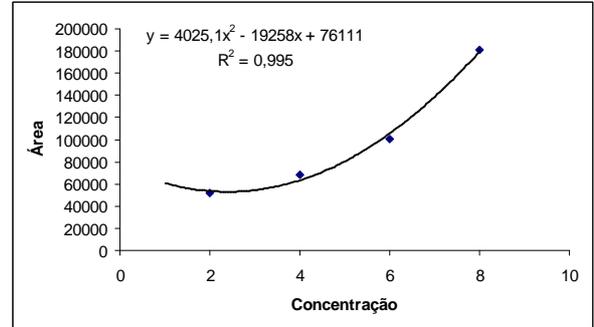
- TEIXEIRA, R.S.S. Produção e caracterização química e bioquímica de xilanases de *Aspergillus awamori*. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro. 2010.
- _____.; PEREIRA, P.M.; FERREIRA-LEITÃO, V.S. Extraction and application of Laccases from Shimeji Mushrooms (*Pleurotus ostreatus*) residues in decolourisation of reactive dyes and a comparative study using commercial Laccase from *Aspergillus oryzae*. **Enzyme Research**. 2010
- THURSTON, C.,F. The structure and function of fungal laccases. **Microbiology**, v.140, p. 19-26, 1994.
- TIEN, M.; KIRK, T. K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* v.81,p. 2280-2284, 1984.
- _____.; KIRK, T. K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. **Methods in Enzymology**, v. 161, p. 238-249, 1988.
- TOPP, E., MULBRY, W.M.; ZHU, H.; NOUR, S.M.; CUPPELS, D. Characterization of s-triazine herbicide metabolism by a Nocardioides sp. isolated from agricultural soils. **Applied and Environmental Microbiology**. v.66, p.3134–3141, 2000.
- TROVALEST-LEROY, M.; JOLIVAT, C.; FROMENT,M-T.; BRASME, B.L.; DAVELOOSE, D.; NACHON, F.; MASSON, P. Application of laccase-mediator system (LMS) for the degradation of organophosphorus compounds. **Chemico-Biological Interactions**. v.187 p. 393-396.2010.
- UETA, J.; PEREIRA, N.L.; SHUHAMA, I.K.; CERDEIRA, A. L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação: microrganismos degradadores do herbicida atrazina. *Biotechnologia*. Brasília,v.10 p.10-13. 1999.
- VASIL'CHENKO, L. G.; KHROMONYGINA, V. V.; KOROLEVA, O. V.; LANDESMAN, E. O.; GAPONENKO, V. V.; KOVALEVA, T. A.; KOZLOV, Y. P.; RABINOVICH, M. L. Consumption of triazine herbicide atrazine by laccase-positive and laccase-negative strains of soil fungus *Mycelia sterilia* INBI 2-26. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 38, n.5,p. 454-459, 2002.
- VOGEL, T. M. Bioaugmentation as a soil bioremediation approach. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 7, p. 311-316, 1996.

- WILKINSON, V.; LUCAS, R. L. Effects of herbicides on the growth of soil fungi. **New Phytologist**, v. 68, p. 709-719, 1969.
- YANZE-KONTCHOU, C. AND GSCHWIND, N. Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain. **Applied and Environmental Microbiology**. v.60, p. 4297–4302, 1994.
- YUECHUN, Z.; XIAOYUN, Y.; MINGHUA, L.; LU, L.; WEIJUAN, M. Biodegradation kinetics of DDT in soil under different environmental conditions by laccase extract from white rot fungi. **Chinese Journal of Chemical Engineering**. v.18, n.3, p.486-492, 2010.
- ZENG, G. M., YA-YU, H., HUANG, D.L., CHEN, Y.N., HUANG, G.H., LI, B.J. Laccase activities of a soil fungus *Penicillium simplicissimum* in relation to lignin degradation. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**. v.22, p.317-324, 2006.

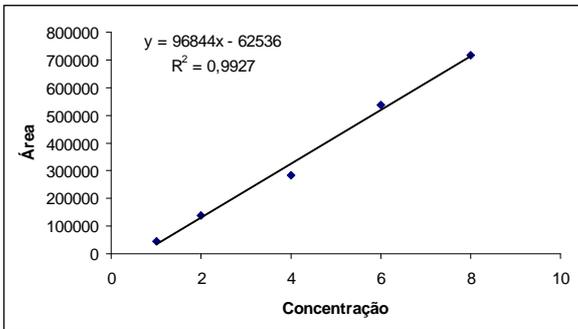
ANEXO 1
Curvas Analíticas



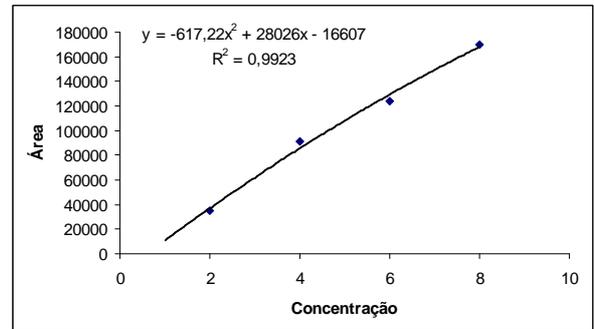
HA



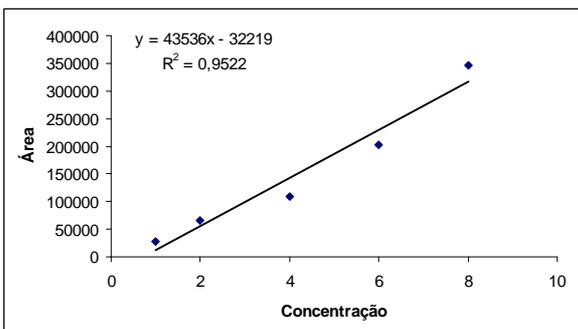
DIHA



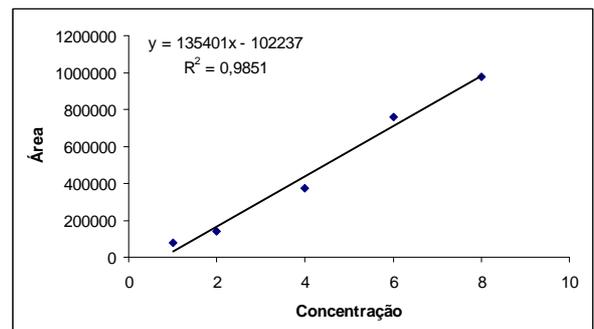
DEA



DEDIA



DEHA



DIA

Figura 27 - Curvas analíticas utilizadas para determinação das concentrações da atrazina e de seus metabólitos formados no processo de degradação.

ANEXO 2

Recuperação

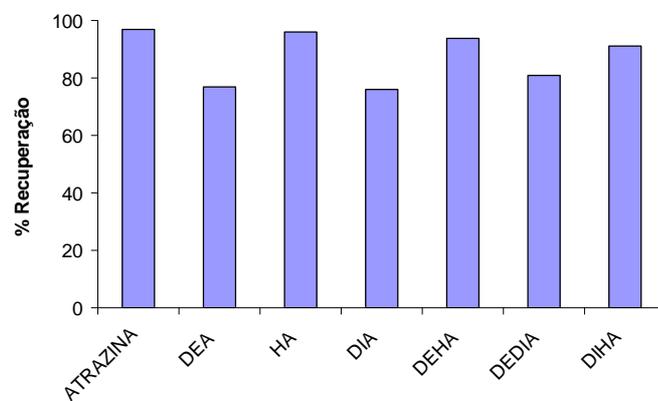


Figura 28 - Porcentagem de recuperação obtida para todos os compostos analisados após extração em cartuchos Oasis MCX.