

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE ENGENHARIA CIVIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DO MEIO AMBIENTE

CAROLINA BRAZ SILVA

REDUÇÃO DO ACEFATO UTILIZANDO LACASES PRODUZIDAS POR
Trametes villosa e *Pycnoporus sanguineus* COM *Trichodermas* ISOLADOS
DO CERRADO.

Goiânia
2011

CAROLINA BRAZ SILVA

**REDUÇÃO DO ACEFATO UTILIZANDO LACASES PRODUZIDAS
POR *Trametes villosa* e *Pycnoporus sanguineus* COM *Trichodermas*
ISOLADOS DO CERRADO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia do Meio Ambiente da Escola de Engenharia Civil da Universidade Federal de Goiás, requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia do Meio Ambiente.

Área de concentração: Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

Orientador: Profa. Dra. Mariângela Fontes Santiago.

Goiânia
Agosto / 2011

CAROLINA BRAZ SILVA

**REDUÇÃO DO ACEFATO UTILIZANDO LACASES PRODUZIDAS
POR *Trametes villosa* e *Pycnoporus sanguineus* COM *Trichodermas*
ISOLADOS DO CERRADO.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Engenharia do Meio Ambiente – PPGEMA da Escola de Engenharia Civil da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de Mestre em Engenharia do Meio Ambiente.

Prof. Dr. Mariangela Fontes Santiago
UFG – Orientadora e Presidente da banca

Prof. Dr. Alexandre Nunes Ponezi
UNICAMP, SP – Examinador Externo

Profa. Dra. Kátia A Kopp
UFG – Examinadora Interna

Profa. Dr Luiz Carlos Cunha
UFG – Examinador Interno

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação na (CIP)
GPT/BC/UFG**

S586r Silva, Carolina Braz.
Redução do Acefato utilizando lacases produzidas por *Trametes villosa* e *Pycnoporus sanguineus* com *Trichodermas* isolados do Cerrado [manuscrito] / Carolina Braz Silva. - 2011.
xv, 98 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mariângela Fontes Santiago.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás,
Escola de Engenharia Civil, 2011.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Apêndices.

1. Acefato. 2. Biorremediação. 3. Lacase. 4 *Trichoderma harzianum*. 5 *Trametes villosa*. 6 *Pycnoporus sanguineus*. I.
Título.

CDU:661.16(213.54)

DEDICATÓRIA

*A Deus pela força nesta caminhada.
Aos meus pais, pelo carinho e apoio
incondicional.*

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Prof. Dra Mariângela Fontes Santiago pela orientação, pelo aprendizado, paciência e dedicação.

A minha “co-orientadora” Valéria de Lima Jardim, pelos inúmeros esclarecimentos desde o início da pesquisa, pelo apoio e ajuda mesmo distante.

A professora Dra. Telma Alves Garcia pelo apoio no laboratório.

Ao professor Dr. Luís Carlos Cunha por ceder gentilmente o Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-farmacológicas – NEPET para o desenvolvimento das análises em GC/MS.

Ao professor Dr. Cirano José Ulhoa por ceder as cepas de *Trichoderma harzianum*.

Ao técnico de laboratório do NEPET, Jerônimo, pela ajuda com as análises em GC/MS.

A Indústria Doles® pela doação dos Kits para a realização dos testes de Colinesterase.

A Arysta Life Science Brasil, por autorizar e doar o agrotóxico utilizado na pesquisa.

Aos professores Dr. Eduardo de Queija Siqueira e Dra Nora kátia Savaedra pelas contribuições durante a qualificação.

Ao meu esposo André, na certeza de que, apesar das dificuldades e das noites interrompidas, valeu a pena, pois a realização pessoal é imprescindível na relação humana.

A minha irmã Lorena e meu cunhado Alan pelo carinho e hospedagem nos últimos meses da pesquisa.

A minha prima Renata que também abriu as portas de sua casa para me hospedar quando necessário.

Aos colegas da turma Abner, Leonora, Patrícia, Cinthia e Francismeire pelo companheirismo e momentos de estudo.

A minha coordenadora Mara Rúbia por compreender os momentos de ausência durante as reuniões.

A minha amiga Cecília Santiago pela revisão e pelas dicas no trabalho.

Aos professores do PPGEMA pelo conhecimento e orientação.

Agradeço a UFG pela concessão da bolsa, que muito me ajudou e contribuiu para o desenvolvimento do mestrado.

SILVA, B. C. **REDUÇÃO DO ACEFATO UTILIZANDO LACASES PRODUZIDAS POR *Trametes villosa* e *Pycnoporus sanguineus* COM *Trichodermas* ISOLADOS DO CERRADO.** Dissertação de Mestrado. Engenharia do Meio Ambiente – Escola de Engenharia Civil, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2011, 98p.

RESUMO

Os inseticidas organofosforados têm sido amplamente utilizados para fins agrícolas. No ambiente, os organofosforados têm sido encontrados em diversas matrizes ambientais, resultando em uma crescente preocupação ambiental, dentre estes compostos destaca-se o Acefato, organofosforado que teve seu registro reavaliado pela ANVISA em 2009, devido ao seu potencial toxicológico e carcinogênico. O desenvolvimento deste trabalho buscou selecionar linhagens de *Trichoderma harzianum* capazes de estimular a produção enzimática por *Trametes villosa* e *Pycnoporus sanguineus* a fim de promover a diminuição da toxicidade do Acefato. Primeiramente realizou-se a seleção das linhagens de *T. harzianum*, em seguida fez-se o cultivo misto das linhagens selecionadas de *T. harzianum* com *Trametes villosa* e *T. harzianum* com *Pycnoporus sanguineus* para verificar o potencial de produção das enzimas, e posteriormente foram realizados os ensaios com concentrações de 10% e 50% de Acefato, em seguida realizou-se os teste de toxicidade para avaliar a redução da toxicidade do Acefato. Os resultados obtidos nos experimentos demonstram que as linhagens de *T. harzianum* são bons produtores de Lignina peroxidase (45 U.mL^{-1}) e Manganês peroxidase (23 UmL^{-1}), as linhagens de *T. harzianum* foram capazes de aumentar a produção de Lacase no cultivo com *T. villosa* ($20,57 \text{ UmL}^{-1}$) e que os fungos avaliados produziram mais enzimas na presença de 50% de Acefato. Nos testes de toxicidade, as amostras com 10% de Acefato tratadas pelos fungos indicaram que em relação ao controle, a associação de *P. sanguineus* e o *Trichoderma* T47 teve aumento de 94% de Colinesterase, indicando diminuição de sua toxicidade, na associação de *P. sanguineus* e *Trichoderma harzianum* ALL42 aumento de 93% e na associação entre *T. villosa* e o *T. harzianum* T39, aumento de 100% de Colinesterase, indicando que os fungos foram capazes de reduzir a toxicidade do Acefato.

Palavras-chave: Acefato, Biorremediação, Lacase, *Trichoderma harzianum*, *Trametes villosa*, *Pycnoporus sanguineus*.

ABSTRACT

The organophosphate insecticides have been widely used for agricultural purposes. In the environment, organophosphates have been found in various environmental matrices, resulting in a growing environmental concern, among these compounds stands out Acephate, organophosphate and was registered by ANVISA reassessed in 2009, due to their toxicological and carcinogenic potential. The development of this work sought to select strains of *Trichoderma harzianum* capable of stimulating enzyme production by *Trametes villosa* and *Pycnoporus sanguineus* to promote the reduction of toxicity of Acephate. First there was the selection of strains of *T. harzianum* then became mixed cropping of selected strains of *T. harzianum* with *Trametes villosa* and *T. harzianum* with *Pycnoporus sanguineus* to determine the potential production of enzymes, and further tests were carried out with concentrations of 10% and 50% Acephate then held the toxicity test to assess the reduction of toxicity of Acephate. The results obtained in the experiments show that linhanges *T. harzianum* are good producers of lignin peroxidase (45 U.mL^{-1}) and manganese peroxidase (23 Uml^{-1}), the strains of *T. harzianum* were able to increase the production of Laccase in culture with *T. villosa* (20.57 Uml^{-1}) and assessed that the fungi produced more enzymes in the presence of 50% Acephate. In toxicity tests, the samples with 10% Acephate addressed by the fungi indicated that compared to control, the association of *P. sanguineus* and *Trichoderma* T47 increased by 94% of cholinesterase, indicating a decrease in its toxicity, the association of *P. sanguineus* and *Trichoderma harzianum* ALL42 increase of 93% and the association between *T. villosa* and *T. harzianum* T39, an increase of 100% of cholinesterase, indicating that fungi were able to reduce the toxicity of Acephate

Keywords: Acephate, Bioremediation, Laccase, *Trichoderma harzianum*, *Trametes villosa*, *Pycnoporus saguineus*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Fórmula química estrutural do Acefato (ANVISA, 2009).....	8
FIGURA 2 -	Fórmula química estrutural do Metamidofós (ANVISA, 2009)...	8
FIGURA 3 -	Fluxograma do Processo de extração das amostras.....	29
FIGURA 4 -	Produção de Lacase pelas diferentes linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> em condição de agitação.....	32
FIGURA 5 -	Produção de Lignina peroxidase pelas diferentes linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> em condição de agitação.....	33
FIGURA 6 -	Produção de Manganês peroxidase pelas diferentes linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> em condição de agitação.....	34
FIGURA 7 -	Produção de Lacase pelas diferentes linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> em condição estática.....	34
FIGURA 8 -	Produção de Lignina peroxidase pelas diferentes linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> em condição estática.....	35
FIGURA 9 -	Produção de Manganês peroxidase pelas diferentes linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> em condição estática.....	35
FIGURA 10 -	Atividade enzimática de <i>Trametes villosa</i> em associação com as linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> em condição de agitação...	37
FIGURA 11 -	Atividade enzimática de <i>Trametes villosa</i> em associação com as linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> em condição estática.....	40
FIGURA 12 -	Atividade enzimática de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em associação com as linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> em condição de agitação.....	40
FIGURA 13 -	Atividade enzimática de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em associação com as linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> em condição estática.....	41
FIGURA 14 -	Atividade enzimática de <i>Trametes villosa</i> em associação com T34 na presença de Acefato 10% em condição estática.....	47
FIGURA 15 -	Atividade enzimática de <i>Trametes villosa</i> em associação com T 39 na presença de Acefato 10% em condição estática.....	48
FIGURA 16 -	Atividade enzimática de <i>Trametes villosa</i> em associação com T	48

	39 na presença de Acefato 50% em condição estática.....	
FIGURA 17 -	Atividade enzimática de <i>Trametes villosa</i> em associação com T 49	
	47 na presença de Acefato 50% em condição estática.....	
FIGURA 18 -	Atividade enzimática de <i>Trametes villosa</i> em associação com 49	
	ALL42 na presença de Acefato 50% em condição estática.....	
FIGURA 19 -	Atividade enzimática de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em associação 52	
	com T47 na presença de Acefato 10% em condição de agitação..	
FIGURA 20 -	Atividade enzimática de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em associação 52	
	com ALL42 na presença de Acefato 10% em condição de	
	agitação.....	
FIGURA 21 -	Cromatograma do padrão Acefato.....	56
FIGURA 22 -	Cromatograma do padrão Metamidofós.....	57
FIGURA 23 -	Grupo controle – solução de Acefato na concentração de 10%.....	57
FIGURA 24 -	Grupo controle – solução de Acefato na concentração de 50%.....	57
FIGURA 25 -	Cromatograma da associação entre <i>P. sanguineus</i> e T47 – 10%... 57	
FIGURA 26 -	Cromatograma da associação entre <i>P. sanguineus</i> e T47 – 10%... 57	
FIGURA 27 -	Cromatograma da associação entre <i>P. sanguineus</i> e ALL42 – 58	
	10%.....	
FIGURA 28 -	Cromatograma da associação entre <i>P. sanguineuse</i> ALL42 – 58	
	10%.....	
FIGURA 29 -	Cromatograma da associação entre <i>T. villosa</i> e T39 – 10%..... 58	
FIGURA 30 -	Cromatograma da associação entre <i>T. villosa</i> e T39 – 10%..... 58	
FIGURA 31 -	Cromatograma da associação entre <i>T. villosa</i> e ALL42 – 10%..... 58	
FIGURA 32 -	Cromatograma da associação entre <i>T. villosa</i> e ALL42 – 10%..... 58	
FIGURA 33 -	Cromatograma da associação entre <i>T. villosa</i> e T34 – 50%..... 58	
FIGURA 34 -	Cromatograma da associação entre <i>T. villosa</i> e T34 – 50%..... 58	
FIGURA 35 -	Cromatograma da associação entre <i>T. villosa</i> e T39 – 50%..... 58	
FIGURA 36 -	Cromatograma da associação entre <i>T. villosa</i> e T39 – 50%..... 58	
FIGURA 37 -	Cromatograma da associação entre <i>T. villosa</i> e T47 – 50%..... 59	
FIGURA 38 -	Cromatograma da associação entre <i>T. villosa</i> e T47 – 50%..... 59	
FIGURA 39 -	Cromatograma da associação entre <i>T. villosa</i> e ALL42 – 50%..... 59	
FIGURA 40 -	Cromatograma da associação entre <i>T. villosa</i> e ALL42 – 50%..... 59	
FIGURA 41-	Atividade da Colinesterase em amostra tratada pela associação 78	

	fúngica entre <i>P. sanguineus</i> e o <i>Trichoderma</i> T47.....	
FIGURA 42 -	Atividade da Colinesterase em amostra tratada pela associação fúngica entre <i>P. sanguineus</i> e o <i>Trichoderma</i> ALL42.....	62
FIGURA 43 -	Atividade da Colinesterase em amostra tratada pela associação fúngica entre <i>T. villosa</i> e o <i>Trichoderma</i> T39.....	62
FIGURA 44 -	Atividade da Colinesterase em amostra tratada pela associação fúngica entre <i>T. villosa</i> e o <i>Trichoderma</i> ALL42.....	63
FIGURA 45 -	Atividade da Colinesterase em amostra tratada pela associação fúngica entre <i>T. villosa</i> e o <i>Trichoderma</i> T34.....	64
FIGURA 46 -	Atividade da Colinesterase em amostra tratada pela associação fúngica entre <i>T. villosa</i> e o <i>Trichoderma</i> T39.....	64
FIGURA 47 -	Atividade da Colinesterase em amostra tratada pela associação fúngica entre <i>T. villosa</i> e o <i>Trichoderma</i> T47.....	65
FIGURA 48 -	Atividade da Colinesterase em amostra tratada pela associação fúngica entre <i>T. villosa</i> e o <i>Trichoderma</i> ALL42.....	65

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1-	Propriedades Físico-Químicas do Acefato.....	7
QUADRO 2 -	Propriedades Físico-Químicas do Metamidofós.....	9
QUADRO 3 -	Estudos que utilizaram técnicas de Cromatografia para identificação e quantificação de organofosforado.....	18
QUADRO 4 -	Fungos utilizados na pesquisa.....	20
QUADRO 5-	Associações entre os fungos.....	23
QUADRO 6 -	Programação do GC/MS utilizada nas análises.....	28
QUADRO 7 -	Associações fúngicas com melhor desempenho na produção de Lacase.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Tabela 1: Média da produção enzimática na associação de <i>Trametes villosa</i> com linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> na presença de Acefato 10% e 50% em condição de agitação e teste estatístico U (ou Mann Whitney).....	43
TABELA 2 -	Média da produção enzimática na associação de <i>Trametes villosa</i> com linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> na presença de Acefato 10% e 50% em condição estática e teste estatístico U (ou Mann Whitney).....	46
TABELA 3 -	Média da produção enzimática na associação de <i>Pycnoporus sanguineus</i> com linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> na presença de Acefato 10% e 50% em condição de agitação e teste estatístico U (ou Mann Whitney).....	50
TABELA 4 -	Média da produção enzimática na associação de <i>Pycnoporus sanguineus</i> com linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> na presença de Acefato 10% e 50% em condição estática e teste estatístico U (ou Mann Whitney).....	53

APÊNDICE A

QUADROS DE VALORES DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA NA ETAPA DE SELEÇÃO DAS LINHAGENS DE *Trichoderma harzianum*

QUADRO A - 1	Seleção de linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> em condição de agitação – Produção de Lacase.....	76
QUADRO A - 2	Seleção de linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> em condição de agitação – Produção de Lignina peroxidase.....	78
QUADRO A - 3	Seleção de linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> em condição de agitação – Produção de Manganês peroxidase.	80
QUADRO A - 4	Seleção de linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> em condição estática– Produção de Lacase.....	81
QUADRO A - 5	Seleção de linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> em condição estática– Produção de Lignina peroxidase	83
QUADRO A - 6	Seleção de linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> em condição estática - Produção de Manganês peroxidase.....	85

APÊNDICE B

TABELA DE VALORES DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA NA ETAPA DE ASSOCIAÇÃO ENTRE AS LINHAGENS DE *Trichoderma harzianum* E OS FUNGOS BASIDIOMICETOS

TABELA B - 1	Produção média da Associação entre <i>T. villosa</i> e as linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> e análise estatística - Teste U (ou Mann Whitney).....	86
TABELA B - 2	Produção média da Associação entre <i>P. sanguineus</i> e as linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> e análise estatística - Teste U (ou Mann Whitney).....	88

APÊNDICE C

TABELA DE VALORES DA ENZIMA COLINESTERASE APÓS TRATAMENTO POR ENZIMAS FÚNGICAS

TABELA C - 1	Análise estatística descritiva de <i>P. sanguineus</i> com T47 e teste ANOVA.....	90
TABELA C - 2	Teste de Tukey da amostra de <i>P. sanguineus</i> em associação com T47.....	91
TABELA C - 3	Análise estatística descritiva de <i>P. sanguineus</i> com ALL42 e teste ANOVA.....	92
TABELA C - 4	Teste de Tukey da amostra de <i>P. sanguineus</i> em associação com ALL42.....	92
TABELA C - 5	Análise estatística descritiva de <i>T. villosa</i> com T39 e teste ANOVA.....	93
TABELA C - 6	Teste de Tukey da amostra de <i>T. villosa</i> em associação com T39.....	93
TABELA C - 7	Análise estatística descritiva de <i>T. villosa</i> com ALL42 e teste ANOVA.....	94
TABELA C - 8	Teste de Tukey da amostra de <i>T. villosa</i> em associação com ALL42.....	94
TABELA C - 9	Análise estatística descritiva de <i>T. villosa</i> com T34 e teste ANOVA.....	95
TABELA C - 10	Teste de Tukey da amostra de <i>T. villosa</i> em associação com T34.....	95
TABELA C - 11	Análise estatística descritiva de <i>T. villosa</i> com T39 e teste ANOVA.....	96
TABELA C - 12	Teste de Tukey da amostra de <i>T. villosa</i> em associação com T39.....	96
TABELA C - 13	Análise estatística descritiva de <i>T. villosa</i> com T47 e teste ANOVA.....	97
TABELA C - 14	Teste de Tukey da amostra de <i>T. villosa</i> em associação com T47.....	97

TABELA C - 15	Análise estatística descritiva de <i>T. villosa</i> com ALL42 e teste ANOVA.....	98
TABELA C - 16	Teste de Tukey da amostra de <i>T. villosa</i> em associação com ALL42.....	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BGA	Batata, Glicose e Ágar
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
EPA	Environmental Protection Agency
FF	Faculdade de Farmácia
GC/MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas
GUS	Índice de Vulnerabilidade de Água Subterrânea
HAP's	Hidrocarboneto Aromático Policíclico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
K _{OC}	Coefficiente de Adsorção à Matéria Orgânica
K _{OW}	Coefficiente de Partição Octanol-Água
LiP	Lignina peroxidase
LENZIBIO	Laboratório de Enzimologia e Biocatálise Ambiental
Lcc	Lacase
LMR	Limite Máximo de Resíduos
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MnP	Manganês peroxidase
NEPET	Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-farmacológicas
PARA	Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos
pH	Potencial Hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
USEPA	United States Environmental Protection Agency
UFG	Universidade Federal de Goiás

SUMÁRIO

RESUMO		viii
ABSTRACT		ix
LISTA DE FIGURAS		x
LISTA DE QUADROS		xiii
LISTA DE TABELAS		xiv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS		xviii
01	INTRODUÇÃO	01
02	JUSTIFICATIVA	03
03	OBJETIVOS	05
	3.1 OBJETIVO GERAL.....	05
	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	05
04	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	06
	4.1 ACEFATO E METAMIDOFÓS.....	06
	4.2 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR AGROTÓXICOS.....	10
	4.3 BIODEGRAÇÃO DE POLUENTES QUÍMICOS POR FUNGOS.....	12
	4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS: CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS E TESTE COLORIMÉTRICO	16
5.0	MATERIAIS E MÉTODOS	20
	5.1 ORIGEM DOS FUNGOS.....	20
	5.2 MEIO DE CULTURA.....	21
	5.3 MANUTENÇÃO DOS FUNGOS.....	21
	5.4 CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO.....	22
	5.4.1 Seleção das linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i>	22
	5.4.2 Associação entre <i>Trametes villosa</i> e <i>Trichoderma harzianum</i> e associação entre <i>Pycnoporus sanguineus</i> e <i>Trichoderma harzianum</i>	23

5.5	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	24
5.6	AGROTÓXICOS.....	25
5.7	PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE.....	26
5.8	DEGRADAÇÃO DO AGROTÓXICO EM MEIO LÍQUIDO NAS CONCENTRAÇÕES DE 10% E 50% DE ACEFATO.....	26
5.9	ANÁLISE DO EXTRATO APÓS TRATAMENTO POR FUNGO PELA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	27
5.10	ANÁLISE DO ACEFATO APÓS O TRATAMENTO UTILIZANDO O TESTE COLORIMÉTRICO DE IDENTIFICAÇÃO DA COLINESTERASE.....	30
5.11	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	31
6.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	32
6.1	SELEÇÃO DAS LINHAGENS DE <i>Trichoderma harzianum</i>	32
6.1.1	Cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i> em meio líquido na condição de agitação	32
6.1.2	Cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i> em meio líquido na condição estática.....	34
6.2	ASSOCIAÇÃO ENTRE AS LINHAGENS SELECIONADAS DE <i>Trichoderma harzianum</i> E FUNGOS DE DECOMPOSIÇÃO BRANCA.....	36
6.2.1	Cultivo das linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> selecionadas com <i>Trametes villosa</i> em condição de agitação e produção das enzimas.....	36
6.2.2	Cultivo das linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> selecionadas com <i>Trametes villosa</i> em condição estática	38
6.2.3	Cultivo das linhagens selecionadas de <i>Trichoderma harzianum</i> com <i>Pycnoporus sanguineus</i> em condição de agitação e produção das enzimas.....	39
6.2.4	Cultivo das linhagens selecionadas de <i>Trichoderma harzianum</i> com <i>Pycnoporus sanguineus</i> em condição estática e produção de enzimas.....	40
6.3	DEGRADAÇÃO DO ACEFATO EM MEIO LÍQUIDO.....	42

6.3.1	Degradação do Acefato em meio líquido pela associação de <i>Trametes villosa</i> com as linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> na condição de agitação.....	43
6.3.2	Degradação do Acefato em meio líquido pela associação de <i>Trametes villosa</i> e as linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> em condição estática.....	45
6.3.3	Degradação do Acefato em meio líquido pela associação de <i>Pycnoporus sanguineus</i> e <i>Trichoderma harzianum</i> em condição de agitação.....	50
6.3.4	Degradação do Acefato em meio líquido pela associação de <i>Pycnoporus snaguineus</i> e as linhagens de <i>Trichoderma harzianum</i> em condição estática.....	53
6.4	ANÁLISE DO ACEFATO APÓS TRATAMENTO	54
6.4.1	Análise do extrato após tratamento por fungo pela técnica de cromatografia gasosa acoplada espectrometria de massas.....	55
6.4.2	Análise do acefato após o tratamento utilizando o teste Colorimétrico de identificação da Colinesterase.....	60
7.0	CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES.....	67
8.0	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
APÊNDICE A.....		76
APÊNDICE B.....		86
APÊNDICE C.....		90

1. INTRODUÇÃO

A qualidade de vida está intimamente ligada à qualidade ambiental. Há algumas décadas, acreditava-se na existência de uma abundância infinita de recursos. Hoje, no entanto é possível verificar que os recursos naturais são limitados e que as condições em que se encontram refletem o descuido e a negligência em sua utilização.

A expansão das fronteiras agrícolas trouxe benefícios à população e à economia mundial, mas aliada à oferta de alimentos e à uma produção anual cada vez mais crescente, observa-se o grande consumo de insumos agrícolas (SOUZA, 2006). O mercado mundial movimenta bilhões de dólares, com o comércio de insumos agrícolas. Os agrotóxicos são os principais itens comercializados e são responsáveis por reduzirem consideravelmente os prejuízos na produção causados por insetos, plantas daninhas e fungos patogênicos (TREVISAN, et al., 2002).

O Brasil tem grande parte de sua economia baseada na atividade agrícola e foi classificado em 2006 como o segundo maior consumidor de agrotóxicos no mundo e oitavo em uso por área cultivada (ANVISA, 2006). Esse modelo produtivo resulta em desequilíbrio ambiental, alterando a composição da flora e fauna, além de promover a contaminação dos ecossistemas em todos os níveis.

Neste contexto, a busca de novas técnicas e metodologias que priorizem a redução da disponibilidade destes agrotóxicos no meio é essencial para garantir um ambiente equilibrado e menos prejudicial à vida em todas as suas esferas. Logo, o estudo de enzimas fúngicas com potencial para aplicações ambientais, representa uma alternativa promissora, pois a origem natural, a não-toxicidade, e a facilidade no cultivo dos fungos e separação de suas enzimas têm estimulado uma infinidade de pesquisas sobre sua aplicabilidade (WIDSTEN & KANDELBAUER, 2008).

Jaques et al. (2009) destacam que os microrganismos utilizados no processo podem ser isolados do próprio sítio contaminado e comparada a outras tecnologias, a biorremediação pode ser considerada de baixo custo. Além de explorar a diversidade metabólica dos microrganismos que convivem com os poluentes há vários anos.

A biorremediação é uma alternativa que oferece a possibilidade de eliminar ou tornar inofensivos vários contaminantes através da atividade biológica de plantas ou microrganismos. Esta técnica pode ser definida como o processo pelo qual os resíduos orgânicos são biologicamente degradados, em condições controladas, para um estado inócuo ou em níveis abaixo dos limites de concentração estabelecidos pelas legislações

vigentes (VIDALI, 2001). É uma técnica que representa baixa toxicidade e proporciona uma sustentabilidade para o ecossistema, devolvendo ao meio ambiente, compostos menos tóxicos que podem ser reintegrados nos ciclos biogeoquímicos naturais.

De acordo com UETA et al. (2009), a biorremediação pode ser considerada uma alternativa viável por explorar a diversidade metabólica dos microrganismos, utilizando enzimas que degradam compostos químicos complexos em substâncias mais simples. Jaques et al. (2009) destacam que nos processos de biorremediação pode-se identificar uma série de processos realizados por microrganismos, capazes de promover a remediação de ambientes contaminados, com destaque para os processos de bioestimulação, bioventilação, bioaspersão e bioaumentação.

A biodegradação microbiana por exemplo, corresponde ao mecanismo primário de eliminação dos poluentes orgânicos do ambiente, sendo de grande importância a manutenção de uma comunidade microbiana heterotrófica ativa, o processo é baseado em reações bioquímicas mediadas por microrganismos e dependem da presença de oxigênio comoceptor final de elétrons ou íons orgânicos alternativos como aceptores finais de elétrons. Vários são os microrganismos degradadores e por isso diferentes reações de transformação, catalisadas por eles, estão envolvidas no processo de degradação (SILVA & FAY, 2004).

Gaylarde, Bellinaso & Manfio (2005) destacam que cada processo de biorremediação é particular. Desta forma, a aplicação em diferentes sítios afetados, requer uma adequação e uma análise integrada dos parâmetros físicos, químicos e biológicos do local de aplicação e das condições ótimas dos microrganismos adotados. Neste sentido, pesquisas têm sido realizadas buscando identificar microrganismos com potencial biodegradador.

De acordo com Belinasso (2002), nos últimos anos, os pesquisadores têm dado maior atenção à obtenção de consórcios microbianos degradadores de compostos recalcitrantes que, comparativamente às culturas puras, têm se mostrado mais efetivos na degradação destes compostos, devido a três fatores principais: (1) à maior disponibilidade e variedade de fontes de carbono e energia; (2) pela maior taxa de degradação e, principalmente, (3) pela maior mineralização destes compostos, verificando a possibilidade de um processo de biorremediação mais efetivo, pois os poluentes têm maiores chances de serem completamente eliminados do ambiente, considerando que os produtos de um organismo podem ser substratos para outros.

2. JUSTIFICATIVA

Os inseticidas organofosforados têm sido amplamente utilizados para fins agrícolas há mais de 40 anos. A utilização desta classe de pesticidas é favorecida sobre os organoclorados devido à sua capacidade de se degradar mais facilmente no meio ambiente e a restrições do uso de organoclorados em diversos países. No ambiente, os organofosforados têm sido encontrados em solos, águas subterrâneas, águas de superfície, lagoas e água potável em diferentes concentrações e, portanto, há uma crescente preocupação ambiental com relação a estes compostos (DIMITRA & TRIANTAFYLLOS, 2001).

Konstantinou, Dimitra & Triantafyllos (2006), em seu estudo sobre a contaminação em águas superficiais por agrotóxicos, relataram que o uso de agrotóxicos aumentou drasticamente nas duas últimas décadas e, como consequência, a contaminação de várias matrizes ambientais. De acordo com estes autores, os resíduos dos agrotóxicos podem atingir o ambiente aquático através de contato direto com o corpo hídrico, através de processos de lixiviação, pela eliminação de embalagens vazias, pela lavagem dos equipamentos e pelo transporte inadequado destes produtos.

Ao analisarmos o uso crescente dos agrotóxicos, aliado à sua intensidade de contaminação nas coleções hídricas, afetando diretamente as águas para o consumo, verifica-se a necessidade do estudo de alternativas para tratamento e remoção destes compostos do solo e dos recursos hídricos.

As enzimas produzidas por microrganismos representam uma alternativa viável e promissora com capacidade de promover a degradação destes compostos recalcitrantes, transformando-as e, em alguns casos, promovendo a mineralização destes compostos (BALDRIAN, 2006).

O organofosforado Acefato teve seu registro reavaliado pela ANVISA em 2009, devido ao seu potencial carcinogênico e risco em relação à exposição crônica em doses baixas, foram propostas algumas alterações, quanto ao modo de aplicação do produto e a restrição no uso de algumas culturas (ANVISA, 2010). Assim, o uso de microrganismos capazes de promover a degradação deste composto e a consequente redução de sua toxicidade, representa uma ferramenta tecnológica que pode contribuir para minimizar os efeitos adversos destes compostos no meio. Diante do exposto optou-se por trabalhar com o organofosforado Acefato, a fim de verificar o potencial das enzimas produzidas pelos fungos *Trametes villosa* e *Pycnoporus sanguineus* em degradar o Acefato

e reduzir a sua toxicidade. A escolha dos basidiomicetos levou em consideração os dados da literatura científica que relatam o grande potencial deste grupo de microrganismos em utilizar os compostos recalcitrantes como fonte de carbono e energia.

Nesta perspectiva, além de identificar microrganismos com potencial para aplicação nos processos de biorremediação, buscou-se estimular o aumento na produção enzimática a fim de tornar o processo viável com possibilidades de aplicação em grande escala, trabalhando com o *Trichoderma harzianum*, um ascomiceto, que têm sido utilizado em pesquisas como agente indutor na produção de enzimas, um microrganismo fácil de ser isolado e cultivado, apresentando vantagens sobre os indutores químicos que podem ser tóxicos e em alguns casos de alto custo.

Desta forma, a pesquisa envolvendo o processo de biorremediação buscou contribuir com informações sobre a produção enzimática de duas linhagens de fungos *Trametes villosa* e *Pyconoporus sanguineus*, bem como o uso de linhagens de *Trichoderma harzianum* isolados do solo do Cerrado com potencial para degradar o agrotóxico Acefato, fornecendo, assim, informações que possam contribuir para a aplicação dos processos de biorremediação em campo.

O interesse pela biodegradação dos agrotóxicos baseia-se na possibilidade de redução da contaminação ambiental, bem como reduzir os riscos causados aos seres vivos devido a sua toxicidade e também pelo potencial carcinogênico de alguns compostos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi promover a redução do Acefato por meio dos fungos *Trametes villosa* e *Pycnoporus sanguineus* utilizando associações com diferentes linhagens do ascomiceto *Trichoderma harzianum* (T34, T39, T47 e ALL42), capazes de aumentar a produção de Lacases.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Promover a biotransformação ou degradação do organofosforado Acefato através da ação enzimática das Lacases;

3.2.2 Realizar ensaios com diferentes linhagens de *Trichoderma harzianum* a fim de seleccionar as linhagens com maior potencial para a produção de Lacases;

3.2.3 Promover associações de *Trametes villosa* com linhagens de *Trichoderma harzianum* e associações de *Pycnoporus sanguineus* com linhagens de *Trichoderma harzianum* e verificar quais associações são capazes de apresentar uma melhor produção enzimática.

3.2.4 Determinar a atividade enzimática de Lacase, Manganês peroxidase e Lignina peroxidase;

3.2.5 Analisar a degradação do Acefato e detectar se houve a formação do seu metabólito Metamidofós nas amostras submetidas ao tratamento pelos fungos, através da análise em Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG/MS);

3.2.7 Verificar através de teste Colorimétrico os níveis de toxicidade do Acefato alcançados após o tratamento com o fungo e se houve a formação do metabólito Metamidofós.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 ACEFATO E METAMIDOFÓS

Os agrotóxicos são compostos químicos ou biológicos utilizados com a finalidade de alterar a fauna ou flora local com o intuito de preservá-la da ação danosa de seres vivos nocivos (BRASIL, 1989). No Brasil, os agrotóxicos comercializados correspondem a cerca de 300 princípios ativos e duas mil formulações comerciais diferentes e são reconhecidos como pesticidas, praguicidas ou defensivos agrícolas (PIVELLI, 2009).

De acordo com a ação e o grupo químico ao qual pertencem os agrotóxicos, eles são classificados em: herbicidas, inseticidas, fungicidas, raticidas, acaricidas, nematocidas, molusquicidas e fumigantes. Os herbicidas representam a classe de agrotóxicos mais consumidos no meio rural, tanto no âmbito mundial como no Brasil, seguidos dos inseticidas e fungicidas (OLIVEIRA-SILVA et al., 2001; UETA et al., 1999).

Os inseticidas organofosforados apresentam em sua constituição, um átomo central de fósforo pentavalente ao qual está ligado um átomo de oxigênio ou enxofre mediante dupla ligação com propriedades apolares. Estes são compostos derivados dos ácidos fosfóricos, tiofosfóricos ou do ácido ditiofosfórico, contendo várias combinações de carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, enxofre e nitrogênio, apresentando vários grupos de acordo com sua estrutura (SUCEN, 2001).

O Acefato ($C_4H_{10}NO_3PS$) é conhecido quimicamente como *O,S-dimethylacetylphosphoramidothioate*, nº CAS 30560-19-1 (Figura 1) é um ingrediente ativo comercializado com mais de 100 tipos de formulações, com boas propriedades inseticidas e acaricidas (RAININA et al., 1996). Possui DL_{50} oral 1400mg.kg⁻¹ e DL_{50} dérmica 10250mg.kg⁻¹ (ANVISA, 2009; ARYSTA LIFE SCIENCE, 2009).

Este composto é empregado na agricultura para o controle de insetos e é inibidor da enzima acetilcolinesterase nas sinapses nervosas, provocando a passagem contínua dos impulsos nervosos, levando o inseto à fadiga e, conseqüentemente, à morte.

De acordo com a ANVISA (2009) os organofosforados apresentam modo de ação semelhante em invertebrados (organismos alvo) e em vertebrados (organismos não alvo), inibindo de forma similar a acetilcolinesterase.

De acordo com o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) (2010), o Acefato tem registro para uso no cultivo de algodão, amendoim, couve, batata, brócolis, citros, couve-flor, crisântemo, fumo, melão, pimenta, repolho vermelho, rosas, soja e tomate e no tratamento de sementes de algodão e feijão destinados ao plantio. O produto é considerado um dos dez mais importantes organofosforados em volume de venda no mundo (MAHAJNA, QUISTAD & CASIDA, 1996).

O Acefato é comercializado sob a forma sólida, com ponto de fusão situado entre 81 e 91°C e altamente solúvel em água, acetona e etanol. O composto apresenta classificação toxicológica nível III. No quadro 1 abaixo estão representadas as principais propriedades físicas e químicas do Acefato.

Quadro 1: Propriedades Físico-Químicas do Acefato.

PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS	VALOR	REFERÊNCIA
Peso molecular	183,16 g/mol	ANVISA (2009)
Pressão de vapor a 24°C	1,7 x 10 ⁻⁶ mm Hg	ANVISA (2009)
Coefficiente de Partição Octanol – Água (k _{ow})	0,13	ANVISA (2009)
Índice de Vulnerabilidade de Águas Subterrânea (GUS)	1,76	ANVISA (2009)
Coefficiente de Adsorção à Matéria Orgânica (K _{oc})	2 mL.g ⁻¹	ANVISA (2009)
Ponto de fusão	82° a 89°	Tomlin (1995)
Meia vida em solo (T _{1/2})	3 dias	Milhome et al. (2009)
Meia vida em água (T _{1/2})	50 dias	Milhome et al. (2009)

A pressão de vapor de um composto orgânico representa a pressão à determinada temperatura em que a fase de vapor (gás) está em equilíbrio com a fase líquida e é utilizada principalmente no cálculo da volatilização da molécula (SILVA & FAY, 2004). A pressão de vapor do Acefato indica que ele é um composto de maior mobilidade e volatilização e, conseqüentemente, de menor persistência.

O Coeficiente de Partição Octanol-Água indica a relação da concentração de um agrotóxico na fase de n-octanol saturado em água e sua concentração na fase aquosa saturada em n-octanol. De forma geral, esse coeficiente indica a mobilidade da molécula orgânica após a sua aplicação no solo (SILVA & FAY, 2004). Este coeficiente indica que o composto é pouco adsorvido aos colóides do solo, evidenciando alto potencial de lixiviação.

Para verificar a possibilidade de contaminação de água subterrânea, pode-se usar o índice GUS (Índice de Vulnerabilidade de Águas Subterrâneas), que é calculado por meio dos valores de meia-vida do composto no solo ($T_{1/2}$) e do coeficiente de adsorção à matéria orgânica do solo (K_s).

No ambiente, o Acefato (Figura 1) degrada-se em Metamidofós, conhecido quimicamente como O, S - dimetil fosforamidotioato, n.º CAS: 10265-92-6 (Figura 2), composto organofosforado que também é usado como inseticida e acaricida, caracterizado pela inibição das acetilcolinesterase, enzima essencial na transmissão dos impulsos nervosos. O Metamidofós tem registro no MAPA para uso em culturas de algodão, amendoim, batata, feijão, soja, tomate é um composto altamente tóxico, aos mamíferos, aves e insetos e apresenta classificação toxicológica nível I (TREVISAN, 2002).

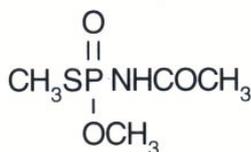


Figura 1: Fórmula química estrutural do Acefato (ANVISA, 2009).

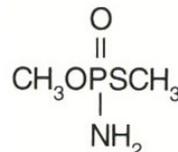


Figura 2: Fórmula química estrutural do Metamidofós (ANVISA, 2009).

O produto também é conhecido comercialmente como Monitor®, Tam®, Nitofol®, Swipe®, Nuratron®, Vetaron®, Filitox®, Patrole®, Tamanox®, SRA 5172® ou Tamaron®. A concentração do ingrediente ativo varia conforme o fabricante, sendo comercializado em formulações não-aquosas concentradas, como concentrados emulsificantes, granulados e sprays (LIMA et al., 2001).

De acordo com a ANVISA (2009) é um produto altamente tóxico aos mamíferos, aves e insetos. Produz desgaste dos EPI como respirador, óculos de proteção para químicos, luvas de borracha e roupa protetora impermeável.

No quadro 2 estão representadas as principais propriedades físicas e químicas do Metamidofós.

Quadro 2: Propriedades Físico-Químicas do Metamidofós.

PROPRIEDADE FÍSICO-QUÍMICA	VALOR	REFERÊNCIA
Peso molecular	141,12 g/mol	ANVISA (2009)
Pressão de vapor a 24°C (PV)	3×10^{-4} mmHg	ANVISA (2009)
Coefficiente de Partição Octanol – Água (kow)	-0,8	ANVISA (2009)
Índice de Vulnerabilidade de Águas subterrâneas (GUS)	2,18	Milhome et al. (2009)
Coefficiente de Adsorção à Matéria Orgânica (K _{oc})	1 mL.g ⁻¹	Milhome et al. (2009)

A pressão de vapor indica que, assim como o Acefato, o Metamidofós apresenta elevada mobilidade e volatilidade, com menor persistência no solo. Milhome et al. (2009), relatam que o Metamidofós é um contaminante em potencial quando considerado o K_{ow} do produto. O valor do GUS indica que o produto localiza-se em uma fase de transição, podendo contaminar águas subterrâneas. Ainda segundo estes autores a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) sugere que na análise preliminar para verificar o potencial de contaminação de águas subterrâneas devem ser observadas também, a solubilidade do pesticida em água e o coeficiente de adsorção da matéria orgânica do solo, considerando estes critérios tanto para o Acefato como para o Metamidofós, que são considerados contaminantes em potencial. Na Figura 2 é apresentada a fórmula estrutural do Metamidofós.

Ao buscar monitorar o nível de resíduos de agrotóxicos em alimentos *in natura*, a ANVISA criou em 2003 o Programa de Análise de Resíduos de Agrotóxicos em Alimentos (PARA), responsável por identificar nos alimentos os resíduos de agrotóxicos que excedem os limites máximos de resíduos (LMR) autorizados pela legislação vigente ou alimentos com resíduos de agrotóxicos, cujo o uso não é autorizado. Os resultados divulgados ao longo dos anos demonstram que o uso de

agrotóxicos não autorizados e a sua presença acima dos Limites Máximos de Resíduos é frequente.

Os organofosforados Acefato e Metamidofós foram monitorados no Programa da ANVISA em 2009, e a agência encontrou resíduos de Acefato em culturas não autorizadas de alface, cebola, cenoura, morango e uva, observando-se o uso indiscriminado do Acefato, sem levar em consideração a existência ou não do registro do produto para determinada cultura (ANVISA, 2009). Ainda de acordo com a ANVISA estes compostos são bem absorvidos por todas as vias de exposição em decorrência da alta lipossolubilidade destes produtos, normalmente as vias de exposição compreendem as vias respiratória, digestiva e cutânea. Os principais sinais e sintomas de intoxicação por Acefato são: salivação, vômitos, convulsões, confusão mental, câimbras, hipertensão, colapso respiratório, fraqueza, dentre outros, com destaque para o colapso respiratório, pois o produto causa alterações no diafragma ocasionando parada respiratória (ANVISA, 2007).

Acefato e Metamidofós tiveram seus registros reavaliados nos últimos anos, cujos resultados demonstram que algumas modificações no modo de aplicação do Acefato em campo devem ser alteradas, bem como sua restrição para algumas culturas, e a proibição de seu uso para fins domissanitário, os resultados demonstraram o potencial carcinogênico do produto. Quanto ao inseticida Metamidofós, a ANVISA recomendou a proibição de seu uso em atividades agrícolas e outras que possibilitem a exposição humana (ANVISA, 2009).

4.2 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL POR AGROTÓXICOS

Os danos ambientais causados por agrotóxicos não se restringem a contaminação dos alimentos, mas também o ar, o solo e as coleções hídricas, podendo atingir até as águas subterrâneas (PARREIRA, et al. 2001).

Claver et al. (2006) avaliaram a presença de 44 substâncias em águas superficiais na bacia do Rio Ebro na Espanha, de acordo com estes autores, a concentração e o tipo de agrotóxico encontrado na água dependem da estação do ano, das propriedades físicas e químicas do composto, sua solubilidade em água, a capacidade de ser retido no solo, sua persistência e demais fatores como a topografia do terreno e a frequência de chuvas. Os compostos persistentes possuem k_{oc} alto e permanecem adsorvidos no solo,

desta forma são capazes de contaminar as águas de superfície facilmente. Compostos com K_{oc} baixo são lixiviados através do solo e são capazes de contaminar as águas subterrâneas.

De acordo com Barriuso et al. (1996) a maior transferência de agrotóxicos ocorre através da perda de sedimentos nos processos erosivos, contaminando as coleções hídricas, segundo Bortoluzzi et al. (2006), a contaminação das águas pode ser atenuada porque a adsorção de moléculas pelas cargas constituintes do solo minimizam a transferência dos agrotóxicos para as águas.

As características físicas e químicas do Acefato demonstram que o mesmo não possui elevado potencial para contaminação das coleções hídricas. Sabe-se também que quando em contato com as coleções hídricas estes compostos são diluídos, assim, a identificação de concentrações muito altas pode ocorrer após as chuvas, principalmente em áreas próximas ao cultivo de grãos e também em ocasiões de acidentes no transporte de produtos, o que pode acarretar o lançamento de grandes quantidades destes produtos no solo e na água.

De acordo com Silva e Fay (2004), nos últimos anos o interesse na poluição potencial causada por agrotóxicos aumentou em decorrência da grande liberação destes compostos no meio ambiente. A persistência de alguns compostos durante vários anos no ecossistema acarreta o acúmulo em organismos biológicos em concentrações muito altas e tóxicas e devido aos mecanismos de transporte que podem carrear a distribuição destes compostos para áreas distantes dos locais de aplicação, com conseqüente contaminação do solo, ar e água.

Em decorrência da contaminação ambiental, dos efeitos toxicológicos do Acefato, principalmente pela acentuada neurotoxicidade, e das suspeitas de carcinogenicidade, o uso do Acefato tem sido alvo de restrições em vários países. Em 2003, a União Européia publicou documento recomendando aos países membros a não renovarem os registros de produtos que continham o Acefato e a não concessão de novas autorizações de uso, com a proibição do armazenamento e comercialização de substâncias que continham Acefato até março de 2004. Em 2008, a entidade publicou novo documento mantendo as mesmas orientações e proibindo a presença de resíduos de Acefato em produtos agrícolas. A Agência Ambiental Americana (USEPA) fixou a dose limite de 0,0012 mg/kg/dia para a ingestão crônica aceitável deste composto (ANVISA, 2010).

No Brasil, o Ministério da Saúde, através da ANVISA, estabeleceu o LMR de Acefato em alimentos entre 0,2 e 0,5 mg/Kg com intervalo de segurança entre 14 e 21 dias,

dependendo da cultura aplicada. Já a portaria que estabelece os padrões de potabilidade para água de consumo humano, não especifica o limite aceitável de detecção do Acefato em águas para consumo humano. Segundo esta portaria, o limite para organofosforados é de 20% de inibição da acetilcolinesterase, para enzimas provenientes de mamíferos (BRASIL, 2004).

Yen, Lin & Wang (2000) avaliaram a degradação e a dissipação do Acefato e do Metamidofós em solo, utilizando amostras de água de superfície e concluíram que o tempo de meia vida do metamidofós varia conforme o pH do meio. Os autores destacam que a mobilidade de ambos, Acefato e Metamidofós, no solo não é muito rápido, fato que dificulta a contaminação de águas subterrâneas em condições normais.

Alexander (1981) *apud* Silva et al. (1999) destacam que a dissipação dos agrotóxicos no solo depende do tipo de produto aplicado, bem como das condições bióticas e abióticas do solo. Neste sentido, a degradação microbiana é responsável em grande parte pela degradação do produto. Ainda de acordo com estes autores, os estudos sobre a persistência dos agrotóxicos no ambiente apresentam resultados variáveis, porém alguns destes produtos apresentam permanência prolongada e são responsáveis por causar contaminação ambiental.

4.3 BIODEGRADAÇÃO DE POLUENTES QUÍMICOS POR FUNGOS

Os fungos constituem um importante grupo de microrganismos, que apresentam atividades diversificadas e podem ser importantes agentes de biodeterioração, participando ativamente dos ciclos do carbono e nitrogênio na biosfera, através da degradação dos materiais orgânicos. Dentre os fungos, os basidiomicetos e, principalmente, os fungos da decomposição branca, são os principais microrganismos envolvidos no decaimento dos materiais lignocelulósicos (REZENDE et al. 2005). Os fungos da decomposição branca são geralmente reconhecidos como os mais promissores grupos de fungos na degradação da lignina, bem como na biorremediação de xenobióticos (GADD 2001 *apud* REZENDE et al. 2005).

De acordo com Pelczar, Chan e Krieg (1997) há cerca de 25.000 espécies de basidiomicetos, reconhecidos popularmente por formarem corpos de frutificação, como cogumelos e orelha de Pau, apresentam fase vegetativa denominada micélio formada por hifas e apresentam como estrutura reprodutiva o basídio.

JACQUES et al. (2007) relatam que no Brasil, os estudos iniciais utilizando microrganismos como agentes no processo de biorremediação, concentraram-se inicialmente na degradação de compostos aromáticos policíclicos (HAP's) em solos contaminados. As pesquisas concentraram-se em áreas urbanas, devido ao uso destes compostos na produção industrial, para fabricação de corantes, de fibras sintéticas, produção de carvão vegetal e, principalmente, com as atividades relacionadas aos postos de combustíveis, devido ao vazamento nos tanques subterrâneos que armazenam combustíveis. Atualmente, as pesquisas nesta área têm-se centrado no desenvolvimento de processos enzimáticos para o tratamento de efluentes (DURÁN & ESPÓSITO, 2000).

De acordo com Bhatti & Legge (2008), os fungos da decomposição branca estão aptos para degradar uma variedade de compostos recalcitrantes. Entre eles cita-se o tratamento de efluentes industriais de celulose e papel, efluentes têxteis ricos em corantes e pigmentos, efluentes provenientes da fabricação de azeite, de melado de cana, efluentes provenientes da fabricação de subprodutos da borracha e todo este potencial está associado à natureza extracelular e não-específica do sistema enzimático composto principalmente de Lignina peroxidase (LiP), Manganês peroxidase (MnP) e Lacase (Lcc).

Ao constatar a habilidade e o potencial destes microrganismos na biodegradação dos compostos de difícil degradação, Rezende et al. (2005) desenvolveram um estudo utilizando os fungos *Pleurotus ostreatus* e *Botryosphaeria rhodina* para verificar o crescimento fúngico e a produção de Lacase em meio de cultura contendo o agrotóxico Scepter, os resultados indicaram que ambos os fungos conseguiram crescer em meio sólido contendo o agrotóxico, identificando atividade de Lacase em concentrações de até 25% do agrotóxico.

O potencial de degradação dos microrganismos também foi estudado por Góes (2009) que verificou a degradação do Acefato por quatro linhagens de bactérias, *Sternotrophomonas maltophilia*, *Rhodococcus* sp, *Staphylococcus* sp e *Pandoreae* sp; todas isoladas a partir de solos agrícolas com histórico de aplicação do Acefato, a autora obteve resultados satisfatórios com a degradação de até 99,24% do Acefato pela bactéria *Rhodococcus*.

Cho et al. (2001) utilizaram fungos da decomposição branca para verificar o potencial destas espécies em remover compostos clorados através da produção de Lacase e obtiveram resultados satisfatórios na presença de até 100 ppm de clorados. Em três dias de cultivo os fungos reduziram 60% dos compostos clorados e, após catorze dias de incubação

da cultura de *Cerrena unicolor* e vinte e um dias de incubação para a cultura de *Abortiporus biennis*, os clorofenóis foram completamente removidos.

De modo geral, Duran et al. (2002) descrevem as Lacases como cupoproteínas, denominadas de oxidases azul. É uma oxiredutase capaz de catalisar a oxidação de vários compostos aromáticos com concomitante redução do oxigênio a água. Em geral, apresentam quatro átomos de cobre que desempenham importante papel nos mecanismos de ação da enzima e caracterizam-se pela baixa especificidade ao substrato. O foco no estudo da Lacase como agente principal no processo de biodegradação está relacionado aos diferentes estudos que demonstraram o potencial desta enzima na desintoxicação de poluentes ambientais, na remoção de corantes, na estabilização do vinho, na transformação do papel e na conversão enzimática de intermediários químicos (DURAN et al., 2002).

As Lacases e Peroxidases Fúngicas são enzimas consideradas de fácil separação e purificação. Em aplicações industriais as Lacases sobressaem-se por não precisarem da adição de peróxido de hidrogênio, necessitando apenas de oxigênio para a catálise, fato que aumenta o seu potencial para aplicações industriais e ambientais com a vantagem de crescerem em substratos de baixo custo (FLORES et al., 2009). Aliado a estas vantagens Mayer e Staples (2002), em um artigo de revisão, destacaram que as Lacases são capazes de degradar a Lignina, na ausência da Lignina peroxidase e Manganês peroxidase, com amplo aspecto de oxidação em diferentes substratos, basicamente em todos que apresentem características semelhantes a um p-difenol.

De forma geral, as Peroxidases são enzimas distribuídas amplamente na natureza, com atividades identificadas em animais, plantas e microrganismos. Estas são enzimas úteis em uma série de aplicações industriais e analíticas, cujas aplicações industriais destacam-se o uso da Lignina peroxidase e da Manganês peroxidase na descoloração de corantes sintéticos, na biorremediação de compostos fenólicos, na indústria de celulose, além da aplicação destas enzimas como biossensores (REGALADO, ALMENDARÉZ & VÁZQUEZ, 2004 ; DURAN & ESPOSITO, 2000).

O potencial das enzimas em degradar uma variedade de compostos aromáticos recalcitrantes e oxidar uma série de compostos aromáticos policíclicos e fenólicos é reconhecido, restando apenas a otimização da produção destas enzimas para viabilizar a aplicação em escala industrial.

De acordo com Flores et al. (2009), vários estudos têm sido realizados com o intuito de aumentar a produtividade da Lacase e, conseqüentemente, sua aplicação em

grande escala. Alguns indutores químicos como o etanol, o cobre e a xilidina já foram inclusive testados.

Garcia (2008) relata vinte e oito indutores diferentes estudados nos últimos anos; De acordo com essa autora, não existe um ótimo indutor de Lacase comum a todos os fungos, os estudos demonstram uma grande variação de indutor conforme o fungo.

Yamanaka et al. (2008) afirmam que a expressão do sistema enzimático produzido por fungos está intimamente relacionado às condições de cultivo, principalmente em relação à composição do meio de cultivo. Os autores realizaram alguns ensaios com *Trametes villosa* e verificaram que a produção de Lacase ocorreu em todo o período de análise com maior produção desta enzima na presença de cobre. No mesmo estudo os autores observaram que a produção de Manganês peroxidase foi melhor na presença de óleo vegetal emulsificado.

Na perspectiva de melhorar a produção de Lacase, Valeriano et al. (2007) também verificaram o efeito do etanol e da 2,5 xilidina na produção de Lacase por *Pycnoporus sanguineus*. Os resultados indicaram excelentes níveis de produção enzimática na presença de 2,5 xilidina e produção considerável na presença do etanol.

Alguns indutores químicos empregados são tóxicos ou de alto custo, logo a busca de novas estratégias para aumentar a produção de Lacase, representa uma alternativa promissora. Algumas pesquisas envolvendo a associações com *Trichoderma* sp têm sido realizadas, objetivando aumentar os índices de produção de Lacase. O *Trichoderma* é um ascomiceto, saprófita, componente ativo da microflora do solo, apresentando crescimento rápido, fato que facilita o seu uso em grande escala (PERES & MELO, 1995).

Howell (2003) descreve os ascomicetos como fungos de ocorrência mundial, em que as espécies que não apresentam fase sexual reconhecida são classificadas como imperfeitas. Elas possuem rápida taxa de de crescimento com a produção de inúmeros esporos, em vários tons de verde, cor característica do gênero *Trichoderma*. Este gênero tem sido estudado e utilizado em processos de degradação de agrotóxicos e na biorremediação de solos e apresenta um excelente potencial para aplicação em várias áreas de interesse agrícola, industrial e ambiental (ESPOSITO & SILVA, 1998)

Nos últimos anos algumas pesquisas têm verificado a capacidade de crescimento do *Trichoderma* em meios contendo agrotóxicos, de acordo com Lucon et al. (2009) os fungos do gênero *Trichoderma* estão entre os microrganismos mais resistentes às toxinas e produtos químicos naturais sintetizados pelo homem, capazes até mesmo de

degradar alguns compostos, tais como hidrocarbonetos e pesticidas; Rezende et al. (2005), relatam que os ascomicentos também apresentam habilidade similar em degradar a lignina, mas poucos são os estudos relacionados a este grupo. Colla et al. (2008) isolaram fungos filamentosos de solos contaminados com herbicidas triazínicos e verificaram que os gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* apresentaram elevada capacidade de crescimento em meios contendo atrazina.

Baldrian (2004) verificou a indução na produção de Lacase quando adicionado o fungo de controle biológico *Trichoderma harzianum* no meio de cultura. De acordo com este autor, a degradação de substâncias lignolíticas no solo, ocorre quando há interação entre os fungos da decomposição branca e microrganismos autóctones. Ainda segundo Baldrian (2006), a indução na produção de Lacase é o resultado de interações interespecíficas provavelmente envolvidas na defesa passiva do contato entre os microrganismos.

Tokimoto & Komatsu (1979) *apud* Savoie & Billette (1998) verificaram que diferentes espécies de *Trichoderma* causam prejuízos ao crescimento micelial e, conseqüentemente, na formação do corpo de frutificação, mas em condições de temperatura e nutrientes adequados, os fungos podem rejeitar o ataque do *Trichoderma* através do seu sistema multienzimático, indicando maior produção de enzimas na presença do *Trichoderma*.

4.4 MÉTODOS ANALÍTICOS: CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS E TESTE COLORIMÉTRICO

É cada vez mais frequente o uso de agrotóxicos na agricultura, resultando na presença de seus resíduos ou de seus metabólitos em alimentos e em diversas matrizes ambientais. Assim técnicas que determinem a presença destes resíduos, bem como os níveis de concentração em diversos substratos, são fundamentais nos programas de monitoramento e controle ambiental.

Pinho et al. (2009) classificam a análise de resíduos de agrotóxicos em cinco etapas básicas: extração do(s) analito(s) da matriz, remoção dos co-extrativos (limpeza), separação, identificação e quantificação do(s) composto(s). Ainda de acordo com estes autores, a cromatografia gasosa é a mais empregada para compostos voláteis. Esta técnica permite detectar os agrotóxicos e seus produtos de degradação em quantidades inferiores

aos Limites Máximos de Resíduos estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

A Cromatografia Gasosa consiste na separação dos diferentes componentes de uma amostra para sua posterior quantificação e esta pode ser feita em espectrometria de massa, uma técnica que permite que os compostos sejam identificados e quantificados (Claver et al., 2006).

De acordo com Hans, Ruud & Odile (2003), a maioria dos organofosforados podem ser analisados por Cromatografia Gasosa. Os autores relatam que alguns destes compostos como Acefato, Metamidofós, Monocrotofós e Ometoato são muito polares e termolabéis, em consequência, algumas dificuldades são vivenciadas durante as análises destes resíduos. Dentre os problemas encontrados destacam-se a rápida deterioração de desempenho do sistema, as perdas do analito na entrada, as diferenças de resposta muito grande entre pesticidas com a mesma concentração em solvente limpo, a seletividade insuficiente devido a interferência da matriz e em decorrência de todos estes fatores, repetibilidade pobre.

Devido à utilização dos organofosforados em uma grande variedade de culturas, estes compostos podem ser encontrados em águas superficiais e subterrâneas comprometendo as águas para o consumo humano (GRIZA et al. 2008). Hayama et al. (2008) descrevem a problemática envolvida na contaminação das águas de consumo por organofosforados, salientado que estes compostos são prejudiciais aos animais, inclusive ao homem, devido à inibição de acetilcolinesterase. De acordo com estes autores, métodos simples e sensíveis devem ser desenvolvidos a fim de determinar a presença de organofosforados em águas utilizadas para o consumo humano. Eles destacam que na União Européia a concentração de organofosforados em águas para consumo humano não pode ultrapassar 0,1 µg /L.

Em um contexto geral, diferentes técnicas analíticas têm sido propostas, estudadas e empregadas para a análise e quantificação de agrotóxicos organofosforados. No Quadro 3 são listados alguns estudos realizados bem como as técnicas empregadas, podendo-se afirmar que os métodos mais utilizados são baseados em técnicas de Cromatografia em fase Gasosa ou Líquida. Estas técnicas são precisas e reprodutivas, apresentando baixo limite de detecção, mas demanda várias etapas de preparo da amostra, exigindo, desta forma, maior tempo de análise (GOÉS, 2009).

Quadro 3: Estudos que utilizaram técnicas de Cromatografia para identificação e quantificação de organofosforados.

TÉCNICAS DE CROMATOGRAFIA PARA IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ORGANOFOSFORADO EM ÁGUA E ALIMENTOS	REFERÊNCIA
Estudo da presença de pesticidas em águas de superfície pela técnica de Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS)	Claver et al. (2006)
Monitoramento de poluentes em águas da Hungria pelas técnicas de Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS) e ELISA	Maloschik et al. (2006)
Análise dos resíduos de Acefato e Metamidofós em folhas e frutos de tomate cultivados em estufa pela técnica de Cromatografia acoplada ao detector fotométrico de chama (GC/FPD)	Antonious & Snyder (1994)
Determinação de seis pesticidas em planta medicinal pela técnica de Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC/MS)	Carvalho et al. (2009)
Análise de pesticidas em vegetais e frutas pela técnica de Cromatografia acoplada ao detector fotométrico de chama (GC/FPD)	Asha, Tan & Chai (2008)
Cromatografia de interação hidrofílica líquido (HILIC) para determinação de organofosforado em água	Hayama et al. (2008)
Determinação de organofosforado em água pela técnica de Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS).	Ingelse et al. (2001).

Em contrapartida, outras técnicas vêm sendo discutidas e pesquisadas, visando o desenvolvimento de metodologias que reduzam o tempo de análise e apresente resultados precisos e confiáveis. Nesta ótica, SRINIVASAN & LINGAPPA (1984) *apud* LIMA et al. (2001) realizaram a determinação do Metamidofós através do teste Colorimétrico a partir

da inibição das enzimas colinesterases extraídas de plasma sanguíneo, com recuperações entre 82% e 90%.

Griza et al. (2008) também avaliaram a contaminação por agrotóxicos inibidores da acetilcolinesterase utilizando o Kit produzido pela FIOCRUZ. O método é baseado em preparações da enzima acetilcolinesterase capaz de ativar os tionofosforados, possibilitando o monitoramento de todos os organofosforados e carabamatos presentes na amostra.

Jardim (2010) também realizou o teste Colorimétrico para verificar a redução da toxicidade do organofosforado Acefato, através dos níveis de inibição das enzimas colinesterases extraídas de plasma sanguíneo, com resultados positivos em relação a substância-teste analisada.

5. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos desenvolvidos neste trabalho foram realizados no laboratório de Enzimologia e Biocatálise Ambiental – LENZIBIO – UFG e no Laboratório de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas – NEPET – UFG. A pesquisa foi dividida em duas etapas: Etapa 1: envolveu o cultivo das linhagens de *Trichoderma harzianum* com a seleção das cepas que produziram maior quantidade de Lacase; o cultivo das associações entre as linhagens selecionadas de *Trichoderma harzianum* com *Trametes villosa* e o cultivo das associações entre as linhagens selecionadas de *Trichoderma harzianum* com *Pycnoporus sanguineus*; Etapa 2: cultivo das associações fúngicas com Acefato nas concentrações de 10% e 50%; análise das amostras tratadas através da Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas e a realização dos testes de toxicidade para quantificar os níveis de Colinesterase.

ETAPA 1

5.1 ORIGEM DOS FUNGOS

Os fungos utilizados na pesquisa fazem parte da coleção do Laboratório LENZIBIO, da Universidade Federal de Goiás. Os fungos da decomposição branca testados foram fornecidos pela Fundação Tropical André Tosello (Campinas, SP) e as linhagens do ascomiceto *Trichoderma harzianum* isoladas do solo do Cerrado, foram gentilmente cedidas pelo prof. Dr. Cirano José Ulhoa, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. A identificação das cepas utilizadas está relacionada no Quadro 4.

Quadro 4: Fungos utilizados na pesquisa.

FUNGOS	IDENTIFICAÇÃO
<i>Trametes villosa</i>	CCT - 5567
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	CCT - 4518
<i>Trichoderma harzianum</i>	T03, T08, T13, T34, T39, T47, T50, ALL42.

5.2 MEIO DE CULTURA

O meio de cultura utilizado para a manutenção dos cultivos fúngicos e para o crescimento dos fungos era composto por batata, glicose e água (BGA) nas seguintes proporções: 3,750 g de ágar, 50 mL de caldo de batata, 5 g de glicose e água destilada, totalizando um volume de 250 mL. Para obter o caldo de batata, realizou-se o cozimento de 1kg de batata inglesa em 1 L de água. O caldo utilizado corresponde à água de cozimento da batata.

O meio utilizado para os experimentos em meio líquido era composto por batata, glicose e caldo, correspondendo ao meio BGC.

5.3 MANUTENÇÃO DOS FUNGOS

O cultivo dos fungos foi realizado em placas de *Petri* contendo meio de cultura BGA e os fungos foram repicados trimestralmente, conforme metodologia de Castellani (1967) descrita a seguir:

Foi realizada a pesagem do ágar e da glicose em balança analítica. Em seguida, adicionou-se o caldo de batata e a água destilada em *Erlenmeyers* com capacidade para 500 mL. Posteriormente, o frasco com o meio de cultura foi autoclavado a 120°C durante 20 minutos. Em seguida, cerca de 15 a 20 mL de meio foram transferidos para as placas de *Petri*. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar e as placas foram mantidas sob a luz UV durante aproximadamente 30 minutos. Logo, um disco de tamanho referente à abertura maior de uma ponteira de 1 mL foi inoculado em cada placa, estas, por sua vez, foram armazenadas em condições ambiente durante sete dias para o crescimento satisfatório dos fungos. Este tempo foi padronizado durante a realização de todos os experimentos.

5.4 CULTIVO EM MEIO LÍQUIDO

5.4.1 Seleção das linhagens de *Trichoderma harzianum*

Todos os experimentos em meio líquido foram realizados sob duas condições: condição estática e condição de agitação. O procedimento de inoculação seguiu a metodologia de Castellani (1967) descrita previamente.

Foi preparado o inóculo dos fungos, que cresceram em placas de *Petri* durante sete dias. No sétimo dia de crescimento, foram retirados seis inóculos de fungos, na região externa de crescimento do fungo, o tamanho destes inóculos correspondiam ao tamanho da abertura maior de uma ponteira de 1 mL. Estes inóculos foram adicionados aos *Erlenmeyers* de 250 mL com meio de cultura previamente autoclavados. Para cada linhagem de fungo, foi preparado quatro *Erlenmeyers* sendo dois frascos para o cultivo em condição estática e dois frascos para o cultivo em condição de agitação. Para a manutenção do meio agitado, utilizou-se o agitador orbital (*shaker*) com programação rotacional de 120 rotações por minuto (rpm) e incubadora DBO para a manutenção da condição estática. Ambos os equipamentos foram programados para manter a temperatura a 28°C durante os experimentos. Os fungos permaneceram em crescimento nestes frascos, durante 25 dias, a 28°C.

Durante o experimento foi realizada a leitura enzimática das enzimas Lacase, Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase. Adotou-se como procedimento padrão, a leitura de Lacase e Lignina peroxidase a cada cinco dias de cultivo e a leitura de Manganês peroxidase no 5°, 15° e 25° dia de cultivo, em todas as etapas do trabalho.

Para padronização dos experimentos em meio líquido adotou-se a realização dos ensaios em duplicata em função da quantidade de experimentos e ao pouco espaço disponível nos equipamentos. Estabeleceu-se, também, a retirada de cinco mL de alíquotas a cada cinco dias, durante os 25 dias dos ensaios, perfazendo um total de cinco coletas, para dosagem enzimática.

5.4.2 Associação entre *Trametes villosa* e *Trichoderma harzianum* e associação entre *Pycnoporus sanguineus* e *Trichoderma harzianum*

Este experimento consistiu no cultivo da cultura mista entre *Trametes villosa* e linhagens do ascomiceto *Trichoderma harzianum* e no cultivo de *Pycnoporus sanguineus* com as linhagens do ascomiceto *Trichoderma harzianum*.

Para a realização deste experimento foram selecionadas quatro cepas que apresentaram o melhor resultado na produção de Lacase, considerando os índices de produção e a frequência de produção durante o período de análise. A escolha da Lacase como parâmetro para selecionar as cepas baseou-se em outros estudos que indicam a Lacase como uma enzima promissora nos processos de biodegradação entre eles pode-se citar o trabalho de Cho et al., 2001; Jardim,2010).

As condições de cultivo seguiram os mesmos procedimentos adotados no item 5.4.1. Para a realização do ensaio foram preparadas as associações descritas no Quadro 5.

Quadro 5: Associações entre os fungos.

ASSOCIAÇÕES ENTRE LINHAGENS DO ASCOMICETO <i>Trichoderma harzianum</i> E OS BASIDIOMICETOS <i>Trametes villosa</i> E <i>Pycnoporus sanguineus</i>.	
<i>Trametes villosa</i> e T34	<i>Pycnoporus sanguineus</i> e T34
<i>Trametes villosa</i> e T39	<i>Pycnoporus sanguineus</i> e T39
<i>Trametes villosa</i> e T47	<i>Pycnoporus sanguineus</i> e T47
<i>Trametes villosa</i> e ALL42	<i>Pycnoporus sanguineus</i> e ALL42

Para o cultivo das culturas mistas foram adicionados aos *Erlenmeyers* três inóculos dos fungos de decomposição branca, que cresceram durante os cinco primeiros dias individualmente. No quinto dia de cultivo, realizou-se a coleta de alíquotas para a realização da análise enzimática e, neste mesmo dia, após a retirada do extrato para análise, foram adicionados os inóculos das cepas de *Trichoderma* em seus respectivos *Erlenmeyers*. Os fungos, então, permaneceram em associação num período de vinte dias.

Todas as cepas foram cultivadas em duplicatas, com o cultivo do grupo controle, que não recebeu *Trichoderma harzianum* como indutor na produção de Lacase.

O ensaio em meio líquido ocorreu num período de 25 dias. O procedimento adotado para análise enzimática seguiu o mesmo padrão adotado nos experimentos com cultivo individual dos fungos.

Esta etapa foi realizada com o objetivo de selecionar as linhagens que apresentaram maior produção de Lacase, observou-se também o comportamento da produção durante os 25 dias, bem como a viabilidade das cepas, desta forma, foram selecionadas quatro linhagens para as etapas posteriores, sendo elas: T34, T39, T47 e ALL42.

5.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A frequência da dosagem enzimática foi definida em função da quantidade de sobrenadante contida nos *Erlenmeyers*, aproximadamente 190 mL, e da ocorrência das enzimas existentes, de acordo com metodologia utilizada por JARDIM (2010).

A atividade enzimática da Lacase (Lcc) foi determinada segundo metodologia de Szklarz et al. (1989-modificado). A oxidação do substrato seringaldazina ($\epsilon_{525} = 65000 \text{ mmol.L}^{-1}\text{cm}^{-1}$) foi conduzida numa mistura de reação que continha 0,6 mL do sobrenadante dos *Erlenmeyers*; 0,3 mL do tampão acetato de sódio 50 mmol.L^{-1} (pH 5,0) e 0,1 mL de seringaldazina $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ preparados em etanol. A reação foi iniciada pela adição da seringaldazina e a velocidade desta reação foi acompanhada por 5 minutos. As leituras da atividade enzimática foram realizadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 525 nm. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar $1 \mu\text{mol}$ de substrato por minuto.

Para Manganês peroxidase (MnP) a metodologia utilizada foi de Kuwahara et al. (1984). Os componentes da mistura foram: 0,5mL de sobrenadante dos *Erlenmeyers*; 0,1 mL de lactato de sódio; 0,2 mL de albumina bovina 0,5%; 0,05 mL de MnSO_4 $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$; 0,05 mL de solução de H_2O_2 $2,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ em tampão de succinato de sódio $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$ e 0,1 mL de vermelho de fenol 0,1%. A mistura foi incubada por 5 minutos a 30°C em banho-maria. A leitura da atividade enzimática foi realizada em espectrofotômetro em comprimento de onda de 610 nm, sendo $\epsilon_{610} = 4460 \text{ mmol.L}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

A atividade da Lignina peroxidase (LiP) foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico ($\epsilon_{310} = 93000 \text{ mmol.L}^{-1}\text{cm}^{-1}$). A mistura de reação continha 0,6 mL de

sobrenadante de extrato fúngico; 0,2 mL de H₂O₂ 2,0 mmol. L⁻¹ e 0,2 mL de uma solução de álcool veratrílico 2,0 mmol. L⁻¹ em tampão tartarato de sódio 0,4 mmol L⁻¹. A reação foi determinada pela oxidação do álcool veratrílico em espectrofotômetro com comprimento de onda de 310 nm. Todas as análises foram realizadas em duplicata e os dados apresentados são as médias de duas repetições.

Para determinação do cálculo enzimático, utilizou-se a **Equação 5.1** descrita por Leonowicz & Grzywnowicz (1981) *apud* Menezes, Silva e Durrant (2009):

$$U = \frac{10^6 \Delta E}{\varepsilon R \Delta t} \quad (5.1)$$

Onde:

ε = coeficiente de extinção molar de cada substrato, conforme dados da literatura (M⁻¹, cm⁻¹);

ΔE = Absorbância em comprimento de onda específico (nm);

Δt = tempo da reação em minutos;

R= Volume de caldo enzimático em mL;

Uma unidade U é definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μ mol de substrato por minuto. O resultado é expresso em U.mL⁻¹.

ETAPA 2

Esta etapa do trabalho consistiu no cultivo dos fungos em meio de cultura contendo as soluções de Acefato nas concentrações determinadas de 10% e 50% de Acefato.

5.6 AGROTÓXICOS

Todos os experimentos envolvendo os agrotóxicos Acefato e Metamidofós, foram realizados conforme as boas práticas de segurança e biossegurança do laboratório durante a manipulação destes produtos.

O produto utilizado para a pesquisa pertence à classe dos organofosforados e possui nome comercial Orthene 750g®. O agrotóxico é fabricado pela indústria japonesa Arysta Life Science, sob o registro nº02788394 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). O produto utilizado foi adquirido por meio de doação do fabricante.

Nos testes de toxicidade, para verificar a formação do metabólito Metamidofós, foi utilizado o ingrediente ativo Metamidofós adquirido comercialmente em revenda de produtos agropecuários, na cidade de Goiânia.

5.7 PREPARO DA SOLUÇÃO ESTOQUE

O organofosforado Orthene 750g® utilizado na pesquisa é um composto comercializado em pó solúvel e apresenta em sua constituição 750g/Kg de Acefato e 250g/Kg de ingredientes inertes e adjuvantes, resultando em uma concentração final de 75% de Acefato. No preparo da solução estoque utilizou-se 1 g de Acefato e 1 L de água destilada autoclavada. Desta forma, a solução preparada apresentou a concentração de 75%. A partir desta concentração foram realizadas diluições para obter as concentrações desejadas (10% e 50%). As determinações destas concentrações foram de acordo com a metodologia de Jardim (2010) que considerou o uso do agrotóxico Acefato em campo (10%) e também considerando uma situação de superdosagem do produto durante sua aplicação ou em casos de acidente durante o transporte (50%).

5.8 DEGRADAÇÃO DO AGROTÓXICO EM MEIO LÍQUIDO NAS CONCENTRAÇÕES DE 10% E 50% DO ACEFATO.

Para realizar estes ensaios, foram utilizadas as soluções do meio de cultura BGA suplementados com Acefato nas concentrações de 10% e 50% de Acefato. Para a realização dos experimentos foram mantidas as mesmas condições de cultivo: condição estática em incubadora DBO a 28°C e em condição de agitação (*shaker*) a 28°C e 120 rpm. Ao final dos ensaios, ou seja, no 25º dia, foram retirados 50 mL de cada *Erlenmeyer* para posterior análise em Cromatografia Gasosa Acoplado à Espectrometria de Massa (CG/MS) e para a realização dos testes de toxicidade. As amostras foram devidamente identificadas e armazenadas em tubos *falcon* e congeladas. O controle abiótico do

experimento consistiu no meio de cultura suplementando com agrotóxico nas concentrações de 10% e 50% de Acefato sem a presença do fungo. A determinação da atividade enzimática foi realizada conforme descrito no item 5.5. Os fungos utilizados neste experimento correspondem as associações descritas no Quadro 5.

5.9 ANÁLISE DO EXTRATO APÓS TRATAMENTO POR FUNGO PELA TÉCNICA DE CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS.

A cromatografia gasosa é uma técnica que permite identificar e quantificar os componentes de uma amostra.

Para a extração e caracterização do Acefato e para analisar a possível formação de seu metabólito foram consultados os trabalhos de Tan e Chai (2008), Ingelse et al (2001), Kaipper, Madureira e Corseuil (2009) e Carvalho et al. (2009), com a aquisição dos seguintes materiais:

Solventes: os solventes adquiridos para o desenvolvimento da pesquisa foram diclorometano, acetonitrila, acetato de etila, ciclohexano e acetona, todos com alto padrão de pureza, considerados grau HPLC.

Coluna: coluna de sílica RTX-5MS de 30 m 0,25mmID.

Padrões: padrão certificado do Acefato, padrão certificado do Metamidofós e o padrão interno 1-Cloro-4-fluorobenzeno. Todos os solventes, padrões e coluna foram adquiridos da empresa SIGMA.

Equipamento: SHIMADZU GCMS-QP 2010 PLUS do Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-farmacológicas – NEPET (UFG).

Para o desenvolvimento das análises foram determinados os seguintes parâmetros de programação do GC/MS (Quadro 6), estabelecidos conforme metodologia de Carvalho et al. (2009).

Quadro 6: Programação do GC/MS utilizada nas análises.

PROGRAMAÇÃO DO GC CONFORME METODOLOGIA DE CARVALHO ET AL.(2009)	
Coluna	RTX-5MS de 30 m 0,25 mmID, 0,25 μ m
Gás carreador	Hélio (99,999% de pureza)
Fluxo	1,8 mL/min.
Programação da Temperatura da coluna	1 minuto a 60°C, elevando então a 300°C na razão de 10°C/min e mantido por 3 min. Atraso do solvente de 5 Min.
Temperatura do injetor	250°
Volume de injeção	1 μ L na modalidade splitless (0.7 minuto).
Temperatura de interface	280°C Fonte de ionização por impacto de elétron de 70 eV igualmente mantida em 280°C.
Íons monitorados	136, 142, e 168 m/z
Tempo total de análise	28 minutos

As soluções padrão foram preparadas através da utilização dos padrões adquiridos comercialmente para posterior injeção no GC/MS, utilizando acetato de etila como solvente. Os experimentos desenvolvidos nesta etapa foram: injeção do composto padrão do Acefato e do Metamidofós em diferentes concentrações (0,2 μ g; 0,5 μ g; 1,0 μ g; 5,0 μ g e 10 μ g) e injeção das amostras sem Acefato. Posteriormente, preparou-se seis concentrações diferentes para a curva de calibração. O total de seis concentrações teve como objetivo preparar a curva de calibração, cujas concentrações foram: 10 μ g/mL, 25 μ g/mL, 50 μ g/mL, 150 μ g/mL, 250 μ g/mL e 350 μ g/mL de soluções contendo o padrão Acefato e, nas mesmas condições, soluções contendo o padrão Metamidofós.

Após a identificação dos picos de Acefato e Metamidofós foram realizados os processos de extração. De forma geral, as amostras contendo agrotóxicos não podem ser analisadas sem pré-tratamento. A etapa de preparação da amostra é necessária para extrair os traços de pesticidas em meio aquoso, trazer os analitos a um nível de concentração adequada e removê-los de forma que evitem a interferência nos

componentes (limpeza) da matriz antes da análise cromatográfica (DIMITRA E TRIANTAFYLLOS, 2001).

Na perspectiva de obter resultados positivos, realizou-se o processo de extração em fase líquida. O processo foi realizado de acordo com as etapas descritas abaixo (Figura 4).

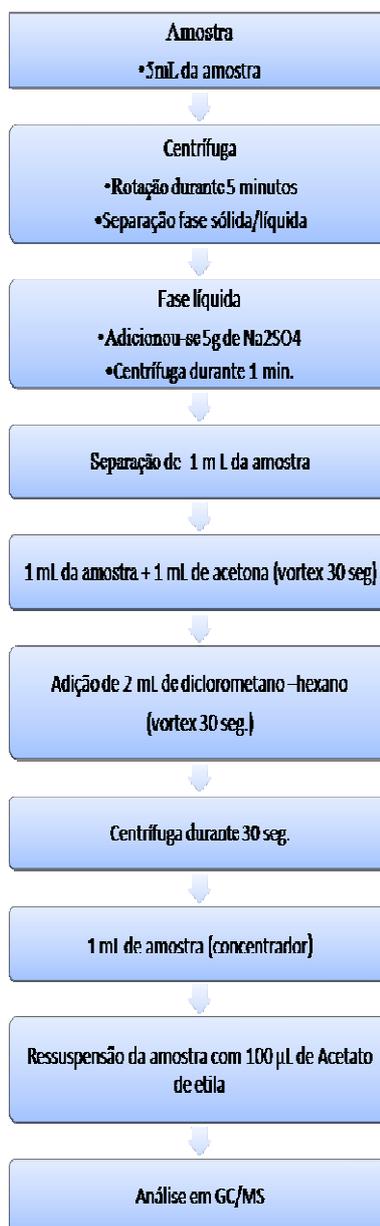


Figura 4: Fluxograma explicativo do processo de extração das amostras analisadas

5.10 ANÁLISE DO ACEFATO APÓS O TRATAMENTO UTILIZANDO O TESTE COLORIMÉTRICO DE IDENTIFICAÇÃO DA COLINESTERASE

Este experimento foi realizado utilizando-se as associações que apresentaram melhor produção enzimática quando comparados os valores de produção enzimática do fungo cultivado em cultura mista em relação ao fungo cultivado individualmente.

O extrato armazenado destas oito associações foi utilizado nos testes de toxicidade, como forma de quantificar a redução da toxicidade do Acefato. A metodologia utilizada foi desenvolvida conforme Jardim (2010), que desenvolveu seu método baseado no Kit Bioquímico produzido pela indústria Doles® onde a atividade de Colinesterase sérica é medida *in vitro* por sistema colorimétrico com metodologia modificada do método de Dietz.

Para a realização dos testes, utilizou-se o plasma sanguíneo de doadores voluntários, sem histórico de contaminação por organofosforados, que apresentaram valores de Colinesterase dentro dos valores de referência. O teste de acetilcolinesterase foi realizado com o plasma dos doadores e os valores indicados correspondiam ao nível de acetilcolinestase para o sexo avaliado.

As concentrações das substâncias teste adotadas seguiram a metodologia de Jardim (2010) e corresponderam às concentrações de 75%, 50%, 25% e 12,5%. Tais concentrações foram obtidas por meio de diluição seriada.

O teste envolveu um conjunto amostral formado por: (1) substância teste (solução contendo Acefato tratada por fungos acrescido de plasma sanguíneo); (2) teste referencial (plasma sanguíneo); (3) Metamidofós (solução contendo Metamidofós acrescido de plasma sanguíneo) e (4) controle da toxicidade (solução contendo Acefato sem tratamento acrescido de plasma sanguíneo). O tempo de exposição das amostras contendo organofosforado foi de 30 minutos antes da realização dos ensaios.

As análises foram realizadas em triplicata com duas repetições, perfazendo um total de seis repetições para cada amostra analisada.

5.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos nos experimentos foram tratados estatisticamente por meio de análise descritiva e inferencial, utilizando o programa computacional SPSS *for* Windows (versão 15.0) com nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Nos experimentos realizados na presença do Acefato, devido ao tamanho da amostra, foi dispensado o teste de normalidade e considerado os dados das variáveis não-normais. Por esta razão, então, foi realizado o teste U (ou Mann Whitney, correspondente não paramétrico do teste t) para o tratamento dos dados.

Os dados obtidos nos testes de toxicidade também foram tratados estatisticamente por meio de análise descritiva e inferencial, utilizando o programa computacional SPSS *for* Windows (versão 15.0), com nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Para este conjunto amostral, foi realizada uma Análise de Variância (ANOVA) para comparação das médias obtidas no experimento. Em seguida, foi realizado um teste *a posteriori*, Teste de Tukey, para verificar os resultados significativos no conjunto analisado.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Etapa 1

6.1 SELEÇÃO DAS LINHAGENS DE *Trichoderma harzianum*

Nesta seção serão apresentados os resultados da seleção das diferentes linhagens de *Trichoderma harzianum* cultivados em meio líquido nas condições de agitação e estática. O valor de produção enzimática no decorrer dos experimentos, com a respectiva análise estatística descritiva desta etapa, encontra-se no apêndice A. Nos gráficos estão representados os desvios padrão da média de produção enzimática durante os 25 dias de cultivo, as diferenças representadas indicam a variação na produção das enzimas nos dias analisados.

6.1.1 Cultivo de *Trichoderma harzianum* em meio líquido na condição de agitação.

As linhagens de *Trichoderma harzianum* cresceram em meio líquido durante 25 dias, em condição de agitação, como mostra o gráfico da Figura 4, que demonstra a produção enzimática de Lacase entre as diferentes linhagens. Os resultados representam a média de produção ao longo dos 25 dias, com determinação da produção enzimática aos 5°, 10°, 15°, 20° e 25 ° dias de cultivo. Os valores demonstram que a produção de enzimas pelas linhagens de *Trichoderma harzianum* variou entre as linhagens cultivadas. Nestas condições a linhagem T39 apresentou os melhores resultados na produção de Lacase.

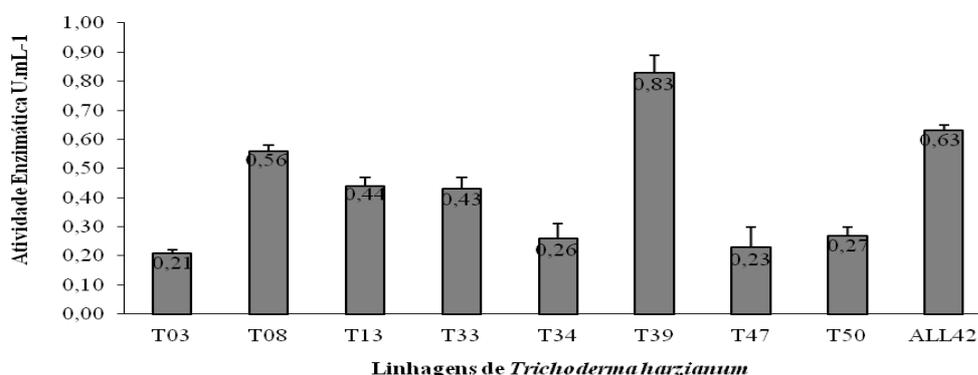


Figura 4: Produção de Lacase pelas diferentes linhagens de *Trichoderma harzianum* em condição de agitação.

Gochev & Krastanov (2007) isolaram diferentes linhagens de *Trichoderma* de quatro solos distintos para verificar a produção de Lacase, associando a produção enzimática com a descoloração do corante violeta cristal. Foram identificadas vinte e três linhagens de *Trichoderma*, destas, quatro foram selecionadas e identificadas como *Trichoderma atroviridae*, *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma reesei* e *Trichoderma virideos*. De acordo com os autores, todas apresentaram resultados positivos na descoloração do corante, relacionando a descoloração com a produção de Lacase. A linhagem *T. viridae* teve a melhor produção com de 2 U.mL^{-1} de Lacase.

A produção de Lignina peroxidase apresentou diferenças significativas entre as linhagens. O gráfico da Figura 5 demonstra que a linhagem T39 produziu apenas $0,23 \text{ U.mL}^{-1}$, enquanto a linhagem T33 teve uma produção dez vezes maior.

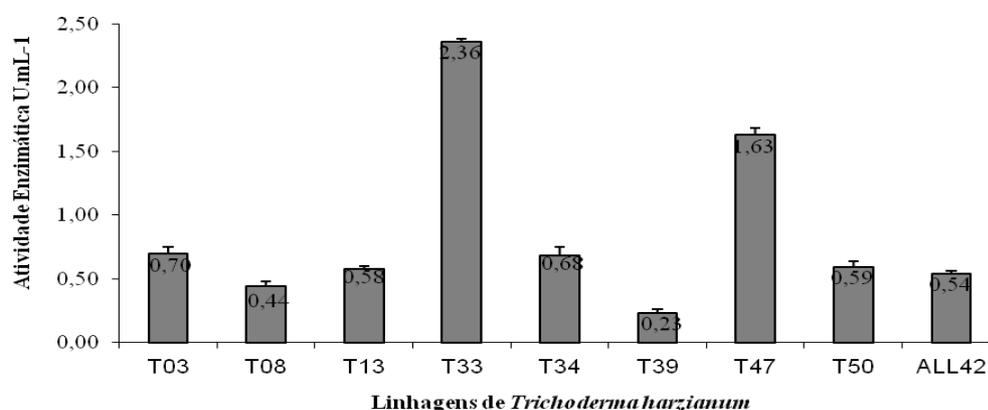


Figura 5: Produção de Lignina peroxidase pelas diferentes linhagens de *Trichoderma harzianum* em condição de agitação.

Observa-se que não há um padrão na produção das diferentes enzimas, a produção varia em quantidade e também entre as linhagens. Neste sentido, a cepa T39 apresentou a melhor produção de Lacase, enquanto que a cepa T33 teve a melhor produção de Lignina peroxidase e a cepa T08, a melhor produção de Manganês peroxidase (Figura 6).

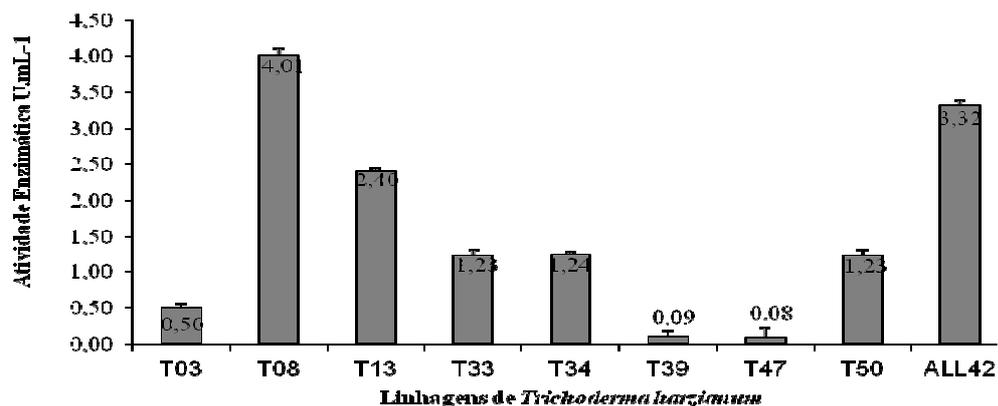


Figura 6: Produção de Manganês peroxidase pelas diferentes linhagens de *Trichoderma harzianum* em condição de agitação.

6.1.2 Cultivo de *Trichoderma harzianum* em meio líquido na condição estática.

O cultivo de *Trichoderma harzianum* também foi realizado em condição estática, desta vez, a linhagem ALL42 destacou-se na produção enzimática de Lacase, com uma média de 3,6 U.mL⁻¹. Neste cultivo, a linhagem T03 também foi responsável pela menor produção de Lacase, assim como no cultivo em condição de agitação. A Figura 7 mostra a produção de enzimas pelas linhagens estudadas.

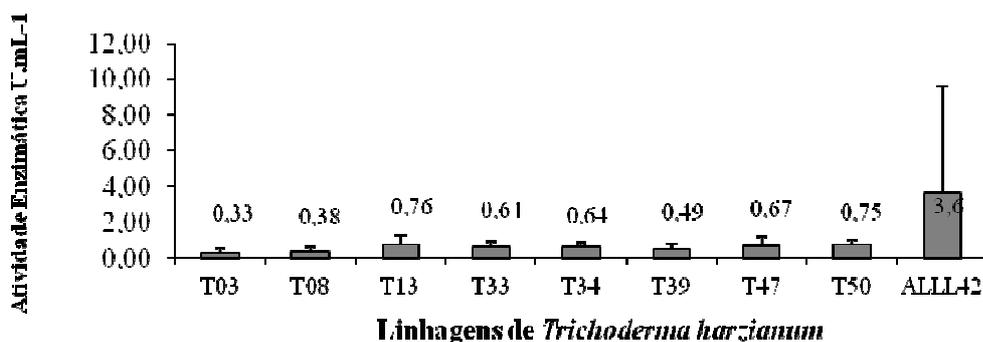


Figura 7: Produção de Lacase pelas diferentes linhagens de *Trichoderma harzianum* em condição estática.

Os resultados da produção de Lignina peroxidase em condição estática demonstraram claramente a influência do meio na produção de enzimas. Ao compararmos a cepa T33, foi verificado que em meio agitado ela apresentou uma produção enzimática

de $2,36 \text{ U.mL}^{-1}$ para Lignina peroxidase, enquanto em condição estática foi a cepa com menor produção de Lignina peroxidase, apenas $0,01 \text{ U.mL}^{-1}$ (Figura 8).

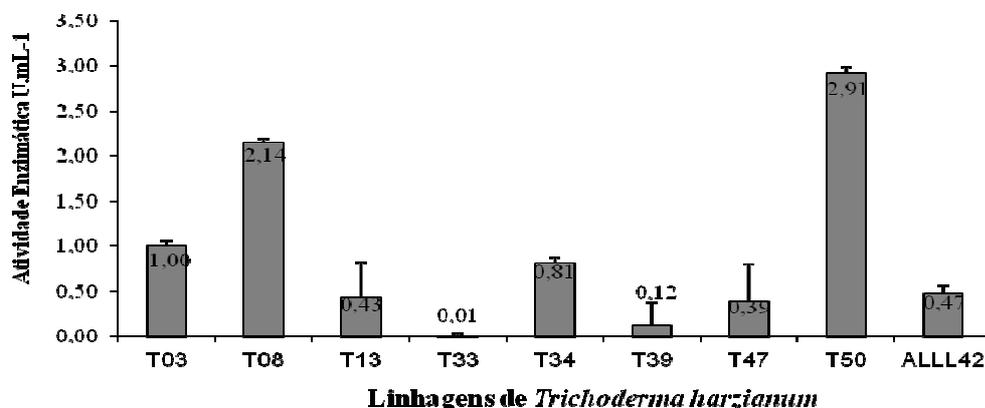


Figura 8: Produção de Lignina peroxidase pelas diferentes linhagens de *Trichoderma harzianum* em condição estática.

O comportamento na produção de Manganês peroxidase foi semelhante à produção de Lacase. Os resultados evidenciaram que nestas condições o gênero em estudo apresenta melhor produção para Manganês peroxidase (Figura 06 e 09). Aguiar, Ferreira & Monteiro (2010) cultivaram três linhagens de *Pleurotus* sp e *Trichoderma reesei* em bagaço pré-tratado e vinhaça e verificaram que o *Trichoderma reesei* produziu Lacase e Manganês peroxidase em todos os ensaios. Eles observaram também que a atividade de Manganês peroxidase foi de 1,9 a 4,8 vezes maiores no ascomiceto, em comparação aos demais basidiomicetos. Demonstrando que este gênero tem potencial para a produção de Manganês peroxidase.

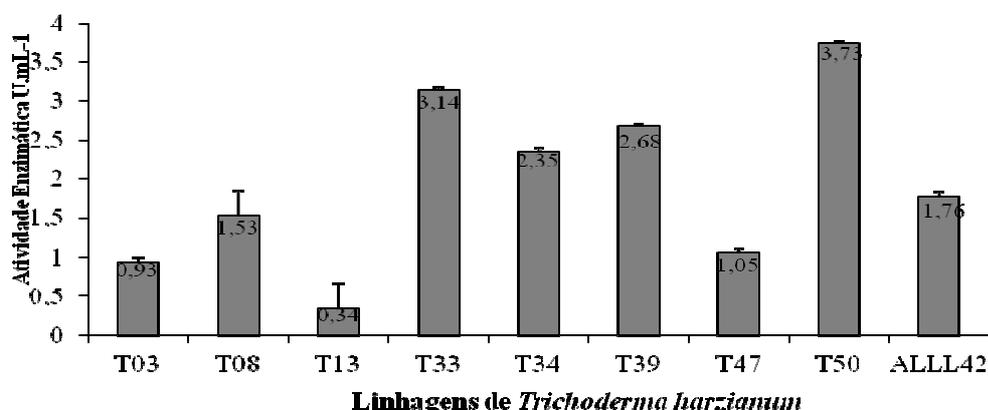


Figura 9: Produção de Manganês peroxidase pelas diferentes linhagens de *Trichoderma harzianum* em condição estática.

Os estudos que buscam identificar linhagens de *Trichoderma* com potencial para aplicação industrial baseiam-se principalmente no estudo da Lacase, devido ao seu reconhecido potencial para aplicações industriais, na remoção de corantes, no tratamento de efluentes *Kraft* e no tratamento de água, mas outras enzimas, produzidas pelos fungos, são capazes de atuar na degradação de compostos de difícil degradação.

6.2 ASSOCIAÇÃO ENTRE AS LINHAGENS SELECIONADAS DE *Trichoderma harzianum* E FUNGOS DE DECOMPOSIÇÃO BRANCA

Após o cultivo das linhagens de *Trichoderma harzianum* (T03, T08, T13, T34, T39, T47, T50, ALL42) em condição estática e de agitação para verificar o potencial de produção enzimática, selecionou-se quatro linhagens (T34, T39, T47 e ALL42) para constituírem as associações com *Trametes villosa* e *Pycnoporus sanguineus*, na escolha das linhagens foram observados a produção de Lacase durante o experimento e o comportamento desta produção no decorrer das análises. Os resultados descritos a seguir estão organizados por espécie. Primeiramente são apresentados os resultados obtidos no cultivo das linhagens de *Trichoderma harzianum* com *Trametes villosa* e posteriormente os resultados obtidos no cultivo das linhagens de *Trichoderma harzianum* com *Pycnoporus sanguineus*. Os resultados das análises com a respectiva estatística descritiva encontram-se no Apêndice B.

6.2.1 Cultivo das linhagens de *Trichoderma harzianum* selecionadas com *Trametes villosa* em condição de agitação e produção das enzimas.

Os experimentos foram realizados conforme descrito no item 5.4.1. A Figura 10 ilustra a produção de Lacase (Lcc), Lignina Peroxidase (LiP) e Manganês peroxidase (MnP), no período de realização do ensaio, que compreendeu 25 dias. Nestas condições a associação entre o *Trichoderma harzianum* T34 e *Trametes villosa* produziram a maior quantidade de Lacase. A grande produção de Manganês Peroxidase pode ser associada à presença do *Trichoderma harzianum*, visto que nos ensaios com cultura pura, esse mesmo gênero apresentou maior produção da enzima Manganês peroxidase.

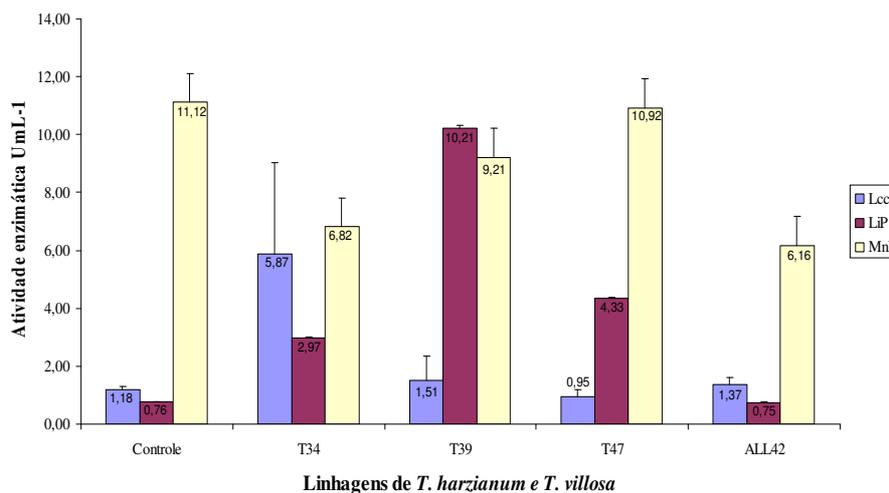


Figura 10: Atividade enzimática de *Trametes villosa* em associação com as linhagens de *Trichoderma harzianum* em condição de agitação.

Ao comparar a produção enzimática das associações com o grupo controle, que correspondeu ao cultivo do *Trametes villosa* individualmente, verificou-se que o *Trichoderma harzianum* foi capaz de induzir a produção enzimática nas associações com T34, apresentando uma produção cinco vezes maior para a enzima Lacase. Nas demais associações verificou-se um pequeno aumento na produção enzimática de Lacase na associação com T39 e ALL42, e um decréscimo na produção, na associação com T47. Observa-se que para estas linhagens o cultivo misto não representou diferenças significativas na produção de Lacase, a análise estatística indicou que nestas condições o *Trichoderma harzianum* não foi um bom indutor na produção de Lacase.

A análise do comportamento de produção de Lacase no decorrer dos experimentos evidenciou picos de produção enzimática diferentes para cada associação. A associação com T34 e T47 demonstrou pico de produção no 10º dia de experimento, com valores correspondentes a 16,19 U.mL⁻¹ e 1,65 U.mL⁻¹, respectivamente. A associação com T39 apresentou maior produção no 20º dia, com uma produção equivalente a 2,27 U.mL⁻¹, enquanto que a associação com ALL42 apresentou os melhores resultados no 25º dia (1,78 U.mL⁻¹).

Foi verificado que a linhagem T39 apresentou a maior produção de LiP, com pico na produção no 25º dia de experimento, com uma produção de 43,91 U.mL⁻¹.

A produção de Manganês peroxidase pode estar relacionada à presença das linhagens de *Trichoderma harzianum*, considerando que nos ensaios para a seleção das

linhagens, a produção de Manganês peroxidase foi expressiva, confirmando o estudo de Aguiar, Ferreira & Monteiro (2010). Estes autores encontraram maior atividade de Manganês peroxidase em *Trichoderma* quando comparado com a produção desta enzima por fungos basidiomicetos.

6.2.2 Cultivo das linhagens de *Trichoderma harzianum* selecionadas com *Trametes villosa* em condição estática.

Os experimentos em condição estática demonstraram que a produção enzimática é influenciada pela condição de cultivo. Foi utilizado o mesmo meio de cultura, temperatura e quantidade de inóculos, mas ao variar a condição (estática/agitação), observou-se maior produção enzimática, tanto em relação ao controle, quanto em relação às associações no cultivo realizado em condição estática. (Figura 11). Vale ressaltar que a associação com T34 produziu a maior quantidade de Lacase em meio agitado, porém nestas condições, a produção não foi significativa, com destaque para a produção das associações com T39 e T47, que apresentaram maior produção nestas condições.

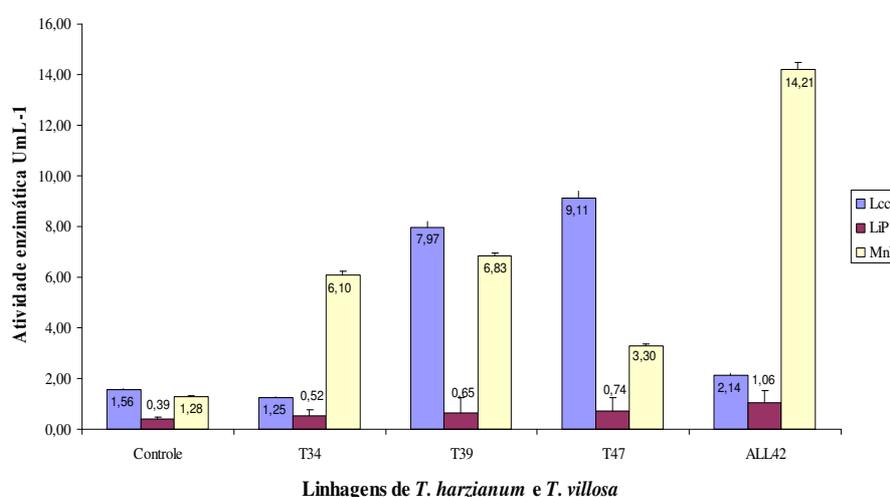


Figura 11: Atividade enzimática de *Trametes villosa* em associação com as linhagens de *Trichoderma harzianum* em condição estática.

Ao analisar a produção enzimática de Lacase no decorrer dos experimentos (Figura 11), observou-se que os picos de produção são tardios em relação à condição de agitação. Desta vez, as associações T34, T47 e ALL42 apresentaram pico de produção no 15º dia de crescimento, apenas a associação T39 teve pico de produção no 20º dia, os

resultados indicam melhor produção nesta condição, porém exigindo maior tempo de cultivo. Já o grupo controle não apresentou diferenças significativas na produção, mantendo-se constante durante o experimento, com valores de produção baixos.

Savoie & Billette (1998) verificaram que o cultivo de *Trichoderma* sp com o basidiomiceto *Lentinus edodes* promoveram aumento em até vinte vezes na produção de Lacase nesta espécie. Eles observaram também que a presença de *Trichoderma* pode influenciar no padrão de isoformas das Lacases, decorrente das interações entre o *Trichoderma* e *Lentinus edodes*. Nesta associação, observou-se que a condição estática favoreceu a produção de Lacase, mas não contribuiu para a produção de Lignina peroxidase. Os valores obtidos foram inferiores à produção em meio agitado, em que a produção chegou a 43,91 U.mL⁻¹, enquanto que na condição estática, os valores não ultrapassaram 3,42 U.mL⁻¹.

Neste ensaio, a produção de Manganês peroxidase foi menor em relação a produção do ensaio em meio agitado, mas observou-se que em meio agitado a menor produção de MnP ocorreu no 5º de cultivo com a produção de 1,32 U.mL⁻¹, entre a associação de *T. villosa* e o *Trichoderma* ALL42, enquanto neste ensaio, a maior produção ocorreu exatamente no 5º dia pela associação de *T. villosa* e o *Trichoderma* ALL2, com a produção de 23,30 U.mL⁻¹.

6.2.3 Cultivo das linhagens selecionadas de *Trichoderma harzianum* com *Pycnoporus sanguineus* em condição de agitação e produção das enzimas.

A associação com *Pycnoporus sanguineus* não favoreceu a produção de Lacase. A produção do grupo controle durante, os 25 dias de experimento superou em até sete vezes a produção da associação de *P. sanguineus* com a linhagem ALL42, associação responsável pela maior produção de enzimas, demonstrando que a presença de *Trichoderma harzianum* pode ter provocado inibição na produção da enzima Lcc (Figura 12).

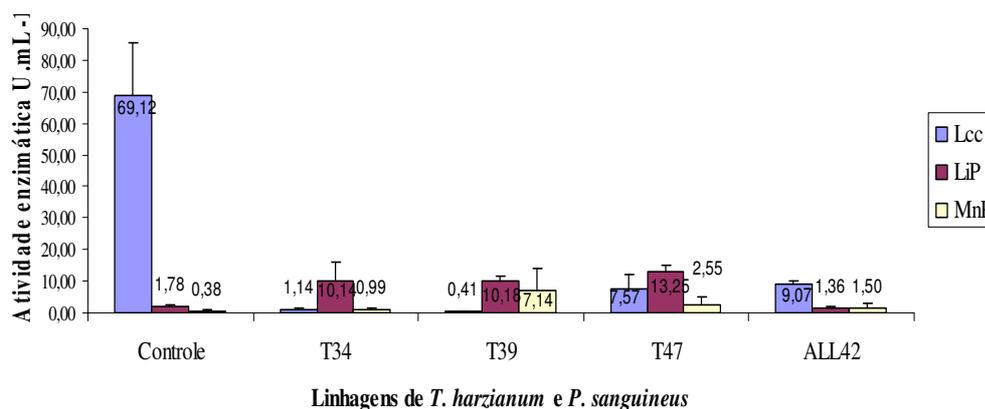


Figura 12: Atividade enzimática de *Pycnoporus sanguineus* em associação com as linhagens de *Trichoderma harzianum* em condição de agitação.

O grupo controle apresentou pico de produção enzimática no 20º dia de cultivo, com uma produção relevante de 159,69 U.mL⁻¹.

Esta associação demonstrou ser favorável para a produção de Lignina peroxidase e Manganês peroxidase que, mais uma vez, pode ter a produção atribuída à presença das linhagens de *Trichoderma harzianum*, pois os valores obtidos para o grupo controle são muito inferiores em relação a associação, confirmando os resultados obtidos na etapa de seleção das linhagens.

6.2.4 Cultivo das linhagens selecionadas de *Trichoderma harzianum* com *Pycnoporus sanguineus* em condição estática e produção de enzimas.

Os resultados demonstram que o cultivo misto de *Trichoderma harzianum* e *P. sanguineus* não foi favorável para a produção de Lacase tanto na condição de agitação, como na condição estática (Figura 13).

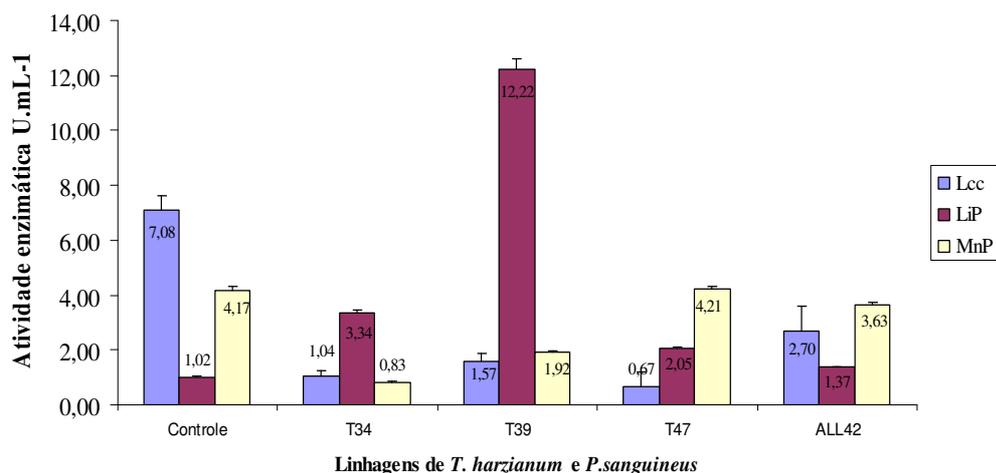


Figura 13: Atividade enzimática de *Pycnoporus sanguineus* em associação com as linhagens de *Trichoderma harzianum* em condição estática.

Nestes experimentos a produção de Lacase pelo fungo *P. sanguineus* foi bem menor em relação a produção na condição de agitação. Enquanto a produção do grupo controle em meio agitado chegou a 159,69 U.mL⁻¹, na condição estática a produção máxima foi de apenas 7,08 U.mL⁻¹.

A produção de Lignina peroxidase foi menor no cultivo em condição estática, com destaque para a associação com a linhagem T39. Nos dois cultivos foi a associação que apresentou melhor produção de Lignina peroxidase.

A produção da enzima Manganês peroxidase foi melhor no grupo controle com a produção de 8,34 UmL⁻¹, enquanto na condição de agitação a associação entre *P. sanguineus* e T39 chegou a produzir 8,06 U.mL⁻¹.

Os resultados desta etapa permitem concluir que no cultivo da cultura mista, o basidiomiceto *Trametes villosa* apresentou os melhores resultados na produção enzimática de Lacase e que a condição estática é mais favorável nesta produção. Flores et al. (2009) cultivaram *Agaricus bisporus* e *Pleurotus ostreatus* na presença de *Trichoderma* e observaram que nos ensaios utilizando *Agaricus bisporus* o incremento na produção de Lacase foi consideravelmente maior em relação aos ensaios com *Pleurotus ostreatus*. Os autores observaram também que o tipo de meio de cultura utilizado influenciou na produção enzimática. Neste trabalho não foram realizados ensaios com meio de cultura diferente, mas observou-se também, que a condição de cultivo agitado/estática influenciou no padrão de produção das enzimas.

Baldrian (2004) observou em seus experimentos que a atividade de Lacase medida após cinco dias de experimento correspondeu a 0,71 U e após a adição de inóculos de *Trichoderma harzianum* esses valores chegaram a 17 U e 45 U, no 12º e 45º dia de experimento. Cedeno et al. (2007) verificaram que a associação entre o fungo da podridão branca *Preurotus ostreatus* e *Trichoderma longibrachiatum* aumentaram de 10 a 18 vezes a produção de Lacase. Neste trabalho a presença do *Trichoderma harzianum* T39 no cultivo com *T. villosa* aumentou em até 13 vezes a produção de Lacase e a linhagem T47 com *T. villosa* aumentou em até 7 vezes a produção desta enzima.

Etapa 2

6.3 DEGRADAÇÃO DO ACEFATO EM MEIO LÍQUIDO

Os experimentos envolvidos na Etapa 2 foram realizados com as associações fungicas descritas no Quadro 5 em meio de cultura suplementado com Acefato, os resultados foram representados em gráficos somente nas amostras com produção significativa de Lacase pela associação em relação ao grupo controle.

Considerando que a atividade ligninolítica das enzimas está associada às condições de cultivo, a degradação do Acefato foi avaliada em condição de agitação e condição estática. No decorrer dos experimentos, verificou-se o valor do pH nas amostras, que teve algumas variações, mas permaneceu entre 4 e 5.

A caracterização da atividade ligninolítica de basidiomicetos foi realizada por Gomes et al. (2009), que identificaram que as Lacases apresentam atividade ótima em pH 3,0 a 3,5 e demonstram-se estáveis em pH de neutro a alcalino. Ainda de acordo com os autores a atividade ótima da Lignina peroxidase ficou entre pH 4,5 e 6,0, enquanto a Manganês peroxidase demonstrou melhores resultados no pH igual a 3,5.

Muhammad et al. (2008) fizeram uma revisão sobre o potencial biorremediador de poluentes industriais por basidiomicetos e mostraram que a Lacase, Lignina peroxidase e Manganês peroxidase são as principais enzimas envolvidas nos processos de degradação. Nesta revisão, os autores verificaram que a Lacase tem atividade ótima no pH de 2 a 10, a Lignina Peroxidase no pH de 2 a 5 e a Manganês peroxidase entre 4 e 7. Esses resultados demonstram que os valores de pH identificados neste estudo contribuíram para a produção de Lcc, Lip e MnP.

A relação carbono/nitrogênio não foi avaliada neste estudo, adotando-se um meio padrão para o cultivo dos fungos, Machado et al. (2006) avaliaram a influência de diferentes concentrações de nitrogênio na produção de enzimas por *Trametes villosa* e *Pycnoporus sanguineus* e observaram que a quantidade de nitrogênio não influenciou na produção enzimática, os autores verificaram também que o cultivo em condição de agitação favoreceu a degradação.

6.3.1 Degradação do Acefato em meio líquido pela associação de *Trametes villosa* com as linhagens de *Trichoderma harzianum* na condição de agitação.

Na tabela 1 são apresentados à média de produção enzimática durante os 25 dias de cultivo, obtidos para associação entre *Trametes villosa* e as linhagens de *Trichoderma harzianum*, na condição de agitação, na presença de 10% e 50% de Acefato, são apresentados também, os resultados estatísticos realizados para comparar a produção entre a cultura pura e as associações.

Tabela 1: Média da produção enzimática na associação de *Trametes villosa* com linhagens de *Trichoderma harzianum* na presença de Acefato 10% e 50% em condição de agitação e teste estatístico U (ou Mann Whitney).

Agitação	Média da Produção enzimática (U.mL ⁻¹)											
	Lacase				Lignina peroxidase				Manganês peroxidase			
Fungo	10%	p	50%	p	10%	p	50%	p	10%	p	50%	p
<i>T. villosa</i>	1,35		11,09		0,93		0,91		3,56		2,05	
<i>T. villosa</i> e T34	1,45	0,564	1,24	1,00	0,81	0,248	3,28	0,083	2,34	0,564	2,91	0,386
<i>T. villosa</i> e T39	1,27	0,772	0,45	1,00	3,00	0,021	11,93	0,043	2,62	0,386	1,72	0,773
<i>T. villosa</i> e T47	1,65	1,00	2,01	1,00	4,21	0,021	5,15	0,149	2,04	0,248	2,10	0,773
<i>T.villosa</i> e ALL42	9,61	0,248	4,06	1,00	0,76	1,00	0,41	0,564	2,75	0,248	1,84	0,773

A produção de Lacase pelo grupo controle, composto pelo fungo *Trametes villosa* apresentou diferenças significativas em relação à concentração do Acefato. Nos

ensaios com concentração de 10% do produto, observou-se uma produção baixa, com pico de produção no 10º de cultivo, com produção máxima de 2,29 U.mL⁻¹

Na concentração de 50% a produção de Lacase aumentou consideravelmente, com destaque para 10º, 20º e 25º dia. Nestas condições, o pico de produção ocorreu no 25º dia.

Nos estudos realizados por Jardim (2010) os valores máximos de produção enzimática foram 0,29 mL⁻¹ de LiP na concentração de 10% e 0,01 de MnP na concentração de 50%, a maior produção de Lacase foi obtida na presença do Acefato 50% com valor de produção igual a 6,72U.mL⁻¹. Neste ensaio, a maior produção de Lacase correspondeu a 20,64 U.mL⁻¹ na concentração de 50% de Acefato. Ao comparar a produção de Lacase em relação a concentração, pode-se dizer que o Acefato pode funcionar com um indutor na produção de Lacase. No entanto, não se observou o mesmo comportamento para a Lignina peroxidase e Manganês peroxidase que apresentaram produção semelhante nas duas concentrações de Acefato 10% e 50%.

Ao avaliar a atividade ligninolítica de 125 fungos basidiomicetos, Matheus, Machado & Bononi (2005) verificaram a produção de Lacase e Manganês peroxidase por três linhagens de *Trametes villosa*. Os pesquisadores observaram que a melhor atividade enzimática foi das linhagens de *Trametes villosa* isolados de solos contaminados com compostos organoclorados, demonstrando que a eficiência na degradação dos compostos recalcitrantes pode ser maior, quando os microrganismos são isolados de sítios contaminados.

A associação entre *Trametes villosa* e a linhagem T34 não influenciou positivamente a produção das três enzimas analisadas, para a Lacase, a produção média não ultrapassou 2,04 U.mL⁻¹ na presença de 10% de Acefato. Considerado a média geral de produção, tanto a Lignina peroxidase como a Manganês peroxidase tiveram menor produção em relação ao grupo controle, formado pelo cultivo individual do *Trametes villosa*.

A associação entre *Trametes villosa* e a linhagem T39 demonstra resultados positivos para a produção de Lignina peroxidase, nas duas concentrações de Acefato, 10% e 50%. Ambos produziram grande quantidade desta enzima, com produção significativa em relação à cultura individual, confirmando o potencial desta linhagem para produção de Lignina peroxidase.

Na concentração de 50% observa-se um pico de produção no 10° dia e posteriormente no 25° ocorre uma retomada na produção. A produção de Lacase não apresentou diferenças significativas entre o cultivo da cultura pura e a associação. Mais uma vez, a produção de Manganês peroxidase foi menor do que a produção do grupo controle.

Ao considerarmos a associação entre *Trametes villosa* e a linhagem T47 mais uma vez a enzima Lignina peroxidase sobressai-se em relação às demais, no cultivo com 10% de Acefato, a produção chega a 20,32 U.mL⁻¹ no 15° dia e no cultivo com 50% de Acefato tem-se uma produção de 18,18 U.mL⁻¹ no 10° dia, e uma retomada no 25° dia. Novamente os valores obtidos para a enzima Lacase e Manganês peroxidase, são inferiores a produção do grupo controle.

A associação entre *Trametes villosa* e linhagem ALL42 apresentou resultados satisfatórios, no cultivo com 10% de Acefato, a produção de Lacase superou o grupo controle em todo o período do ensaio, com pico de produção no 10° dia.

O ensaio na presença de Acefato 50% apresentou melhor produção em relação às demais associações analisadas, porém os valores foram menores do que a produção do grupo controle. A produção de Lignina peroxidase e Manganês peroxidase também foi menor em relação a média do grupo controle.

Os resultados analisados neste grupo indicam que somente a associação entre *Trametes villosa* e a linhagem ALL42 na presença de 10% de Acefato, apresentou maior produção de Lacase em relação ao cultivo da cultura pura. O pico de produção das enzimas não obedeceu a um padrão, observam-se picos distintos entre a cultura pura e a associação, e entre as mesmas linhagens em diferentes concentrações de Acefato. A produção de Lignina peroxidase, foi significativa em duas associações em relação a produção do grupo controle, e a produção de Manganês peroxidase em todas as associações, foi menor do que a produção desta mesma enzima, nos ensaios sem a presença do Acefato (*Etapa 1*).

6.3.2 Degradação do Acefato em meio líquido pela associação de *Trametes villosa* e as linhagens de *Trichoderma harzianum* em condição estática.

Na tabela 2 são apresentados à média de produção enzimática obtidos para associação entre *Trametes villosa* e as linhagens de *Trichoderma harzianum*, na condição

estática, na presença de 10% e 50% de Acefato, são apresentados também os resultados estatísticos realizados para comparar a produção entre a cultura pura e as associações.

Tabela 2: Média da produção enzimática na associação de *Trametes villosa* com linhagens de *Trichoderma harzianum* na presença de Acefato 10% e 50% em condição estática e teste estatístico U (ou Mann Whitney).

Estática	Média da Produção enzimática (U.mL ⁻¹)											
	Lacase				Lignina peroxidase				Manganês peroxidase			
Fungo	10%	p	50%	p	10%	p	50%	p	10%	p	50%	p
<i>Trametes villosa</i>	1,57		0,93		1,03				1,25		1,92	
<i>T. villosa</i> e T34	1,12	0,386	2,03	0,021	1,04	0,564	0,92	0,149	2,23	0,386	3,28	0,773
<i>T. villosa</i> e T39	5,28	0,021	2,67	0,021	1,45	0,564	1,67	0,083	1,41	0,773	2,19	0,773
<i>T. villosa</i> e T47	2,35	0,149	2,19	0,021	1,14	0,073	1,08	0,149	2,58	0,083	4,27	0,773
<i>T.villosa</i> e ALL42	4,69	0,021	3,34	0,021	4,12	0,083	0,72	0,773	1,72	0,564	5,55	0,043

O cultivo de *Trametes villosa* em condição estática na presença de 10% de Acefato indicou melhor produção de Lacase em relação ao cultivo em meio agitado. Observa-se que o pico de produção ocorreu no 20º dia, com a produção de 3,1 U.mL⁻¹, ao contrário do cultivo em meio agitado cujo pico de produção ocorreu no 10º dia com a produção de 2,29 U.mL⁻¹. A produção de LiP e MnP também foram baixas, com produção máxima de 1,3 U.mL⁻¹ e 2,18 U.mL⁻¹, respectivamente.

Machado et al. (2006) verificaram o potencial de *Trametes villosa* e *Pycnoporus sanguineus* em descolorir corantes têxteis utilizados na manufatura do algodão, e verificaram que o *Trametes villosa* descoloriu os 28 corantes testados, enquanto o *Pycnoporus sanguineus* descoloriu apenas nove. Demonstrando o maior potencial de *T. villosa* para a produção de enzimas. Os resultados indicaram que o cultivo em meio agitado favoreceu a degradação, os pesquisadores verificaram também que a concentração de nitrogênio não interferiu na atividade lignolítica dos fungos.

Na associação de *Trametes villosa* com a linhagem T34 observa-se maior produção de Lignina peroxidase na presença de Acefato 10%, com destaque para a produção do 25º dia de experimento (Figura 14).

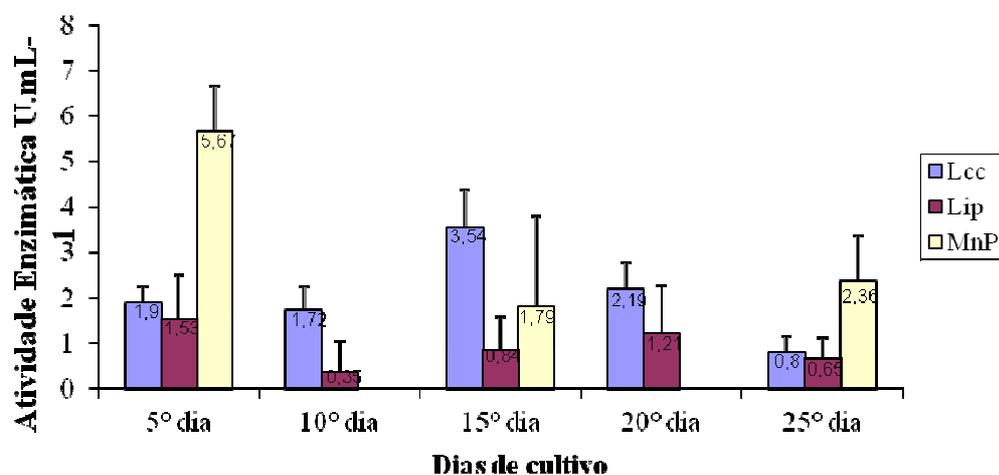


Figura 14: Atividade enzimática de *Trametes villosa* em associação com T34 na presença de Acefato 50% em condição estática.

A associação de *Trametes villosa* com a linhagem T39 apresentou bons resultados para a produção de Lacase, o pico de produção não foi o mesmo nas duas concentrações trabalhadas, na presença de 10% de Acefato observa-se uma produção considerável de 10,3 U.mL⁻¹ de Lacase no 25º dia enquanto na presença de 50% de Acefato obteve-se a maior produção no 15º dia 3,31 U.mL⁻¹. Nesta associação observa-se uma produção significativa de Lacase em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). Não houve diferenças significativas entre a produção de Manganês peroxidase e Lignina peroxidase em comparação ao grupo controle. Para esse mesmo grupo em condição de agitação a produção de Lacase não superou 2 U.mL⁻¹ (Figuras 15 e 16).

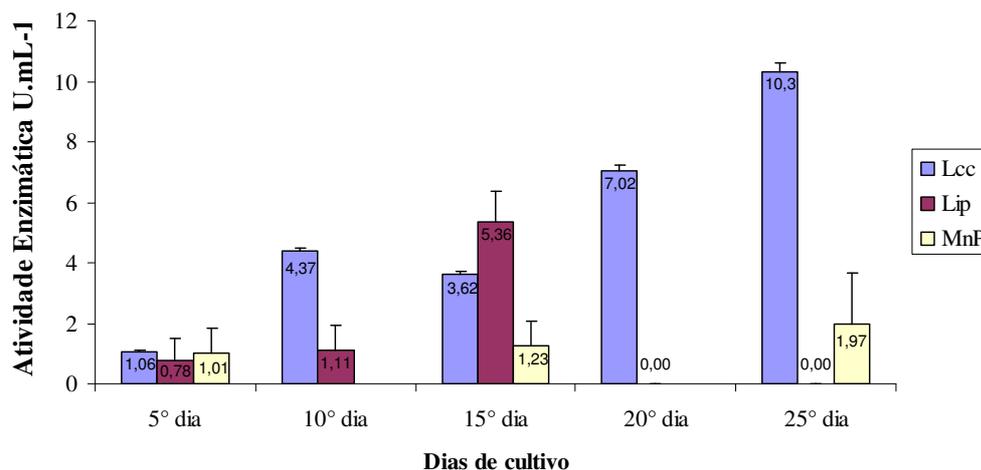


Figura 15: Atividade enzimática de *Trametes villosa* em associação com T 39 na presença de Acefato 10% em condição estática.

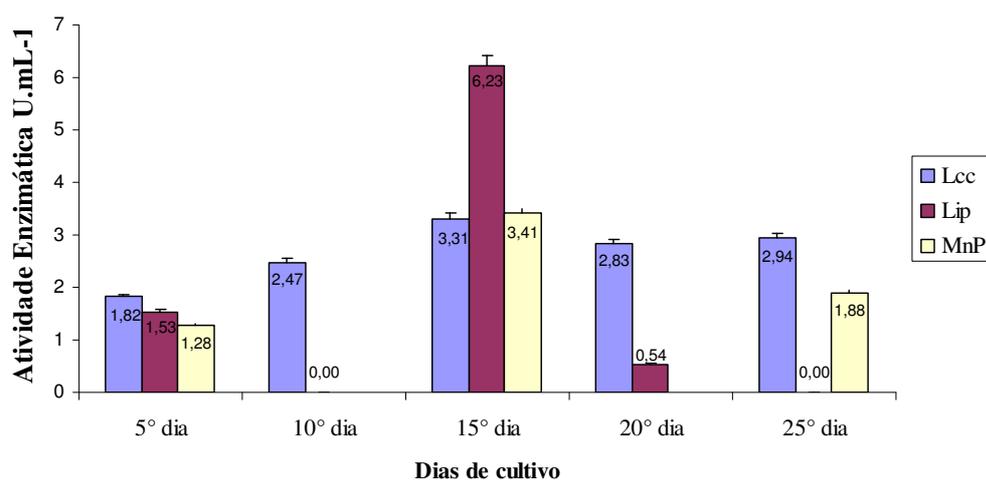


Figura 16: Atividade enzimática de *Trametes villosa* em associação com T 39 na presença de Acefato 50% em condição estática.

Para a associação entre *Trametes villosa* e a linhagem T47 houve diferenças significativas na produção de Lacase entre o grupo controle e a associação, no experimento com 50% de Acefato (Figura 17). A produção de Lignina peroxidase e Manganês peroxidase pela associação foi menor em relação ao grupo controle.

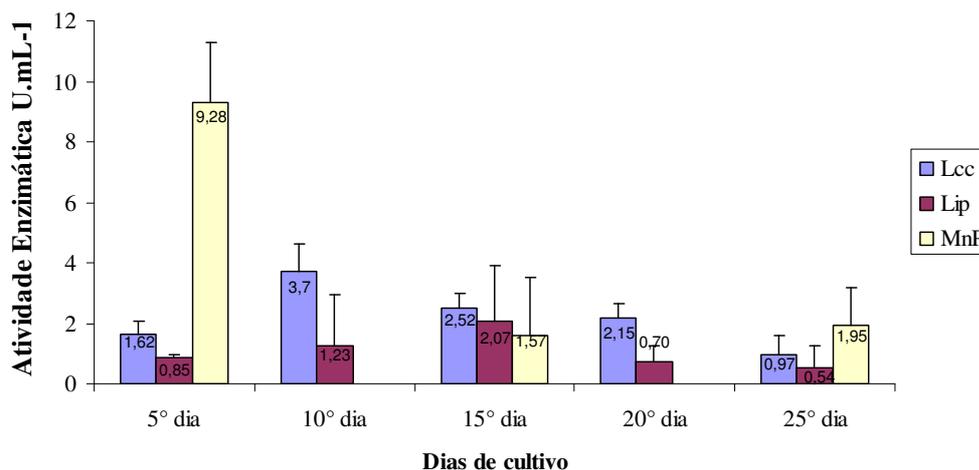


Figura 17: Atividade enzimática de *Trametes villosa* em associação com T 47 na presença de Acefato 50% em condição estática.

A associação de *Trametes villosa* com a linhagem ALL42 apresentou produção significativa de Lacase em relação ao grupo controle, na presença de 10% e 50% de Acefato, os resultados na condição estática e de agitação indicam que esta linhagem é um bom indutor para a produção de Lacase e Manganês peroxidase nestas condições (Figura 18).

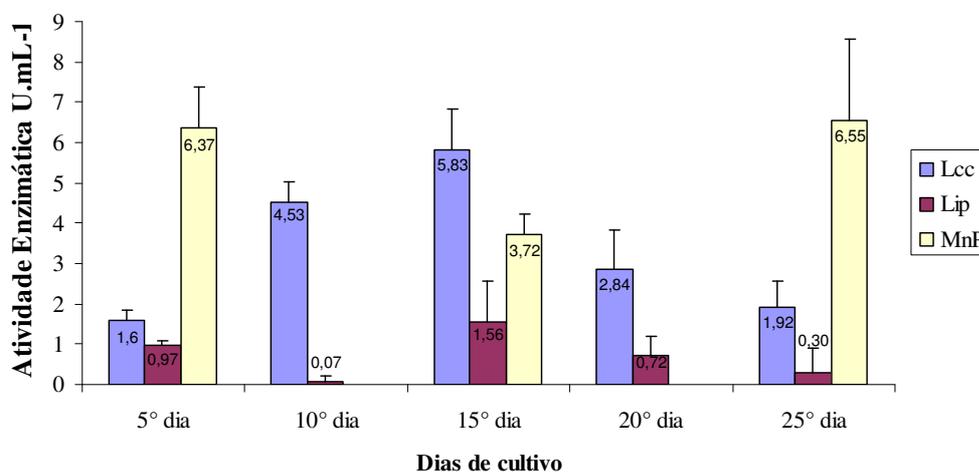


Figura 18: Atividade enzimática de *Trametes villosa* em associação com ALL42 na presença de Acefato 50% em condição estática.

6.3.3 Degradação do Acefato em meio líquido pela associação de *Pycnoporus sanguineus* e *Trichoderma harzianum* em condição de agitação.

Na tabela 3 serão apresentados à média de produção enzimática obtidos para associação entre *Pycnoporus sanguineus* e as linhagens de *Trichoderma*, na condição de agitação, na presença de 10% e 50% de Acefato, são apresentados também os resultados estatísticos realizados para comparar a produção entre a cultura pura e as associações.

Tabela 3: Média da produção enzimática na associação de *Pycnoporus sanguineus* com linhagens de *Trichoderma harzianum* na presença de Acefato 10% e 50% em condição de agitação e teste estatístico U (ou Mann Whitney).

Agitação		Média da Produção enzimática (U.mL ⁻¹)											
		Lacase				Lignina peroxidase				Manganês peroxidase			
Fungo		10%	p	50%	p	10%	p	50%	p	10%	p	50%	p
<i>P. sanguineus</i>		5,15		26,14		1,28		1,62		1,85		3,59	
<i>P. sanguineus</i> e T34		2,33	0,021	2,77	0,021	2,24	0,149	3,01	0,564	3,71	0,248	5,80	0,564
<i>P. sanguineus</i> e T39		0,99	0,021	5,22	0,021	1,47	0,772	2,54	0,248	2,74	0,149	6,87	0,149
<i>P. sanguineus</i> e T47		7,66	0,021	22,31	0,564	3,69	0,021	1,83	0,773	1,60	0,386	3,09	0,564
<i>P. sanguineus</i> e ALL42		8,92	0,043	14,31	0,248	3,85	0,021	1,49	0,773	1,83	0,773	3,32	0,773

A associação entre *Pycnoporus sanguineus* e as linhagens de *Trichoderma harzianum* na presença de 10% de Acefato indicam que somente as linhagens de *T. harzianum* T47 e *T. harzianum* ALL42 foram capazes de aumentar a produção de Lacase por *P. sanguineus*, na presença de 50% todas as associações produziram menos Lacase do que o grupo controle.

Na cultura pura com a presença de Acefato 10%, o pico de produção de Lacase ocorreu no 10º dia, com a produção de 7,53 U.mL⁻¹ ao comparar os experimentos com esta mesma espécie, sem a presença do Acefato, observa-se que este mesmo fungo produziu 69,12 U.mL⁻¹ de Lacase. Demonstrando que nestas condições o cultivo do fungo sem a presença do Acefato é mais favorável a produção de enzimas.

A produção de Lignina peroxidase e Manganês peroxidase, apresentaram variações, nos dias de cultivo analisados, na presença de 10% de Acefato a maior produção de LiP ocorreu no 15º dia com 3,66 U.mL⁻¹ e no 5º dia com 3,10 U.mL⁻¹ de MnP, o mesmo comportamento não foi observado por Jardim (2010) que obteve produção inferior a 0,16 U.mL⁻¹ para LiP e 0,13 U.mL⁻¹MnP. Estes resultados indicam que a maior produção de Lip e MnP podem estar relacionados a presença das linhagens de *Trichoderma harzianum*.

A produção de Lacase por *Pycnoporus sanguineus* na presença de 50% de Acefato apresentou os melhores resultados. A produção média foi de 26,14 U.mL⁻¹, durante os 25 dias de cultivo, com destaque para o 10º dia que apresentou uma produção de 47,19 U.mL⁻¹, nestas mesmas condições de cultivo Jardim (2010) obteve produção máxima igual a 27,03 U.mL⁻¹.

Na associação entre *Pycnoporus sanguineus* e a linhagem T34 os melhores resultados de produção enzimática foram para a Lignina peroxidase e Manganês peroxidase, ambos com pico de produção no 15º dia.

Na presença de 50% de Acefato a linhagem T34 apresentou o mesmo comportamento em relação a produção das enzimas, MnP também teve o pico de produção no 15º dia, já a produção de LiP teve seu pico no 20º dia.

O mesmo comportamento pode ser observado para a associação com a linhagem T39, onde a produção de LiP e MnP foi maior do que a produção de Lacase, com pico de produção de LiP, também no 15º dia.

Assim como no ensaio com 10% de Acefato esta mesma associação não teve produção de LiP no 20º dia de cultivo, a produção de Lacase e Manganês peroxidase foi maior em relação a associação com 10% de Acefato, mas a média geral de produção foi menor do que a produção do grupo controle.

A associação com a linhagem T47 apresentou resultados significativos para a produção da enzima Lacase e Lignina peroxidase, com pico de produção no 10º e 15º dia respectivamente. A produção média das enzimas, foi significativa em relação a produção da cultura de *Pycnoporus sanguineus* individualmente, indicando que esta linhagem pode ser utilizada como indutor para as enzimas Lacase e Lignina peroxidase (Figura 19).

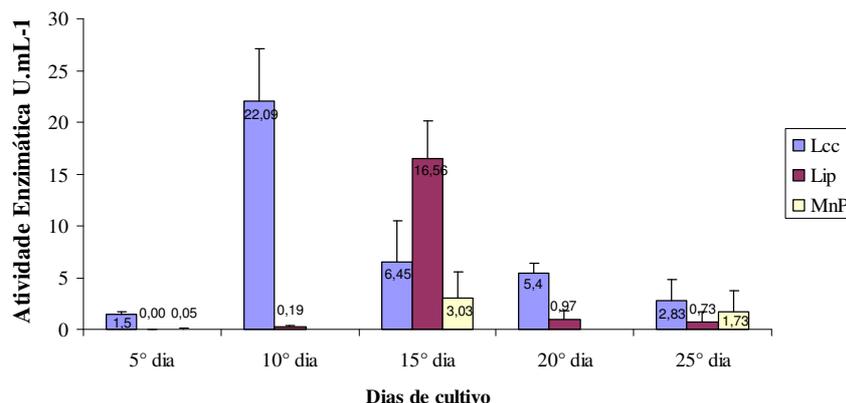


Figura 19: Atividade enzimática de *Pycnoporus sanguineus* em associação com T47 na presença de Acefato 10% em condição de agitação.

Na presença de 50% de Acefato a associação com a linhagem T47 apresentou bons resultados para a produção da enzima Lacase, nestas condições não houve produção de Lignina peroxidase no 5º e 15º dia de cultivo, mas a média geral de produção superou a média de produção do grupo controle.

A associação com a linhagem ALL42 também apresentou resultados positivos para a produção de Lacase e Lignina peroxidase, confirmando o potencial desta linhagem como agente indutor na produção de enzimas, visto que, na associação com *Trametes villosa* esta mesma linhagem também apresentou resultados significativos na produção de Lacase e Manganês peroxidase. De forma geral, a associação com a linhagem ALL42 sobressai-se em relação aos demais, aumentando a produção de Lacase nos cultivos com a sua presença (Figura 20).

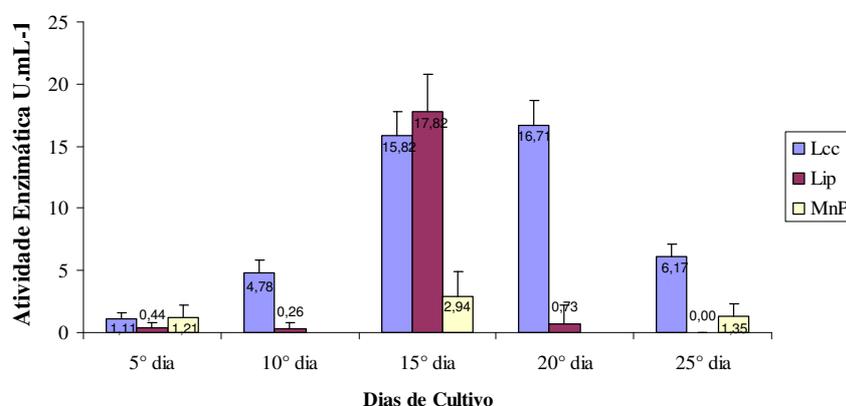


Figura 20: Atividade enzimática de *Pycnoporus sanguineus* em associação com ALL42 na presença de Acefato 10% em condição de agitação.

6.3.4 Degradação do Acefato em meio líquido pela associação de *Pycnoporus sanguineus* e as linhagens de *Trichoderma harzianum* em condição estática.

Na tabela 4 serão apresentados à média de produção enzimática obtidos para associação entre *Pycnoporus sanguineus* e as linhagens de *Trichoderma*, na condição estática, na presença de 10% e 50% de Acefato, são apresentados também os resultados estatísticos realizados para comparar a produção entre a cultura pura e as associações.

Tabela 4: Média da produção enzimática na associação de *Pycnoporus sanguineus* com linhagens de *Trichoderma harzianum* na presença de Acefato 10% e 50% em condição estática e teste estatístico U Mann Whitney.

Estática	Média da Produção enzimática (U.mL ⁻¹)											
	Lacase				Lignina peroxidase				Manganês peroxidase			
Fungo	10%	p	50%	p	10%	p	50%	p	10%	p	50%	p
<i>P. sanguineus</i>	1,61		6,18		1,25		1,13		2,11		3,60	
<i>P.sanguineusx</i> T34	1,57	0,773	1,98	0,020	1,59	0,386	1,03	0,564	3,21	0,386	0,99	0,386
<i>P.sanguineusx</i> T39	1,87	0,564	2,56	0,245	0,94	0,248	4,31	0,021	2,34	0,773	2,58	0,773
<i>P.sanguineusx</i> T47	1,74	0,773	1,62	0,021	1,69	0,386	1,54	0,386	1,76	0,386	2,15	0,773
<i>P.sanguineusx</i> ALL42	1,25	0,059	2,98	0,248	0,79	0,149	0,87	1,00	2,94	0,773	3,40	0,386

Para o fungo *Pycnoporus sanguineus* a condição estática não favoreceu a produção de Lacase, pois a melhor produção ocorreu em condição de agitação, na presença de 10% de Acefato, a produção máxima de Lacase ocorreu no 15° dia de cultivo com a produção de apenas 3,26 U.mL⁻¹, enquanto em condição de agitação nesta mesma concentração a produção chegou a 7,53 U.mL⁻¹.

A produção de Manganês peroxidase chegou a 5,54 U.mL⁻¹ no 15° dia de cultivo, enquanto no estudo desenvolvido por Jardim (2010) a produção não ultrapassou 0,48U.mL⁻¹. Na presença de 50% de Acefato, houve maior produção de Lcc, com destaque para o 20° dia de cultivo, que teve produção igual a 7,72 U.mL⁻¹, nestas condições a produção de MnP chegou a 7,33 U.mL⁻¹.

Os resultados da associação com a linhagem T34, não indicam resultados positivos para a associação, observa-se no gráfico da Figura 45 e 46 que houve a produção das três enzimas, em todos os dias analisados, mas a média de produção não superou a produção do grupo controle.

Na associação com a linhagem T39 observa-se que não houve a produção de LiP no 20° e 25° dia de cultivo na presença de 10% de Acefato. A produção de Lacase também foi inferior a produção do grupo controle.

Na presença de 50% de Acefato esta foi a única associação que produziu maior quantidade de LiP, quando comparado com a produção do grupo controle.

As associações com a linhagem T47 na presença de 10% e 50% de Acefato, apresentaram produção das três enzimas, em todos os dias analisados, mas a produção também foi menor em relação ao grupo controle, indicando que nestas condições o cultivo individual de *Pycnoporus sanguineus* é mais favorável para a produção das enzimas em estudo.

A associação com a linhagem ALL42 apresentou maior produção de MnP na presença de 10% de Acefato, superando a produção do grupo controle. Na presença de 50% de Acefato a produção de Lcc foi considerável, mas a média geral de produção foi menor do que a produção do grupo controle. Estes resultados indicam que a linhagem ALL42 é um bom indutor na produção de enzimas, confirmando os resultados encontrados nos ensaios realizados com *Trametes villosa* e *Pycnoporus sanguineus* em meio agitado.

6.4 ANÁLISE DO ACEFATO APÓS TRATAMENTO

Após os ensaios com as associações fungicas na presença do Acefato foram realizados dois experimentos diferentes: análise do extrato após tratamento por fungo pela técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, com o intuito de verificar se houve redução do Acefato e ou a formação de seu metabólito, o Metamidofós e análise do Acefato após o tratamento utilizando o Teste Colorimétrico de Identificação da Colinesterase.

Para a realização desta etapa foram selecionadas as associações que apresentaram os melhores resultados enzimáticos obtidos na presença do Acefato, a seleção resultou em oito associações que apresentaram produção significativa de enzimas em relação à produção do grupo controle. O teste estatístico realizado para comparar a

produção enzimática, foi o Teste u (Mann Whitney), que compara dois grupos que não possui distribuição normal. O quadro 7 apresenta as associações selecionadas.

Quadro 7: Associações fúngicas com melhor desempenho na produção de Lacase.

ASSOCIAÇÕES COM MELHOR PRODUÇÃO ENZIMÁTICA		
Associação fúngica	Concentração de Acefato	Condição de cultivo
<i>Pycnoporus sanguineus</i> e T47	10%	Agitação
<i>Pycnoporus sanguineus</i> e ALL42	10%	Agitação
<i>Trametes villosa</i> e T39	10%	Estática
<i>Trametes villosa</i> e ALL42	10%	Estática
<i>Trametes villosa</i> e T34	50%	Estática
<i>Trametes villosa</i> e T39	50%	Estática
<i>Trametes villosa</i> e T47	50%	Estática
<i>Trametes villosa</i> e ALL42	50%	Estática

6.4.1 Análise do extrato após tratamento por fungo pela técnica de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

Na fase experimental do trabalho algumas dificuldades operacionais foram vivenciadas, devido a falta de seringa no GC/MS, coluna incompatível com os analitos analisados e também pela troca do corpo técnico do laboratório, fato que dificultou e atrasou a realização dos ensaios, mesmo assim várias tentativas foram realizadas a fim de validar o método.

Diferentes configurações foram testadas na programação do CG/MS, entre elas: fluxo de injeção, programação da temperatura da coluna, temperatura do injetor, volume de injeção, temperatura da interface, inclusive os íons monitorados. Porém, todos os ensaios realizados permitiram apenas a identificação dos picos do Acefato e do Metamidofós.

As soluções injetadas para fazer a curva de calibração não apresentaram resultados satisfatórios, os resultados expressos através dos cromatogramas não foram

suficientes para fazer a curva de calibração, os picos formados não apresentaram áreas correspondentes à concentração injetada.

Assim foi possível, apenas identificar os picos do Acefato e do Metamidofós, nas soluções padrão injetadas, as amostras com os respectivos padrões foram preparadas em acetato de etila e posteriormente injetadas no GC/MS.

Desenvolveu-se a metodologia proposta por Faria et al. (2009) adaptado de Netherlands (1996a) e Netherlands (1996b) para a análise dos agrotóxicos por meio de métodos de multirresíduos. O método adotado mostrou boa recuperação dos compostos injetados, mas não foi possível concluir as análises devido ao não ajuste da metodologia aos parâmetros de validação. Mesmo assim, optou-se pela injeção das amostras com resultados significativos na produção de enzimas.

Ao injetar as análises procurou-se verificar a presença ou ausência do Acefato e a possível formação do seu metabólito Metamidofós nas amostras injetadas. Para esta observação, utilizou-se os picos destes produtos identificados previamente, durante a injeção das soluções padrão de Acefato e Metamidofós, salientando que os experimentos desenvolvidos não foram suficientes para quantificar os resíduos de agrotóxicos existentes nas amostras. Eles somente serviram para indicar a presença ou ausência e, por inferência, concluir se houve ou não a degradação dos compostos analisados.

Para a análise em GC/MS, as amostras passaram pelo processo de extração, conforme detalhado no item 5.9 e posteriormente foram injetadas no GC/MS. Todas as amostras foram preparadas em injetadas em duplicata.

Nos cromatogramas das Figuras 21 e 22 é possível visualizar os picos do Acefato e do Metamidofós, respectivamente.

O cromatograma da Figura 21 indica que o tempo de retenção do Acefato é de aproximadamente 12,2 minutos, neste ensaio o íon monitorado para o Acefato correspondeu ao íon 136 m/z.

Na Figura 22 é possível visualizar o pico do Metamidofós, com tempo de retenção aproximado em 9,3 minutos, o íon monitorado foi o 94m/z.

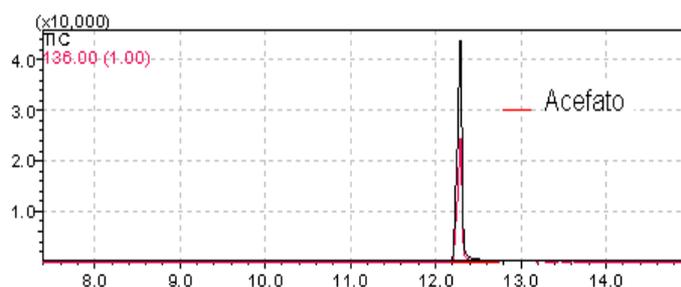


Figura 21: Cromatograma do padrão Acefato.

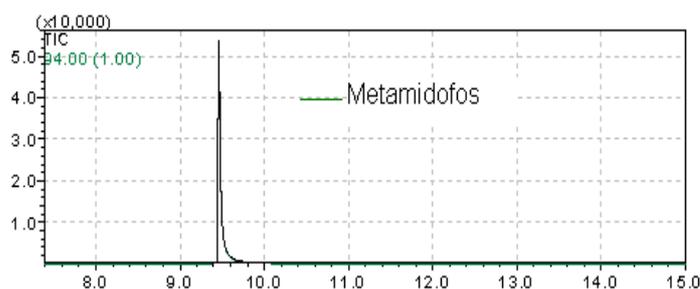
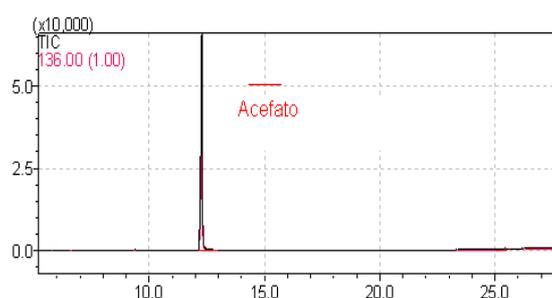
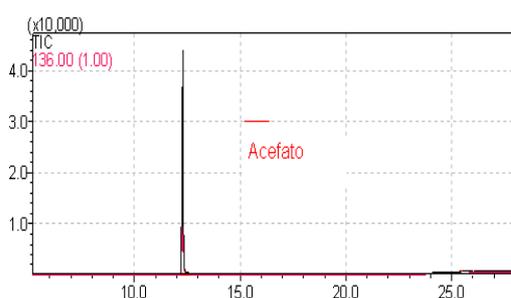


Figura 22: Cromatograma do padrão Metamidofós.

Com o pico de retenção de cada agrotóxico foi possível analisar as amostras tratadas em relação à presença ou ausência dos compostos analisados, considerando a formação do pico característico de cada produto e comparando as amostras tratadas microbiologicamente com o grupo controle que não recebeu o tratamento microbiológico (Figuras 23 e 24).



Figuras 23 e 24: Grupo controle – solução de Acefato nas concentrações de 10% e 50% respectivamente.

A seguir são apresentados os cromatogramas das amostras injetadas, onde foi possível verificar se houve a formação de picos característicos dos agrotóxicos analisados.

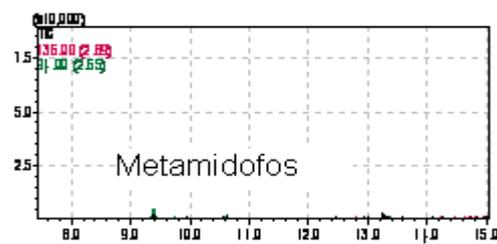
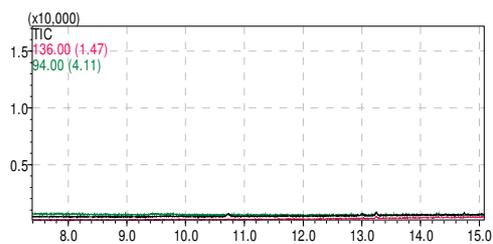


Figura 25 e 26: Cromatogramas da associação entre *P. sanguineus* e T47 – 10%.

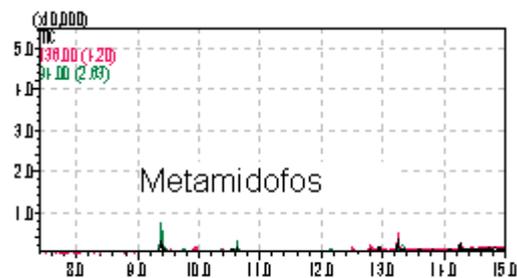
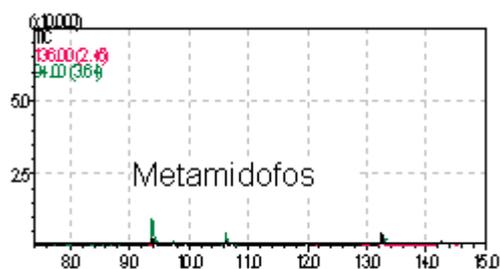


Figura 27 e 28: Cromatogramas da associação entre *P. sanguineus* e ALL42 – 10%.

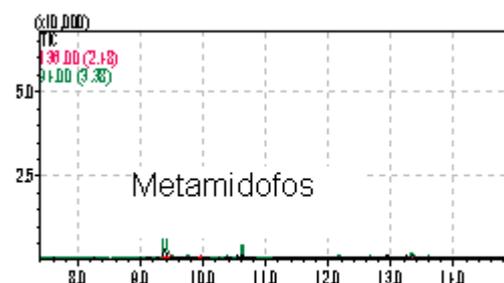
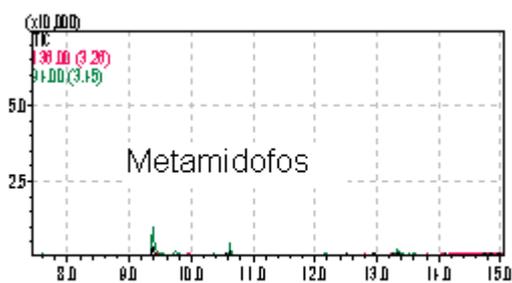


Figura 29 e 30: Cromatogramas da associação entre *T. villosa* e T39 – 10%.

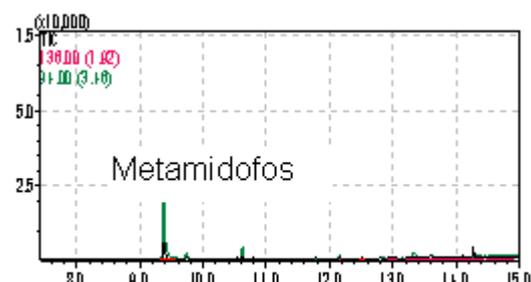
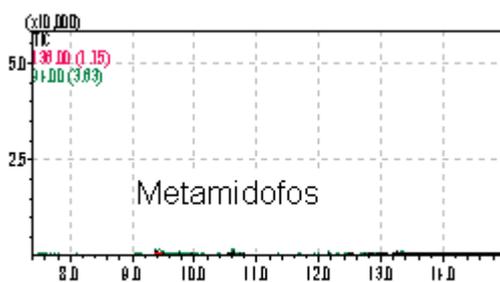


Figura 31 e 32: Cromatogramas da associação entre *T. villosa* e ALL42 – 10%.

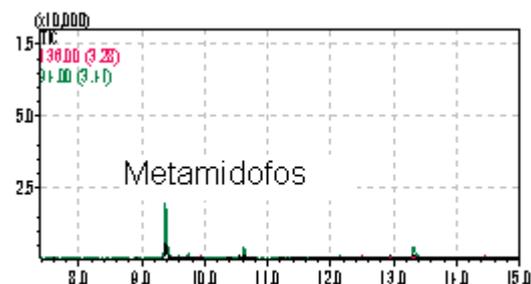
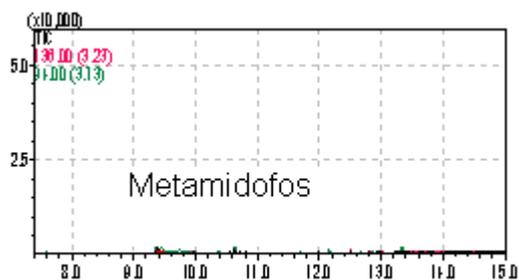


Figura 33 e 34: Cromatogramas da associação entre *T. villosa* e T34 – 50%.

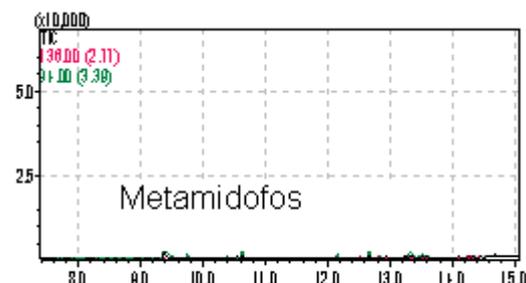
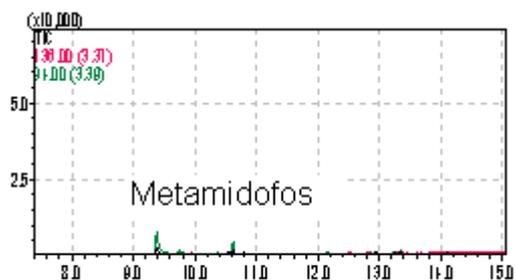


Figura 35 e 36: Cromatogramas da associação entre *T. villosa* e T39 – 50%.

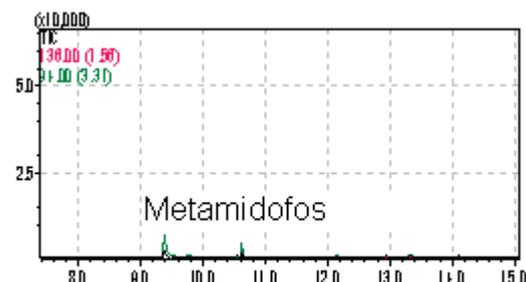
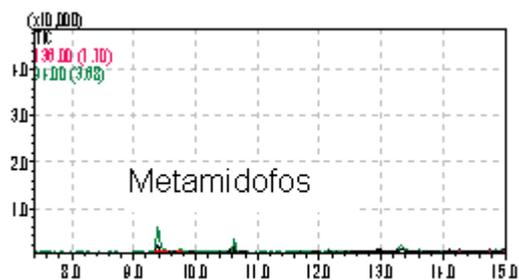


Figura 37 e 38: Cromatogramas da associação entre *T. villosa* e T47 – 50%.

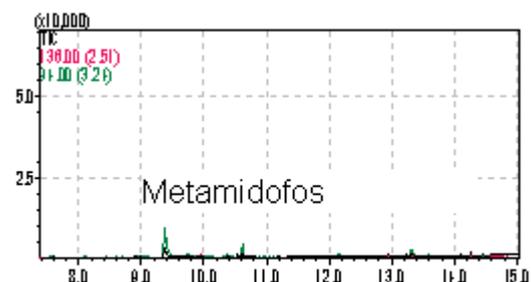
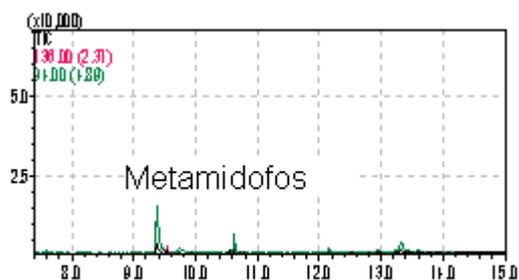


Figura 39 e 40: Cromatogramas da associação entre *T. villosa* e ALL42 – 50%.

Observando os cromatogramas das amostras analisadas e comparando-os com os cromatogramas obtidos na injeção do padrão, pode-se concluir que não houve a

formação de picos característicos do Acefato, porém observa-se a formação de picos em diferentes intensidades do metabólito Metamidofós. Os dados disponíveis não permitem quantificar os níveis de degradação do Acefato, visto que, as amostras foram analisadas após o processo de extração e como não foi possível fazer a curva de calibração, não tivemos resultados precisos sobre a taxa de recuperação do analito, após o processo de extração.

Diante dos fatos expostos, procedeu-se a realização do teste Colorimétrico para identificação da Colinesterase, utilizou-se nestes testes as mesmas amostras selecionadas para a análise em Cromatografia Gasosa.

6.4.2 Análise do acefato após o tratamento utilizando o teste Colorimétrico de identificação da Colinesterase

O teste de inibição da enzima Colinesterase é um teste utilizado para determinar a Colinesterase sérica no soro ou plasma sanguíneo, nestes experimentos foi utilizado o plasma. O conjunto amostral deste teste compreendeu as oito associações fúngicas que apresentaram melhor resultado na produção de Lacase (Quadro 07), com seus respectivos grupo controle e o metabólito Metamidofós. O teste de Colinesterase sérica foi utilizado para verificar se houve a redução da toxicidade nas amostras tratadas por fungos. A análise estatística descritiva encontra-se no Apêndice C.

A metodologia de análise foi realizada de acordo com Jardim (2010) e baseia-se no princípio de que a Colinesterase sérica encontra-se diminuída, em casos de intoxicação por inseticidas organofosforados. Os resultados são apresentados de forma comparativa entre o conjunto amostral (substância-teste) em quatro concentrações: 75%, 50%, 25% e 12,5%, adotou-se as mesmas concentrações utilizadas por Jardim (2010). De acordo com esta autora a realização do teste em diferentes concentrações permite encontrar a melhor dose-resposta para o método, estas concentrações foram obtidas através de diluição seriada considerando as amostras com 10% e 50% de Acefato.

Para verificar a melhor dose resposta nas concentrações adotadas, fez-se o teste estatístico ANOVA entre as médias das concentrações adotadas, considerando os valores significativos para $p < 0,05\%$. Em seguida, realizou-se o teste de Tukey para determinar em quais concentrações as diferenças foram significativas.

a) Amostras analisadas com 10% de Acefato

No teste realizado com a associação de *Pycnoporus sanguineus* e o *Trichoderma harzianum* T47 foi possível observar um padrão no decréscimo na Colinesterase apenas na concentração equivalente a 50%, indicando que esta concentração apresenta a melhor dose-resposta entre as concentrações analisadas. As demais concentrações não exibiram comportamento semelhante. A análise estatística indicou diferenças significativas entre as concentrações do grupo referência. No gráfico da Figura 41 é possível visualizar os resultados.

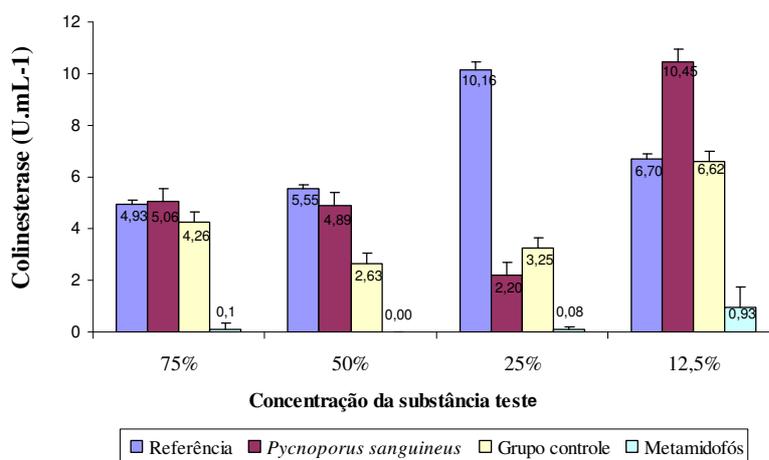


Figura 41: Atividade da Colinesterase em amostra tratada pela associação fúngica entre *P. sanguineus* e o *Trichoderma harzianum* T47.

A associação de *Pycnoporus sanguineus* e o *Trichoderma* ALL42 demonstrou um padrão no decréscimo da enzima, com decaimento dos valores no sentido referência, substância-teste, grupo controle e Metamidofós, nas concentrações de 75%, 50% e 25%. O teste ANOVA indicou diferenças significativas no grupo referência, no grupo da substância-teste e no grupo controle, no grupo da substância-teste a maior diferença está entre a concentração de 50% e 12,5%, já o grupo controle demonstra de forma clara, o aumento de Colinesterase proporcional ao decréscimo na concentração da substância-teste, nas concentrações de 50%, 25% e 12,5% (Figura 42). A concentração de 75% demonstrou excelentes resultados com valores de Colinesterase da substância-teste superior ao grupo referência, demonstrando a degradação do agrotóxico.

Na concentração de 50% é possível observar diferenças significativas entre o grupo que recebeu o tratamento e o grupo não tratado com aumento de 94% na atividade de Colinesterase.

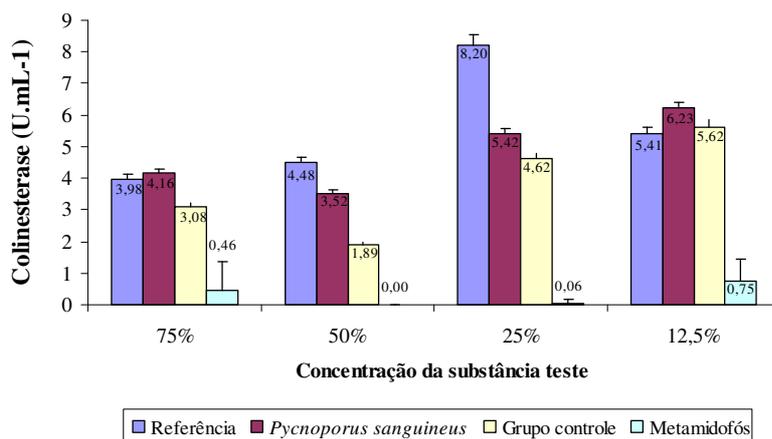


Figura 42: Atividade da Colinesterase em amostra tratada pela associação fúngica entre *P. sanguineus* e o *Trichoderma harzianum* ALL42.

O gráfico da Figura 43 demonstra a associação entre *Trametes villosa* e o *Trichoderma* T39, observa-se claramente que não houve correspondência nos resultados amostrados nas concentrações de 75% e 25%, onde a atividade de Colinesterase foi maior no grupo controle do que na substância-teste tratada, pode-se inferir que essas concentrações não são adequadas no que diz respeito à dose-resposta, pois não houve coerência entre os valores. Mais uma vez os testes não indicaram diferenças significativas para o metabólito do Acefato. Observa-se que na concentração de 12,5% a produção de Colinesterase foi nove vezes maior em relação à concentração de 75%. Para esta associação a melhor dose-resposta foi na concentração de 25%.

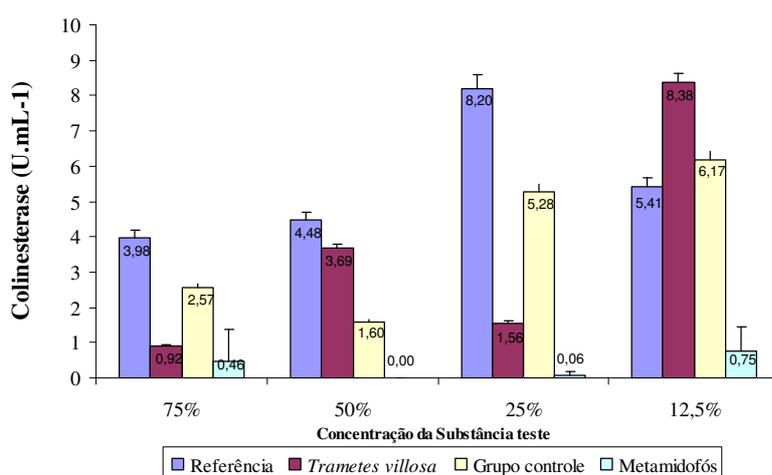


Figura 43: Atividade da Colinesterase em amostra tratada pela associação fúngica entre *T. villosa* e o *Trichoderma harzianum* T39.

A associação entre *Trametes villosa* e o *Trichoderma* ALL42 apresentou correlação nas concentrações de 75% e 25%. Com correspondência dos valores no sentido referência, substância-teste e grupo controle (Figura 44).

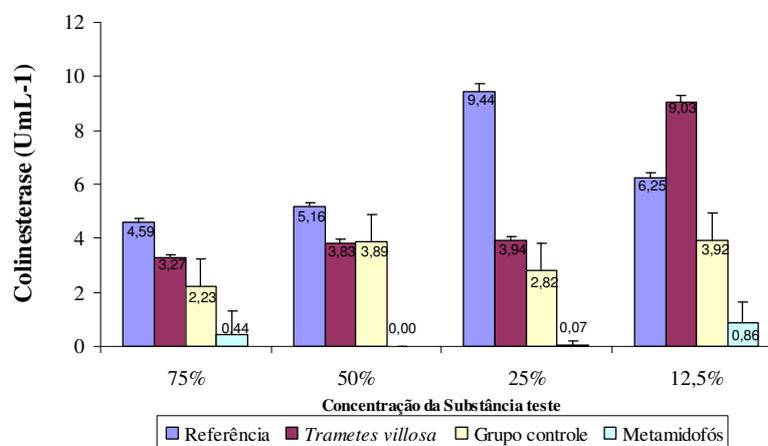


Figura 44: Atividade da Colinesterase em amostra tratada pela associação fúngica entre *T. villosa* e o *Trichoderma harzianum* ALL42.

Nestes ensaios considerando a presença de 10% de Acefato os melhores resultados são das amostras com concentração de 50%, na associação de *P. sanguineus* e o *Trichoderma* T47, com aumento de 94% de Colinesterase e na associação de *P. sanguineus* e *Trichoderma harzianum* ALL42 com aumento de 93,% de Colinesterase e na associação entre *Trametes villosa* e o *Trichoderma harzianum* T39, com aumento de 100% de Colinesterase.

b) Amostras analisadas com 50% de Acefato

Ao analisar o gráfico da Figura 45 pode-se afirmar que novamente a concentração de 50% apresentou o melhor resultado dentre as concentrações da substância-teste analisada.

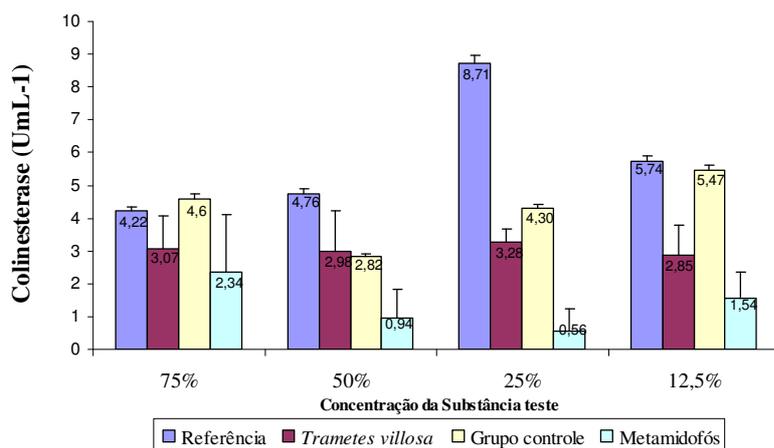


Figura 45: Atividade da Colinesterase em amostra tratada pela associação fúngica entre *T. villosa* e o *Trichoderma harzianum* T34.

A associação entre *Trametes villosa* e o *Trichoderma harzianum* T39 demonstrou melhor resultado na concentração de 50% (Figura 46).

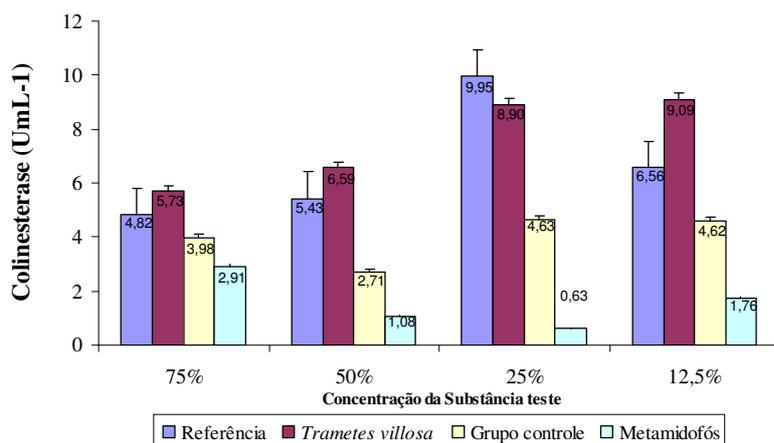


Figura 46: Atividade da Colinesterase em amostra tratada pela associação fúngica entre *T. villosa* e o *Trichoderma harzianum* T39.

Na associação entre *Trametes villosa* e o *Trichoderma harzianum* T47 é possível observar que houve decréscimo da Colinesterase, mas os valores entre o grupo tratado e a substância teste não diferiram significadamente (Figura 47).

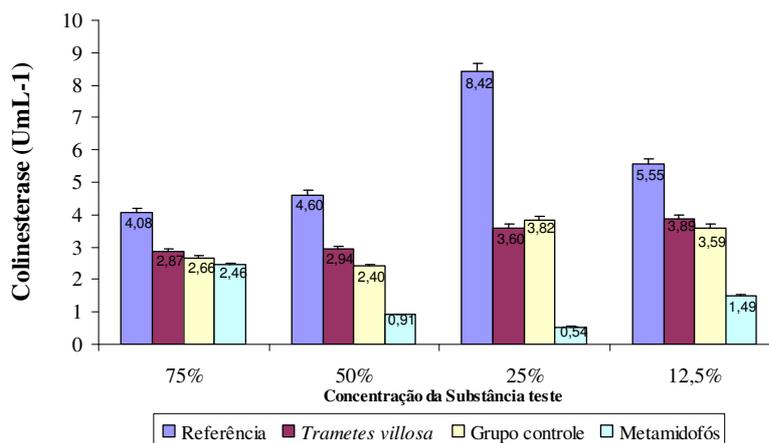


Figura 47: Atividade da Colinesterase em amostra tratada pela associação fúngica entre *T. villosa* e o *Trichoderma harzianum* T47.

Os resultados da associação, entre *Trametes villosa* e o *Trichoderma harzianum* ALL42 não diferiram das demais associações, quando considerado a presença de 50% de Acefato, de forma geral os valores da substância-teste e do grupo controle são muito próximos, indicando que nesta concentração as enzimas não conseguiram degradar o Acefato (Figura 48).

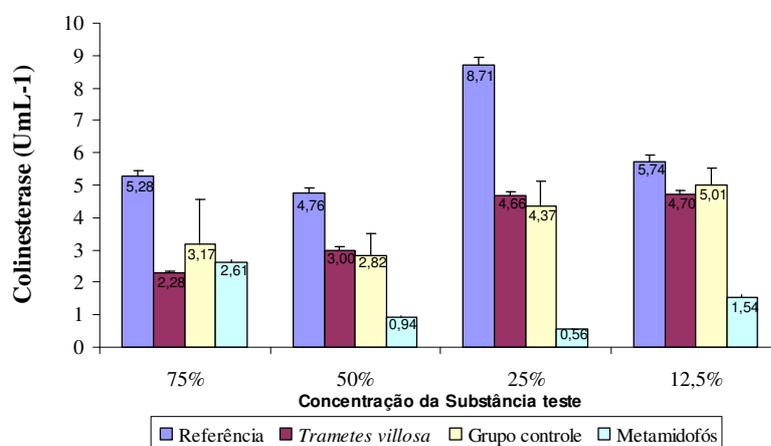


Figura 48: Atividade da Colinesterase em amostra tratada pela associação fúngica entre *T. villosa* e o *Trichoderma harzianum* ALL42.

Considerando os resultados apresentados observa-se que na concentração de 50% de Acefato o melhor tratamento foi realizado pela associação entre *T. villosa* e a linhagem T39, na concentração de 75% obteve-se um aumento de Colinesterase equivalente a 72%, na concentração de 50% o aumento correspondeu a 100%, na

concentração de 25% foi de 96% e na concentração de 12,5% o aumento foi equivalente a 98%. Verificando que assim como na concentração de 10% de Acefato a melhor dose-resposta corresponde à concentração de 50%.

Os resultados evidenciam que o tratamento microbiológico reduziu a toxicidade do Acefato, Ribeiro e Mella (2007) relatam que atividade enzimática acima de 75% não indica casos de contaminação e ou exposição, nestes ensaios sete amostras analisadas apresentaram índices de colinesterase superior a este valor.

O teste de inibição da acetilcolinesterase demonstra ser uma eficiente ferramenta no monitoramento da qualidade ambiental, Hirata, Skortzaru e Narciso (2003) também utilizaram esta metodologia para avaliar a degradação de organofosforados em função do pH os pesquisadores verificaram grande correlação entres os níveis de colinesterase e o grau de toxicidade.

Estudo semelhante foi desenvolvido por Griza (2008) que avaliou a contaminação de águas superficiais utilizando o teste de colinesterase, os resultados destes estudos comprovam que esta é uma técnica que pode ser aplicada na perspectiva de obter resultados precisos e confiáveis.

7. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

Os resultados obtidos durante o trabalho experimental permitem concluir que a associação de *Trichoderma harzianum* com *Trametes villosa* é capaz de aumentar a produção de Lacases, aumentando o potencial de aplicação deste fungo em grande escala, na degradação de compostos recalcitrantes. Os resultados ainda permitem concluir que:

As linhagens de *Trichoderma harzianum* são excelentes produtores das enzimas Lignina peroxidase e Manganês peroxidase, com destaque para a linhagem T39 que apresentou resultados excelentes no cultivo em condição de agitação;

No cultivo misto sem a presença do Acefato as associações com maior produção de Lacase foram as associações com *T. villosa* com o *T. harzianum* T34, *T. villosa* com *T. harzianum* T39, e *T. villosa* com o *T. harzianum* T47;

O fungo *Pycnoporus sanguineus* é um excelente produtor de Lacases, demonstrando melhor produção no cultivo individual;

Na presença de Acefato o *Trichoderma harzianum* T47 e ALL42 são os melhores indutores na produção de Lacase;

As duas condições de cultivo analisadas demonstram que *Trametes villosa* apresentou melhores resultados na produção de Lacase em condição estática enquanto *Pycnoporus sanguineus* teve melhores resultados em condição de agitação.

A produção de Lacase por *Trametes villosa* e *Pycnoporus sanguineus* foi superior na presença de 50% de Acefato em relação a concentração de 10%;

Não foi possível mensurar com exatidão os níveis de degradação do Acefato devido às dificuldades em realizar a análise em Cromatografia Gasosa, mas foi possível inferir que houve redução do Acefato, devido a ausência de picos representativos desta substância nas amostras analisadas, com a formação de seu metabólito;

As análises para identificação da Colinesterase indicaram que o método é uma alternativa que pode ser aplicada, os resultados indicaram níveis excelentes de Colinesterase nas amostras de *Pycnoporus sanguineus* com 10% de Acefato, nesta concentração a produção de Lacase foi maior do que na concentração de 50% de Acefato, indicando que a redução da toxicidade do Acefato está relacionada a quantidade de enzimas presentes no meio, além de demonstrar que a concentração de 50% foi a concentração com melhor dose-resposta nos testes realizados.

Os resultados indicaram também que não houve correspondência nos níveis de Colinesterase em todas as amostras analisadas fato que pode estar relacionado a presença do Metabólito, cujos picos foram identificados nas análises de GC/MS.

De acordo com os resultados observados recomenda-se:

Aprimorar as técnicas de Cromatografia gasosa a fim de determinar quantitativamente a degradação do Acefato;

Isolar e purificar as enzimas produzidas por *T. harzianum* (Lignina peroxidase e Manganês peroxidase) e verificar o potencial destas enzimas em processos de biorremediação;

Estudar o potencial de produção de enzimas por microrganismos isolados de sítios contaminados; a fim de verificar se há maior produção enzimática;

Avaliar a aplicabilidade destas enzimas na remoção do Acefato em locais com histórico de contaminação do Acefato.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Resíduos de agrotóxicos em alimentos. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 361-363, 2006.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Nota Técnica de Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo Acefato**, 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Nota Técnica de Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo Metamidofós**, 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Reavaliação de Produtos Tóxicos 10 anos de proteção a população**. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/reavaliacao /index.htm](http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/reavaliacao/index.htm)>. Acesso em 22 julho 2009.
- AGUIAR, M. M.; FERREIRA, L. F. R.; MONTEIRO, R. T. R. Use of vinasse and sugarcane bagasse for the production of enzymes by lignocellulolytic fungi. **Brazilian archives of biology and technology**, v. 53, n. 5, p. 1245-1254, set/out., 2010.
- ANTONIOUS, G. F. ; SNYDER, J. C. Residues and Half-Lives of Acephate, Methamidophos, and Pirimiphos-Methyl in Leaves and Fruit of Greenhouse-Grown Tomatoes. **Bulletin Envirometal Contamination and Toxicology**. v. 52, p. 141-148, 1994.
- ASHA, L. ; GUANHUAT, T. ; CHAI, M. Multiresidue Analysis of Pesticides in Fruits and Vegetables Using Solid-Phase Extraction and Gas Chromatographic Methods. **Analytical Sciences**, v. 24, feb., 2008.
- BALDRIAN, P. Increase of laccase activity during interspecific interactions of white-rot fungi. **Microbiology Ecology**, v. 50, p. 245-253, 2004.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases - occurrence and properties. **Review Microbiology** v. 30, p. 215-243, 2006.
- BARRIUSO, E.; CALVET, R.; SCHIAVON, M.; SOULAS, G. Les pesticides et les polluants organiques des sols: transformations et dissipation. **Étude et Gestion des Sols, Ardon**, v.3, n.4, p.279-296, 1996.
- BELLINASSO, M. L. **Estudo sobre a biodegradação do herbicida trifluralina por bactérias isoladas de solo agrícola e proposta metodológica para o ensino de biodegradação**. Dissertação de Mestrado, Porto Alegre: EdUFRGS , 2002, 147 p.
- BHATTI, H. N. ; LEGGE, H. N. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, v. 19, p. 771-783, 2008.
- BONFIM, M. P. Antagonismo *in vitro* E *in vivo* de *Trichoderma* sp. A

Rhizopus stolonifer em maracujazeiro amarelo. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, UESB, 2007, 74p.

BORTOLUZZI, E. C. ; RHEINHEIMER, D. S. ; GONÇALVES, C. S. ; PELLEGRINI, J. B. R. ; ZANELLA, R. ; COPETTI, A. C. C. Contaminação de águas superficiais por agrotóxicos em função do uso do solo numa microbacia hidrográfica de Agudo, RS. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 10, n. 4, p. 881-887, 2006.

BRASIL, Portaria Normativa n.º 329 de 02 de setembro de 1985 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília 1985.

BRASIL, Lei Federal n.º 7.802, de 11 de julho de 1989. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 1989.

BRASIL, Portaria Normativa n.º 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília 2004.

CARVALHO, P. H. ; PRATA V. M. ; ALVES, P. B. ; NAVICKIENE, S. Determination of six pesticides in the medicinal herb *Cordia salicifolia* by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography/mass spectrometry. **Journal of AOAC International**, v 92, n. 4, p. 1184 -1189, jul./ago., 2009.

CASTELLANI, A. Maintenance and Cultivation of Common Pathogenic Fungi of Man in Sterile Distilled Water. Further Researcher. **Journal of Tropical Medicine and Hygienet**, v. 70, p. 181-184, 1967.

CEDENO, M. V.; FARNET, A. M.; BILLETTE, C. B.; MATA, G.; SAVOIE, J. M. Interspecific interactions with *Trichoderma longibrachiatum* induce *Pleurotus ostreatus* defence reactions based on the production of laccase isozymes. **Biotecnol Lett**, v. 29, p. 1583-1590, 2007.

COLLA, L. M. ; PRIMAZ, A. L. ; LIMA, M. ; BERTOLINI, T. E. ; COSTA, J. A. V. Isolamento e Seleção de Fungos para Biorremediação a partir de Solo Contaminado com Herbicidas Trizínicos. **Ciência e Agrotecnologia Lavras**, v. 32, n. 3, p. 809-813, 2008.

CHO, N. S. ; NAM, J. H. ; PARK, J. M. ; KOO, C. D. ; LEE, S. S. ; PASHENOVA, N. ; OHGA, S. ; LEONOWICZ, A. Transformation of Chlorophenols by White-Rot Fungi and their Laccase. **Holzforschung**, v. 55, p. 579-584, 2001.

CLAVER, A. ; ORMAD, P. ; RODRÍGUEZ, L. ; OVELLEIRO, J. L. Study of the presence of pesticides in surface waters in the Ebro river basin (Spain) **Chemosphere**, v. 64, p.1437-1443, 2006.

COUTINHO, C. F. B. ; TANIMOTO, S. T. ; GALLI, A. ; GARBELLINI, G. S. ; TAKAYAMA, M. ; AMARAL, R. B. ; MAZO, L. H. ; AVACA, L. A. ; MACHADO, S. A. S. Pesticidas: mecanismo de ação, degradação e toxidez. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**. Curitiba, v. 15, p. 65-72, 2005.

DIMITRA, A. L.; TRIANTAFYLLOS, A. A.; Optimization of headspace solid-phase microextraction conditions for the determination of organophosphorus insecticides in natural waters. **Journal of Chromatography A** v. 922, p. 243-255, 2001.

DURÁN, N., ESPÓSITO, E. Potential applications of oxidative enzymes and phenoloxidase-like compounds in wastewater and soil treatment: a review. **Applied Catalysis B: Environmental** v. 28, p. 83-99, 2000.

DURÁN, N.; ROSA, M. A. ; D'ANNIBALE, A. ; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology** v. 31, p. 907-931, 2002.

ESPOSITO, E.; SILVA, M. Systematics and environmental application of the genus *Trichoderma*. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 24, n. 2, p.89 -98, 1998.

FARIA, V. H. F. ; DIAS, B. M. ; COSTA, M. C. M ; SILVA, V. R. ; DRUMMOND, A. L. ; FRANCO, V. P. ; CUNHA, M. R. R. ; FRANKLIN, H. M. O. H. ; PEIXOTO, T. M. A. **G. Avaliação de resíduos de agrotóxicos em polpas de morango industrializadas. Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente, v. 19, p. 49-56, 2009.**

FLORES, C. ; VIDAL, C. ; TREJO-HERNANDEZ, M. R. ; GALINDO, E. ; SERRANO-CARREO, L. Selection of *Trichoderma* strains capable of increasing laccase production by *Pleurotus ostreatus* and *Agaricus bisporus* in dual cultures. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, p. 249-257, 2009.

GARCIA, T. A. **Purificação e Caracterização das Lacases de *Pycnoporus sanguineus***. Tese de Doutorado. Departamento de Biologia Celular, Universidade de Brasília, Brasília, 2006, 126 p.

GAYLARDE, C. C. ; BELLINASSO, M. L., MANFIO, G. P. Biorremediação, aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, n. 34 jan/junho, 2005.

GOMES, E. ; AGUIAR, A. P. ; CARVALHO, C. C. ; BONFÁ, M. R. B. ; SILVA, R. ; BOSCOLO, M. Lignases Production by Basidiomycetes strains on lignocellulosic agricultural residues and their application in the decolorization of synthetic dyes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n.1, mar., 2009.

GOCHEV, V. K. ; KRASTANOV, A.I. Isolation of laccase producing *Trichoderma* spp. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 13, p. 171-176, 2007.

GÓES, K. P., **Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras do Acefato**. Tese de Doutorado. Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009, 180p.

GRIZA, F. T. ; ORTIZ, K. S. ; GEREMIAS, D. ; THIESEN, F.V. Avaliação da Contaminação por organofosforados em águas superficiais no município de Rondinha – Rio Grande do Sul, **Química Nova**, v. 31, p. 1631-1635, 2008.

HANS, G.J.M.; RUUD, C.J.V.D.; ODILE, M.S.; Determination of polar organophosphorus pesticides in vegetables and fruits using liquid chromatography with tandem mass spectrometry: selection of extraction solvent. **Journal of Chromatography A**, v. 1015, p. 119-127, 2003.

HAYAMA, T. ; YOSHIDA, H. ; TODOROKI, K. ; NOHTA, H. ; YAMAGUCHI, M. Determination of polar organophosphorus pesticides in water samples by hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Rapid Communications In Mass Spectrometry**, v. 22, p. 2203–2210, 2008.

HIRATA, R., SKORTZARU, B., NARCISO, E.S. Avaliação da degradação de inseticidas, em função do pH utilizando *Drosophila melanogaster* e teste de inibição enzimática **Arq. Inst. Biol.**, v.70, n.3, p.359-365, jul./set., 2003.

HOWELL, C. R. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. **Plant Disease**, v. 87, n. 1., 2003.

INGELSE, B. A. RUUD, C. J. V. D. ; VREEKEN, R. J. MOL, H. G. J. ; STEIJEGER, O. M. Determination of polar organophosphorus pesticides in aqueous samples by direct injection using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 918, p. 67–78, 2001.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. Levantamento sistemático da produção agrícola pesquisa mensal de previsão e acompanhamento das safras agrícolas no ano civil, v. 22 n. 04 p. 1-80 abr., 2009.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, **Ciência Rural**, v. 37, p. 1192-1201, jul./ago., 2007.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M. ; SELBACH, P. A. ; GIANELLO, C. ; TEDESCO, M. J. ; CAMARGO, F. A. O. Processos biotecnológicos e oportunidades na biorremediação de ambientes contaminados, **Boletim Informativo da Sociedade Brasileira de Ciência do Solo**, jan./abril, 2009.

JARDIM, V. L. **Seleção de fungos de decomposição branca produtores de enzimas oxidativas na presença de Acefato para redução de sua toxicidade**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Goiás, UFG, 2010, 131p.

KAIPPER, B.I.A.; MADUREIRA, L.A.S.; CORSEUIL, H.X.. Use of activated charcoal in a solid-phase extraction technique for analysis of pesticide residues in tomatoes. *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo, v. 12, n. 4, Aug. 2001. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010350532001000400012&lng=en&nrm=iso>. access on 16 Sept. 2009. doi: 10.1590/S0103-50532001000400012 acessado em 16 de setembro de 2009.

KONSTANTINO, I. K.; DIMITRA, G. H.; TRIANTAFYLLOS, A. A. The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels, **Environmental Pollution**, v. 141, p. 555-570, 2006.

KUWAHARA, M. ; KIMURA, Y. ; ASADA, Y. Screening of Basidiomycetes for Lignin Peroxidase Genes Using a DNA Probe. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 4 , 1989.

LIMA, F. J. C. ; MARQUES, P. R. B. O. ; NUNES, G. S. ; TANAKA, S. M. C. N. Inseticida organofosforado metamidofós: aspectos toxicológicos e analíticos. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 11, p. 17-34, jan./ dez., 2001.

LUCON, C. M. M. ; KOIKE, C. M. ; ISHIKAWA, A. I. ; PATRICIO, F. R. A. ; HARAKAVA, R. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* sp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, n. 3, p. 225-232, 2009.

MACHADO, K. M. G. ; MATHEUS, D. R. ; BONONI, V. L. R. Ligninolytic Enzymes Production and Remazol Brilliant Blue R Decolorization by Tropical Brazilian Basidiomycetes Fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 246-252, 2005.

MACHADO, K. M. G. ; COMPART, L. C. A. ; MORAIS, R. O. ; ROSA, L. H. ; SANTOS, M. H. Biodegradation of reactive textile dyes by basidymicetous fungi from Brazilian ecosystems. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 481-487, out./dez., 2006.

MAHAJNA, M. ; QUISTAD, G. B. ; CASIDA, J. E. Acephate Insectide Toxicity: Safety Conferred by Inhibition of the Bioactivating Carboxyamidase by the Metabolite Methamidophos. **Chemical Research in Toxicology**. v. 10, p. 64-69, 1996.

MENEZES, C. R. ; SILVA, I. S. ; DURRANT, L. R. Bagaço de Cana: Fonte para Produção de Enzimas Ligninocelulósicas. **Estudos Tecnológicos**, v. 5, n. 1, p. 68-78, jan./abr, 2009.

MAYER, A. M. ; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme, **Phytochemistry**, v. 60, p. 551-565, 2002.

MILHOME, M. A. L. ; SOUSA, D. O. B. ; LIMA, F. A. F. ; NASCIMENTO, F. R. Avaliação do potencial de contaminação de águas superficiais e subterrâneas por pesticidas aplicados na agricultura do Baixo Jaguaribe, CE. **Engenharia Sanitária e Ambiental** .v. 14, n. 3, p. 363-372, jul/set., 2009.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA. E ABASTECIMENTO - MAPA. Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários (AGROFIT), 2010, Disponível em: http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit . Acesso em 19/05/2010.

MUHAMMAD, A. BHATTI, H. N. ; ASHRAF, M. ; LEGGE, R. L. Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. **Biodegradation**, v. 17, n.6, p.771-783, 2008.

OLIVEIRA - SILVA, J. J. ; ALVES, S. R. ; MEYER, A. ; PEREZ, F. ; SARCINELLI, P. N. ; MATTOS, R. C. C. ; MOREIRA, J. C. Influência de fatores socioeconômicos na contaminação por agrotóxicos, Brasil. **Revista Saúde Pública**, São Paulo, v. 35, n. 2, p. 130-135, 2001.

PARREIRA, F. V. ; PANIAGO, E. B. ; CARVALHO, C. R. AFONSO, R. J. C. Avaliação da presença de pesticidas N-metilcarbamatos e seus produtos de degradação nas águas da região de Pará de Minas (MG) Brasil. **Pesticidas: Revista Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 11, p. 77-92, jan./dez., 2001.

PELCZAR JR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. **Microbiologia**. 2. ed. São Paulo, SP: Pearson Makron Books, 1997.

PERES, E. ; DE MELO, I. S. ; Variabilidade entre isolados de *Trichoderma harzianum* Aspectos citológicos, **Scientia Agricola.**, v. 52, n. 1, p. 56-59, Piracicaba, jan./abr.,1995.

PINHO, G. P.; NEVES, A. A. ; QUEIROZ, M. E. L. R. ; SILVÉRIO, F.O. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p.987-995, 2009.

PIVELI, R. P. Curso Qualidade das águas e poluição: aspectos físico-químicos. Aula 13 **Pesticidas em água**. São Paulo, USP.

RAININA, E. I. ; EFREMENCO, E. N. ; VARFOLOMEYER,S. D. ; SIMONIAN, A. L. ; WILD, J. R. The development of a new biosensor based on recombinant *E coli* for the direct detection of organophosphorus neurotoxins. **Biosensor & Bioelectronics**, v. 11, n. 10, p. 996-1000, 1996.

REGALADO, C. ; ALMENDÁREZ, B. G. ; VÁZQUEZ, M. A. D. Biotechnological applications of peroxidases. **Phytochemistry Reviews**, v. 3, p. 243–256, 2004

REZENDE, M. I., BARBOSA, A. M., VASCONCELOS, A. F. D, HADDADI, R., DEKKERI, R. F. H. Growth and production of laccases by the ligninolytic fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Botryosphaeria rhodina*, cultured on basal medium containing the herbicide, Scepter® (imazaquin), **Journal of Basic Microbiology**, v. 45, n. 6, p. 465-474, 2005.

RIBEIRO, A. C. C. ; MELLA, E. A. C. Intoxicação ocupacional por organofosforados – A importância da dosagem de colinesterase. **Cesumar**, v. 9, n.2, p. 125-134, jul/dez., 2007.

SAVOIÉ, J. M. ; BILLETTE, M. A. C. Extracellular laccase production during hyphal interactions between *Trichoderma* sp. and *Shiitaki*, *Lentinula edodes*; **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 49, p. 589-593, 1998.

SILVA, C. M. M. S & FAY, E. F. Agrotóxicos Aspectos Gerais. In: SILVA, C. M. M. S & FAY, E. F (Org.). **Agrotóxicos e Ambiente**. Brasília: Empraba, 2004, cap.1, p.17-72.

SILVA, C. M. M. S. ; MELO, I. S. ; MAIA, A. H. N. ; ABAKERLI, R. B. Isolamento de fungos degradadores de carbendazim. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n.7, p.1255-1264, jul., 1999.

SOUZA, M. V. **Resíduos de Agrotóxicos Ditiocarbamatos e Organofosforados em alimentos consumidos no Restaurante Universitário-UNB, Avaliação da Exposição Humana**. Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília – Brasília – DF, 2006.

SZKLARZ, G. D. ; ANTIBUS, R. K. ; SINSABAUGH, R. L. ; LINKINS, A. E. Production of Phenoloxidases and Peroxidases by Wood-Rotting Fungi. *Mycology*, v. 81, p. 234-240, 1989.

SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS DO ESTADO DE SÃO PAULO – SUCEN. Documentos Técnicos – Classificação, 2001. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/downl/segtrb/sequi2.pdf>. Acesso em 08 de maio de 2011.

TOMLIN, C. **The Pesticide Manual**, 10. Ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1341p. 1995.

TREVISAN, L. R. P. **Resíduos de Acefato, seu metabólito metamidafós e clorotalonil em cultura protegida de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) e de campo**. Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura - Piracicaba – SP, 2002.

UETA, J.; PEREIRA, N. L.; SHUHAMA, I. K.; CERDEIRA, A. L. Biodegradação de herbicidas e biorremediação: microrganismos degradadores do herbicida atrazina. **Biotecnologia**, Brasília, v. 10, p. 10-13, 1999.

VALERIANO, V. S. ; SILVA, A. M. F. ; SANTIAGO, M. F. ; GARCIA, T. A. Estudo de Indutores para a Produção de Lacase por *Pycnoporus sanguineus*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Suplemento v. IV., n. 2, p. 140-143, 2007.

VIDALI, M. Bioremediation: An overview **Pure and Applied Chemistry.**, v. 73, n. 7, p. 1163–1172, 2001.

WIDSTEN, P.; KANDELBAUER, A.; Laccase applications in the Forest products industry: A review. **Enzyme and Microbiology Technology**, v. 42, p. 293-307, 2008.

YAMANAKA, R. ; SOARES, C. F. ; MATHEUS, D. R. ; MACHADO, K. M. G.Lignolytic Produced by *Trametes villosa* CCB176 under different culture conditions. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, p. 78-84, 2008.

YEN, J. H. ; LIN, K. H. ; WANG, Y.S. Potential of the Insecticides Acephate and Methamidophos to Contaminate Groundwater. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 45, p.79-86, 2000.

APÊNDICE – A

QUADROS DE VALORES DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA NA ETAPA DE SELEÇÃO DAS LINHAGENS DE *Trichoderma harzianum*

Quadro A-01 Seleção de linhagens de *Trichoderma harzianum* em meio agitado – Produção de Lacase.

Lcc	n	Média (U/mL ⁻¹)	dp	Min	Max
T03					
5	4	0,21	0,18	0,01	0,37
10	4	0,23	0,31	0,00	0,69
15	4	0,01	0,02	0,00	0,03
20	4	0,37	0,16	0,18	0,57
25	4	0,24	0,28	0,00	0,52
T08					
5	4	0,61	0,56	0,03	1,38
10	4	1,28	0,59	0,50	1,89
15	4	0,02	0,01	0,02	0,03
20	4	0,18	0,13	0,00	0,30
25	4	0,72	0,44	0,15	1,18
T13					
5	4	0,77	0,92	0,00	1,84
10	4	0,84	0,69	0,09	1,66
15	4	0,08	0,03	0,04	0,10
20	4	0,51	0,25	0,28	0,81
25	4	0,00	0,00	0,00	0,00
T33					
5	4	0,61	0,41	0,32	1,22
10	4	0,51	0,32	0,05	0,81
15	4	0,04	0,01	0,03	0,06
20	4	0,27	0,27	0,00	0,59
25	4	0,71	0,29	0,27	0,91
T34					
5	4	0,61	0,59	0,00	1,16
10	4	0,16	0,31	0,00	0,62
15	4	0,09	0,06	0,03	0,16
20	4	0,39	0,46	0,00	1,01
25	4	0,05	0,05	0,00	0,11
T39					
5	4	1,04	0,35	0,86	1,57
10	4	1,54	0,48	0,91	2,02
15	4	0,04	0,02	0,02	0,07
20	4	0,42	0,34	0,00	0,82
25	4	1,12	0,35	0,84	1,63
T47					
5	4	0,70	0,67	0,09	1,43

Quadro A-01 Seleção de linhagens de *Trichoderma harzianum* em meio agitado – Produção de Lacase (continuação)

10	4	0,28	0,25	0,00	0,55
15	4	0,04	0,05	0,00	0,09
20	4	0,00	0,00	0,00	0,00
25	4	0,13	0,23	0,00	0,47
T50					
5	4	0,09	0,14	0,00	0,29
10	4	0,62	0,61	0,00	1,45
15	4	0,03	0,03	0,01	0,06
20	4	0,16	0,33	0,00	0,65
25	4	0,44	0,50	0,00	1,01
ALL42					
5	4	1,17	0,31	0,85	1,58
10	4	0,67	0,42	0,36	1,26
15	4	0,04	0,03	0,01	0,07
20	4	0,32	0,29	0,00	0,61
25	4	0,94	0,64	0,25	1,73

n: número amostral; dp: desvio padrão

Quadro A-02 Seleção de linhagens de *Trichoderma harzianum* em meio agitado – Produção de Lignina peroxidase.

LiP	n	Média(UmL ⁻¹)	DP	Min	Max
T03					
5	4	0,21	0,21	0,00	0,50
10	4	1,19	0,81	0,00	1,79
15	4	0,00	0,00	0,00	0,00
20	4	2,08	3,36	0,00	7,03
25	4	0,01	0,02	0,00	0,04
T08					
5	4	0,00	0,00	0,00	0,00
10	4	1,13	0,48	0,54	1,61
15	4	0,40	0,51	0,00	1,08
20	4	0,00	0,00	0,00	0,00
25	4	0,68	0,82	0,00	1,65
T13					
5	4	0,46	0,55	0,00	1,22
10	4	0,63	0,66	0,18	1,61
15	4	0,34	0,44	0,00	0,93
20	4	0,87	0,70	0,00	1,72
25	4	0,60	0,70	0,00	1,29
T33					
5	4	11,78	13,60	0,00	23,73
10	4	0,00	0,00	0,00	0,00
15	4	0,00	0,00	0,00	0,00
20	4	0,00	0,00	0,00	0,00
25	4	0,00	0,00	0,00	0,00
T34					
5	4	0,28	0,26	0,04	0,65
10	4	0,28	0,20	0,07	0,50
15	4	0,69	0,68	0,00	1,61
20	4	2,04	2,09	0,18	4,34
25	4	0,10	0,20	0,00	0,39
T39					
5	4	0,08	0,14	0,00	0,29
10	4	0,49	0,97	0,00	1,94
15	4	0,00	0,00	0,00	0,00
20	4	0,24	0,49	0,00	0,97
25	4	0,36	0,56	0,00	1,18
T47					
5	4	3,95	4,48	0,11	9,86
10	4	0,98	1,14	0,00	2,19
15	4	1,32	1,54	0,00	2,97
20	4	1,89	2,56	0,00	5,41
25	4	0,00	0,00	0,00	0,00

Quadro A-02 Seleção de linhagens de *Trichoderma harzianum* em meio agitado – Produção de Lignina peroxidase

T50					
5	4	1,31	0,68	0,47	2,11
10	4	0,96	0,95	0,07	2,29
15	4	0,00	0,00	0,00	0,00
20	4	0,00	0,00	0,00	0,00
25	4	0,67	0,81	0,00	1,61
ALL42					
5	4	0,28	0,29	0,00	0,65
10	4	0,61	0,45	0,11	1,04
15	4	0,16	0,33	0,00	0,65
20	4	1,47	1,65	0,29	3,91
25	4	0,16	0,33	0,00	0,65

n: número amostral; dp: desvio padrão

Quadro A-03 Seleção de linhagens de *Trichoderma harzianum* em meio agitado – Produção de Manganês peroxidase.

MnP	n	Média (UmL ⁻¹)	DP	Min	Max
T03					
5	4	0,00	0,00	0,00	0,00
15	4	0,46	0,83	0,00	1,70
25	4	1,04	0,24	0,72	1,26
T08					
5	4	2,78	3,37	0,00	6,82
15	4	7,36	4,92	1,26	11,39
25	4	1,91	3,14	0,00	6,55
T13					
5	4	4,02	4,08	0,00	8,52
15	4	0,00	0,00	0,00	0,00
25	4	3,19	5,54	0,00	11,48
T33					
5	4	0,07	0,14	0,00	0,27
15	4	1,73	1,58	0,00	3,77
25	4	1,91	2,21	0,00	3,95
T34					
5	4	0,00	0,00	0,00	0,00
15	4	2,83	5,00	0,00	10,31
25	4	0,90	0,38	0,54	1,43
T39					
5	4	0,11	0,23	0,00	0,45
15	4	0,00	0,00	0,00	0,00
25	4	0,16	0,32	0,00	0,63
T47					
5	4	0,00	0,00	0,00	0,00
15	4	0,25	0,31	0,00	0,63
25	4	0,00	0,00	0,00	0,00
T50					
5	4	0,00	0,00	0,00	0,00
15	4	1,39	1,19	0,00	2,87
25	4	2,31	4,62	0,00	9,24
ALL42					
5	4	0,02	0,05	0,00	0,09
15	4	0,00	0,00	0,00	0,00
25	4	9,93	12,03	0,00	24,30

n: número amostral; dp: desvio padrão

Quadro A-04 Seleção de linhagens de *Trichoderma harzianum* em condição estática– Produção de Lacase.

Lcc	n	Média (UmL ⁻¹)	DP	Min	Max
T03					
5	4	0,23	0,19	0,00	0,45
10	4	0,31	0,36	0,00	0,65
15	4	0,30	0,14	0,09	0,37
20	4	0,73	0,64	0,24	1,66
25	4	0,11	0,22	0,00	0,44
T08					
5	4	0,16	0,21	0,00	0,45
10	4	0,09	0,11	0,00	0,25
15	4	0,66	0,38	0,28	1,10
20	4	0,65	0,66	0,00	1,49
25	4	0,33	0,42	0,00	0,87
T13					
5	4	0,57	0,21	0,44	0,88
10	4	1,01	0,42	0,54	1,54
15	4	1,50	0,52	0,95	1,98
20	4	0,52	0,54	0,00	1,16
25	4	0,18	0,36	0,00	0,71
T33					
5	4	0,47	0,33	0,24	0,95
10	4	0,53	0,52	0,01	1,20
15	4	0,99	0,69	0,32	1,64
20	4	0,93	0,68	0,05	1,65
25	4	0,29	0,20	0,00	0,43
T34					
5	4	0,47	0,08	0,39	0,57
10	4	0,99	0,72	0,17	1,85
15	4	0,53	0,44	0,08	1,13
20	4	0,71	0,54	0,26	1,48
25	4	0,49	0,68	0,00	1,46
T39					
5	4	0,18	0,19	0,00	0,42
10	4	0,54	0,52	0,00	1,04
15	4	0,78	0,21	0,49	0,97
20	4	0,16	0,15	0,00	0,34
25	4	0,78	0,87	0,04	2,04

n: número amostral; dp: desvio padrão

Quadro A-04 Seleção de linhagens de *Trichoderma harzianum* em condição estática– Produção de Lacase (continuação).

T47					
5	4	0,30	0,42	0,05	0,92
10	4	1,26	0,49	0,83	1,97
15	4	0,50	0,36	0,07	0,84
20	4	1,15	1,50	0,00	3,15
25	4	0,13	0,27	0,00	0,53
T50					
5	4	0,67	0,53	0,00	1,21
10	4	0,81	0,96	0,00	1,90
15	4	0,70	0,48	0,15	1,32
20	4	1,12	0,18	0,92	1,36
25	4	0,46	0,55	0,00	1,12
ALL42					
5	4	0,36	0,13	0,17	0,46
10	4	0,99	0,92	0,00	2,22
15	4	1,71	0,57	0,89	2,19
20	4	0,69	0,50	0,17	1,37
25	4	14,26	16,52	4,18	38,73

n: número amostral; dp: desvio padrão

Quadro A-05 Seleção de linhagens de *Trichoderma harzianum* em condição estática– Produção de Lignina peroxidase.

LiP	n	Média (UmL⁻¹)	DP	Min	Max
T03					
5	4	0,03	0,06	0,00	0,11
10	4	7,58	8,75	0,00	15,27
15	4	0,58	0,83	0,00	1,76
20	4	0,00	0,00	0,00	0,00
25	4	0,00	0,00	0,00	0,00
T08					
5	4	9,73	6,49	0,00	13,30
10	4	0,42	0,34	0,00	0,82
15	4	0,54	0,69	0,00	1,54
20	4	0,00	0,00	0,00	0,00
25	4	0,00	0,00	0,00	0,00
T13					
5	4	0,00	0,00	0,00	0,00
10	4	0,06	0,11	0,00	0,22
15	4	0,47	0,56	0,00	1,11
20	4	0,76	1,53	0,00	3,05
25	4	0,86	1,72	0,00	3,44
T33					
5	4	0,07	0,12	0,00	0,25
10	4	0,00	0,00	0,00	0,00
15	4	0,00	0,00	0,00	0,00
20	4	0,00	0,00	0,00	0,00
25	4	0,00	0,00	0,00	0,00
T34					
5	4	0,46	0,45	0,00	0,90
10	4	0,91	0,91	0,00	2,04
15	4	0,68	1,36	0,00	2,72
20	4	0,00	0,00	0,00	0,00
25	4	1,98	2,72	0,00	5,77
T39					
5	4	0,58	0,50	0,00	1,22
10	4	0,00	0,00	0,00	0,00
15	4	0,00	0,00	0,00	0,00
20	4	0,00	0,00	0,00	0,00
25	4	0,00	0,00	0,00	0,00

Quadro A-05 Seleção de linhagens de *Trichoderma harzianum* em condição estática– Produção de Lignina peroxidase (continuação).

T47					
5	4	0,89	1,14	0,00	2,51
10	4	0,00	0,00	0,00	0,00
15	4	0,31	0,44	0,00	0,93
20	4	0,74	0,75	0,22	1,83
25	4	0,00	0,00	0,00	0,00
T50					
5	4	4,42	6,34	0,00	13,44
10	4	0,00	0,00	0,00	0,00
15	4	0,66	0,48	0,00	1,15
20	4	7,49	13,72	0,50	28,06
25	4	1,98	1,36	0,43	3,37
ALL42					
5	4	0,00	0,00	0,00	0,00
10	4	0,26	0,41	0,00	0,86
15	4	0,13	0,10	0,00	0,25
20	4	0,31	0,63	0,00	1,25
25	4	1,65	1,57	0,00	3,37

n: número amostral; dp: desvio padrão

Quadro A-06 Seleção de linhagens de *Trichoderma harzianum* em condição estática– Produção de Manganês peroxidase

MnP	n	Média (U/mL ⁻¹)	DP	Min	Max
T03					
5	4	1,01	1,53	0,00	3,23
15	4	0,88	0,87	0,00	2,06
25	4	0,90	0,73	0,00	1,79
T08					
5	4	1,77	2,09	0,00	4,04
15	4	1,17	0,93	0,00	2,15
25	4	1,64	2,98	0,00	6,10
T13					
5	4	0,00	0,00	0,00	0,00
15	4	0,41	0,31	0,00	0,72
25	4	0,63	0,67	0,00	1,52
T33					
5	4	0,02	0,05	0,00	0,09
15	4	3,21	1,81	1,88	5,83
25	4	6,19	11,72	0,00	23,77
T34					
5	4	2,56	3,07	0,00	6,73
15	4	1,15	0,50	0,45	1,61
25	4	3,34	4,52	0,00	9,96
T39					
5	4	0,94	1,11	0,00	2,15
15	4	2,02	0,55	1,61	2,78
25	4	5,09	10,18	0,00	20,36
T47					
5	4	0,45	0,54	0,00	1,08
15	4	0,97	1,31	0,00	2,78
25	4	1,75	2,00	0,00	4,48
T50					
5	4	1,26	0,72	0,36	2,06
15	4	8,95	10,33	0,00	18,03
25	4	0,99	1,56	0,00	3,32
ALL42					
5	4	2,67	2,31	0,81	5,83
15	4	2,60	1,13	1,52	4,13
25	4	0,00	0,00	0,00	0,00

n: número amostral; dp: desvio padrão

APÊNDICE – B

TABELA DE VALORES DE PRODUÇÃO ENZIMÁTICA NA ETAPA DE ASSOCIAÇÃO ENTRE AS LINHAGENS DE *TRICHODERMA* E OS FUNGOS BASIDIOMICETOS

Tabela B-1 Produção média (UmL^{-1}) da Associação entre *T. villosa* e as linhagens de *Trichoderma harzianum* e análise estatística - Teste U (ou Mann Whitney).

<i>T.villosa - shaker</i>	n	Média	dp	Min	Max	p
Lcc						
Controle	4	1,18	0,11	1,10	1,26	
T34	4	5,87	3,16	2,84	8,89	0,064
T39	4	1,51	0,85	0,77	2,59	1,000
T47	4	0,95	0,26	0,61	1,19	0,355
ALL42	4	1,37	0,25	1,10	1,62	0,481
Total	18	2,29	2,42	0,61	8,89	

n: número amostral; dp: desvio padrão

<i>T.villosa estática</i>	n	Média	dp	Min	Max	p
Lcc						
Controle	4	1,56	0,00	1,56	1,56	
T34	4	1,25	0,18	1,03	1,47	0,060
T39	4	7,97	6,18	4,62	17,23	0,060
T47	4	9,11	4,98	4,48	13,47	0,060
ALL42	4	2,14	0,46	1,70	2,62	0,060
Total	18	4,72	4,87	1,03	17,23	

n: número amostral; dp: desvio padrão

<i>T.villosa - shaker</i>	n	Média	dp	Min	Max	p
LiP						
Controle	4	0,76	0,23	0,59	0,92	
T34	4	2,97	3,06	0,22	5,63	1,000
T39	4	10,21	3,82	6,56	15,02	0,064
T47	4	4,33	4,27	0,35	8,27	0,481
ALL42	4	0,75	0,41	0,31	1,15	1,000
Total	18	4,14	4,53	0,22	15,02	

n: número amostral; dp: desvio padrão

<i>T.villosa</i> - estática	n	Média	dp	Min	Max	p
LiP						
Controle	4	0,39	0,07	0,34	0,44	
T34	4	0,52	0,25	0,26	0,82	0,643
T39	4	0,65	0,61	0,20	1,52	1,000
T47	4	0,74	0,51	0,00	1,11	0,355
ALL42	4	1,06	0,48	0,49	1,61	0,064
Total	18	0,70	0,46	0,00	1,61	

n: número amostral; dp: desvio padrão

<i>T.villosa</i> - shaker	n	Média	dp	Min	Max	p
MnP						
Controle	4	11,12	9,57	4,35	17,89	
T34	4	6,82	2,33	4,08	9,37	0,643
T39	4	9,21	2,13	7,26	11,70	1,000
T47	4	10,92	5,87	2,42	15,74	0,643
ALL42	4	6,16	3,77	2,15	9,87	0,355
Total	18	8,59	4,47	2,15	17,89	

n: número amostral; dp: desvio padrão

<i>T.villosa</i> - estática	n	Média	dp	Min	Max	p
MnP						
Controle	4	1,28	1,81	0,00	2,56	
T34	4	6,10	6,48	0,00	13,95	0,481
T39	4	6,83	8,78	0,00	18,39	0,623
T47	4	3,30	2,72	0,00	6,55	0,240
ALL42	4	14,21	15,91	3,59	37,58	0,064
Total	18	6,90	9,31	0,00	37,58	

n: número amostral; dp: desvio padrão

Tabela B-2 Produção média (UmL^{-1}) da Associação entre *P. sanguineus* e as linhagens de *Trichoderma harzianum* e análise estatística - Teste U (ou Mann Whitney).

<i>P.sanguineus- shaker</i>	n	Média	dp	Min	Max	p
Lcc						
Controle	4	69,12	16,52	57,44	80,80	
T34	4	1,14	0,31	0,87	1,50	0,064
T39	4	0,41	0,19	0,21	0,65	0,064
T47	4	7,57	4,64	3,45	11,75	0,064
ALL42	4	9,07	1,00	7,70	9,90	0,064
Total	18	11,72	21,68	0,21	80,80	

n: número amostral; dp: desvio padrão

<i>P.sanguineus- estática</i>	n	Média	dp	Min	Max	p
Lcc						
Controle	4	7,08	0,55	6,69	7,47	
T34	4	1,04	0,20	0,87	1,32	0,064
T39	4	1,57	0,31	1,22	1,91	0,064
T47	4	0,67	0,51	0,20	1,15	0,064
ALL42	4	2,70	0,88	1,95	3,69	0,064
Total	18	2,11	2,01	0,20	7,47	

n: número amostral; dp: desvio padrão

<i>P.sanguineus- shaker</i>	n	Média	dp	Min	Max	p
LiP						
Controle	4	1,78	0,71	1,28	2,28	
T34	4	10,14	5,93	4,41	16,37	0,064
T39	4	10,18	1,31	8,27	11,12	0,064
T47	4	13,25	1,79	11,67	15,43	0,064
ALL42	4	1,36	0,44	0,72	1,73	0,643
Total	18	7,96	5,54	0,72	16,37	

n: número amostral; dp: desvio padrão

<i>P.sanguineus- estática</i>	n	Média	dp	Min	Max	p
LiP						
Controle	4	1,02	0,16	0,90	1,13	
T34	4	3,34	2,14	1,49	5,53	0,064
T39	4	12,22	8,78	4,37	20,15	0,064
T47	4	2,05	0,96	0,85	2,97	0,355
ALL42	4	1,37	0,43	0,99	1,84	0,355
Total	18	4,33	5,84	0,85	20,15	

n: número amostral; dp: desvio padrão

<i>P.sanguineus- shaker</i>	n	Média	dp	Min	Max	p
MnP						
Controle	4	0,38	0,54	0,00	0,76	
T34	4	0,99	0,74	0,00	1,75	0,240
T39	4	7,14	6,82	1,08	14,35	0,064
T47	4	2,55	2,28	0,00	5,02	0,240
ALL42	4	1,50	1,74	0,00	3,90	0,481
Total	18	2,75	4,01	0,00	14,35	

n: número amostral; dp: desvio padrão

<i>P.sanguineus- estática</i>	n	Média	dp	Min	Max	p
MnP						
Controle	2	4,17	2,22	2,60	5,74	
T34	4	0,83	0,96	0,00	1,66	0,057
T39	4	1,92	1,61	0,81	4,22	0,159
T47	4	4,21	3,46	1,17	7,31	1,000
ALL42	4	3,63	2,72	0,00	6,59	1,000
Total	18	2,82	2,50	0,00	7,31	

n: número amostral; dp: desvio padrão

APÊNDICE – C

TABELA DE VALORES DA ENZIMA COLINESTERASE APÓS TRATAMENTO POR ENZIMAS FÚNGICAS

Tabela C -1: Análise estatística descritiva de *P. sanguineus* com T47 e teste ANOVA.

<i>P.sanguineus</i> x T 47 10%	n	Média (U/mL ⁻¹)	dp	Min	Max	p
Referência						
75%	6	4,93	1,34	3,30	6,68	
50%	6	5,55	1,57	3,61	7,73	
25%	6	10,16	3,75	6,27	14,95	
12,50%	6	6,70	0,91	5,50	8,04	
Total	24	6,84	2,90	3,30	14,95	0,002
Teste						
75%	6	5,06	1,24	2,72	6,06	
50%	6	4,89	1,16	2,59	5,67	
25%	6	2,20	1,21	1,04	4,37	
12,50%	6	10,45	3,08	6,48	13,93	
Total	24	5,65	3,52	1,04	13,93	<0,001
Acefato						
75%	6	4,26	0,94	2,90	5,46	
50%	6	2,63	1,30	1,48	4,97	
25%	6	3,25	2,63	0,00	6,24	
12,50%	6	6,62	0,78	5,50	7,57	
Total	24	4,19	2,15	0,00	7,57	0,002
Metabólito						
75%	6	0,10	0,23	0,00	0,57	
50%	6	0,00	0,00	0,00	0,00	
25%	6	0,08	0,13	0,00	0,32	
12,50%	6	0,93	0,84	0,17	2,13	
Total	24	0,28	0,57	0,00	2,13	0,005

n: número amostral; dp: desvio padrão

Tabela C -2: Teste de Tukey da amostra de *P. sanguineus* em associação com T47

Teste Tukey <i>P. sanguineus</i> T 47 10%					
Referência		p	Teste		p
75%	50%	0,959	75%	50%	0,998
	25%	0,003		25%	0,066
	12,50%	0,511		12,50%	0,000
50%	25%	0,008	50%	25%	0,091
	12,50%	0,801		12,50%	0,000
25%	12,50%	0,056	25%	12,50%	0,000
Acefato		p	Metabólito		p
75%	50%	0,314	75%	50%	0,981
	25%	0,694		25%	1,000
	12,50%	0,079		12,50%	0,018
50%	25%	0,905	50%	25%	0,990
	12,50%	0,002		12,50%	0,008
25%	12,50%	0,008	25%	12,50%	0,015

Tabela C -3: Análise estatística descritiva de *P. sanguineus* com ALL42 e teste ANOVA.

<i>P.sanguineus</i> x ALL42 10%	n	Média (UmL ⁻¹)	dp	Min	Max	p
Referência						
75%	6	3,98	1,08	2,67	5,39	
50%	6	4,48	1,26	2,92	6,24	
25%	6	8,20	3,03	5,06	12,07	
12,50%	6	5,41	0,73	4,44	6,49	
Total	24	5,52	2,34	2,67	12,07	0,002
Teste						
75%	6	4,16	2,23	0,00	6,42	
50%	6	3,52	0,78	2,60	4,59	
25%	6	5,42	1,46	3,55	7,09	
12,50%	6	6,23	0,89	5,30	7,28	
Total	24	4,83	1,74	0,00	7,28	0,018
Acefato						
75%	6	3,08	0,69	2,23	4,07	
50%	6	1,89	1,15	0,49	3,21	
25%	6	4,62	1,99	2,64	6,83	
12,50%	6	5,62	1,03	4,07	6,97	
Total	24	3,80	1,90	0,49	6,97	<0,001
Metabólito						
75%	6	0,46	0,92	0,00	2,29	
50%	6	0,00	0,00	0,00	0,00	
25%	6	0,06	0,11	0,00	0,26	
12,50%	6	0,75	0,68	0,14	1,72	
Total	24	0,32	0,62	0,00	2,29	0,109

n: número amostral; dp: desvio padrão

Tabela C -4: Teste de Tukey da amostra de *P. sanguineus* em associação com ALL42.

Teste Tukey - <i>P.sanguineus</i>x ALL 4210%					
Referência	Teste				
75%	50%	0,959	75%	50%	0,998
	25%	0,003		25%	0,066
	12,50%	0,511		12,50%	0,000
50%	25%	0,008	50%	25%	0,091
	12,50%	0,801		12,50%	0,000
25%	12,50%	0,056	25%	12,50%	0,000
Acefato			Metabólito		
75%	50%	0,314	75%	50%	0,981
	25%	0,694		25%	1,000
	12,50%	0,079		12,50%	0,018
50%	25%	0,905	50%	25%	0,990
	12,50%	0,002		12,50%	0,008
25%	12,50%	0,008	25%	12,50%	0,015

Tabela C -5: Análise estatística descritiva de *T. villosa* com T39 e teste ANOVA.

<i>T.villosa</i> x T39 10%	n	Média (U/mL ⁻¹)	dp	Min	Max	p
Referência						
75%	6	3,98	1,08	2,67	5,39	
50%	6	4,48	1,26	2,92	6,24	
25%	6	8,20	3,03	5,06	12,07	
12,50%	6	5,41	0,73	4,44	6,49	
Total	24	5,52	2,34	2,67	12,07	0,002
Teste						
75%	6	0,92	1,74	0,00	4,43	
50%	6	3,69	1,57	2,54	6,70	
25%	6	1,56	2,08	0,00	5,56	
12,50%	6	8,38	1,52	6,68	11,12	
Total	24	3,64	3,40	0,00	11,12	<0,001
Acefato						
75%	6	2,57	1,34	0,00	3,40	
50%	6	1,60	1,85	0,00	4,23	
25%	6	5,28	1,81	2,99	7,10	
12,50%	6	6,17	1,82	4,38	8,29	
Total	24	3,90	2,50	0,00	8,29	<0,001
Metabólito						
75%	6	0,46	0,93	0,00	2,32	
50%	6	0,00	0,00	0,00	0,00	
25%	6	0,06	0,11	0,00	0,26	
12,50%	6	0,75	0,68	0,14	1,72	
Total	24	0,32	0,62	0,00	2,32	0,112

n: número amostral; dp: desvio padrão

Tabela C-6: Teste de Tukey da amostra de *T. villosa* em associação com T39.

Teste Tukey - <i>T.villosa</i> x T39 10%					
Referência		p	Teste		p
75%	50%	0,959	75%	50%	0,055
	25%	0,003		25%	0,920
	12,50%	0,511		12,50%	<0,001
50%	25%	0,008	50%	25%	0,182
	12,50%	0,801		12,50%	0,001
25%	12,50%	0,056	25%	12,50%	0,000
Acefato					
75%	50%	0,764			
	25%	0,057			
	12,50%	0,008			
50%	25%	0,007			
	12,50%	0,001			
25%	12,50%	0,806			

Tabela C -7: Análise estatística descritiva de *T. villosa* com ALL42 e teste ANOVA.

<i>T.villosa</i> x ALL 2 10%	n	Média (U/mL ⁻¹)	dp	Min	Max	p
Referência						
75%	6	4,59	1,26	3,07	6,20	
50%	6	5,16	1,45	3,35	7,18	
25%	6	9,44	3,48	5,82	13,88	
12,50%	6	6,25	0,89	5,11	7,62	
Total	24	6,36	2,70	3,07	13,88	0,002
Teste						
75%	6	3,27	2,37	0,00	5,64	
50%	6	3,83	0,51	3,22	4,64	
25%	6	3,94	3,13	0,00	6,63	
12,50%	6	9,03	2,23	5,41	11,19	
Total	24	5,02	3,19	0,00	11,19	0,001
Acéfato						
75%	6	2,23	2,07	0,00	5,65	
50%	6	3,89	2,17	0,00	5,73	
25%	6	2,82	3,01	0,00	5,95	
12,50%	6	3,92	4,95	0,00	11,15	
Total	24	3,22	3,13	0,00	11,15	0,761
Metabólito						
75%	6	0,44	0,85	0,00	2,13	
50%	6	0,00	0,00	0,00	0,00	
25%	6	0,07	0,12	0,00	0,30	
12,50%	6	0,86	0,78	0,16	1,98	
Total	24	0,34	0,65	0,00	2,13	0,068

n: número amostral; dp: desvio padrão

Tabela C-8: Teste de Tukey da amostra de *T. villosa* em associação com ALL42

Teste Tukey - <i>T.villosa</i> x ALL 2 10%		
Referência		p
75%	50%	0,962
	25%	0,003
	12,50%	0,510
50%	25%	0,008
	12,50%	0,791
25%	12,50%	0,060
Teste		p
75%	50%	0,974
	25%	0,956
	12,50%	0,001
50%	25%	1,000
	12,50%	0,004
25%	12,50%	0,005

Tabela C -9: Análise estatística descritiva de *T. villosa* com T34 e teste ANOVA

<i>T.villosa</i> x T34 50%	n	Média (UmL ⁻¹)	dp	Min	Max	p
Referência						
75%	6	4,22	1,15	2,83	5,72	
50%	6	4,76	1,34	3,10	6,62	
25%	6	8,71	3,22	5,38	12,82	
12,50%	6	5,74	0,78	4,72	6,89	
Total	24	5,86	2,49	2,83	12,82	0,002
Teste						
75%	6	3,07	1,01	1,68	4,68	
50%	6	2,98	1,25	1,50	4,79	
25%	6	3,28	0,37	2,63	3,60	
12,50%	6	2,85	0,95	1,46	4,16	
Total	24	3,05	0,90	1,46	4,79	0,879
Acefato						
75%	6	4,60	3,54	1,40	11,22	
50%	6	2,82	0,98	1,15	3,71	
25%	6	4,30	0,98	2,95	5,36	
12,50%	6	5,47	4,43	0,48	11,54	
Total	24	4,30	2,89	0,48	11,54	0,479
Metabólito						
75%	6	2,34	1,75	0,06	4,30	
50%	6	0,94	0,88	0,14	2,36	
25%	6	0,56	0,69	0,00	1,52	
12,50%	6	1,54	0,82	0,40	2,56	
Total	24	1,35	1,25	0,00	4,30	0,060

n: número amostral; dp: desvio padrão

Tabela C-10: Teste de Tukey da amostra de *T. villosa* em associação com T34

Teste Tukey - T.villosa x T34 50%		
Referência		p
75%	50%	0,958
	25%	0,003
	12,50%	0,510
50%	25%	0,008
	12,50%	0,801
25%	12,50%	0,056

Tabela C - 11: Análise estatística descritiva de *T. villosa* com T39 e teste ANOVA

<i>T.villosa</i> x T39 10%	n	Média	dp	Min	Max	p
Referência		(UmL ⁻¹)				
75%	6	3,98	1,08	2,67	5,39	
50%	6	4,48	1,26	2,92	6,24	
25%	6	8,20	3,03	5,06	12,07	
12,50%	6	5,41	0,73	4,44	6,49	
Total	24	5,52	2,34	2,67	12,07	0,002
Teste						
75%	6	0,92	1,74	0,00	4,43	
50%	6	3,69	1,57	2,54	6,70	
25%	6	1,56	2,08	0,00	5,56	
12,50%	6	8,38	1,52	6,68	11,12	
Total	24	3,64	3,40	0,00	11,12	<0,001
Acefato						
75%	6	2,57	1,34	0,00	3,40	
50%	6	1,60	1,85	0,00	4,23	
25%	6	5,28	1,81	2,99	7,10	
12,50%	6	6,17	1,82	4,38	8,29	
Total	24	3,90	2,50	0,00	8,29	<0,001
Metabólito						
75%	6	0,46	0,93	0,00	2,32	
50%	6	0,00	0,00	0,00	0,00	
25%	6	0,06	0,11	0,00	0,26	
12,50%	6	0,75	0,68	0,14	1,72	
Total	24	0,32	0,62	0,00	2,32	0,112

n: número amostral; dp: desvio padrão

Tabela C-12: Teste de Tukey da amostra de *T. villosa* em associação com T39

Teste Tukey - <i>T.villosa</i> x T39 50%		
Referência		p
75%	50%	0,959
	25%	0,003
	12,50%	0,511
50%	25%	0,008
	12,50%	0,801
25%	12,50%	0,056
Metabólito		p
75%	50%	0,098
	25%	0,029
	12,50%	0,433
50%	25%	0,932
	12,50%	0,795
25%	12,50%	0,448

Tabela C - 13: Análise estatística descritiva de *T. villosa* com T47 e teste ANOVA

<i>T.villosa</i> x T47 50%	n	Média	DP	Min	Max	p
Referência		(UmL⁻¹)				
75%	6	4,08	1,11	2,73	5,53	
50%	6	4,60	1,30	2,99	6,40	
25%	6	8,42	3,11	5,20	12,38	
12,50%	6	5,55	0,75	4,56	6,66	
Total	24	5,66	2,40	2,73	12,38	0,002
Teste						
75%	6	2,87	0,70	1,91	3,72	
50%	6	2,94	0,28	2,63	3,38	
25%	6	3,60	0,87	2,81	4,91	
12,50%	6	3,89	2,59	1,43	8,64	
Total	24	3,32	1,39	1,43	8,64	0,536
Acefato						
75%	6	2,66	0,23	2,40	3,01	
50%	6	2,40	0,84	1,11	3,51	
25%	6	3,82	1,23	2,69	5,82	
12,50%	6	3,59	2,38	0,14	6,68	
Total	24	3,12	1,45	0,14	6,68	0,257
Metabólito						
75%	6	2,46	1,72	0,06	4,15	
50%	6	0,91	0,85	0,14	2,29	
25%	6	0,54	0,66	0,00	1,47	
12,50%	6	1,49	0,79	0,38	2,47	
Total	24	1,35	1,26	0,00	4,15	0,033

n: número amostral; dp: desvio padrão

Tabela C-14: Teste de Tukey da amostra de *T. villosa* em associação com T47

Teste Tukey - <i>T.villosa</i> x T47 50%		
Referência		p
75%	50%	0,958
	25%	0,003
	12,50%	0,510
50%	25%	0,008
	12,50%	0,801
25%	12,50%	0,056
Metabólito		p
75%	50%	0,097
	25%	0,029
	12,50%	0,430
50%	25%	0,931
	12,50%	0,797
25%	12,50%	0,448

Tabela C - 15: Análise estatística descritiva de *T. villosa* com ALL42 e teste ANOVA

<i>T.villosa</i> x ALL2 50%	n	Média	DP	Min	Max	p
Referência		(UmL ⁻¹)				
75%	6	5,28	3,04	2,83	11,04	
50%	6	4,76	1,34	3,10	6,62	
25%	6	8,71	3,21	5,38	12,81	
12,50%	6	5,74	0,78	4,72	6,89	
Total	24	6,12	2,69	2,83	12,81	0,037
Teste						
75%	6	2,28	0,76	1,27	3,48	
50%	6	3,00	0,60	2,00	3,55	
25%	6	4,66	1,25	3,01	5,89	
12,50%	6	4,70	1,65	2,05	6,78	
Total	24	3,66	1,51	1,27	6,78	0,003
Acefato						
75%	6	3,17	1,37	1,86	4,87	
50%	6	2,82	0,70	1,94	3,64	
25%	6	4,37	0,74	3,23	5,30	
12,50%	6	5,01	0,53	4,28	5,76	
Total	24	3,84	1,23	1,86	5,76	0,001
Metabólito						
75%	6	2,61	1,82	0,06	4,30	
50%	6	0,94	0,88	0,14	2,36	
25%	6	0,56	0,69	0,00	1,52	
12,50%	6	1,54	0,82	0,40	2,56	
Total	24	1,41	1,33	0,00	4,30	0,029

n: número amostral; dp: desvio padrão

Tabela C-16: Teste de Tukey da amostra de *T. villosa* em associação com ALL42

Teste Tukey - <i>T.villosa</i> x ALL2 50%					
Referência		p	Acefato		p
75%	50%	0,980	75%	50%	0,903
	25%	0,084		25%	0,130
	12,50%	0,986		12,50%	0,010
50%	25%	0,039	50%	25%	0,034
	12,50%	0,888		12,50%	0,002
25%	12,50%	0,157	25%	12,50%	0,602
Teste		p	Metabólito		p
75%	50%	0,697	75%	50%	0,086
	25%	0,009		25%	0,026
	12,50%	0,008		12,50%	0,394
50%	25%	0,090	50%	25%	0,935
	12,50%	0,080		12,50%	0,799
25%	12,50%	1,000	25%	12,50%	0,457