

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

**VALÉRIA DE LIMA JARDIM**

**SELEÇÃO DE FUNGOS DE DECOMPOSIÇÃO BRANCA PARA A  
REDUÇÃO DA TOXICIDADE DO ACEFATO**

GOIÂNIA - GO  
2010

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

**VALÉRIA DE LIMA JARDIM**

**SELEÇÃO DE FUNGOS DE DECOMPOSIÇÃO BRANCA PARA A  
REDUÇÃO DA TOXICIDADE DO ACEFATO**

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

**Área de Concentração:** Recursos Hídricos e Saneamento Ambiental.

**Orientadora:** Prof. Dra. Mariângela Fontes Santiago.

**Co-orientadora:** Prof. Dra. Marize Campos Valadares.

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

J373s Jardim, Valéria de Lima.  
Seleção de fungos de decomposição branca para a redução da toxicidade do acefato [manuscrito] / Valéria de Lima Jardim. - 2010.  
xvii, 134 f. : figs., tabs.

Orientadora: Profª. Drª. Mariângela Fontes Santiago; Co-orientadora: Marize Campos Valadares Bozinis.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Escola de Engenharia Civil, 2010.

Bibliografia.  
Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.  
Apêndices.

1. Biorremediação de organofosforado 2. Inibição de colinesterase 3. Toxicidade do acefato 4. Lacase I. Título.

CDU: 661.16

VALÉRIA DE LIMA JARDIM

**SELEÇÃO DE FUNGOS DE DECOMPOSIÇÃO BRANCA PARA A  
REDUÇÃO DA TOXICIDADE DO ACEFATO**

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, aprovada em 23 de agosto de 2010, pela banca examinadora:

---

**Profa. Dra. Mariângela Fontes Santiago**  
FF - UFG - Presidente da Banca e Orientadora

---

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

---

**Profa. Dra. Nora Katia Saavedra del Águila**  
EEC - UFG – Examinadora Interna

---

**Profa. Dra. Marize Campos Valadares Bozinis**  
FF - UFG – Examinadora Interna e Co-orientadora

## DEDICATÓRIA

À Deus, por me sustentar nessa caminhada.

Ao Ricardo, à mamãe Regina e ao Pudim pelo amor, compreensão e motivação.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dra. Mariângela Fontes Santiago, meu agradecimento especial pela orientação, dedicação e aprendizado ao longo desse período, e por ser um exemplo profissional e pessoal para mim.

À professora Dra. Marize Campos Valadares Bozinis pela excelente co-orientação no desenvolvimento desse trabalho e por me ensinar a fazer pesquisa.

À professora Dra. Telma Alves Garcia pelos inúmeros esclarecimentos e ajuda técnica.

Ao Núcleo de Estudos e Pesquisas Tóxico-Farmacológicas– NEPET e ao Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular da Faculdade de Farmácia - UFG pelo apoio técnico necessário para o desenvolvimento dessa pesquisa.

À Arysta Life Science Brasil, por autorizar e ceder o agrotóxico utilizado nesse trabalho, por meio de seu representante Carlos Mitsuo Murakami.

A indústria e comércio laboratorial Doles ® pelo suporte material.

A Faculdade de Farmácia e Escola de Engenharia Civil - Universidade Federal de Goiás e seus funcionários.

Aos professores do PPGEMA, pelo conhecimento transmitido e por contribuir com a minha formação profissional.

Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. Alexandre Nunes Ponezi, Profa. Dra. Nora Kátia Saavedra Del Águila e Profa. Dra. Marize Campos Valadares, pela atenção e disponibilidade.

À Maria Regina C. Melo e toda equipe do Hospital das Clínicas – UFG; Matilde Batista Aires e Laboratório Rômulo Rocha – FF – UFG, por doarem plasma sanguíneo a este estudo.

Ao meu pai Antônio Sérgio R. Jardim pelo apoio incondicional e por me ensinar que a educação é o bem mais valioso do ser humano.

A meu irmão Fernando pelo apoio e amizade.

Às amigas de caminhada Bárbara, Daniela, Fernanda e Alyne pelos momentos de estudo e divertimento.

À minha amiga e irmã Ana Paula Teles pela sua infinita amizade e incentivo.

À farmacêutica Ana Claudia Rodrigues Siqueira pelo companheirismo e amizade no Laboratório de Enzimologia e Biocatálise Ambiental – FF – UFG.

JARDIM, V. L. **Seleção de Fungos de Decomposição Branca para a Redução da Toxicidade do Acefato**. Dissertação de Mestrado. Engenharia do Meio Ambiente – Escola de Engenharia Civil, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2010. 134p.

## RESUMO

O Brasil está entre os principais países consumidores de agrotóxicos, sendo o Estado de Goiás um colaborador em potencial devido à grande produção de tomate industrial. Dentre os agrotóxicos mais utilizados, destaca-se o organofosforado Acefato com características toxicológicas capazes de contaminar os seres vivos e o meio ambiente. Várias são as pesquisas que buscam soluções na remediação de compostos xenobióticos, sendo os microrganismos importantes ferramentas biotecnológicas para esse fim. O objetivo deste estudo foi selecionar fungos de decomposição branca capazes de produzir enzimas oxidativas em determinadas condições, na presença de Acefato, avaliando a sua eficiência em reduzir a sua toxicidade. Para tanto o estudo foi dividido em três partes: ensaios em meio de cultura sólido em diferentes condições nutricionais, ensaios em meio de cultura líquido sob duas condições distintas (agitação e estática) e desenvolvimento de metodologia analítica de avaliação da redução de toxicidade do Acefato. Foram definidas duas concentrações de Acefato, 10 e 50%, as quais foram submetidas ao tratamento pelas seguintes espécies: *Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Pycnoporus sanguineus*, *Phanerochaete chrysosporium* e *Lentinus edodes*. Em meio de cultura sólido, todas as espécies apresentaram crescimento micelial e desenvolvimento satisfatórios na presença de Acefato em condição nutricional padrão. A concentração de 50% de Acefato causou limitação para *Trametes villosa* no cultivo em meio de cultura sólido e líquido. O oposto ocorreu com *Pycnoporus sanguineus*, que teve bons resultados de desenvolvimento e produção enzimática na presença de Acefato. Lignina Peroxidase esteve presente em *Phanerochaete chrysosporium* com  $15,77 \text{U.mL}^{-1}$  somente em Acefato 50%, sugerindo que o agrotóxico possa induzir seu complexo enzimático. A enzima Lacase se destacou em *Pycnoporus sanguineus* nas duas condições de cultivo, sendo o maior pico de  $45,95 \text{U.mL}^{-1}$  na presença de 50% de Acefato em agitação. No entanto, o melhor valor para produção de Lacase foi de *Trametes villosa* na condição estática:  $73,55 \text{U.mL}^{-1}$  em Acefato 10%. Nos testes de toxicidade aplicados, NRU e Inibição da Enzima Colinesterase, comprovou-se que não houve formação do metabólito Metamidofós, nestas condições. A metodologia toxicológica desenvolvida para avaliar a redução de toxicidade do sobrenadante tratado mostrou-se eficaz e promissora no monitoramento e investigação de contaminação ambiental. As amostras tratadas por fungos apresentaram 100% de aumento de Colinesterase em comparação com o Grupo Controle (sem tratamento) para *T. villosa* e 91,7% para *P. sanguineus*. Esses resultados mostram que o complexo enzimático dos fungos estudados é capaz de reduzir a toxicidade do Acefato, comprovando que os fungos de decomposição branca, se bem conduzidos, podem trazer benefícios ambientais de mitigação.

Palavras – chave: Biorremediação de Organofosforado, Inibição de Colinesterase, Toxicidade do Acefato, Lacase.

JARDIM, V. L. **Selection of Rot - White Fungi for Reduction of Acephate Toxicity.** Master Dissertation. Environmental Engineering – Civil Engineering School, Federal University of Goiás, Goiânia, 2010. 134p.

## ABSTRACT

Brazil is one of the top pesticides using countries in the world, being the State of Goiás a potential contributor due to its large production of industrial tomatoes. Among the most widely used pesticides is the organophosphate Acephate with toxicological characteristics capable of infecting both living beings and the environment. There are several seeking solution studies to remediate xenobiotic compounds, being microorganisms an important biotechnological tool against them. The aim of this study was to select rot-white fungal that can produce oxidative enzymes under certain conditions, in the presence of Acephate, evaluating their effectiveness in reducing its toxicity. Thus, the study was divided into three parts: testing on solid medium under different nutritional conditions, tests in liquid culture medium under two different conditions (shaking and static) and development of analytical methodology to evaluate the decrease of Acephate toxicity. We defined two levels of Acephate, 10 and 50%, which were treated by the following species: *Trametes versicolor*, *Trametes villosa*, *Pycnoporus sanguineus*, *Phanerochaete chrysosporium* and *Lentinus edodes*. In solid medium all species showed mycelial growth and satisfying development in the presence of Acephate under standard nutritional conditions. The concentration of 50% Acephate caused limitation to *Trametes villosa* in solid and liquid medium cultivation. The opposite occurred to *Pycnoporus sanguineus*, which had good results in the development and production of enzymes in the presence of Acephate. Lignin Peroxidase in *Phanerochaete chrysosporium* was present with a  $15.77\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  only in Acephate 50%, suggesting that the pesticide may induce its enzyme complex. The enzyme Laccase excelled in *Pycnoporus sanguineus* in the two culture conditions, being the largest peak  $45.95\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  in 50% Acephate in shaking. However, the best value for the production of Laccase from *Trametes villosa* was in the static condition:  $73.55\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  in Acephate 10%. The toxicity tests applied, NRU and Cholinesterase Enzyme Inhibition, proved that in these conditions there was no formation of the metabolite Methamidophos. The toxicological methodology developed to assess the toxicity reduction in the treated supernatant was efficient and promising to monitor and investigate environmental contamination. The samples treated by fungi showed 100% increase of Cholinesterase compared to the control group (no treatment) for *T. villosa* and 91.7% for *P. sanguineus*. These results showed that the enzyme complex of the fungi studied is capable to reduce Acephate toxicity, proving that well managed rot-white fungal can bring environmental benefits of mitigation.

Key - words: Bioremediation of organophosphate, Cholinesterase Inhibition, Toxicity of Acephate, Laccase.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01:	Fórmula química estrutural do Acefato (ANVISA, 2009) .....	08
Figura 02:	Fórmula química estrutural do Metamidofós (ANVISA, 2006) .....	08
Figura 03:	Gráfico de agrotóxicos encontrados em amostras do RU – UNB .....	09
Figura 04:	Áreas de cultivo de tomate no Estado de Goiás. ....	11
Figura 05:	Células viáveis do teste do Vermelho Neutro. ....	15
Figura 06:	Esquema dos fatores de contaminação por agrotóxicos. ....	16
Figura 07:	Área agrícola do cerrado brasileiro: contaminação por agrotóxicos. ....	17
Figura 08:	Degradação de antraceno em bagaço de cana-de-açúcar por MnP. ....	20
Figura 09:	Degradação de agrotóxicos por MnP. ....	25
Figura 10:	(a) gráfico da degradação de 2,4D. (b) gráfico da degradação de MCPA com diferentes tamanhos de inóculos. ....	26
Figura 11:	Fluxograma explicativo do desenvolvimento do trabalho. ....	27
Figura 12:	Pontos equidistantes para medição de crescimento. ....	31
Figura 13:	Esquema do plaqueamento – Teste NRU. ....	37
Figura 14:	Gráfico do Crescimento de <i>Trametes versicolor</i> em Baixa Condição Nutricional. ....	41
Figura 15:	Aspecto do Micélio e Crescimento de <i>Trametes versicolor</i> em Baixa Condição Nutricional. ....	42
Figura 16:	Gráfico de Crescimento de <i>Trametes versicolor</i> em Média Condição Nutricional. ....	43
Figura 17:	Aspecto do Micélio e Crescimento de <i>Trametes versicolor</i> em Média Condição Nutricional. ....	43
Figura 18:	Gráfico de Crescimento de <i>Trametes versicolor</i> em Condição Nutricional Padrão. ....	44
Figura 19:	Aspecto do Micélio e Crescimento de <i>Trametes versicolor</i> em Condição Nutricional Padrão. ....	44
Figura 20:	Gráfico de Crescimento de <i>Trametes villosa</i> em Baixa Condição Nutricional. ....	45
Figura 21:	Aspecto do Micélio e Crescimento de <i>Trametes villosa</i> em Baixa Condição Nutricional. ....	45

Figura 22:	Gráfico de Crescimento de <i>Trametes villosa</i> em Média Condição Nutricional. ....	46
Figura 23:	Aspecto do Micélio e Crescimento de <i>Trametes villosa</i> em Média Condição Nutricional. ....	47
Figura 24:	Gráfico de Crescimento de <i>Trametes villosa</i> em Condição Nutricional Padrão. ....	47
Figura 25:	Aspecto do Micélio e Crescimento de <i>Trametes villosa</i> em Condição Nutricional Padrão. ....	48
Figura 26:	Gráfico de Crescimento de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em Baixa Condição Nutricional. ....	49
Figura 27:	Aspecto do Micélio e Crescimento de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em Baixa Condição Nutricional. ....	49
Figura 28:	Gráfico de Crescimento de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em Média Condição Nutricional. ....	50
Figura 29:	Aspecto do Micélio e Crescimento de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em Média Condição Nutricional. ....	50
Figura 30:	Gráfico de Crescimento de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em Condição Nutricional Padrão. ....	51
Figura 31:	Aspecto do Micélio e Crescimento de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em Condição Nutricional Padrão. ....	51
Figura 32:	Gráfico de Crescimento de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em Baixa Condição Nutricional. ....	52
Figura 33:	Aspecto do Micélio e Crescimento de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em Baixa Condição Nutricional. ....	53
Figura 34:	Gráfico de Crescimento de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em Média Condição Nutricional. ....	53
Figura 35:	Aspecto do Micélio e Crescimento de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em Média Condição Nutricional. ....	54
Figura 36:	Gráfico de Crescimento de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em Condição Nutricional Padrão. ....	54
Figura 37:	Aspecto do Micélio e Crescimento de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em Condição Nutricional Padrão. ....	55
Figura 38:	Gráfico de Crescimento de <i>Lentinus edodes</i> em Baixa Condição Nutricional. ....	56
Figura 39:	Aspecto do Micélio e Crescimento de <i>Lentinus edodes</i> em Baixa Condição Nutricional. ....	56
Figura 40:	Gráfico de Crescimento de <i>Lentinus edodes</i> em Média Condição Nutricional. ....	57

Figura 41: Aspecto do Micélio e Crescimento de <i>Lentinus edodes</i> em Média Condição Nutricional. ....	57
Figura 42: Gráfico de Crescimento de <i>Lentinus edodes</i> em Condição Nutricional Padrão. ....	58
Figura 43: Aspecto do Micélio e Crescimento de <i>Lentinus edodes</i> em Condição Nutricional Padrão. ....	58
Figura 44: Dispersão do Crescimento Fúngico pela Evolução da Concentração de Meio de Cultura em Relação ao BGA 0% em Acefato 10%. ....	59
Figura 45: Dispersão do Crescimento Fúngico pela Evolução da Concentração de Meio de Cultura em Relação ao BGA 0% em Acefato 50%. ....	60
Figura 46: Dispersão do Crescimento Fúngico pela Evolução da Concentração de Meio de Cultura em Relação ao BGA 0% no Grupo Controle. ....	60
Figura 47: Desenvolvimento de <i>Trametes versicolor</i> em substrato ABTS. ....	61
Figura 48: Desenvolvimento de <i>Trametes villosa</i> em substrato ABTS. ....	62
Figura 49: Desenvolvimento de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em substrato ABTS. ....	63
Figura 50: Desenvolvimento de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em substrato ABTS. ....	63
Figura 51: Desenvolvimento de <i>Lentinus edodes</i> em substrato ABTS. ....	64
Figura 52: Atividade Enzimática de <i>Trametes villosa</i> na Presença de Acefato 10%. ....	67
Figura 53: Atividade Enzimática de <i>Trametes villosa</i> na Presença de Acefato 50%. ....	67
Figura 54: Atividade Enzimática de <i>Trametes villosa</i> na Ausência de Acefato (Grupo Controle). ....	67
Figura 55: Desenvolvimento de <i>Trametes villosa</i> em meio líquido. ....	68
Figura 56: Biomassa de <i>Trametes villosa</i> em Diferentes Concentrações de Acefato. ....	69
Figura 57: Atividade Enzimática de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> na Presença de Acefato 10%. ....	70
Figura 58: Atividade Enzimática de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> na Presença de Acefato 50%. ....	70
Figura 59: Atividade Enzimática de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> na Ausência de Acefato (Grupo Controle). ....	71
Figura 60: Desenvolvimento de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em meio líquido. ....	71
Figura 61: Biomassa de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em Diferentes Concentrações de Acefato. ....	72
Figura 62: Atividade Enzimática de <i>Pycnoporus sanguineus</i> na Presença de Acefato 10%. ....	73

Figura 63:	Atividade Enzimática de <i>Pycnoporus sanguineus</i> na Presença de Acefato 50%. .....	73
Figura 64:	Atividade Enzimática de <i>Pycnoporus sanguineus</i> na Ausência de Acefato (Grupo Controle). .....	74
Figura 65:	Desenvolvimento de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em meio líquido. ....	74
Figura 66:	Biomassa de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em Diferentes Concentrações de Acefato. ....	75
Figura 67:	Atividade Enzimática de <i>Trametes villosa</i> na Presença de Acefato 10%. ....	77
Figura 68:	Atividade Enzimática de <i>Trametes villosa</i> na Presença de Acefato 50%. ....	77
Figura 69:	Atividade Enzimática de <i>Trametes villosa</i> na Ausência de Acefato (Grupo Controle). .....	78
Figura 70:	Desenvolvimento de <i>Trametes villosa</i> em meio líquido. ....	78
Figura 71:	Biomassa de <i>Trametes villosa</i> em Diferentes Concentrações de Acefato. ....	79
Figura 72:	Atividade Enzimática de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> na Presença de Acefato 10%. ....	80
Figura 73:	Atividade Enzimática de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> na Presença de Acefato 50%. ....	80
Figura 74:	Atividade Enzimática de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> na Ausência de Acefato (Grupo Controle). .....	81
Figura 75:	Desenvolvimento de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em meio líquido. ....	81
Figura 76:	Biomassa de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em Diferentes Concentrações de Acefato. ....	81
Figura 77:	Atividade Enzimática de <i>Pycnoporus sanguineus</i> na Presença de Acefato 10%. ....	82
Figura 78:	Atividade Enzimática de <i>Pycnoporus sanguineus</i> na Presença de Acefato 50%. ....	83
Figura 79:	Atividade Enzimática de <i>Pycnoporus sanguineus</i> na Ausência de Acefato (Grupo Controle). .....	83
Figura 80:	Desenvolvimento de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em meio líquido. ....	84
Figura 81:	Biomassa de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em Diferentes Concentrações de Acefato. ....	84
Figura 82:	Gráfico de Viabilidade Celular na Presença de Acefato e Metamidofós 50%. ....	86
Figura 83:	Captação do Vermelho Neutro no NRU com Amostra Tratada por <i>Pycnoporus sanguineus</i> . .....	86
Figura 84:	Atividade de Colinesterase em Amostra Tratada por <i>Trametes villosa</i> . ....	88

Figura 85: Atividade de Colinesterase em Amostra Tratada por <i>Pycnopus sanguineus</i> . .....	89
---	----

## LISTA DE QUADROS

Quadro 01:	Propriedades Físico-Químicas do Acefato. ....	07
Quadro 02:	Informações Toxicológicas do Acefato. ....	13
Quadro 03:	Principais aplicações da Lacase. ....	19
Quadro 04:	Microrganismos utilizados na pesquisa. ....	28
Quadro 05:	Meio de Cultura .....	29
Quadro 06:	Períodos dos Ensaios em Meio de Cultura Sólido. ....	31
Quadro 07:	Períodos dos Ensaios em Meio de Cultura Líquido. ....	32
Quadro 08:	<i>Grupos Controle</i> usados no experimento. ....	33
Quadro 09:	Periodicidade das análises enzimáticas dos ensaios em meio líquido. ....	34
Quadro 10:	Universo amostral do teste de Atividade de Colinesterase. ....	38
Quadro 11:	Aumento da Colinesterase das Amostras Tratadas em Comparação com o Grupo Controle. ....	87

## APÊNDICE A – LISTA DE QUADROS

Quadro A – 01:	Valores Médios de Medição em BGA – 0%. ....	103
Quadro A – 02:	Valores Médios de Medição em BGA – 40%. ....	104
Quadro A – 03:	Valores Médios de Medição em BGA – Padrão. ....	105
Quadro A – 04:	Teste de Spearman. ....	106

## APÊNDICE B – LISTA DE QUADROS

Quadro B - 01:	Atividade Enzimática de <i>Trametes villosa</i> em condição de Agitação. ....	108
Quadro B - 02:	Atividade Enzimática de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em Condição de Agitação. ....	109
Quadro B - 03:	Atividade Enzimática de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em Condição de Agitação. ....	110
Quadro B - 04:	Atividade Enzimática de <i>Trametes villosa</i> em Condição Estática. ....	111
Quadro B - 05:	Atividade Enzimática de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em Condição Estática. ....	112

Quadro B - 06:	Atividade Enzimática de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em Condição Estática. ....	113
Quadro B - 07:	Análise Estatística Descritiva de <i>Trametes villosa</i> em Agitação. ....	114
Quadro B - 08:	Análise Estatística Descritiva de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em Agitação. ....	116
Quadro B - 09:	Análise Estatística Descritiva de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em Agitação. ....	118
Quadro B - 10:	Análise Estatística Descritiva de <i>Trametes villosa</i> em Estático. ....	120
Quadro B - 11:	Análise Estatística Descritiva de <i>Phanerochaete chrysosporium</i> em Estático. ....	122
Quadro B - 12:	Análise Estatística Descritiva de <i>Pycnoporus sanguineus</i> em Estático. ....	124

### APÊNDICE C – LISTA DE QUADROS

Quadro C - 01:	Resultados de Colinesterase (U.I.mL <sup>-1</sup> ) no Ensaio com Amostra de <i>Pycnoporus sanguineus</i> . ....	127
Quadro C - 02:	Resultados de Colinesterase (U.I.mL <sup>-1</sup> ) no Ensaio com Amostra de <i>Trametes villosa</i> . ....	128
Quadro C - 03:	Análise Estatística Descritiva com Amostra de <i>Pycnoporus sanguineus</i> ....	129
Quadro C - 04:	Análise Estatística Descritiva com Amostra de <i>Trametes villosa</i> . ....	130
Quadro C - 05:	Análise de Variância – Teste ANOVA com Amostra de <i>Trametes villosa</i> ....	131
Quadro C - 06:	Teste de aderência Kolmogorov-Smirnov de uma variável para comprovação ou não de normalidade com Amostra de <i>Trametes villosa</i> ....	131
Quadro C - 07:	Teste de Tukey com Amostra de <i>Trametes villosa</i> ....	132
Quadro C - 08:	Análise de Variância – Teste ANOVA com Amostra de <i>Pycnoporus sanguineus</i> ....	133
Quadro C - 09:	Teste de aderência Kolmogorov-Smirnov de uma variável para comprovação ou não de normalidade com Amostra de <i>Pycnoporus sanguineus</i> ....	133
Quadro C - 10:	Teste de Tukey com Amostra de <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....	134

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 01: Crescimento e Morfologia dos Fungos Submetidos a Diferentes Condições Nutricionais na Presença de Acefato. ....	40
Tabela 02: Valores Máximos de Produção Enzimática em Condição Estática e Sob Agitação. ....	65

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

Lcc	Lacase
MnP	Manganês Peroxidase
LiP	Lignina Peroxidase
BGA	Batata, Glicose e Ágar
Le	<i>Lentinus edodes</i>
Pc	<i>Phanerochaete crysosporium</i>
Ps	<i>Pycnoporus sanguineus</i>
Tve	<i>Trametes versicolor</i>
Tvi	<i>Trametes villosa</i>
rpm	Rotações por minuto
pH	Potencial Hidrogeniônico
EPA	Environment Protection Agency
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
UFG	Universidade Federal de Goiás
FF	Faculdade de Farmácia
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NRU	Neutral Red Uptake – Teste
CONAMA	Conselho Nacional de Meio Ambiente
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e Recursos Renováveis
PPA	Potencial de Periculosidade Ambiental
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico - Farmacológicas
AChase	Acetilcolinesterase
IDA	Ingestão Diária Aceitável
NOAEL	Nível Máximo de Dose em que não se Observam Efeitos Adversos
DL <sub>50</sub>	Dose Letal Mediana
i. a.	Ingrediente ativo

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	01
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	04
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	06
3.1 OBJETIVO GERAL .....	06
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	06
<b>4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	07
4.1 ORGANOFOSFORADO ACEFATO E SEU USO .....	07
4.2 TOXICIDADE .....	12
4.3 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL .....	16
4.4 ENZIMAS FÚNGICAS: INDUÇÃO E CONDIÇÕES IDEAIS .....	19
4.5 POTENCIAL BIORREMEIADOR DE MICRORGANISMOS .....	23
<b>5. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	27
5.1 AGROTÓXICOS .....	28
5.2 MICRORGANISMOS .....	28
5.3 MEIO DE CULTURA .....	29
5.4 MANUTENÇÃO DOS MICRORGANISMOS .....	29
5.5 PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO - ESTOQUE .....	30
5.6 CONCENTRAÇÃO DO ACEFATO .....	30
5.7 TRATAMENTO DO ACEFATO EM BATELADA .....	30
<b>5.7.1 Experimentos em Meio de Cultura Sólido – Etapa 01</b> .....	30
<b>5.7.2 Experimentos em Meio de Cultura Líquido – Etapa 02</b> .....	32
<b>5.7.3 Determinação da Biomassa</b> .....	34
5.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	34
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	36
5.10 ANÁLISE DO ACEFATO – ETAPA 03 .....	36
<b>5.10.1 Teste de Toxicidade com Células de Fibroblasto de Camundongo –             Teste do Vermelho Neutro (NRU)</b> .....	36
<b>5.10.2 Teste de Inibição da Enzima Colinesterase</b> .....	37
5.10.2.1 Preparação da Amostra .....	37
5.10.2.2 Procedimento Técnico e Reprodutibilidade .....	38

<b>6. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	39
6.1 EXPERIMENTOS EM MEIO DE CULTURA SÓLIDO – ETAPA 01 .....	39
<b>6.1.1 Ensaios em Diferentes Condições Nutricionais</b> .....	39
6.1.1.1 <i>Trametes versicolor</i> .....	41
6.1.1.2 <i>Trametes villosa</i> .....	44
6.1.1.3 <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .....	48
6.1.1.4 <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....	52
6.1.1.5 <i>Lentinus edodes</i> .....	55
<b>6.1.2 Correlações entre as Diferentes Condições Nutricionais</b> .....	59
<b>6.1.3 Indicação de Atividade Enzimática</b> .....	61
6.1.3.1 <i>Trametes versicolor</i> .....	61
6.1.3.2 <i>Trametes villosa</i> .....	62
6.1.3.3 <i>Phanerochaete chrysosporium</i> .....	62
6.1.3.4 <i>Pycnoporus sanguineus</i> .....	63
6.1.3.5 <i>Lentinus edodes</i> .....	64
6.2 EXPERIMENTOS EM MEIO DE CULTURA LÍQUIDO – ETAPA 02 .....	65
<b>6.2.1 Determinação da Atividade Enzimática e Produção de Biomassa</b> .....	65
6.2.1.1 Agitação .....	66
6.2.1.2 Estático .....	76
6.3 ANÁLISE DO ACEFATO APÓS TRATAMENTO – ETAPA 03 .....	85
<b>6.3.1 Teste de Toxicidade com Células de Fibroblasto de Camundongo –</b> <b>Teste do Vermelho Neutro</b> .....	85
<b>6.3.2 Teste de Inibição da Enzima Colinesterase</b> .....	87
<b>7. CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES</b> .....	90
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	93

## 1 INTRODUÇÃO

O sistema agrícola atual utiliza grandes áreas de cultivo, resultando em demandas cada vez maiores de produtos e insumos a fim de proporcionar características favoráveis ao cultivo. Na busca pela qualidade do produto cultivado, exigida pelos clientes e consumidores finais, os agrotóxicos assumem um importante papel, principalmente em relação ao seu extensivo e intensivo uso.

Existem várias denominações para esses compostos: pesticidas, defensivos agrícolas, biocidas, veneno, praguicidas e agrotóxicos. O termo “agrotóxico” é bastante utilizado no Brasil e coloca em evidência a toxicidade desses compostos para os seres vivos e meio ambiente, sendo, portanto, a denominação mais adequada (BRASIL, 1997). A Lei Federal n.º 7.802 de 11 de julho de 1989 define os agrotóxico como:

Produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos (BRASIL, 1989).

O uso indiscriminado de agrotóxicos produz conseqüências graves para o meio ambiente, incluindo os seres humanos. Dentre as conseqüências, o dano causado aos recursos hídricos parece ter proporções ainda maiores, pois esses compostos afetam a cadeia alimentar, o abastecimento público e são de difícil remediação. As águas superficiais e subterrâneas são fontes vitais de água potável, necessitando, portanto de atenção no que diz respeito a esse tipo de contaminação.

Segundo Sanches et al. (2003), o monitoramento de água contaminada por compostos químicos, bem como o tratamento dessa água para abastecimento, possui custo bastante elevado, limitações tecnológicas e demanda tempo, o que dificulta a operação. Para as águas subterrâneas, o monitoramento e a mitigação se tornam ainda mais difíceis. Algumas regiões do Brasil, onde o solo é utilizado agronomicamente, merecem cuidado especial por serem pontos de recarga dos aquíferos. Este é o caso da região de Ribeirão Preto, interior do Estado de São Paulo, onde parte do abastecimento público é proveniente de aquíferos cujos pontos de recarga possuem cultivo de cana-de-açúcar (BRASIL, 2006).

A contaminação das coleções de água por agrotóxicos sejam elas superficiais ou subterrâneas, pode ocorrer principalmente por: (1) deriva das aplicações, (2) lixiviação da água no solo, (3) erosão, (4) vazamento no transporte do produto e (5) pela lavagem de embalagens e tanques de pulverização, além das aplicações habituais (FILIZOLA et al., 2002).

Conforme afirma Dores e De-Lamonica-Freire (2001), a grande maioria dos agrotóxicos apresenta concentrações baixas em água, devido ao poder de diluição e a pouca solubilidade; e mesmo em baixas concentrações afetam organismos aquáticos podendo atingir a cadeia trófica por processos bioacumulativos. No entanto, esses autores alertam para a presença de agrotóxicos em águas superficiais e sub-superficiais em altas concentrações depois de chuvas intensas, principalmente após recentes aplicações.

Spadotto (2006) afirma que o Brasil possui uma legislação rígida em relação à utilização dos agrotóxicos, pois se ocupa não apenas da periculosidade dos compostos, mas de seu comportamento nos diversos compartimentos ambientais: solo, água, ar e seres vivos. A legislação federal de agrotóxicos e afins, nº 7.802, dispõe sobre muitos aspectos em relação ao uso de agrotóxico: pesquisa, experimentação, embalagem, transporte, comercialização, destino final de resíduos, importação, exportação, dentre outros. Em relação à contaminação dos recursos hídricos, duas leis se aplicam: a resolução nº. 357 de 17 de março de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) e a portaria nº. 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde, sendo essa última específica para padrões de potabilidade. Porém, é importante ressaltar que nem todos os agrotóxicos, representados pelo seu ingrediente ativo, estão contemplados nessas legislações. Em relação à toxicidade a seres humanos, os agrotóxicos são enquadrados segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, e para toxicidade a seres vivos e ao meio ambiente, a responsabilidade é da portaria normativa n.º 84 de 15 de outubro de 1996 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA.

O Brasil está entre os principais consumidores mundiais de agrotóxicos. Das atividades agrícolas presentes em Goiás, a cadeia produtiva de tomate industrial se destaca por representar mais de 40% da produção nacional, devido ao sucesso da cultura no ecossistema cerrado (CAMARGO et al., 2006). As indústrias de polpa de tomate e derivados localizadas no Estado geram uma grande demanda de produção do fruto, o que conseqüentemente, proporciona o uso intenso de agrotóxicos. Os organofosforados e os carbamatos são os grupos de agrotóxicos mais utilizados nessa cultura.

Dentre os organofosforados mais usados na produção de tomate industrial, o ingrediente ativo Acefato assume elevada importância. De acordo com a ANVISA e IBAMA, o Acefato é classificado toxicologicamente e ambientalmente como classe III, que conforme a Lei Federal n.º 7.802 de 11 de julho de 1989, regulamentada pelo Decreto n.º 98.816 de 11 de janeiro de 1990, equivale a toxicidade mediana. Pertencente à classe dos inseticidas/acaricidas, o Acefato possui registro para várias culturas como soja, rosa, fumo, citros, melão, tomate e outras. A classificação ambiental dos agrotóxicos nem sempre coincide com a classificação toxicológica, já que os aspectos ambientais também são levados em consideração. Desta forma, para um mesmo produto, pode haver diferenças entre a classificação ambiental e toxicológica. Este é o caso do Acefato, cuja uma das marcas comerciais está enquadrada toxicologicamente como produto medianamente perigoso e ambientalmente como produto muito perigoso (classe II).

A remediação de compostos e substâncias contaminantes do meio ambiente tem sido largamente estudada. Dentre os contaminantes, os compostos ditos xenobióticos, como os agrotóxicos, plásticos e solventes, exibem efeitos tóxicos e indesejados aos organismos vivos, quando introduzidos nos ecossistemas naturais. No entanto, vários são os xenobióticos que podem ser degradados por microrganismos.

A biorremediação é uma ferramenta da biotecnologia que tem se mostrado uma alternativa promissora quanto à redução ou até remoção de determinados poluentes do meio ambiente. A utilização de fungos para esse fim oferece bons resultados, especialmente os fungos de decomposição branca por possuírem um sistema enzimático capaz de tolerar altas doses de compostos tóxicos (BARBOSA e SANTIAGO, 2005). Via de regra, a degradação de moléculas complexas no meio ambiente ocorre devido à interação entre as comunidades bacterianas e fúngicas, alcançando assim maior poder metabólico.

As ligninases, enzimas cujo substrato natural é a madeira, são produzidas por fungos de forma extracelular e têm seu uso potencializado, por apresentarem baixa especificidade de substrato e também, por reagirem bem a agentes indutores em condições favoráveis, tornando assim, uma ferramenta manipulável.

Vários estudos já comprovaram a eficiência do complexo enzimático dos fungos de decomposição branca em processos de tratamento que vão desde refinamento de efluentes até remediação *in situ* e *ex situ* de solos contaminados. Assim, o sistema enzimático fúngico possui um amplo espectro de aplicações, que se bem conduzidas podem gerar grandes benefícios ao meio ambiente.

## 2 JUSTIFICATIVA

A contaminação dos recursos hídricos, superficiais e subterrâneos, representa um problema ambiental de grandes proporções, pois o potencial hídrico de abastecimento público pode ser inutilizado e causar danos aos seres vivos e ao ecossistema como um todo.

Segundo Bedor et al. (2007) cerca de 44% dos agrotóxicos registrados são classificados como muito perigosos ao meio ambiente. Estes autores relatam que algumas revendas da região nordeste do país, sugerem, indiscriminadamente, o uso de cerca de 30 agrotóxicos para o cultivo de tomate e destes os mais utilizados são organofosforados, incluindo o Acefato.

Conforme comunicação verbal obtida em entrevista realizada nas revendas autorizadas localizadas em Goiânia e interior do Estado e por profissionais de assessoria técnica, o Acefato é o organofosforado mais utilizado em Goiás na cultura do tomate, com aplicações que variam entre quinzenal e semanalmente, ocorrendo, inclusive, em alguns casos, uso excessivo do produto. O intensivo uso de Acefato pode potencializar o risco de contaminação do solo, água, chegando, inclusive aos seres vivos (informação verbal)<sup>1</sup>.

O potencial de contaminação hídrica do Acefato foi estudado pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA, que considera o produto de média potencialidade quando dissolvido em água e de baixa potencialidade quando associado ao sedimento, resultados estes que podem estar influenciados pelas propriedades físico-químicas dos produtos e características de solo e clima (BRASIL, 2007).

Segundo Yen et al. (2000), o potencial de contaminação de águas subterrâneas por Acefato deve ser levado em conta, principalmente em condições específicas de solo e clima, como temperatura elevada e a presença de silte. Nas águas superficiais, a contaminação por agrotóxicos pode ocorrer durante os períodos de plantio, principalmente após chuvas. Desta forma, Griza et al. (2008), ao detectar Acefato em fonte de água mineral utilizada para consumo, no município de Rondinha – RS, ressalta a importância de serem realizados acompanhamentos durante as safras para que a contaminação seja definida como casual ou persistente, possibilitando a remediação.

A presença de agrotóxicos em águas de abastecimento público revela-se em um problema ambiental grave, uma vez que é conhecido o fato de que os tratamentos convencionais para potabilidade nem sempre são eficientes na remoção desses compostos.

---

<sup>1</sup> Informação fornecida por profissionais responsáveis pelas revendas autorizadas em Fevereiro de 2009.

Libânio, Rissato e Melo (2005) encontraram contaminação por organoclorados em 10% das amostras de água tratada em sistema de ciclo completo. As contaminações das coleções de água por agrotóxicos nas regiões de agricultura intensiva podem atingir os seres humanos ocasionando intoxicações do tipo crônica, pois o contato é considerado pequeno ou moderado em função do poder de diluição do corpos d'água, porém constantes. No entanto, esse tipo de intoxicação causa danos irreversíveis, como as paralisias e neoplasias (BRASIL, 1997).

Atualmente muitos estudos têm sido realizados sobre a capacidade mutagênica e toxicidade dos compostos químicos tóxicos. Neste contexto, vários organofosforados estão sendo alvo de reavaliações periódicas em todo mundo, com o intuito de atualizar seu perfil toxicológico e de substituir seu ingrediente ativo, quando possível, por outros mais seguros, já que é conhecido o fato dos organofosforados serem responsáveis pelo maior número de morbidade e mortalidade associada ao uso de agrotóxicos (ANVISA, 2009).

Os fungos de decomposição branca apresentam capacidade degradativa de compostos químicos orgânicos, incluindo os agrotóxicos, por meio das suas enzimas lignolíticas, como a Lacase (Lcc), as peroxidases Manganês Peroxidase (MnP) e Lignina Peroxidase (LiP). A degradação desses compostos tóxicos pelo complexo enzimático de microrganismos se deve à utilização de elementos como carbono e nitrogênio presentes nesses compostos como fontes nutricionais primárias. Assim, o crescimento e a adaptabilidade desses microrganismos estão condicionados a fatores energéticos e níveis de toxicidade apresentados pelo composto químico.

Cho et al. (2001), em sua pesquisa com fungos de decomposição branca, mostraram que compostos químicos aromáticos, como os clorofenóis, podem ser transformados e até removidos quando expostos a maiores quantidades da enzima Lacase, produzida extracelularmente por esses fungos. Para Cavallazzi, Kasuya e Soares (2005) o uso de indutores que aumentem a produção enzimática de fungos é um importante mecanismo para que a enzima seja purificada e posteriormente utilizada com maior facilidade.

Utilizar o potencial remediador das enzimas fúngicas para reduzir ou até mesmo remover a toxicidade do Acefato, pode ser uma tecnologia vantajosa em relação às existentes. Além disso, o Acefato pode ser uma importante ferramenta na indução da produção enzimática de fungos, tornando-a manipulável e controlável. Desta forma, a biorremediação como ferramenta biotecnológica, nesta pesquisa, procura buscar soluções para a contaminação de águas de abastecimento por agrotóxicos, por meio de fungos que fazem parte da biodiversidade brasileira e produção de conhecimento técnico-científico, o que justifica o estudo mais aprofundado do potencial remediador das enzimas fúngicas.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Selecionar fungos de decomposição branca que são capazes de produzir enzimas oxidativas na presença de Acefato avaliando a sua eficiência em reduzir a toxicidade deste para uma futura aplicação de descontaminação em águas naturais.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Selecionar a concentração dos meios de cultura BGA que proporcionem maior adaptação dos fungos ao Acefato;
- 3.2.2 Selecionar os fungos com maior capacidade de produção enzimática na presença de Acefato;
- 3.2.3 Determinar as concentrações de Acefato conforme o crescimento e a adaptabilidade dos fungos;
- 3.2.4 Determinar a melhor condição para a produção enzimática em meio líquido;
- 3.2.5 Determinar a atividade enzimática de Lacase, Manganês Peroxidase e Lignina Peroxidase dos fungos selecionado em cada uma das concentrações de Acefato;
- 3.2.6 Avaliar o potencial do Acefato como indutor do complexo enzimático para cada um dos fungos;
- 3.2.7 Testar os níveis de toxicidade do Acefato alcançados após o tratamento com fungo;
- 3.2.8 Verificar se houve a formação do metabólito Metamidofós após o tratamento com fungo.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 4.1 ORGANOFOSFORADO ACEFATO E SEU USO

Os organofosforados são compostos derivados de ácidos fosfóricos, tiosfosfóricos, ditiofosfóricos e outros. São formados por combinações de carbono, fósforo, nitrogênio, enxofre, oxigênio e hidrogênio, sendo sua fórmula molecular  $C_4H_{10}NO_3PS$  (SUCEN, 2001).

O Acefato é um organofosforado de nome químico *O,S-dimethyl-acetylphosphoramidothioate*, nº CAS 30560-19-1, da classe dos inseticidas/acaricidas, registrado para uso em 18 culturas. Sua formulação é em pó solúvel, de cor branca, com concentração de  $750gKg^{-1}$  de ingrediente ativo e  $250gKg^{-1}$  de substâncias inertes; seu modo de ação é por contato e ingestão; seu mecanismo de ação é por meio da inibição da enzima Acetilcolinesterase, presente em insetos e mamíferos (ANVISA, 2002).

No Brasil, o Acefato é comercializado pelos nomes Orthene 750®, Cefanol®, Acefato Fersol® entre outros. No Quadro 01 abaixo estão representadas as principais propriedades físico-químicas do Acefato.

Quadro 01: Propriedades Físico-Químicas do Acefato.

PROPRIEDADE FÍSICO-QUÍMICA	VALOR	REFERÊNCIA
Solubilidade em Água a 20°C (S)	$750g.L^{-1}$	TomLin (1995)
Pressão de Vapor a 24°C (PV)	0,229mPA	TomLin (1995)
Coefficiente de Partição Octanol-Água ( $K_{ow}$ )	0,13	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)
Groudwater Ubiquity Score (GUS)	1,76	Milhome et al. (2009)
Coefficiente de Adsorção à Matéria Orgânica ( $K_{oc}$ )	$2mL.g^{-1}$	Milhome et al. (2009)

A alta solubilidade do Acefato indica que há maior possibilidade de lixiviação e/ou carreamento do produto pelas chuvas ou águas de irrigação para as coleções de água, sendo esta informação corroborada pelo Coeficiente de Adsorção à Matéria Orgânica ( $K_{oc}$ ), onde valores menores que  $50mL.g^{-1}$  refletem alta mobilidade no solo. Consequentemente sua meia-vida em solo é baixa, ao contrário do que pode ocorrer em água. Quanto à volatilização

e capacidade lipofílica, o Acefato não apresenta valores preocupantes, evidenciados pelas propriedades de Pressão de Vapor e Coeficientes de Partição Octanol-Água, respectivamente. A possibilidade de contaminação da água subterrânea é representada pelo índice de GUS (Groundwater Ubiquity Score), onde é levado em conta o  $K_{oc}$  e a meia-vida do produto, excluindo dados de solubilidade. Desta forma, o Acefato encontra-se enquadrado como improvável contaminante (MILHOME et al., 2009). No entanto, ainda segundo Milhome et al, (2009), para a Agência Americana de Proteção Ambiental – EPA (Environmental Protection Agency), a solubilidade em água é um dos critérios que definem a capacidade de contaminação de águas subterrâneas, o que coloca o Acefato como contaminante em potencial.

Outras características importantes são observadas sobre o Acefato: geração de metabólito e Limite Máximo Residual (LMR). No ambiente, o Acefato pode degradar-se em Metamidofós, um organofosforado também usado como ingrediente ativo e classificado como altamente tóxico (ANVISA, 2009). Desta forma, em muitos casos, a presença do metabólito não indica ao certo qual ingrediente ativo foi utilizado na cultura, já que o Metamidofós possui registro para apenas 07 culturas contra as 18 do Acefato.

Lima et al. (2003) relatam que desde meados da década de 80, quando o Metamidofós foi introduzido no Brasil, seu uso tem sido cada vez mais freqüente na agricultura, necessitando, portanto, de acompanhamento no que diz respeito a possíveis resíduos nas matrizes ambientais e alimentares. A seguir as fórmulas estruturais do Acefato e seu metabólito nas Figuras 01 e 02:

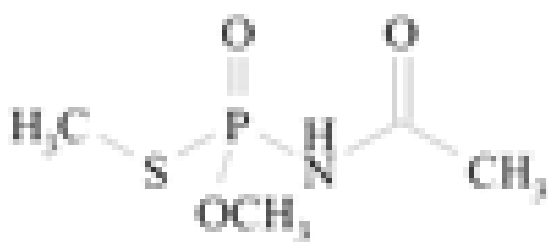


Figura 01: Fórmula química estrutural do Acefato (ANVISA, 2009)

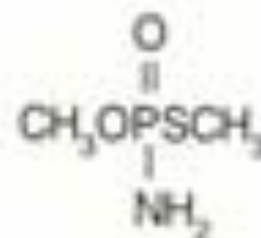


Figura 02: Fórmula química estrutural do Metamidofós (ANVISA, 2006)

O Limite Máximo Residual é definido como a quantidade máxima de resíduo de um determinado agrotóxico que pode estar presente no alimento, em decorrência da aplicação adequada do produto em campo, expressa em  $\text{mg.Kg}^{-1}$  (BRASIL, 1989). Os LMR'S do Acefato e Metamidofós são de  $0,5\text{mgkg}^{-1}$  em intervalo de segurança de 07 e 21 dias, respectivamente, para a cultura de tomate (ANVISA, 2002).

Conforme estudo realizado em cultura de tomate por Trevisan (2002), os LMR's desses ingredientes ativos se apresentaram em conformidade com o preconizado pela legislação, no entanto foram observados fatores como persistência e formação acentuada do metabólito nas folhas da cultura. O Programa de Análise de Resíduo de Agrotóxico em Alimento (PARA) da Agência Nacional de Vigilância em Saúde (ANVISA) divulgou que em 2007 mais de 44% das amostras de tomate analisadas apresentaram resultados insatisfatórios. Dentre os agrotóxicos identificados nesta análise estão o Monocrotofós e Metamidofós, sendo que este último não tem seu uso autorizado para tomate de mesa, apenas para o cultivo de tomate industrial (plantio rasteiro), (BRASIL, 2009).

Souza (2006) analisou a presença de resíduos de agrotóxicos no Restaurante Universitário - RU da Universidade de Brasília – UNB e ressalta o risco de contaminação acumulativa por ingestão. Dentre os dez agrotóxicos pesquisados, o Acefato e o Metamidofós foram os mais encontrados, com 24% e 42% de presença do total de 150 amostras analisadas, respectivamente, conforme apresenta o gráfico da Figura 03.

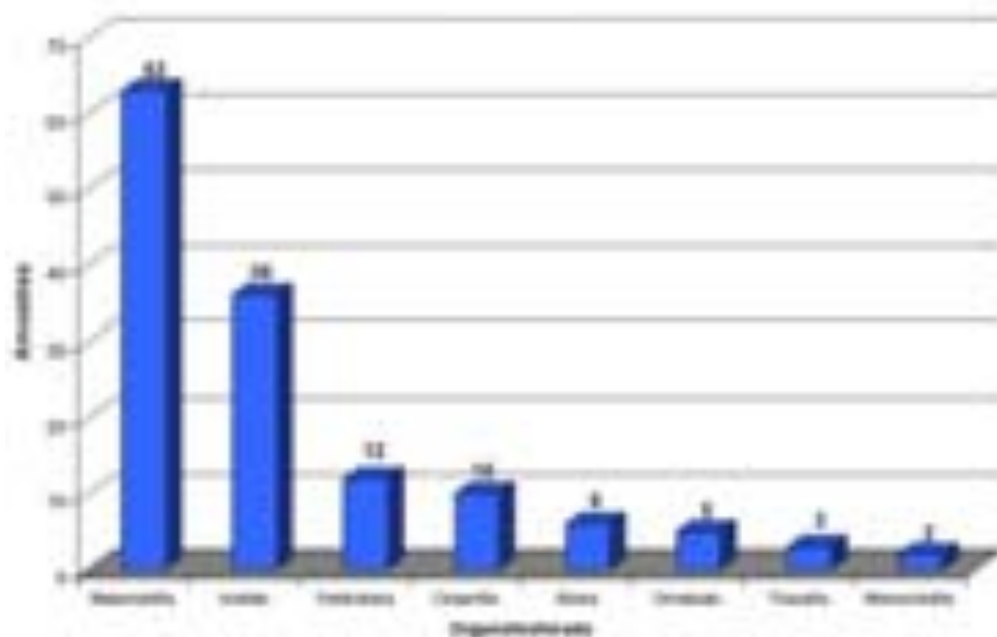


Figura 03: Gráfico de agrotóxicos encontrados em amostras do RU – UNB, (SOUZA, 2006)

O Estado de Goiás é um dos principais consumidores de Acefato. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA, em 2008, o consumo de Acefato foi de mais de 44 toneladas, sendo que nas revendas autorizadas 344 toneladas de produto foi adquirido dos fabricantes, só no segundo semestre (BRASIL, 2008). Conforme informações do Governo do Estado de Goiás – Agricultura Estadual, no ano de 2007, o Estado ocupou o primeiro lugar no cenário nacional na produção de tomate com 25 municípios participando da cadeia produtiva. A Figura 04 mostra as regiões de cultivo de tomate rasteiro no Estado.

A produção de tomate industrial em Goiás, no período de 1990 a 2004, cresceu 47%, representando a produção majoritária do Brasil. O sucesso da cultura no cerrado brasileiro se deve a grande adaptação do fruto ao clima e condições de solo (CAMARGO et al., 2006).

Melo e Vilela (2005) ressaltam que a tomaticultura no ecossistema cerrado está sujeita a pragas e doenças que podem causar momentos de declínio na produtividade, cujo controle é feito exclusivamente com agroquímicos nocivos ao meio ambiente, pois acumulam resíduos tóxicos. Tais pesquisadores sugerem que sejam desenvolvidos genótipos resistentes aos patógenos, já que ambientalmente, seria uma solução mais racional.

De acordo com Alves, Fernandes e Marin (2008), em 2005, Goiás foi responsável pela maior produção de tomate do Brasil, perfazendo um total de 720 toneladas de frutos colhidos. Em contrapartida, essa alta produtividade pode estar amparada ao uso de grande quantidade de produtos agrotóxicos, incluindo insumos, fertilizantes e defensivos. Esses mesmos autores relatam que na produção de tomate de mesa são realizadas aplicações diárias de agrotóxicos, dependendo da época do ano e que, na grande maioria dos casos os trabalhadores rurais estão expostos aos riscos de contaminação em todas as etapas da aplicação, como: (1) preparação da calda, (2) utilização de equipamentos de pulverização e (3) intervalos de segurança inadequados. Assim, muitos são os trabalhadores que mesmo sabendo do risco de contaminação não utilizam Equipamento de Proteção Individual (EPI), cerca de 50%.

A pesquisa realizada por Latorraca et al. (2008), destaca o organofosforado Metamidofós como um dos mais utilizados na cultura de tomate nos municípios de Goiânia e Goianópolis, além de outros, inclusive sem autorização de uso para tal cultura. A partir dessa informação é possível inferir que ainda ocorrem práticas agrícolas indevidas, como falta de assistência técnica, do uso do receituário agrônomo e de orientação e fiscalização por parte dos órgãos competentes.



Figura 04: Áreas de cultivo de tomate no Estado de Goiás.

## 4.2 TOXICIDADE

Os organofosforados foram desenvolvidos na década de 40 para substituir os organoclorados que não eram mais tão eficientes devido à resistência apresentada por alguns insetos. Esses compostos possuem uma ampla gama de produtos agrícolas e sanitários que vão de extremamente tóxicos até os de baixa toxicidade, sendo responsáveis por um grande número de intoxicações e mortes no país (SUCEN, 2001).

As intoxicações aos seres vivos são definidas em aguda, subaguda, sub-crônica e crônica, levando em conta as características químicas e toxicológicas do produto, condições do indivíduo exposto, além dos fatores de exposição, como tempo, ambiente e tipo de contato (BRASIL, 1997).

A Organização Panamericana de Saúde (1996) considera os organofosforados como sendo o grupo de agrotóxicos mais importante devido aos números expressivos de intoxicações e mortes, e alerta sobre os danos de intoxicações provenientes de exposição a baixas concentrações do composto. Em Goiás, no ano de 2005, foram registrados 296 casos de intoxicações com organofosforados e destes, 24 resultaram em óbito (OLIVEIRA et al., 2005).

Conforme dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) do Ministério da Saúde, os casos de intoxicações a seres humanos apresentaram crescimento de 75% de 1996 a 2006. Os casos de contaminação no Brasil em 2006 perfazem o total de 15.783, sendo que destes, 905 ocorreram no Estado de Goiás. Tais contaminações ocorrem não só com os produtos de uso exclusivo agrícola, mas também com raticidas e agrotóxicos de uso doméstico. A maior parte das intoxicações por agrotóxicos ocorre devido ao não cumprimento das boas práticas agrícolas, além de uso para outros fins, como envenenamentos e tentativa de suicídio. Em 2006 foram registrados 137 casos em Goiás de tentativa de suicídio utilizando agrotóxicos e 60 casos de acidente ocupacional (BRASIL, 2009).

Segundo Davy et al. (2007), o mecanismo de ação do Acefato, conhecido como inibidor de acetilcolinesterase (AChase), altera as sinapses, causando maior estímulo de receptores nervosos. Desta forma, a transmissão do impulso nervoso fica comprometida, o que provoca funcionamento inadequado dos sistemas muscular e nervoso. Nos insetos, a morte ocorre por fadiga muscular. Nos mamíferos, a paralisação do diafragma causa parada respiratória ocasionando a morte.

Os inibidores de AChase, como os organofosforados, causam um quadro neurotóxico agudo e neurológico, com vários sinais e sintomas (síndrome colinérgica) que resultam na exacerbação da função colinérgica aos níveis do Sistema Nervoso Autônomo e Central, e junção neuromuscular (ANVISA, 2009). A absorção do ingrediente ativo pode ser por via oral, respiratória e dérmica. Os sinais e sintomas de intoxicação por Acefato são: (1) sudorese, (2) salivação, (3) vômitos, (4) confusão mental, (5) convulsões, (6) câimbras, (7) midríase, (8) hipertensão, (9) colapso respiratório, (10) fraqueza, dentre outros (ANVISA, 2007).

Recentemente a ANVISA divulgou a nota técnica referente à reavaliação do Acefato. Neste documento constam informações importantes sobre o potencial carcinogênico do Acefato, além de resultados comprovados dos efeitos neurotóxicos e manifestações da síndrome colinérgica (ANVISA, 2009). No Quadro 02 estão as principais informações toxicológicas do Acefato.

Quadro 02: Informações Toxicológicas do Acefato.

PARÂMETRO	VALOR	REFERÊNCIA
DL <sub>50</sub> Oral	1400mg.kg <sup>-1</sup>	ANVISA (2009)
DL <sub>50</sub> Dérmica	10250mg.kg <sup>-1</sup>	Arysta Life Science (2009)
IDA (Ingestão Diária Aceitável)	0 - 0,0008mg.kg <sup>-1</sup> por peso corporal	ANVISA (2009)
Potencial Mutagênico	Sugestivo	ANVISA (2009)
Potencial Carcinogênico	Classe C	US – EPA (1993) ANVISA (2009)
NOAEL (Nível Máximo de Dose sem Efeito Adverso)	0,08mg.acefato.kg <sup>-1</sup> peso corporal.dia <sup>-1</sup>	ANVISA (2009)

A DL<sub>50</sub> (Dose Letal Mediana) é considerada como a concentração de uma substância química capaz de matar 50% da população exposta. Ainda que a concentração de Acefato para a DL<sub>50</sub> seja considerada alta em roedores, o estudo relata que doses muito inferiores a 1400mg.kg<sup>-1</sup> foram capazes de provocar efeitos não letais incluindo sinais de neurotoxicidade e de síndrome colinérgica. Tais sinais são ocasionados pela inibição da AChase cerebral que juntamente com os dados de NOAEL (nível máximo de dose em que não se observam efeitos adversos) e do estudo da Agência Americana de Proteção Ambiental

(EPA), propiciaram a ANVISA recomendar a alteração da Ingestão Diária Aceitável (IDA) de  $0,03\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  para valores que vão de 0 a  $0,0008\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  por peso corporal. Os sinais de mutagenicidade apresentados pelo Acefato sugerem que as substâncias inertes contidas no formulado sejam os possíveis contaminantes mutagênicos, já que em elevado grau de pureza (próximo a 100%), o Acefato não demonstra tal potencial (ANVISA, 2009).

A carcinogenicidade apontada pela EPA se deve a presença de carcinomas e tumores hepatocelulares em fêmeas de roedores (US – EPA, 1993), também evidenciada em camundongos (ANVISA, 2009).

Outros aspectos importantes do Acefato foram abordados em estudos de genotoxicidade por Özkan et al. (2009). Nesta pesquisa, três testes de toxicidade *in vitro* foram realizados em culturas de linfócitos humanos: ensaio do micronúcleo, teste de aberrações cromossômicas e de troca das cromátides-irmãs. Observou-se que houve um aumento significativo na formação de micronúcleos e de danos ao DNA em todas as concentrações de Acefato, que variavam de  $12,5$  a  $200\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . Desta forma, o Acefato foi considerado por tais pesquisadores como sendo clastogênico e genotóxico, já que apresentou mais resultados positivos do que negativos nos referidos testes, devendo assim, ser utilizado com precaução, pois causa prejuízos à saúde humana.

Dantzger et al. (2008) também evidenciaram o efeito tóxico do Acefato. Em teste de toxicidade com *Daphnia similis*, o agroquímico não causou alterações na atividade de fosfatase *in vitro* na concentração de  $0,37\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . No entanto, os ensaios de toxicidade aguda durante 24 e 48h comprovaram que o Acefato é nocivo ao organismo em concentrações superiores, sendo que a  $\text{CE}_{50}$  (Concentração Efetiva Média) diminui ao longo do período, sugerindo que a toxicidade aumente em relação ao tempo.

Testes de toxicidade *in vitro* têm sido muito utilizados devido ao conceito dos 3R's (*Reduction, Refinement, Replacement*, traduzidos como Redução, Refinamento e Substituição, respectivamente). Desenvolvido por Russel e Burch em 1959, o programa dos 3R's visa diminuir o sofrimento e uso de animais em experimentos científicos. Existe uma tendência mundial de validar e desenvolver métodos alternativos que respondam aos parâmetros toxicológicos exigidos e que estejam conforme preconiza o programa. A *Redução* sugere que seja utilizado o menor número possível de espécies animais, sendo estes capazes de atingir o objetivo toxicológico; ao *Refinamento* é atribuído o aprimoramento de métodos e técnicas para se obter informações mais relevantes; a *Substituição* é a troca de “animais conscientes por matéria insensível” como culturas de células, modelos computacionais e espécies invertebradas (RICHMOND, 2000).

Para a validação de métodos de toxicidade alternativos é necessário uma completa avaliação que comprove sua relevância e confiabilidade. Desta forma, vários países participam de processos de validação por meio de agências regulatórias centrais, sendo o Comitê Organizador Inter-Agências para Validação de Métodos Alternativos, o ICCVAM (Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods), responsável pela validação de tais métodos nos Estados Unidos e na Europa o ECVAM (European Centre for the Validation of Alternative Methods), (CAZARIN, CORRÊA e ZAMBRONE, 2004).

O teste de citotoxicidade *in vitro* do Vermelho Neutro – NRU (Neutral Red Uptake) foi validado pelo ICCVAM e se baseia na habilidade da célula de captar o vermelho neutro, um corante vital, sendo este processo, um indicativo de viabilidade celular. Este método é usado em células de fibroblasto da linhagem BALB/c 3T3 com o objetivo de avaliar a citotoxicidade da substância-teste em diferentes concentrações, já que algumas substâncias são capazes de alterar a estrutura da membrana celular e dos lisossomas, causando interferência na captação do corante (ICCVAM, 2003). A Figura 05 mostra os queratinócitos que foram expostos a lauril sulfato de sódio: em destaque as células avermelhadas pelo corante Vermelho Neutro, sendo estas as células viáveis.

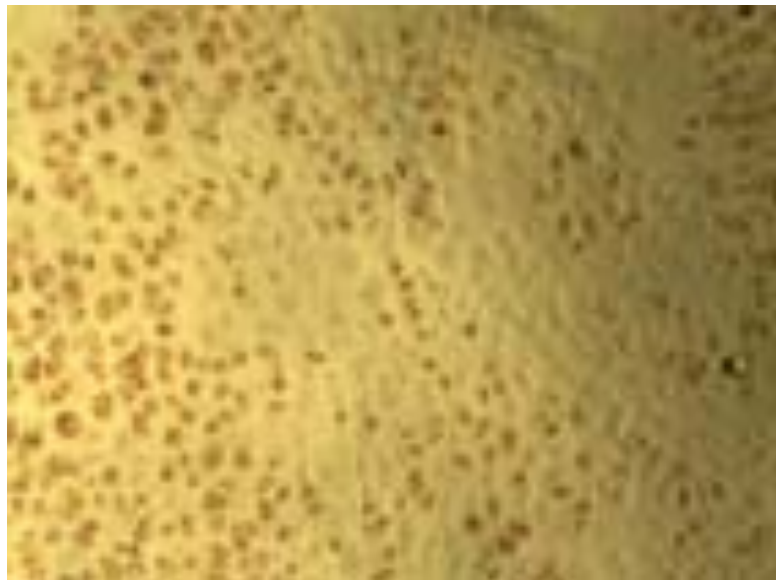


Figura 05: Células viáveis do teste do Vermelho Neutro.

Fonte: Richard Clothier do FRAME Alternative Laboratory – UK em [www.iccvam.niehs.nih.gov](http://www.iccvam.niehs.nih.gov)

### 4.3 CONTAMINAÇÃO AMBIENTAL

A contaminação hídrica por agrotóxicos é muito mais freqüente do que se imagina. Vários são os fatores que favorecem essa contaminação: (1) declividade do terreno plantado, (2) geomorfologia do solo, (3) falta de cobertura vegetal observada na fase inicial da plantação, (4) intercomunicabilidade dos recursos hídricos, (5) proximidade com as áreas de cultivo, (6) deflúvio superficial e (7) transporte pelo ar atmosférico, destacados pela Figura 06. É importante ressaltar que a contaminação hídrica afeta não só a comunidade local, mas toda população que é abastecida por este recurso, ainda que este seja um afluente do manancial de abastecimento (VEIGA et al., 2006).

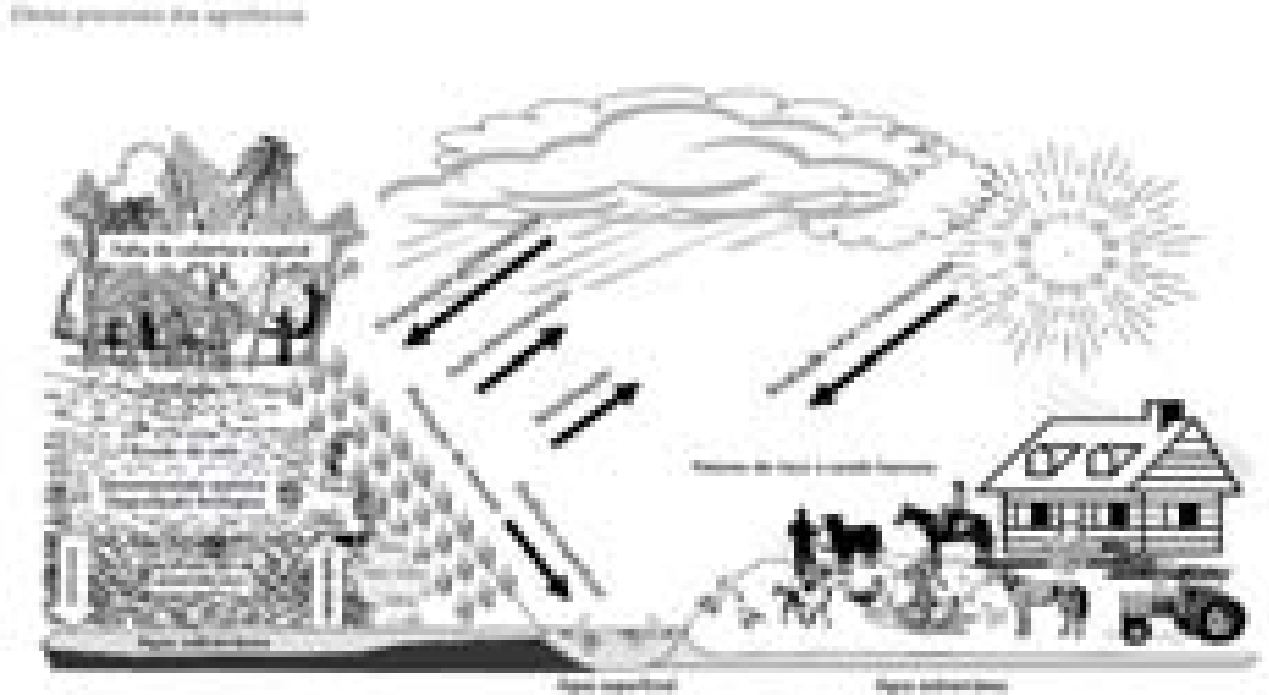


Figura 06: Esquema dos fatores de contaminação por agrotóxicos.

Fonte: VEIGA et al. (2006)

A análise do potencial de contaminação hídrica do Acefato na região nordeste do país é descrito por Ferracini et al. (2001), que utilizaram os seguintes critérios de avaliação: (1) índice de GUS (Groundwater Ubiquity Score), (2) método de GOSS e (3) instruções normativas da EPA. Este estudo classificou o Acefato como contaminante potencial de águas subterrâneas, segundo a EPA, que considera como critérios de “screening” a solubilidade, meia vida no solo e água e coeficiente de adsorção a matéria orgânica. Conforme os critérios do índice de GUS, o Acefato não foi considerado como contaminante, já para GOSS, que considera o transporte do agrotóxico adsorvido aos colóides do solo ou dissolvido em água, o



Outra forma de contaminação ambiental por agrotóxicos é causada por acidentes relacionados ao transporte destes. Verginassi et al. (2007) afirmam que a falta de consciência e de formação dos condutores associados às condições inadequadas dos veículos e estradas, são responsáveis pela maior parte de acidentes envolvendo agrotóxicos no Estado de Mato Grosso. Dentre os agrotóxicos mais transportados naquela região, está o Metamidofós perfazendo o total de 430.000L transportados por ano. Em Caçu, interior de Goiás, o tombamento de um caminhão carregado com agrotóxicos, dentre eles o Acefato, deixou 12 mil habitantes sem água potável por mais de 12 horas. Além dos prejuízos a população abastecida pelo manancial, a contaminação causou mortandade de sapos e rãs (RIBEIRO & RODRIGUES, 2010). Também no interior de Goiás, em Bela Vista, cerca de 3.000kg de agrotóxicos eram transportados de forma irregular e após acidente do veículo, as águas do rio Garapa, afluente do manancial de abastecimento, foram atingidas por parte da carga (ASSUNÇÃO, 2009).

Quanto ao que preconiza as legislações sobre contaminação ambiental, destacam-se: a portaria normativa n.º 84 do IBAMA e a portaria n.º 518 do Ministério da Saúde.

A contaminação dos agrotóxicos ao meio ambiente é avaliada segundo portaria normativa n.º 84 de 15 de outubro de 1996 do IBAMA, por meio do Potencial de Periculosidade Ambiental – PPA, de acordo com os seguintes parâmetros: (1) bioacumulação, (2) persistência, (3) transporte, (4) toxicidade a organismos e (5) potenciais mutagênicos, (6) teratogênicos e (7) carcinogênicos. Quando o agrotóxico, seus componentes ou afins forem positivos para os potenciais mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos e não houver mecanismos de desativação conhecido, o produto é classificado como Impeditivo de Obtenção de Registro (BRASIL, 1996).

Em relação aos organofosforados nas águas de abastecimento usadas para potabilidade, a portaria n.º 518 de 25 de março de 2004 do Ministério da Saúde estabelece em seu artigo 14 parágrafo 2º que a avaliação da presença de inseticidas organofosforados na água deve ser realizada com a determinação da atividade da enzima acetilcolinesterase, observando-se os limites máximos de 15% de inibição enzimática para enzimas de insetos ou 20% quando a enzima utilizada for proveniente de mamíferos (BRASIL, 2004).

#### 4.4 ENZIMAS FÚNGICAS: INDUÇÃO E CONDIÇÕES IDEAIS

Os fungos de decomposição branca são conhecidos pela sua capacidade de degradar compostos lignocelulósicos na natureza, principalmente a madeira. As enzimas fúngicas produzidas extracelularmente podem ser consideradas vantajosas do ponto de vista da manipulação e utilização. As principais são: (1) Lacase (Lcc); (2) Manganês Peroxidase (MnP) e (3) Lignina Peroxidase (LiP). Dentre as enzimas fúngicas, a Lacase se destaca por apresentar um largo espectro de substratos, ou seja, possui capacidade oxidativa mais ampla, o que ambientalmente se reflete em uma vantagem (BALDRIAN, 2006).

A Lacase é uma polifenol oxidase, produzida extracelularmente por fungos de decomposição branca, pertencente ao grupo das enzimas multicobre, com capacidade oxidativa de vários compostos químicos, incluindo vários tóxicos ao meio ambiente (WINDSTEN & KANDELBAUER, 2008). O papel da Lacase na oxidação de compostos químicos, como anéis fenólicos e aminas aromáticas, envolve uma série de reações que há muito vem sendo pesquisadas, devido suas aplicações industriais e ambientais (GARCIA, 2006). Abaixo no Quadro 03 estão algumas aplicações da Lacase.

Quadro 03: Principais aplicações da Lacase.

<b>APLICAÇÕES BIOTECNOLÓGICAS DA LACASE</b>	<b>REFERÊNCIA</b>
Tratamento de efluentes em indústria papelreira.	Queiroz, Jordão e Salgueiro, (2002)
Remoção de cor em efluentes industriais e branqueamento.	Obici & Peralta, (2002)
Processos industriais de polpa celulósica.	Windsten e Kandelbauer, (2008)
Indústria alimentícia de bebidas e panificação.	Minussi, Pastore e Durán, (2002)
Remediação de solos contaminados por agrotóxicos.	Silva et al., (2007)
Degradação de poluentes como as bifenilas policloradas – PCB's.	Bumpus et al., (1985)
Sistemas mediadores na degradação de compostos organofosforados.	Trovaslet-Leroy et al. (2010)
Síntese de compostos farmacêuticos.	Nicotra et al. (2004)
Degradação de compostos fenólicos.	Majeau, Brar e Tyagi (2010)

Majeau, Brar e Tyagi (2010) afirmam que a Lacase produzida por fungos é a mais estudada, com cerca de 115 tipos caracterizados, e com muitos mecanismos oxidativos elucidados, superando as Lacases produzidas por bactérias e por plantas. Esses pesquisadores ressaltam que dentre os fatores que influenciam a produção de Lacase por fungos, como espécies, tempo e tipo de cultivo, a fonte nutricional é o mais importante, sendo a relação entre nitrogênio, carbono e glicose, fundamental para sua produção.

A produção enzimática está também relacionada a condições específicas do ambiente e tipos de substrato. Regina e Broetto (2005) investigaram a produção enzimática em resíduos agrícolas como meio de cultura, o que proporcionou maior produção enzimática de Manganês Peroxidase em comparação com Lacase para *Lentinus edodes*.

Em meio de cultura, também rico em resíduos agrícolas, o antraceno, um hidrocarboneto aromático policíclico (PAHs) considerado carcinogênico e xenobiótico, foi consideravelmente degradado por *Phanerochaete chrysosporium* quando imobilizado em bagaço de cana-de-açúcar, sendo este meio um importante estimulador de produção enzimática, principalmente Manganês Peroxidase. Além disso, o estudo mostra que as condições do microambiente são fundamentais para atingir maiores valores de degradação, sendo neste caso, a agitação mais eficiente do que as condições estáticas, Figura 08, (MOHAMMADI e NASERNEJAD, 2009). Menezes, Silva e Durrant (2009) ressaltam que além do bagaço de cana ser uma importante fonte de produção de enzimas lignocelulolíticas, sua utilização pode ser uma alternativa para resolver problemas ambientais referentes ao acúmulo desse resíduo na natureza.

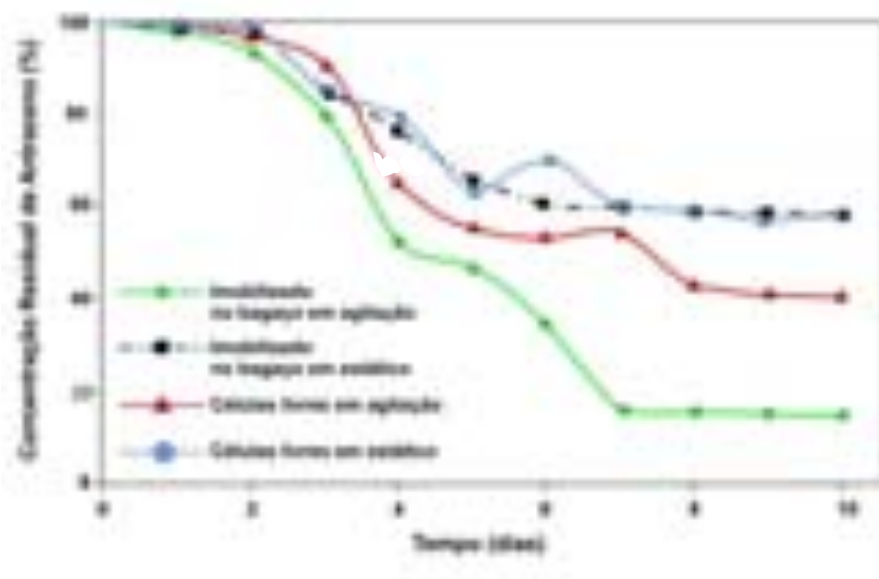


Figura 08: Degradação de antraceno em bagaço de cana-de-açúcar por MnP.

Fonte: Mohammadi e Nasernejad (2009)

A seleção de meios de cultura que proporcionem ótimas condições de produção enzimática vem sendo bastante pesquisada, bem como o uso de formas indutoras, já que isso permite a caracterização e purificação das enzimas produzidas, ampliando o seu uso. Gomes et al. (2007) ao testarem farelo de trigo e palha de arroz como meios de cultura de espécies fúngicas na degradação de corantes industriais, verificaram que a maior produção das enzimas Lacase, Manganês Peroxidase e Lignina Peroxidase ocorrem em meio de cultura com farelo de trigo para a maioria das cepas testadas. Desta forma o fungo *Corioloopsis birsyna* chegou a produzir  $200\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$  de Lcc na 3ª semana de cultivo, quase 50 vezes mais do que foi produzido no meio de cultura com palha de arroz. Para o fungo *Pycnoporus sanguineus*, nessas condições, a produção de Lacase também se mostrou superior no meio de cultura enriquecido com farelo de trigo, mas igual nos dois tipos de meios de cultura quando a enzima produzida foi Manganês Peroxidase.

Os pesquisadores Yamanaka et al. (2008) comprovaram que a suplementação do meio de cultura com o elemento cobre pode propiciar maior produção de enzima de *Trametes villosa*, que apesar de inibir o crescimento da biomassa, houve acréscimo considerável na produção de Lacase e das Peroxidases.

Experimentos com cobre também foram realizados por Tychanowicz et al. (2006) para otimizar a produção de Lacase de *Pleurotus pulmonaris*. Neste estudo, os autores observaram que a dosagem específica de cobre pode aumentar a produtividade enzimática e que outras dosagens funcionam como inibidores da enzima. Desta forma, uma mesma substância pode se comportar como indutor ou inibidor enzimático, sendo esse comportamento dependente da dose utilizada.

A utilização de indutores de produção enzimática foi testada por Myasoedova et al. (2008) com duas espécies fúngicas: *Lentinus strigosus* e *Steccherinum ochraceum*. Este estudo mostra que a uso de indutores é muito específico, pois para *Lentinus strigosus* o uso de 2,6-dimetilfenol (DMP), ácido ferúlico, veratrílico e outros, proporcionaram o acréscimo considerável de produção de Lacase: de 6,6 para  $8,2\mu\text{mL}^{-1}$ . O mesmo não ocorreu para *Steccherinum ochraceum* que não respondeu aos indutores, permanecendo sua produção de Lacase semelhante ao do controle sem indutores. Além dessa relação específica entre microrganismo e indutor, o meio de cultura e sua condição são considerados como forte influenciador na resposta do indutor (GARCIA, 2006).

A utilização de compostos químicos fenólicos como enriquecedores de meio de cultura foi testado por Morisaki et al. (2001), onde foram obtidos resultados significativos de produção de Manganês Peroxidase e Lacase em diversas espécies fúngicas. A Xilidina, uma amina usada na fabricação de corantes, é conhecida como um excelente indutor de produção de Lacase, sendo a mais citada por pesquisadores. Garcia, Santiago e Ulhoa em 2006, por meio da adição de 2,5Xilidina, puderam identificar e caracterizar dois tipos de Lacase de *Pycnoporus sanguineus*, pois houve grande produção enzimática.

O Etanol é considerado um importante indutor enzimático, principalmente por ser de baixa toxicidade e de baixo custo quando comparado a Xilidina. Os resultados apresentados pelo Etanol também são satisfatórios no que diz respeito ao incremento da produção enzimática: o fungo *Pycnoporus cinnabarinus* chegou a produzir nove vezes mais Lacase na presença do Etanol quando comparado com a sua produção na presença do indutor ácido ferúlico (LOMASCOLO et al., 2003).

Outro aspecto importante do uso do Etanol como indutor é sua capacidade de proporcionar descoloração do meio. Valeriano, et al. (2007) obteve bons resultados de acréscimo de produção de Lacase em *Pycnoporus sanguineus* com 50gL<sup>-1</sup> de Etanol, e inibição do pigmento alaranjado do fungo, o que não ocorreu na presença da Xilidina, sugerindo que o Etanol inibe a síntese de melanina pelo fungo.

O uso de indutores para potencializar a atividade enzimática fúngica é um importante mecanismo para o desenvolvimento de tecnologias de remediação. Bollag & Leonowicz (1984) afirmam que as formas induzidas de Lacase são mais ativas que as formas constitutivas, reforçando a informação de que a indução enzimática é uma ferramenta potencializada.

#### 4.5 POTENCIAL BIORREMEIADOR DE MICRORGANISMOS

As tecnologias biológicas de biorremediação disponíveis estão fundamentadas nas atividades de biodegradação dos microrganismos. Vários são os microrganismos degradadores e por isso diferentes reações de transformação, catalisadas por eles, estão envolvidas no processo de degradação. Dentre as reações existentes, a Reação Oxidativa é caracterizada por usar o oxigênio molecular como reagente no metabolismo de xenobióticos, o que concede aos microrganismos uma faixa de utilização do substrato muito maior, sendo portanto, uma reação eficiente (SILVA & FAY, 2004).

A biorremediação de compostos tóxicos ao meio ambiente por microrganismos há muito tempo é estudada: ainda em 1977, Sjoblad & Bollag analisaram o potencial degradador do fungo *Rhizoctonia praticola* em compostos químicos intermediários usados em agrotóxicos. Este estudo provou que a enzima fúngica foi capaz de reagir na presença de 04 dos 12 compostos aromáticos testados, formando polímeros e compostos menos tóxicos.

Dentre os microrganismos conhecidos como biorremediadores, *Phanerochaete chrysosporium* é um fungo filamentososo cujas reações de degradação contam com as hemeperoxidases: Lignina Peroxidase e Manganês Peroxidase, além de um sistema gerador de água oxigenada e de possíveis enzimas intracelulares envolvidas também na degradação de compostos tóxicos. Isso faz com que *P. chrysosporium* possua rara capacidade de mineralização de xenobióticos considerados recalcitrantes (VALLI & GOLD, 1991 *apud* SILVA & FAY, 2004).

A utilização de microrganismos no tratamento de ambientes contaminados por agrotóxicos foi testada por Franco et al. (2003), onde a bactéria *Acinetobacter johnsonii*, isolada de solo contaminado por agrotóxicos, apresentou potencial remediador, crescendo significativamente em dosagem de campo do fungicida Iprodione. Silva et al. (2007) também avaliou a capacidade degradativa de microrganismos em 2,4D, herbicida reconhecido como cancerígeno, onde os microrganismos *Stenothrophomas maltophilia* e *Penicillium* sp., bactéria e fungo respectivamente, apresentaram valores satisfatórios de degradação nunca antes descritos, além deste último pertencer a biota natural do solo estudado. Dos microrganismos estudados nessa pesquisa, *Stenothrophomos maltophilia* se destaca pelos valores significativos de degradação, cerca de 30%.

O estudo da degradação do herbicida Imazaquin por Lacase de *Pleurotus ostreatus* e *Botryosphaeria rhodina* apresentou grandes variações devido à capacidade de tolerância dos microrganismos a determinadas concentrações e condições de cultivo. O

ascomiceto *B. rhodina* se revelou uma excelente ferramenta biorremediadora, reduzindo mais de 80% da concentração inicial desse herbicida após 144 horas de cultivo, em 10% do herbicida. No entanto, para *P. ostreatus* a redução foi de aproximadamente 15% em 6% do herbicida. Tais concentrações do agrotóxico foram testadas conforme a adaptabilidade e tolerância dos microorganismos (REZENDE et al., 2005).

Segundo Hirai, Nakanishi e Nishida (2004) as enzimas lignolíticas de fungos de decomposição branca, são promissoras na degradação de Metoxicloro, substância utilizada em agrotóxicos e conhecida como xenobiótica. Neste estudo, a enzima extracelular Manganês Peroxidase, na presença de mediadores enzimáticos, foi responsável por remoções que chegaram a mais de 60% da concentração inicial em 24 horas de tratamento, sendo este o melhor tratamento alcançado na pesquisa. No entanto foi observada a formação de cerca de 6% de metabólito, o que não ocorreu com a exposição à enzima Lignina Peroxidase apesar dessa apresentar valores menores de remoção: 28%. A Lacase, extraída do fungo *Trametes versicolor*, no tratamento com Metoxicloro, não pôde ser vista como a melhor opção, pois além de formar metabólito, a degradação foi a menor observada: cerca de 25% para o mesmo período de tempo.

A biorremediação de solos contaminados por agrotóxicos tem sido amplamente estudada. Segundo Colla et al. (2008), o isolamento de microrganismos presentes em solos contaminados é um importante mecanismo para o estudo da biorremediação, pois o local contaminado atua como um meio de cultivo seletivo de microrganismos. Sua pesquisa com solos contaminados por herbicidas triazínicos aponta o gênero *Aspergillus* como uma boa alternativa na degradação desse poluente. Tomaz (2003) conseguiu isolar cerca de 50 espécies fúngicas em solo contaminado com Diuron, das quais 08 apresentaram maior tolerância e resistência ao herbicida, sendo a linhagem *Pleurotus* sp. o maior destaque, alcançando mais de 85% de degradação por meio da enzima Manganês Peroxidase.

As enzimas lignolíticas possuem notável capacidade de degradar moléculas químicas de agrotóxicos. Pizzul, Castillo e Stenström (2009) investigaram essa capacidade ao testarem a mistura de 22 agrotóxicos de diferentes grupos químicos, na presença de mediadores enzimáticos, em exposição *in vitro*. Das enzimas testadas, Manganês Peroxidase foi a que melhor apresentou resultados de degradação em 06 dias de incubação, conseguindo 100% de degradação para os agrotóxicos Cloroxiuron, Prometrina e Terbutrina, Figura 09.

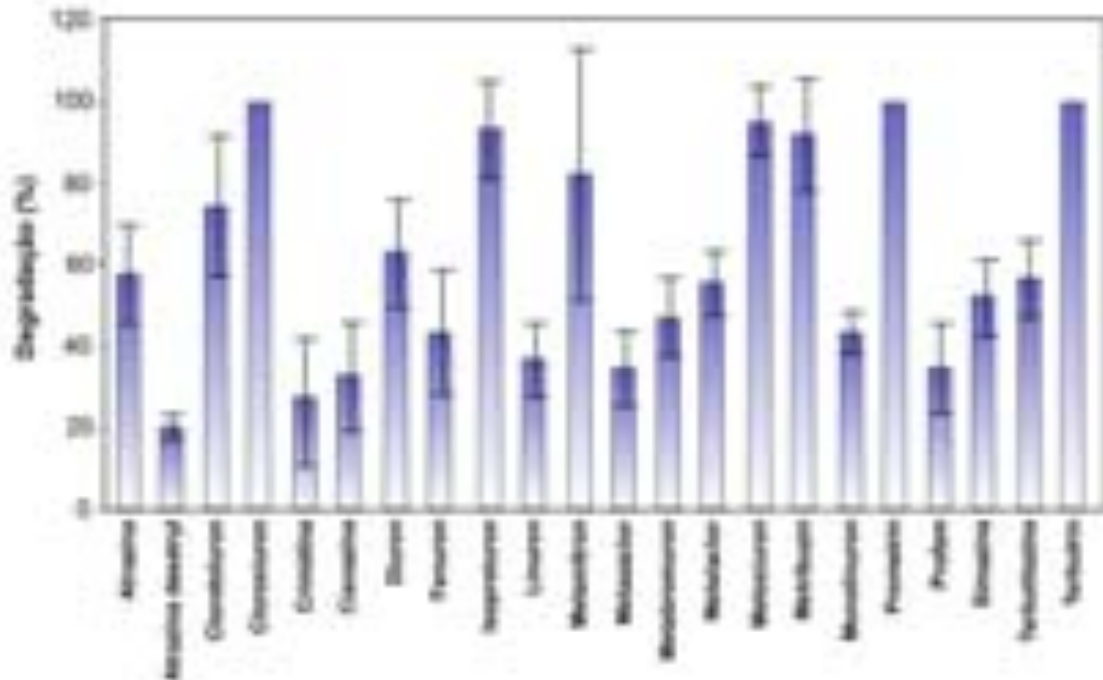


Figura 09: Degradação de agrotóxicos por MnP.

Fonte: Pizzul, Castillo e Stenström (2009).

O fungo *Lentinus crinitus* também é descrito como um eficaz microrganismo degradador em condições ideais. Cultivado em bagaço de cana suplementado com Carbono e Nitrogênio, o microrganismo cresceu completamente em solo contaminado com Pentaclorofenol, um herbicida organoclorado muito tóxico, promovendo altas taxas de degradação em decorrência da grande produção de Lacase e Manganês Peroxidase (BALLAMINUT, 2007).

Yamada, Takahama e Yamada (2008), comprovaram a eficiência da bactéria *Ochrobactrum* sp. na degradação do composto químico 2,4,6Tribromofenol, utilizado como fungicida. A bactéria biorremediadora foi isolada de solo contaminado com o agrotóxico e colocada em contato com 100 $\mu$ M da substância. O decréscimo total da concentração inicial ocorreu no período de 36horas, quando então, iniciou o crescimento celular.

Novas metodologias têm sido aplicadas em estudos sobre biorremediação ambiental. Ao utilizar cepas bacterianas conhecidas como degradadoras de agrotóxicos para remediar solo e lavoura contaminados por simulação, Önnby, Jonsson e Stenström (2010) provaram que a degradação pode ser total, quando os microrganismos estão adequados ao ambiente. A pesquisa chama atenção para fatores importantes como: o isolamento dos microrganismos de locais contaminados e a quantidade de células aplicadas. A Figura 10 (a) mostra a completa degradação do herbicida 2,4D e a Figura 10 (b), a influência da quantidade de microrganismo aplicada ao herbicida MCPA. Em ambas, é possível notar que no terceiro dia do tratamento a degradação é total.

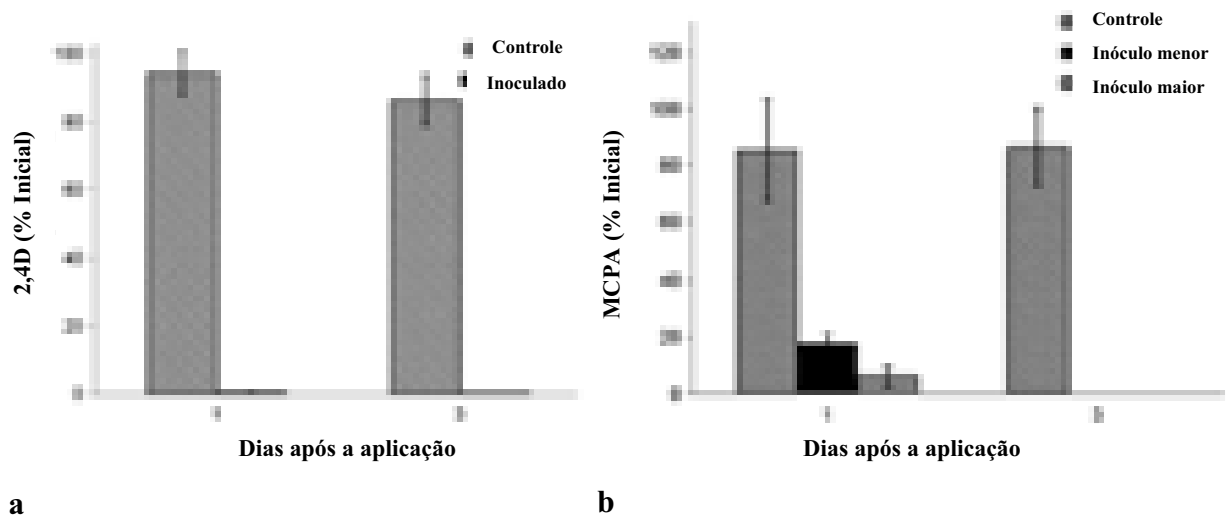


Figura 10: (a) gráfico da degradação de 2,4D.  
 (b) gráfico da degradação de MCPA com diferentes tamanhos de inóculos.  
 Fonte: Önnby, Jonsson e Stenström (2010).

Machado et al. (2006), em seu estudo sobre a capacidade degradativa de corantes da indústria têxtil por Basidiomicetos, apontam os basidiomicetos *Trametes versicolor* e *Pycnoporus sanguineus* como alternativas na biorremediação de cor de efluentes. O estudo mostra as diferenças entre os microrganismos: *T. villosa* descoloriu completamente 17 corantes enquanto *P. sanguineus* descoloriu apenas 9. Porém o melhor resultado foi obtido quando as duas culturas fúngicas foram misturadas, evidenciado pela rápida descoloração dos corantes, aproximadamente 80% de redução em sete dias de tratamento. Os autores afirmam que o consórcio de culturas é uma alternativa interessante de tratamento que deve ser investigada para que a interação entre os complexos enzimáticos dos microrganismos envolvidos seja melhor aproveitada.

Moreno, Becerra e Santos (2004), ressaltam que os Basidiomicetos são os fungos com mais possibilidades de serem aplicados em processos de biorremediação, devido a sua capacidade de solubilizar compostos mais complexos que a própria lignina.

Os tratamentos biológicos por fungos e outros microrganismos podem contemplar uma série de compostos orgânicos, inorgânicos e até os xenobióticos, reduzindo-os a formas químicas menos tóxicas, podendo inclusive, ser aplicados à descontaminação de águas superficiais (MORENO, BECERRA e SANTOS, 2004; BALLAMINUT e MATHEUS, 2007).

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S. M. F.; FERNANDES, P. M.; MARIN, J. O. B. **Condições de Trabalho Associadas ao Uso de Agrotóxicos na Cultura de Tomate de Mesa em Goiás.** Ciências Agrotécnicas Lavras. Vol. 32, n.6, p.1737-1742. 2008.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Monografias.**(2002) Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/agrotoxicotoxicologia> Acesso em: 01 de maio de 2009.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Monografias.**(2006) Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/agrotoxicotoxicologia> Acesso em: 01 de maio de 2009.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Nota Técnica de Reavaliação Toxicológica do Ingrediente Ativo Acefato.** 2009.
- ASSUNÇÃO, M. **Agrotóxicos Contamina Ribeirão.** O POPULAR. Goiânia, 31 de Maio de 2009. Caderno Cidades. P. 10.
- ARISTA LIFE SCIENCE. Acessado em 10/10/2009:  
<http://www.arystalifescience.com.br/globalsite/manuais/ORTHENE%20750BR%20Bula%204000454%20REV12%200407vis.pdf>
- BALDRIAN, P. **Fungal Laccases – Occurrence and Properties.** FEMS Microbiol. Rev. Vol. 30, 215-242. 2006.
- BALLAMINUT, N. & MATHEUS, D. R. **Characterization of Fungal Inoculum Uses in Soil Bioremediation.** Brazilian Journal of Microbiology 38:248-253. 2007.
- BALLAMINUT, N. **Caracterização Fisiológica do Inóculo de *Lentinus crinitus* (L.) Fr. CCB274 Empregado em Biorremediação de Solo.** Dissertação de Mestrado. Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente – SP. 163p. 2007.
- BARBOSA, D. R. & SANTIAGO, M. F. **Descoloração do Corante Antraquinona (Remazol Brilhante Laranja) por Fungos de Decomposição Branca.** Revista Eletrônica de Farmácia – Suplemento Volume 2 (2) 32 – 33. 2005.
- BASTOS, A. C. & MAGAN, N. ***Trametes versicolor*: Potential for Atrazine Bioremediation in Calcareous Clay Soil Under Low Water Availability Conditions.** International Biodeterioration e Biodegradation, 63 p. 389 – 394, 2009.
- BEDOR, C. N. G.; RAMOS, L. O.; REGO, M. A. V.; PAVÃO, A. C. AUGUSTO, L. G. S. **Avaliação e Reflexos da Comercialização e Utilização de Agrotóxicos na Região do Submédio do Vale do São Francisco.** Revista Baiana de Saúde Pública. Vol. 31, n.1, p. 68-67. 2007.
- BOLLAG, J.M. & LEONOWICZ. **A Comparative Studies of Extracellular Fungal Laccases.** Applied and Environmental Microbiology. P. 849-854. 1984.

BRASIL, Lei Federal Nº 7.802 de 11 de Julho de 1989. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília. 1989.

BRASIL, Ministério da Saúde/Organização Panamericana da Saúde – Organização Mundial de Saúde. **Manual de Vigilância da Saúde de Populações Expostas a Agrotóxicos**. Brasília – DF. 1997.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento - MAPA. **Dados Consolidados de Acefato – Goiás 1º e 2º Semestre**. 2008.

BRASIL, Portaria Nº 518 de 25 de Março de 2004 do Ministério da Saúde. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília. 2004.

BRASIL, Portaria Normativa Nº 84 de 15 de Outubro de 1996 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Renováveis – IBAMA. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília. 1996.

BRASIL, Resolução Nº 357 de 17 de Março de 2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília. 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Diário Oficial da União de 04 de Julho de 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema Nacional de Informações Toxicofarmacológicas – SINITOX e Programa de Análise de Resíduos – PARA – ANVISA. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/bvs> Acesso em: 09 de maio de 2009.

BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. **Avaliação do Potencial de Transporte de Agrotóxicos Usados no Brasil por Modelos Screening e Planilha Eletrônica**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 44. Jaguariúna – SP. 2007.

BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa. **Monitoramento do Herbicida Diuron em Água Subterrânea na Microbacia do Córrego Espreado, Região de Ribeirão Preto/SP**. Documento 55. Jaguariúna – SP. 2006.

BUMPUS, J. A.; TIEN, M; WRIGHT, D. S.; AUST, S. D. **Oxidation of Persistent Environmental Pollutants by a White Rot Fungus**. Science, Washington, v. 228, p. 1434 – 1436, 1985.

CAMARGO, F. P.; ALVES, H. S.; FILHO, W. P. C; VILELA, N. J. **Cadeia Produtiva de Tomate Industrial no Brasil: Resenha da Década de 1990, Produção Regional e Perspectivas**. Informações Econômicas, SP, V. 36, N.º 11. 2006.

CASTELLANI, A. **Maintenance and Cultivation of Common Pathogenic Fungi of Man in Sterile Distilled Water**. Further Researcher. Journal Trop. Med. Hyg. V.70, p. 181-184, 1967.

CAVALLAZZI, J. R. P.; KASUYA, C. M.; SOARES, M. A. **Screening of Inducers for Laccase Production by *Lentinula edodes* in Liquid Medium.** Brazilian Journal of Microbiology, 36: 383 – 387, 2005.

CAZARIN, K. C. C.; CORRÊA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. **Redução, Refinamento e Substituição do Uso de Animais em Estudos Toxicológicos: Uma Abordagem Atual.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, vol. 40, nº3, 2004.

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 55 – 579-584, 2001.

COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; LIMA, M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J.A.V. **Isolamento e Seleção de Fungos para Biorremediação a Partir de Solo Contaminado com Herbicidas Triazínicos.** Cienc. Agrotec. Lavras. Vol. 32, n. 3. P.809-813. 2008.

DANTZGER, M. D.; DANTZGER, D. D.; PRESTES, E. B.; JONSSON, C. M.; AOYAMA, H. **Estudos de Toxicidade de Agroquímicos na Atividade da Fosfatase Ácida de *Daphnia similis*.** Revista Ecotoxicologia 18 – 06 (1). 2008.

DAVY, M.; ECKEL, W.; HAMMER, C. **Risks of Acephate Use to the Federally Listed California Red Lagged Frog. Pesticides Effects Determination.** Washington D. C. 2007.

DORES, E. F. G. C. & De-LAMÔNICA-FREIRE. **Contaminação do Ambiente Aquático por Pesticidas, Estudo de Caso: Águas Usadas para Consumo Humano em Primavera do Leste, Mato Grosso – Análise Preliminar.** Química Nova, Vol. 24, n.1, p.27-36. 2001.

FERRACINI, V. L.; PESSOA, M.C.Y.P.; SILVA, A. S.; SPADOTTO, C. A. **Análise de Risco de Contaminação das Águas Subterrâneas e Superficiais da Região de Petrolina (PE) e Juazeiro (BA).** Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente. Vol. 11, p.1-16. Curitiba. 2001.

FILIZOLA, H. F.; FERRACINI, V. L.; SANS, L. M. A.; GOMES, M. A.; FERREIRA, C. J. A. **Monitoramento e Avaliação do Risco de Contaminação por Pesticidas em Água Superficial e Subterrânea na Região de Guaira.** Pesquisa Agropecuária Brasileira, Brasília, Vol. 37, n.5, p.659-667. 2002.

FRANCO, A. C. N.; SOARES, M. M. S. R.; MELO, I. S. **Seleção de Linhagens Envolvidas na Biodegradação de Pesticidas.** Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento, Vol. 29, 124-127. 2003.

FREIRE, P. F.; LABRADOR, V.; MARTÍN, J. M. P.; HAZEN, M. J. **Cytotoxic effects in Mammalian Vero Cells Exposed to Pentachlorophenol.** Toxicology 15; 210(1): 37-44. 2005.

GARCIA, T. A. **Purificação e Caracterização das Lacases em *Pycnoporus sanguineus*.** 110 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília, Brasília – DF. 2006.

GARCIA, T. A.; SANTIAGO, M. F.; ULHOA, C. J. **Properties of laccases produced by *Pycnoporus sanguineus* induced by 2,5 - xylidine**. Biotechnology Letters. Vol. 28:633 – 636. 2006.

GOIÁS. Agência Rural do Estado de Goiás. **Anuário Estatístico – Tomate**. Disponível em: <http://www.agronegocio.goias.gov.br/docs/portal/tomaterasteiromapa.pdf> Acesso em: 01 de maio de 2009.

GOMES, E.; AGUIAR, A. P.; CARVALHO, C. C.; BONFÁ, M. R. B.; SILVA, R.; BOSCOLO, M. **Ligninases Production by Basidiomycetes Strains on Lignocellulosic Agricultural Residues and Their Application in the Decolorization of Synthetic Dyes**. Brazilian Journal of Microbiology, 40:31-39. 2009.

GONZÁLEZ, D. E.; VALLEJO, O. V.; ANAYA, C. M.; SÁNCHEZ, M. M.; GONZÁLEZ, M. C.; PALOMARES, L. A.; MALLOL, J. F. **Production of Two Novel Laccase Isoforms by a Thermotolerant Strain of *Pycnoporus sanguineus* Isolated from an Oil-Polluted Tropical Habitat**. Int. Microbiol. Vol. 11. 2008.

GRIZA, F. T.; ORTIZ, K. S.; GEREMIAS, D.; THIESEN, F. V. **Avaliação da Contaminação por Organofosforados em Água Superficial no Município de Rondinha – Rio Grande do Sul**. Química Nova, Vol. 31, N.º7, 1631-1635. 2008.

HIRAI, H.; NAKANISH S.; NISHIDA, T. **Oxidative Dechlorination of Metoxichlor by Ligninolytic Enzymes from White-rot Fungi**. Chemosphere, Vol. 55, 641-645. 2004.

INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS (ICCVAM). **Test Method Protocol for BALB/c 3T3 Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay Phase III**. The National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM). National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC, 2003.

IVANOV, I.; HALKOVA, Z. H.; TSOLOVA, S.; SIMEONOV, K.; SAINOVA, I.; TASHEVA, M. **Cytotoxicity Induced by Herbicides Glyphosate and Alachlor in vitro**. Experimental Pathology and Parasitology, 4/6. 2001.

JUNIOR, R. P. S. & SILVA, J. P. **Potencial de Contaminação da Água Subterrânea por Pesticidas na bacia Do Rio Dourados, Ms**. Revista Ecotoxicológica e Meio Ambiente, Curitiba, v. 17, p. 87-106, jan./dez. 2007.

KUWAHARA, M.; KIMURA, Y.; ASADA, Y. **Screening of Basidiomycetes for Lignin Peroxidase Genes Using a DNA Probe**. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol. 32, N.º 04, 1989.

LATORRACA, A.; MARQUES, G. J. G.; SOUZA, K. V.; FORNÉS, N. S. **Agrotóxicos Utilizados na Produção do Tomate em Goiânia e Goianópolis e Efeitos na Saúde Humana**. Revista Ciências Saúde. 19(4) 365-374. 2008.

LEE, S.; BAE, H.; KIM, N.; HWANG, S. **Optimization of Growth Conditions of *Lentinus edodes* Mycelium on Corn Processing Waste Using Response Surface Analysis**. Journal of Bioscience and Bioengineering. Volume 105 (2), 161-163. 2008.

- LIBÂNIO, M.; RISSATO, S. R.; MELO, N. A. S. **Avaliação das Perspectivas de Remoção de Pesticidas Organoclorados em Estações de Tratamento de Água.** 23º Congresso de Engenharia Sanitária e Ambiental. 2005.
- LIMA, F. J. C.; TANAKA, S. M. N.; NUNES, G. S.; SANTOS, T. C. R.; CORDEIRO, P. J. M. **Análise de Resíduos do Inseticida Metamidofós em Soja e Determinação Final por Cromatografia em Fase Gasosa.** Revista Pesticidas: Ecotoxicologia e Meio Ambiente, Curitiba, v.13, 2003.
- LOMASCOLO, A.; RECORD, E.; HERPOËL-GIMBERT, I.; DELATTRE, M.; ROBERT, J. L.; GEORIS, J.; DAUVRIN, T.; SIGOILLOT, J. C.; ASTHER, M. **Overproduction of laccase by a monokaryotic strain of *Pycnoporus cinnabarinus* using ethanol as inducer.** Journal of Applied Microbiology. v. 94, p. 618-624, 2003.
- MACHADO, K. M. G.; COMPART, L. C. A.; MORAIS, R. O.; ROSA, L. H.; SANTOS, M. H. **Biodegradation of reactive textile dyes by basidiomycetous fungi from Brazilian ecosystems.** Brazilian Journal of Microbiology, 37: pp. 481- 487. 2006.
- MACHADO, K. M. G.; COMPART, L. C. A.; MORAIS, R. O.; ROSA, L. H.; SANTOS, M. H. **Biodegradation of Reactive Textile Dyes by Basidiomycetous Fungi from Brazilian Ecosystems.** Brazilian Journal of Microbiology, 37: 481-487, 2006.
- 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, 36:246-252. 2005.
- MAJEAU, J. A.; BRAR, S. K.; TYAGI, R. D. **Laccases for Removal of Recalcitrant and Emerging Pollutants.** Bioresource Technology 101, 233-2350, 2010.
- MELLO, S. C. M.; ÁVILA, Z. R.; OLIVEIRA, C.; HATANO, L. T. **Avaliação do Efeito de Pesticidas no Crescimento Micelial de *Cercopora caricis*.** Comunicado Técnico 94. Brasília – DF. 2003.
- MELO, P.C.T. & VILELA, N. J. **Desafios e Perspectivas para a Cadeia Brasileira do Tomate para Processamento Industrial.** Horticultura Brasileira, Brasília, vol. 23, n.1, p.154-157. 2005.
- MENEZES, C. R.; SILVA, I. S.; DURRANT, L. R. **Bagaço de Cana: Fonte para Produção de Enzimas Ligninocelulolíticas.** Estudos Tecnológicos - Vol. 5, nº 1:68-78 (jan/abr 2009).
- MILHOME, M. A. L.; SOUZA, D. O. B.; LIMA, F. A. F.; NASCIMENTO, R. F. **Avaliação do Potencial de Contaminação de Águas Superficiais e Subterrâneas por Pesticidas Aplicados na Agricultura do Baixo Jaguaribe, CE.** Engenharia Sanitária Ambiental, v.14, nº3, 363-372, 2009.
- MINUSSI, R. C.; PASTORE, G. M.; DURÁN, N. **Potential Applications of Laccase in the Food Industry.** Trends in Food Science Technology. Vol. 13, p. 205-216. 2002.

MOHAMMADI, A. & NASERNEJAD, B. **Enzymatic Degradation of Anthracene by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium* Immobilized on Sugarcane Bagasse.** Journal of Hazardous Materials, 161, 534-537. 2009.

MORENO, C. M.; BECERRA, A. G.; SANTOS, M. J. B. **Tratamientos Biológicos de Suelos Contaminados: Contaminación por Hidrocarburos. Aplicaciones de Hongos em Tratamientos de Biorrecuperación.** Revista Iberoamericana Micología. Vol. 21, 103-120. España. 2004.

MORISAKI, K.; FUSHIMI, T.; KANEKO, S.; KUSAKABE, I. **Screening for Phenoloxidases from Edible Mushrooms.** Biosci. Biotechnol. Biochem., 65 (10), 2334-2336, 2001.

MORISAKI, K.; FUSHIMI, T.; KANEKO, S.; KASUKABE, I. KOBAYASHI, H. **Screening for Phenoloxidase from Edible Mushrooms.** Bioscience Biotechnol. Biochem. Vol. 65 (10), p. 2334-2336. 2001.

MYASOEDOVA, A.M; CHERNYKH, A. M.; PSURTSEVA, N.V.; BELOVA, N.V.; GOLOVLEVA, L. A. **New Efficient Producers of Fungal.** Applied Biochemistry and Microbiology. Vol. 44, Nº 1, pp. 84 – 89. 2008.

NICOTRA, S.; INTRA, A.; OTTOLINA, G.; RIVA, S.; DANIELI, B. **Laccase – mediated Oxidation of the Stereoid Hormone 71b-estradiol in Organic Solvents.** Tetrahedron: Asymmetry, 15 – 2927-2931. 2004.

OBICI, L. & PERALTA, R. M. **Descoloração in vivo de Corantes Industriais por *Lentinus edodes*.** In: XI Encontro Anual de Iniciação Científica da Universidade Estadual de Maringá – PR. 2002.

OKEKE, B. C.; SMITH, J. E.; PATERSON, A.; CRAIK, I. A. W. **Aerobic Metabolism of Pentachlorophenol by Spent Sawdust Culture of “Shiitake” Mushroom (*Lentinus edodes*) in Soil.** Biotechnology Letters, Volume 15, nº10 1993.

OLIVEIRA, B. L. D.; BRITO, C. P. F.; DÁVILA, E. D. P.; BRANCO, A. B. **Epidemiologia das Intoxicações por Pesticidas em Goiás.** Revista Eletrônica de Farmácia. Suplemento Vol. 2 (2), 129-132, 2005.

ÖNNEBY, K.; JONSSON, A.; STENSTRÖM. **A New Concept for Reduction of Diffuse Contamination by Simultaneous Application of Pesticide and Pesticide Degrading Microorganisms.** Biodegradation, 21:21-29. 2010.

ÖZKAN, D.; YÜZBASIOGLU, D.; ÜNAL, F.; YILMAZ, S.; AKSOY, H. **Evaluation of the Cytogenetic Damage Induced by the Organophosphorus insecticide Acephate.** Cytotechnology 59: 73-80, 2009.

PAPAGIANNI, M. **Fungal Morphology and Metabolite Production in Submerged Mycelial Process.** Biotechnology Advances, V. 22, p. 189 – 259. 2004.

PIZZUL, L.; CASTILLO, M. P. & STENSTRÖM, J. **Degradation of Glyphosate and Other Pesticides by Ligninolytic Enzymes.** Biodegradation 20:751-759, 2009.

QUEIROZ, G. O.; JORDÃO, R. C. C.; SALGUEIRO, A. A. **Seleção de microrganismos produtores de celulases a partir de efluente de fábrica de papel.** Revista Química e Tecnologia. Ano 1, n.º 1. 2002.

REGINA, M. & BROETTO. **Atividade de Enzimas Oxidativas do *Lentinus edodes* em Meio de Cultura Líquida de Sub-produtos Energéticos.** Energ. Agric. Botucatu. Vol. 20, n.1, p.47-61. 2005.

REZENDE, M. I.; BARBOSA, A. M.; VASCONCELOS, A. F. D.; HADDAD, R.; DEKKER, R. F. H. **Growth and Production of Laccase by the Ligninolytic Fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Botryosphaeria rhodina*, Cultured on Basal Medium Containing Herbicides Scepter (Imazaquin).** Journal Basic Microbiology, Vol. 45, N.º. 6, 465-474. 2005.

RIBEIRO, K. & RODRIGUES, M. **Risco de Contaminação Deixa Caçu sem Água. O POPULAR.** Goiânia, 05 de Dez. de 2010. Caderno Cidades. P. 09.

RICHMOND, J. **The 3R's – Past, Present and Future.** Scand. J. Lab. Anim. Sci. N.º2, Vol. 27, 2006.

ROSSI, I. H.; MONTEIRO, A. C.; MACHADO, J. O. **Desenvolvimento Micelial de *Lentinula edodes* com Efeito da Profundidade e Suplementação do Substrato.** Revista Agropecuária Brasileira, Brasília, v. 36, n.º.6, p. 887-891. 2001.

SANCHES, S. M.; SILVA, C. H. T. P.; CAMPOS, S. X.; VIEIRA, E. M. **Pesticidas e Seus Respectivos Associados à Contaminação da Água.** Pesticidas: R. Ecotoxicol. E Meio Ambiente, Vol. 13, 53-58. 2003.

SAPARRAT, M. C. N.; BUCSINSZKY, A. M. M.; TOURNIER, H. A.; CABELLO, M. N.; ARAMBARRI, A. M. **Extracellular ABTS-Oxidizing activity of autochthonous fungal strains from Argentina in Solid Medium.** Rev. Iberoam Micol, 17:64-68. 2000.

SILVA, C. M. M. S. & FAY, E. F. **Agrotóxicos & Ambiente.** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Brasília – DF. 400p. 2004.

SILVA, C. M.; FAY, E. F; MELO, I. S. **Degradação do Fungicida Carbendazim por *Phanerochaeta chrysosporium*.** Fitopatologia Brasileira, Brasília. V. 21, p. 496 – 498, 1996.

SILVA, T. M.; MAZZETTO, A. M.; ANDRADE, F. D.; PILEGGI, S. A. V.; FÁVERO, P. R.; CANTÚ, M. D.; CARRILHO, E.; CARNEIRO, P. I. B.; PILEGGI, M. **Degradation of 2,4D by Microorganisms Isolated From Brazilian Contaminated Soil.** Brazilian Journal of Microbiology, 38:522-527. 2007.

SJOBLAD, R. D. & BOLLAG, J. M. **Oxidative Coupling of Aromatic Pesticide Intermediates by a Fungal Phenol Oxidaset.** Applied and Environmental Microbiology, Vol. 33, n.º4, 906-910. 1977.

SOARES, W. L. & PORTO. **Atividade Agrícola e Externalidade Ambiental: uma Análise a partir do Uso de Agrotóxicos no Cerrado Brasileiro.** Revista Ciência & Saúde Coletiva, 12(1):131-143, 2007.

SOUZA, M. V. **Resíduos de Agrotóxicos Ditiocarbamatos e Organofosforados em Alimentos Consumidos no Restaurante Universitário – UNB: Avaliação da Exposição Humana.** Dissertação de Mestrado. Ciências da Saúde – Universidade de Brasília. 2006.

SPADOTTO, C. A. **Abordagem Interdisciplinar na Avaliação Ambiental de Agrotóxicos.** Revista Núcleo de Pesquisa Interdisciplinar, São Manuel. 2006.

SPIELMANN, H. **Animal Use in the Safety Evaluation of Chemicals: Harmonization and Emerging Needs.** ILAR Journal. Volume 43, Supplement. 2002.

STURM, A.; WOGRAM, J.; HANSEN, P. D.; LIESS, M. **Potential Use of Cholinesterase in Monitoring Low Levels of Organophosphates in Small Streams: Natural Variability in Three-Spined Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) and Relation to Pollution.** Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 18, nº2, 194-200. 1999.

SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo. **Documentos Técnicos – Classificação.** 2001. Acessado em: 20 de março de 2009. Disponível em: [http://www.sucen.sp.gov.br/docs\\_tec/seguranca/cap12cla.pdf](http://www.sucen.sp.gov.br/docs_tec/seguranca/cap12cla.pdf)

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

TAKAMIYA, M.; MAGAN, N.; WARNER, P. J. **Impact Assessment of Bisphenol A on Lignin-modifying Enzymes by Basidiomycete *Trametes versicolor*.** Journal of Hazardous Materials 154, 33-37, 2008.

TIEN, M. & KIRK, K. **Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – requiring oxygenase.** PNAS Microbiology, Vol. 81, N.º 08, 2280-2284. 1984.

TOMAZ, R. M. A. G. **Avaliação de Fungos com Potencial de Degradação de Diuron e Pyriithiobac-sodium.** 116f. Tese de Doutorado. Faculdade de Engenharia Química. Universidade Estadual de Campinas. 2003.

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

TREVISAN, L. R. P. **Resíduos de Acefato, de seu Metabólito Metamidofós e de Clorotalonil em Cultura Protegida de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill) e de Campo.** Tese de Doutorado. Escola Superior de Agricultura – Piracicaba – SP. 2002.

TROVASLET-LEROY, M.; JOLIVALT, C.; FROMENT, M. T.; BRASME, B.; LEFEBYRE, B.; DAVELOOSE, D.; NACHON, F.; MASSON, P. **Application of Laccase-Mediator System (LMS) for the Degradation of Organophosphorus Compounds.** Chémico-Biological Interactions, 2010.

TYCHANOWICZ, G. K.; SOUZA, D. F.; SOUZA, C. G.; KADOWAKI, M. K.; PERALTA, R. M. **Cooper Improves the Production of Laccase by the White-Rot Fungus *Pleurotus pulmonaris* in Solid State Fermentation.** Brazilian Archives of Biology and Technology. Vol. 49, n.5, p. 699-704. 2006.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY – USA – EPA.  
**Integrated Risk Information System, 0354: Acepahte (CASRN 30560-19-1).**  
<<http://www.epa.gov/IRIS/subst/0354.htm>>. Acesso em: 10/08/2009. 1993.

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 Vol. IV (2) 140 – 143, 2007.

VEIGA, M. M.; SILVA, D. M.; VEIGA, L. B. E.; FARIA, M. V. C. **Análise da Contaminação dos Sistemas Hídricos por Agrotóxicos numa Pequena Comunidade Rural no Sudeste do Brasil.** Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, 22 (11): 2391-2399, 2006.

VERGINASSI, A.; DORES, E. F. G. C.; WEBER, O. L. S.; LAMBERT, J. A. **Acidentes Ambientais no Transporte Rodoviário de Cargas Perigosas no Estado de Mato Grosso.** Engenharia Ambiental – Espírito Santo do Pinhal, volume 4, n°.1, p. 103-119. 2007.

WINDSTEN, P. & KANDELBAUER, A. **Laccase Applications and the Forest Products Industry: a Review.** Enzyme and Microbial Technology, Vol. 42, 293-307. 2008.

YAMADA, T.; TAKAHOMA, Y.; YAMADA, Y. **Biodegradation of 2,4,6 – Tribromophenol by *Ochrobactrum* sp. Strain TB01.** Biosci. Biotechnol. Biochem., 72 (5), 1264 – 1471, 2008.

YAMANAKA, R.; SOARES, C. F.; MATHEUS, D. R.; MACHADO, K. M. G. **Lignolytic Enzymes Produced by *Trametes villosa* CCB176 under Different Culture Conditions.** Brazilian Journal of Microbiology. Vol. 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 45, 79-89. 2000.