

ISABELA ARAUJO FIORAVANTE

ESTUDO DA BIODEGRADAÇÃO DOS PESTICIDAS METILPARATION E TRIFLURALINA POR *MICROCYSTIS NOCACEKII* (KOMÁREK) COMPÈRE, 1974 MANTIDA EM CONDIÇÕES DE CULTIVO DE LABORATÓRIO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Profa. Dra. Sérgia Maria
Stanling Magalhães

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Barbosa

Colaborador: Prof. Dr. Rodinei Augusti

Belo Horizonte

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Agradecimentos

A pesquisa científica apesar de um trabalho solitário possui a contribuição de várias pessoas. Portanto aqui estão meus sinceros agradecimentos a aqueles que contribuíram para este trabalho:

À minha orientadora, Sérgia Starling pela paciência, companheirismo e contribuição em todas as questões que surgiram.

Aos meus orientadores Rodinei Augusti e Francisco Barbosa por compartilharem seus conhecimentos comigo.

Às minhas alunas de iniciação científica que se esforçaram para a concretização deste trabalho: Iara, Flávia e Taciane

Aos inúmeros amigos que fiz no Laboratório de Espectrometria de Massas: Amauri, Vanessa, Jaque, Júnia, Karla, Carol, Gleydson, Patterson, Sérgio, Helvécio, Átila e amigos do Laboratório de Águas: Alessandra, Édna, Mariana, Vivian, Geraldo e Valéria. Amigos que tornaram a caminhada bem mais leve!

Aos companheiros de mestrado: Cris, Anderson e Bia que compartilharam os mesmos desafios e nossa convivência acabou se tornando uma grande amizade.

Aos meus amores: Pai, Mãe, Lívia, Flávio e Paulinho por me incentivarem e fazerem tudo mais feliz!

E finalmente a Deus que me deu esta oportunidade!

**“Os fracos é que são maus,
só se pode esperar brandura
dos fortes”**

Hercília de Araújo - Nova
Era/MG

Resumo

Palavras-chave :Cianobactéria, *Microcystis novacekii*, biodegradação, pesticidas, metilparation, trifluralina.

Vários tipos de pesticidas vêm sendo encontrados em águas subterrâneas e superficiais, em decorrência do carreamento de sedimentos pelas chuvas, lixiviação ou por contaminação direta. Medidas para recuperação de áreas impactadas são fundamentais para minimizar os danos causados a saúde e meio ambiente por pesticidas. Microorganismos, entre eles as cianobactérias são potencialmente úteis para a recuperação de ambientes contaminados. Nesta perspectiva, avaliou-se a capacidade da cianobactéria *Microcystis novacekii*, isolada do Parque Estadual do Rio doce, de degradar o inseticida organofosforado metilparation e o herbicida dinitroanilínico trifluralina. O ensaio de biodegradação foi realizado em cinco concentrações de cada pesticida, em meio tamponado WC, a temperatura de 25°C e 12 horas de fotoperíodo com duração de 9 dias. Amostras, coletadas nos dias 1, 5 e 9, foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Os resultados para o metilparation indicaram que o pesticida foi removido do meio de cultura em todas as concentrações testadas, com percentuais de remoção variando de 76 a 98%. Nos frascos controle, sem a cianobactéria, a degradação espontânea do pesticida variou de 2 a 11%, até o nono dia de experimento. A remoção do pesticida nos testes indica que a cianobactéria exerce um papel significativo na remoção deste pesticida, sugere-se o mecanismo de degradação ocorra via Enzimas Citocromo P450. Nos experimentos com a trifluralina, no quinto dia de ensaio, baixas concentrações foram detectadas nos testes e controles. Com a degradação pronunciada, no frasco controle, não se pode afirmar a degradação biológica seja significativa. Outras vias de degradação, como a fotólise podem ter ocorrido. Nesta perspectiva, produtos de fotólise descritos na literatura foram pesquisados, dois destes compostos foram detectados por espectrometria de massas com ionização por eletrospray, encontrados nos testes e controles, indicando que o mecanismo de degradação pode ter ocorrido por via fotolítica. Porém, não se pode afirmar que a cianobactéria não exerce um papel na biodegradação da trifluralina, visto que os ensaios in vitro não corroboram com a realidade dos sistemas aquáticos naturais. A presença de matéria orgânica e turbidez dos corpos d'água podem ter um papel fotoprotetor. A *Microcystis novacekii*, demonstrou potencial para biodegradação do pesticida, sendo uma espécie tropical adaptadas às condições locais.

Abstract

Keywords: Cyanobacteria, *Microcystis novacekii*, biodegradation, pesticides, methylparathion, trifluralin

Various types of pesticides have been found in ground and surface waters stemming from the displacement of sediments by rains, lixiviation or direct contamination. Measures for the recuperation of impacted areas are fundamental to minimizing the damage caused by pesticides to health and the environment. Microorganisms, including cyanobacteria, are potentially useful to the recuperation contaminated environments. The present study assessed the capacity of the cyanobacterium *Microcystis novacekii* isolated from the Rio Doce State Park to degrade the organophosphate insecticide methylparathion and the dinotroaniline herbicide trifluralin. The biodegradation assay was performed with five concentrations of each pesticide in a WC buffer medium at a temperature of 25 °C and a 12/12 h photoperiod for nine days. Samples were collected on Days 1, 5 and 9 and were analyzed through gas chromatography coupled to mass spectrometry. The results for the methylparathion indicate that the pesticide was removed from the culture medium at all concentrations tested, with removal percentages ranging from 76 to 98%. In the control flasks without the cyanobacterium, spontaneous degradation of the pesticide ranged from 2 to 11% by the ninth day of the experiment. The results of the tests indicate that this cyanobacterium plays a significant role in the removal of this pesticide. It is suggested that the degradation mechanism occurs through cytochrome P450 enzymes. In the experiments with trifluralin, low concentrations were detected in the test and controls on the fifth day of the assay. With pronounced degradation in the control flasks, it cannot be said that biological degradation was significant. Other degradation mechanism may have been involved, such as photolysis. Photolysis products described in the literature were researched. Two of these compounds were detected by mass spectrometry with electrospray ionization in the tests and controls, indicating that the degradation mechanism may have occurred through a photolytic mechanism. However, it cannot be stated that the cyanobacterium does not play a role in the biodegradation of trifluralin, as the *in vitro* assays did not match the actual situation of natural aquatic systems. The presence of organic matter and turbidity of bodies of water may have a photoprotective role. *Microcystis novacekii* demonstrated potential in the biodegradation of pesticides and is a tropical species adapted to local conditions.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Consumo de ingredientes ativos no Brasil; de 2000 a 2005.....	17
Tabela 2. Tipo de agrotóxicos mais consumidos no Brasil de 2003 a 2005.....	18
Tabela 3. Classificação dos pesticidas.....	20
Tabela 4. Limites aceitáveis de agrotóxicos em água potável.	23
Tabela 5. Pesticidas encontrados nos corpos d'água de Primavera do Leste (MT).....	25
Tabela 6 - Preparo do meio WC para cultivo de <i>M. novacekii</i> . Composição das Soluções estoque de 1 a 7:	43
Tabela 7 - Composição da solução estoque 8	43
Tabela 8- Composição da solução estoque 9	43
Tabela 9. Concentrações testadas dos pesticidas nos ensaios de biodegradação	49
Tabela 10. Condição de microextração em fase sólida dos pesticidas	51
Tabela 11. Condições experimentais de análise do pesticida por GC-EM.....	51
Tabela 12. Concentrações testadas no ensaio de toxicidade do metilpration..	52
Tabela 13. Porcentagem de redução da concentração do metilpration nos testes e controles.....	71
Tabela 14. Inibição do crescimento da <i>M. novacekii</i> (%).	73
Tabela 15. EC ₅₀ (mg/L) durante 72 e 96 horas de exposição ao metilpration	76
Tabela 16. Porcentagem de redução da concentração da trifluralina nos testes e controles.	82
Tabela 17. Produtos de fotólise identificados por ESI-MS.	83

Lista de Figuras

Figura 1. Venda de defensivos agrícolas por estado.	18
Figura 2. Vendas de defensivos agrícolas por cultura.....	19
Figura 3. Consumo de defensivos agrícolas por classe em 2006.	19
Figura 4. Estrutura química do metilparation.....	26
Figura 5. Estrutura química da Trifluralina	27
Figura 6. Microextração por imersão direta	29
Figura 7. Interação que ocorre entre os sistemas bioquímicos envolvidos na detoxificação de compostos químicos em microorganismos fotossintéticos aquáticos. (Moacir ET al ,2008)	35
Figura 8 Foto da colônia (à esquerda) e das células (à direita) de <i>Microcystis novacekii</i>	38
Figura 9. Atividades antrópicas ao entorno do PERD	39
Figura 10: Esquema do ensaio de biodegradação. * Triplicatas para cada concentração.	50
Figura 11. Esquema do ensaio de Toxicidade	53
Figura 12. Comparação da absorbância em 440 e 680nm com a contagem celular.	57
Figura 13. Correlação entre o crescimento monitorado por densidade óptica (Abs 680nm) e a contagem celular ao microscópio da cultura de <i>M.novacekii</i> sem a adição de pesticidas.....	58
Figura 14. Correlação entre o crescimento monitorado por densidade óptica (Abs 680nm) e a contagem celular ao microscópio da cultura de <i>M.novaceki</i> na presença do metilparation.....	59
Figura 15. Correlação entre o crescimento monitorado por densidade óptica (Abs 680nm) e a contagem celular ao microscópio da cultura de <i>M.novaceki</i> na presença da trifluralina.....	60
Figura 16. Cromatograma obtido a partir de uma solução padrão de metilparation (2mg/L).....	60
Figura 17 . Fragmentação característica do metilparation. Fonte NIST	61
Figura 18. Fragmentação do metilparation no tempo de retenção de 12.51 minutos	61
Figura 19. Estrutura do metilparation com identificação dos hidrogênios.	62

Figura 20. Espectros RMN ¹ H	63
Figura 21. Espectro de RMN ³¹ P	64
Figura 22. Controle de degradação espontânea (1.0mg/L) : Cromatograma do primeiro dia de ensaio com pico referente ao metilparation (12.26minutos)	66
Figura 23. Teste (1.0mg/L). Cromatograma do primeiro dia de ensaio.	66
Figura 24. Teste(1mg/L). Cromatograma no quinto dia de ensaio.	67
Figura 25. Controle de degradação espontânea (1.00mg/L). Cromatograma no quinto dia de ensaio.....	68
Figura 26. Teste(1.00mg/L). Cromatograma no nono dia de ensaio.	69
Figura 27. Controle de degradação espontânea (1mg/L). Cromatograma no nono dia de ensaio.	69
Figura 28. Curva de calibração do metilparation	70
Figura 29. Crescimento da <i>M.novacekii</i> durante o ensaio de biodegradação do metilparation.	72
Figura 30. Porcentagem de inibição do crescimento da <i>M.novacekii</i> exposta a concentrações crescente de metilpration em 72 horas de ensaio.	75
Figura 31. Porcentagem de inibição do crescimento de <i>M.novacekii</i> exposta a concentrações crescentes do metilparation em 96 horas de ensaio.	76
Figura 32. Cromatograma da trifluralina 0.50mg/L	77
Figura 33. Espectro de massas do pico com tempo de retenção 6.21 minutos.	78
Figura 34. Espectro de massas da trifluralina. Fonte : NIST	78
Figura 35. Cromatograma do controle (0.5mg/L) no primeiro dia de ensaio com a Trifluralina no tempo de retenção de 6.17 minutos.....	79
Figura 36. Cromatograma do teste (0.5mg/L) no primeiro dia de ensaio com a Trifluralina no tempo de retenção de 6.17 minutos.....	80
Figura 37. Curva de calibração da Trifluralina.....	81
Figura 38. Proposta do mecanismo de fotólise da Trifluralina. (Dimou et. al ,2004).....	84
Figura 39. Espectro de massas do composto 1 e sua fragmentação.....	85
Figura 40. Espectro de massas do composto 2 e sua fragmentação.....	86
Figura 41. Curva de crescimento durante a biodegradação da Trifluralina.	87

Sumário

1	Introdução.....	12
2	Revisão Bibliográfica	14
2.1	Histórico dos pesticidas	14
2.2	O consumo de pesticidas no Brasil.....	17
2.3	Contaminação ambiental por pesticidas	20
2.4	Metilparation.....	26
2.5	Trifluralina.....	27
2.6	Técnicas analíticas para análises ambientais	28
2.7	O processo de biodegradação de pesticidas	30
2.8	Estudos de biodegradação por cianobactérias	32
2.9	Metabolismo de xenobióticos por cianobactérias.....	34
3	Contextualização do estudo.....	37
3.1	Cianobactérias.....	37
3.1.1	<i>Microcystis novacekii</i>	37
3.2	Parque Estadual do Rio Doce.....	38
3.3	Determinação analítica dos pesticidas.....	40
4	Objetivo.....	41
4.1	Objetivos Específicos	41
5	Material e métodos	42
5.1	Condições de cultivo da <i>Microcystis novacekii</i>	42
5.1.1	Banco de cianofíceas - Manutenção da cultura-mãe.....	42
5.1.2	Preparo do meio WC.....	42
5.2	Vidrarias	44
5.3	Pesticidas	44
5.3.1	Metilparation	44

5.3.2	Trifluralina.....	44
5.4	Instrumentação.....	45
5.4.1	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)	45
5.4.2	Espectrometria de massas com ionização por eletrospray(ESI-MS).....	45
5.4.3	Ressonância nuclear magnética (RMN).....	46
5.4.4	Curvas de calibração.....	46
5.4.5	Procedimento estatístico	46
5.4.6	Microextração em fase sólida (MEFS)	46
5.5	Curva de crescimento da cultura de <i>M. novacekii</i>	47
5.5.1	Contagem celular	47
5.5.2	Monitoramento por densidade ótica.....	47
5.6	Purificação do Metilparation.....	48
5.7	Ensaio de Biodegradação-.....	49
5.7.1	Preparação da cultura para os experimentos com pesticidas. Cultura-Teste	49
5.7.2	Concentrações testadas.....	49
5.7.3	Coleta de amostras	50
5.8	Procedimento Analítico	51
5.8.1	Extração dos pesticidas em fase sólida	51
5.8.2	Condições de análise	51
5.9	Ensaio de Toxicidade	52
5.9.1	Determinações da EC ₅₀ (Dose de pesticida que tem como resposta 50% de inibição do crescimento da <i>M.Novacekii</i>).....	54
6	Resultados e Discussões.....	56
6.1	Curva de crescimento <i>M.novacekii</i>	56
6.1.1	Escolha do comprimento de onda para monitorar o crescimento da cultura de <i>M. novacekii</i> 56	
6.2	Purificação do metilparation.....	60
6.2.1	RMN(Ressonância magnética nuclear).....	62
6.3	Ensaio de biodegradação	65

6.3.1	Metilparation	65
6.3.2	Ensaio de Toxicidade	75
6.3.3	Trifluralina	77
7	Conclusão	89
8	Referências Bibliográficas	91

1 Introdução

O processo de industrialização, o aumento populacional e a demanda por alimentos e bens de consumo têm contribuído para a degradação das condições ambientais, principalmente no que se refere às águas superficiais. O crescimento populacional tem justificado a adoção de técnicas agressivas que assegurem o aumento da produção agrícola, entre estas a utilização de pesticidas, também denominados praguicidas, agrotóxicos ou defensivos agrícolas. Qualquer substância ou mistura capazes de prevenir, destruir, repelir pragas é chamado de pesticida. (GALLI et. al, 2006)

O Brasil é o quarto maior mercado de pesticidas, tendo até 2005, 282 ingredientes ativos com uso aprovado e mais de 2000 produtos registrados incluindo inseticidas, fungicidas, herbicidas, acaricidas, reguladores de crescimento, feromônios, molucidas e protetores de semente. (IBGE, 2008)

As políticas agrícolas governamentais ao longo dos anos facilitaram o acesso a fertilizantes e pesticidas como soluções rápidas para implementar a agricultura, tanto para consumo interno quanto para exportação. Como consequência do acesso facilitado os pesticidas passaram a ser utilizados de modo indiscriminado e excessivo e em condições cujo emprego pode ser questionável. Casos agudos de intoxicação são freqüentemente relatados, principalmente entre os trabalhadores agrícolas. (SOBREIRA & ADISSI, 2003)

A contaminação hídrica pelas culturas a margem dos cursos d'água, pelo lançamento nas águas de restos das formulações, lavagem de equipamentos de pulverização, contaminação no caso de pulverização aérea e pela lavagem e carreamento dos pesticidas pelas chuvas, tem mobilizado as sociedades organizadas no sentido de estabelecer medidas restritivas e punitivas que regulem o uso de pesticidas. (SOBREIRA & ADISSI, 2003)

O emprego de pesticidas nas culturas agrícolas ainda que usado adequadamente, pode levar à contaminação dos mananciais devido ao carreamento de tais produtos pelas águas de irrigação e da chuva. A mobilidade de um defensivo agrícola no solo é condicionada as características físico-químicas do produto. O ambiente condiciona a movimentação do pesticida no solo por meio da temperatura e, principalmente, da quantidade de chuva após a aplicação do herbicida. Quanto ao solo é importante destacar a drenagem, a textura e o teor de matéria orgânica (capacidade adsortiva); assim, quanto maior a capacidade de adsorção de um solo, menor é a mobilidade do defensivo agrícola. (CRUCIANE et. al, 1996).

A persistência do pesticida no meio aquático é determinada entre outros fatores, pela capacidade da flora microbiana local de degradar tais substâncias, assim o uso de microrganismos entre as ações para tratamento de resíduos e recuperação ambiental já é técnica bem conhecida nos sistemas de tratamento de esgoto. Alguns microrganismos são capazes de utilizar compostos orgânicos como fonte nutricional.

A recuperação de corpos d'água contaminados, explorando o potencial biológico apresenta vantagens como o baixo custo, e uma menor geração de produtos secundários como ocorre no tratamento físico ou químico dos resíduos. (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

Até recentemente, os estudos de biodegradação estavam direcionados unicamente para bactérias heterotróficas e fungos, porém nos últimos anos os estudos têm demonstrado que as cianobactérias representam um recurso muito pouco estudado, mas com grande potencial. Estes microrganismos têm ampla distribuição e possuem mecanismos bem desenvolvidos de adaptação às condições ambientais, o que lhes confere grande resistência em ambientes poluídos, podendo ser utilizados como agentes de recuperação de áreas impactadas.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Histórico dos pesticidas

A utilização de substâncias químicas como formas de controles de pragas já era descrita na Antiguidade. Escrituras gregas e romanas de mais de 3.000 anos já mencionavam o uso de arsênio para controles de insetos. Compostos naturais como a piretrina, obtida de flores de crisântemo, eram utilizadas como inseticidas por chineses há 2.000 anos. Outros compostos orgânicos vegetais como a nicotina extraída das folhas do tabaco e a rotenona, extraída das raízes do Timbó também eram usados com propriedades inseticidas. (MILLER, 1990; PASCHOAL, 1979 ; SAMPAIO & GUERRA, 1991; YUDELMAN et. al, 1998)

O uso de compostos inorgânicos à base de metais tóxicos tais como cobre, enxofre, arsênio e chumbo, tiveram grande aplicação na Europa no século XIX para o combate de doenças causadas por fungos e parasitas nas culturas de hortaliças. Em 1897 o “verde-paris” (acetoarsenito de cobre), foi introduzido nos Estados Unidos para controlar o ataque de besouros nas plantações de batata. Inúmeros compostos de metais pesados foram utilizados como praguicidas, impulsionados pelo bom resultado do verde paris. Compostos de cobre e mercúrio foram amplamente utilizados até 1940 para proteção de sementes e controle das mais variadas pragas. (ALVES, 2002)

A maioria destes compostos inorgânicos também chamados de pesticidas de primeira geração não é mais utilizada devido a sua grande toxicidade para seres humanos e animais e elevada persistência no ambiente. (SAMPAIO&GUERRA, 1991; MILLER, 1990)

Até a segunda guerra mundial a maioria dos pesticidas utilizados eram compostos inorgânicos. Impulsionadas pela guerra a indústria de síntese química desenvolveu os biocidas orgânicos sintéticos também chamados de pesticidas de segunda geração. Em 1874 o DDT (Dicloro-difenil-tricloroetano), foi sintetizado por Othmar Zeidler, mas suas propriedades inseticidas só foram descobertas por Paul Muller em 1939. Esta descoberta levou a mudanças na agricultura e saúde pública, pois foi usada com êxito no controle da malária, febre amarela e outras doenças veiculadas por insetos, que causavam grande mortalidade na população mundial na época. Paul Muller foi contemplado com o Nobel de Fisiologia e Medicina em 1948 por esta inovação. (PASCHOAL, 1979)

Durante a segunda guerra foram desenvolvidos inúmeros biocidas sintéticos por americanos e alemães. Dentre os gases utilizados pela indústria alemã, estavam os derivados do ácido fosfórico, os quais deram origem aos inseticidas organofosforados. A indústria americana se dedicou a descoberta de várias substâncias herbicidas capazes de destruir as plantações inimigas por via aérea. (LUTZENBERGER, 1985)

No Brasil os primeiros registros de compostos organoclorados foram feitos em 1946. Neste mesmo período foram introduzidos os inseticidas. Durante os anos de 1954 a 1960, foi intenso o registro de novos produtos junto ao Ministério da Agricultura. Cerca de 2.500 produtos foram registrados neste período, grande parte desses compostos eram pesticida. (LIMA, 1960)

Ao final dos anos 50 e início dos anos 60, surgem na comunidade científica internacional os primeiros processos de reavaliação da segurança e eficácia dos agrotóxicos. No ano de 1962, foi publicado o livro "Primavera Silenciosa" pela pesquisadora americana Rachel Carson, que reuniu várias denúncias de bioacumulação em animais e danos ao meio ambiente e à saúde humana decorrentes do uso indiscriminado do DDT e outros compostos organoclorados.

Os argumentos consistentes apresentados pela pesquisadora influenciaram a opinião pública norte americana, que levou a uma reavaliação do uso dos pesticidas por órgãos governamentais, culminando na criação da agência de regulação ambiental americana (EPA-ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY). Posteriormente, a EPA seria responsável pelo banimento do uso agrícola dos organoclorados e a partir da década de 1970, outras classes de pesticidas foram banidas ou seu uso restrito. (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2000)

Na década de 80 começaram a surgir novos produtos classificados como pesticidas de terceira geração, em uma fase onde a busca por produtos menos nocivos ao homem e meio ambiente, que tenham maior especificidade para o organismo alvo e menor persistência no ambiente, passam a ser estratégico para a indústria química. Fazem parte desta terceira geração as formulações à base de feromônios, piretróides e a utilização de substâncias produzidas por microorganismos como biocidas. (SAMPAIO & GUERRA, 1991)

No início da década de 90, desenvolveu-se a técnica de “Manejo integrado” de pragas que se fundamenta nos estudos de integração praga e hospedeiro, visando reduzir o uso de agrotóxicos. Para isso são associadas outras formas de controle de pragas como o controle biológico, rotação de culturas e uso de variedades resistentes. (KNIPLING, 1999)

Atualmente, o controle genético (transgênicos) é a área de grande interesse no combate as pragas. A técnica baseada na modificação do DNA, permite a geração de organismos geneticamente modificados (OGMs), que apresentam resistência a pragas, reduzindo a necessidade do uso de pesticidas. (VALLE&COSTA, 1999)

2.2 O consumo de pesticidas no Brasil

As culturas de café e algodão foram responsáveis pela introdução de agrotóxicos no Brasil na década de 40. Os organoclorados ainda importados eram utilizados no controle das pragas nestas culturas. A partir de 1960 passou-se a utilizar outros tipos de pesticidas tais como organofosforados, carbamatos, piretróides etc. (LARA, 1992)

Na década de 70, o aumento do consumo de agrotóxico aumentou substancialmente, influenciado pelo crédito agrícola que direcionava 15% do valor dos empréstimos para aquisição de agrotóxicos, estimulando a ampliação do mercado interno. O aumento da demanda fez surgir as primeiras fábricas de agrotóxicos no Brasil. (FERRARI,1985)

Embora o Brasil tenha adotado os protocolos internacionais no que se refere à restrição do uso de alguns pesticidas, a expansão das fronteiras das terras cultiváveis tem mantido o país entre os maiores mercados de defensivos agrícolas. (Tabela 1)

Tabela 1. Consumo de ingredientes ativos no Brasil; de 2000 a 2005.

Ano	2000	2001	2002	2003	2004	2005
Número de ingredientes ativos de agrotóxicos e afins comercializados	270	289	300	286	266	282
Consumo de ingredientes ativos(t)	162.486	158.804	145.985	169.861	211.827	208.366

*Fonte: IBGE,2006 . (t) Toneladas

Os compostos organofosforados (Glifosato, Metamidofós e 2,4D) são os ingredientes ativos mais consumidos no Brasil, junto com o adjuvante óleo mineral e o enxofre como fertilizante. Dados de 2003 a 2005, demonstram que estes compostos se revezam nas 5 primeiras posições e representam cerca de 60% do consumo nacional de pesticidas. (Tabela 2)

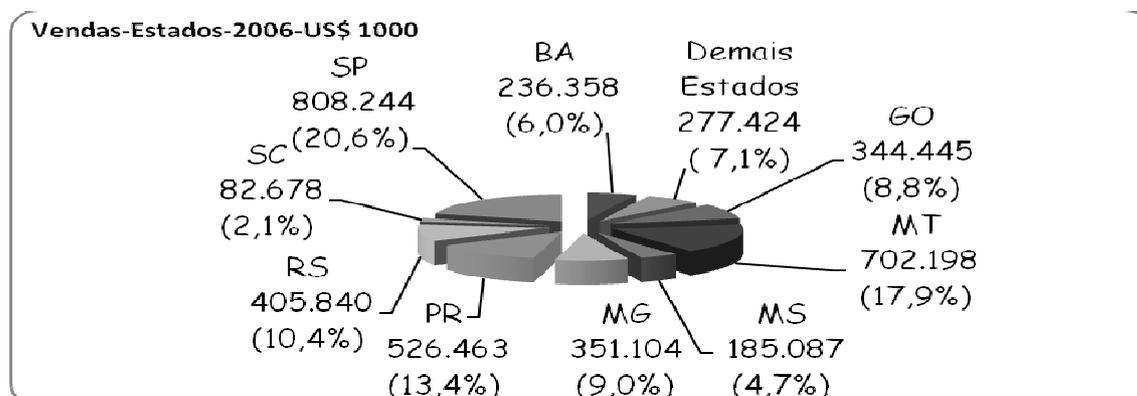
Tabela 2. Tipo de agrotóxicos mais consumidos no Brasil de 2003 a 2005.

Classificação Nacional	2003(t)	2004(t)	2005(t)
1°	Glifosato (57.614)	Glifosato (77.068)	Glifosato(70.953)
2°	2,4D (11.897)	2,4D(13.043)	Óleo mineral (14.917)
3°	Óleo mineral (10.628)	Óleo mineral (12.045)	2,4D (13.754)
4°	Enxofre (9.882)	Metamidofós (11.845)	Metamidofós (13.449)
5°	Metamidofós (7.779)	Enxofre (8.944)	Enxofre (10.358)
Consumo 1° ao 5°	97.800	122.945	123.431
Relação ao consumo nacional (%)	57,58%	58,04%	59,24%
Consumo Nacional Total	169.861	211.827	208.366

*Fonte: IBGE,2006. (t) Toneladas

Nove estados brasileiros são responsáveis por mais de 90% do consumo de defensivos agrícolas. O estado de São Paulo corresponde a 20% do total, seguido pelo Mato Grosso, Paraná, Rio Grande do Sul e Minas Gerais, sugerindo a tendência da produção agrícola brasileira, concentrada em poucos estados. (Figura 1)

Figura 1. Venda de defensivos agrícolas por estado.



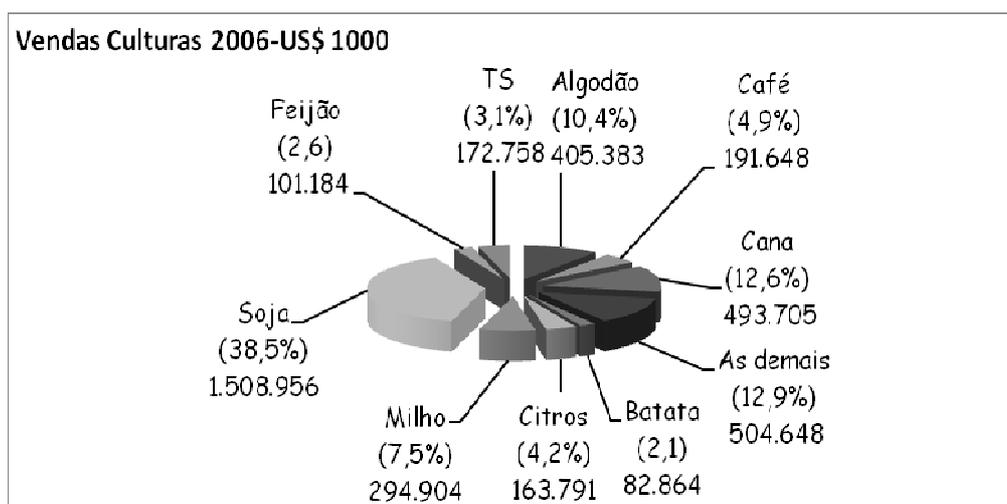
*Fonte: SINDAG (Sindicato das Indústrias de Defensivos Agrícolas).

As principais culturas que utilizam agrotóxicos são a soja, cana de açúcar, algodão, milho e café. Essas plantações consomem particularmente herbicidas que correspondem a quase 50% do total de agrotóxicos usados. (Figura 2 e

*Fonte:SINDAG

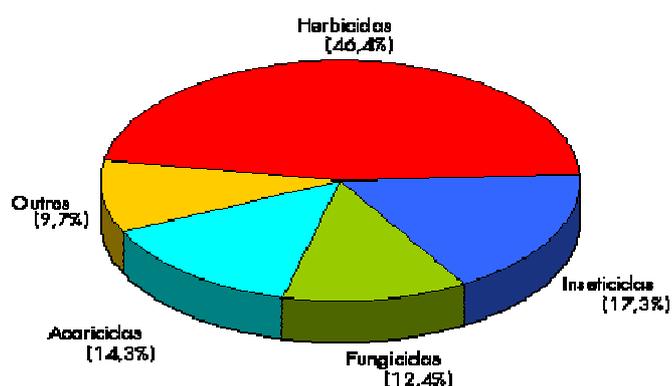
Figura 3)

Figura 2. Vendas de defensivos agrícolas por cultura.



*Fonte:SINDAG

Figura 3. Consumo de defensivos agrícolas por classe em 2006.



*Fonte: SINDAG

2.3 Contaminação ambiental por pesticidas

Os pesticidas podem ser classificados de acordo com o organismo alvo, com o mecanismo de ação, ou pela estrutura química (

Tabela 3). Mais de 500 formulações de pesticidas são usadas no ambiente, a maioria na agricultura, e também para controle biológico de vetores transmissores de doenças. (AZEVEDO, 1998)

Tabela 3. Classificação dos pesticidas.

Organismo alvo	Classe Química	Mecanismo de Ação
Inseticidas	Organofosforados	Atuam sobre o sistema nervoso, acarretando o acúmulo do neuromediador colinesterase, levando a paralisia muscular
	Organoclorados	A ação consiste em inibir os canais de sódio e potássio nos tecidos nervosos, impedindo a transmissão dos impulsos nervosos
	Piretróides	Atuam nos canais de sódio da membrana de axônios, diminuindo e retardando a condutância de sódio para o interior da célula e suprimindo o efluxo de potássio. Também podem inibir a adenosina trifosfatase (ATPase). O resultado final é uma diminuição do potencial de ação e a geração de impulsos nervosos repetitivos.
	Carbamatos	Inibição reversível da acetilcolinesterase, menos tóxico para mamíferos.
Herbicidas	Triazinas	Inibidores do fotossistema das plantas
	Dinitroanilinas	Inibidores de fases da mitose, impede formação de raízes e germinação de sementes
	Sulfoniluréias	Inibem síntese protéica e duplicação do DNA.

*Fonte: Estevez et al (2008)

Nos últimos 50 anos, o uso de pesticidas tem aumentado a quantidade e qualidade da produção agrícola no mundo todo. Por outro lado há muitos efeitos indesejáveis em organismos não-alvo, incluindo os seres humanos. Pesticidas têm sido identificados como a causa de morte de peixes, problemas reprodutivos em pássaros e doenças em humanos. (RAO et. al, 1993)

Estima-se que menos de 0.1% do defensivo agrícola aplicado nas culturas atinja o organismo alvo, o restante é inserido no ambiente, contaminando o solo água e ar. Muitos podem persistir por longos períodos no ecossistema, alguns organoclorados, por exemplo, são encontrados em corpos d'água mesmo após 20 anos da proibição de seu uso. (LARSON et. al ,1997).

Uma vez, no ambiente estes pesticidas são inseridos na cadeia alimentar, acumulando nos tecidos gordurosos dos organismos, levando ao fenômeno de bioacumulação e biomagnificação em organismos superiores.

A dinâmica de um defensivo agrícola no solo, ou seja, sua mobilidade é dependente da dose aplicada, da solubilidade em água e das características químicas do produto que condicionam a adsorvidade da molécula às partículas coloidais do solo. Pesticidas com coeficiente de partição óleo/água (*K_{ow}* octanol/água) maiores que 1000, possuem características lipofílicas e, portanto são mais aderidos a matéria orgânica do solo, reduzindo seu potencial de lixiviação (contaminação de águas subterrâneas pelo escoamento da água da chuva através do solo). Entretanto, mesmo os pesticidas muito lipossolúveis têm sido encontrados em águas subterrâneas e superficiais, devido ao carregamento de partículas do solo por chuvas torrenciais. (ELLIOTT et. al, 2000)

A meia vida de um defensivo agrícola no solo é dependente de uma série de fatores. Pesticidas com alta pressão de vapor, podem volatilizar e contaminar a atmosfera, eles também podem sofrer lixiviação e atingir os corpos d'água e podem ficar retidos no solo e sofrer processos de degradação. Os processos de degradação físico-química (hidrólise, fotólise, temperatura) e biológico atenuam os níveis destes compostos. Solos com maiores teores de matéria orgânica possuem uma maior variedade de microorganismos favorecendo a biodegradação, em contrapartida podem exercer um efeito protetor quanto aos efeitos de temperatura e irradiação solar. Quanto maior a persistência do pesticida no ambiente maior a possibilidade de ser introduzido na cadeia alimentar e sofrerem bioacumulação em seres superiores (ESTEVEZ et. al,2008)

Nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental (EPA), responsável pela monitoração de pesticidas em águas, detectaram na década de 90, 46 tipos destes compostos em águas subterrâneas e 76 em águas superficiais. A Atrazina foi o agrotóxico mais encontrado, pois foi amplamente utilizado nas culturas daquele país com um consumo de 4000 toneladas em 1989. Vários defensivos agrícolas também foram encontradas nos corpos d'água norte americanos como Pronofós, Etil Paration, Dimetoato, Clordano, Fluometurona, Diuron , Trifluralina etc. (LARSON, 1997)

No Brasil, ainda existem poucos dados sobre a contaminação dos recursos hídricos, devido a ausência de um órgão publico que gerencie sua contaminação. Há legislações do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA n° 20/86) e do Ministério da Saúde (Portaria n° 518/2004) que estabelecem limites aceitáveis para água potável de substâncias químicas que representam risco a saúde, dentre elas alguns agrotóxicos. (Tabela 4)

Tabela 4.Limites aceitáveis de agrotóxicos em água potável.

Agrotóxicos	Limite Máximo (µg/L)
Alacor	20,0
Aldrin e Dieldrin	0,03
Atrazina	2
Bentazona	300
Clordano	0,2
2,4D	30
Endossulfano	2
DDT	20
Endrin	0,6
Glifosato	500
Heptacloro	0,03
Hexaclorobenzeno	1
Lindano(γ -BHC)	2
Metolacloro	10
Metoxicloro	20
Molinato	6
Pendimetalma	20
Pentaclorofenol	9
Permetrina	20
Propanil	20
Simazina	2
Trifluralina	20

***Fonte: Ministério da Saúde, Portaria n°518/04**

Atualmente os poucos dados de contaminação dos mananciais brasileiros se encontram restritos aos estudos das instituições de pesquisa. Em Bauru, São Paulo, RISSATO et. al (2004), aplicaram técnicas analíticas de determinação de organoclorados nos mananciais, água potável e solos da região. Os solos apresentaram concentrações mais altas de todos organoclorados estudados (Lindano, Dieldrin, Aldrin, Heptaclor, DDT). Os mesmo produtos foram encontrados em menor concentração nas amostras de águas de mananciais e água potável. As concentrações dos pesticidas estudados em água potável se encontravam dentro do padrão de potabilidade exigido na legislação brasileira.

No Rio Grande do Sul, MARCHESAN et. al (2007) monitoraram nos anos de 2000 a 2003 , dois rios (Vacaí e Vacaí-mirim) localizados numa região de plantio de arroz. Vários herbicidas organoclorados e dinitroanilínicos foram encontrados em ambos os rios e em estações chuvosas os resultados foram alarmantes com mais de 40% das amostras contaminadas.

DORES et. al (2006), pesquisaram a presença de herbicidas em Primavera do Leste, Mato Grosso, em uma área de intensa agricultura de soja e algodão, vários destes compostos foram encontrados nos corpos d'água da região e na água potável (Tabela 5). A Trifluralina foi encontrada em amostras de água de irrigação proveniente dos rios da região e apresentou uma concentração média de 0.09 µg/L.

Tabela 5. Pesticidas encontrados nos corpos d'água de Primavera do Leste (MT).

Tipo de amostra	Composto	Concentração (µg/L)	
		Mínima	Máxima
Água potável	Atrazina	0,036	0,063
	Simazina	0,023	0,061
	Metolacoloro	0,088	0,091
Água de poço	Metribuzina	0,069	0,090
	Metolacoloro	0,088	1,732
Represa	Metribuzina	0,069	0,138
Cabeceira de Rio	Simazina	0,023	0,043
Água de irrigação	Atrazina	0,078	0,156
	Metribuzina	0,069	0,129
	Trifluralina	0,078	0,102

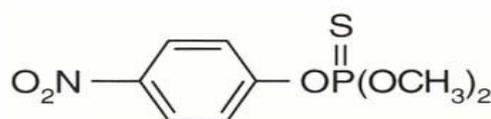
*Fonte: Dores, 2006.

Estudos de LANCHOTE et. al (2000) e LAABS et.al (2002) avaliando o destino de pesticidas em solo do Cerrado brasileiro, mostraram que os pesticidas alcalor, atrazina, metacolor, simazina e trifluralina podem ser encontrados em até 95 cm de profundidade. Esses resultados sugerem que a contaminação de águas subterrâneas por estas substâncias não pode ser descartada.

2.4 Metilparation

O metilparation (O,O-dimetil-O-nitrofenilfosfotionato) pertence a classe dos organofosforados, usado como inseticidas na agricultura (Figura 4). Seu mecanismo de ação consiste em inibir a acetilcolinesterase com conseqüente acumulação de acetilcolina nas terminações nervosas, responsável pela sua alta toxicidade. O metilparation é um sólido amarelado cristalino de massa molecular=263, com ponto de fusão de 37-38°C, densidade de 1,358 , $Kow=794$. Solúvel em solventes orgânicos, possui solubilidade em água de 50ppm. (THE MERCK INDEX, 2001)

Figura 4. Estrutura química do metilparation.



No Brasil é muito utilizado nas culturas de algodão, milho, soja, amendoim, arroz, melão, melancia, e em hortaliças para o controle de uma grande variedade de insetos.

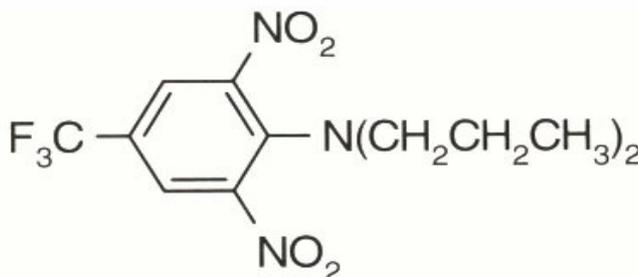
Em água o metilparation é hidrolisado a p-nitrofenol e ácido dietilortonitrofosfórico e esta reação pode ser acelerada por aumento da temperatura e pelo meio alcalino. A vida media do metilparation em água é de 30 a 100 dias e no solo de 120 dias.

Em ambientes aquáticos os organofosforados possuem curta meia vida e por isso são pouco detectados. Sofrem degradação espontânea por processos de fotólise, hidrólise e degradação microbiana. Devido ao seu mecanismo de ação, pouco seletivo atuando em neurotransmissores, atinge uma variedade de animais, causando mortes e levando a um desequilíbrio em toda a cadeia alimentar. Apesar do curto período de tempo no meio ambiente pode gerar danos imprevisíveis como mutagênese, carcinogênese e teratogênese em organismos que entrarem em contato com esta substancia. (WAUCHOPE et. al, 1992)

2.5 Trifluralina

A trifluralina (α,α,α -trifluor-2,6-dinitro N,N-dipropil p-tolueno) pertence ao grupo das Dinitroanilinas (Figura 5). É um herbicida, pré-emergente (aplicado antes do plantio), para controle e prevenção do crescimento de espécies de ervas daninhas e gramas. Seu mecanismo de ação inibe a mitose que inviabiliza o crescimento da raiz e germinação de sementes. (GROOVER et.al, 1997)

Figura 5. Estrutura química da Trifluralina



É um sólido cristalino, laranja brilhante, com ligeiro odor aromático. Seu ponto de fusão é de 46-47°C e ponto de ebulição de 96-97°C, $K_{ow}=199.000$. Sua solubilidade em água 0,3 a 0,6 mg L⁻¹. É altamente solúvel em solventes orgânicos como metanol, hexano, acetona, clorofórmio, diclorometano, tolueno. (GROOVER et.al, 1997)

A Trifluralina é usada no Brasil em culturas de soja, algodão, eucalipto e nas plantações de flores. Este herbicida não possui grupos funcionais passíveis de hidrólise, mas alguns autores relatam sua fotodecomposição. (GROOVER et.al, 1997)

A fotólise nos solos é menos pronunciada sendo relatada uma perda de 28% da trifluralina durante 30 dias sob luz fluorescente. Já em ambientes aquáticos a sua fotodecomposição depende de vários fatores como, comprimento de onda da luz solar, época do ano, latitude, profundidade e teor de matéria orgânica dos corpos d'água. (GROOVER et.al, 1997)

2.6 Técnicas analíticas para análises ambientais

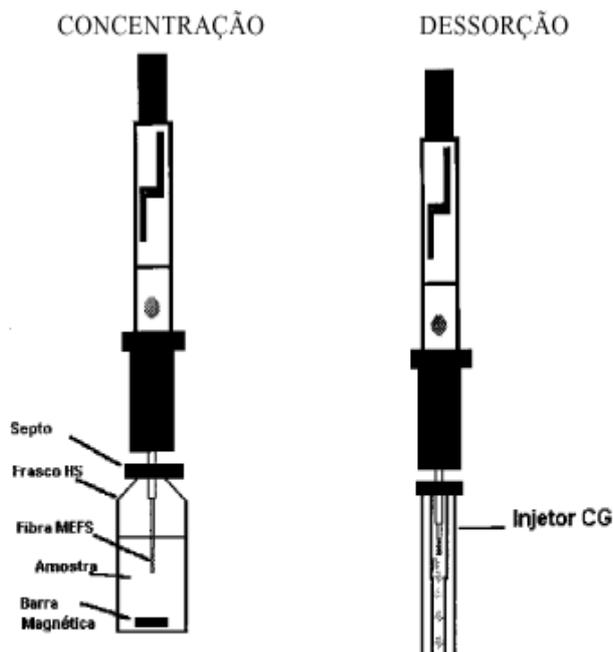
Os métodos utilizados no século XX, para extração de agrotóxico em solo e água eram baseados na extração líquido-líquido (ELL) ou líquido sólido (ELS). Tais métodos apresentam seletividade e sensibilidade reduzidas, demandam muito tempo para preparação da amostra, são dispendiosas e utilizam uma grande quantidade de solventes tóxicos para o homem e ambiente. A preocupação com o impacto ambiental e a busca por métodos mais sensíveis levaram ao desenvolvimento de novas técnicas de preparação de amostra.

A técnica de extração ideal deve ser rápida, apresentar baixo custo, alta seletividade, pré concentração e ser aplicada a vários tipos de compostos. Algumas técnicas desenvolvidas nos anos 80 e 90 possuem estas características, pois utilizam como meio de extração fases sólidas, gasosas, membranas, sendo consideradas como técnicas alternativas aos processos convencionais, por utilizarem pouco ou nenhum solvente. (MARJORS,1994)

Em 1990, o pesquisador Janusz Pawliszyn, desenvolveu na Universidade do Canadá, a técnica de microextração em fase sólida (MEFS). A fibra constituída de sílica fundida é revestida com um filme polimérico com cerca de 1 cm de comprimento. Esta fibra é adaptada em uma seringa especial, também chamada de suporte manual, pode ser colocada em contato direto (imersão) ou via espaço confinado com a amostra, tendo como resultado a partição dos analitos entre as duas fases. Em seguida os analitos são desorvidos da fibra em um instrumento analítico, onde são separados, identificados e quantificados. (PAWLISZYN, 1999)

A MEFS pode ser dividida de acordo com o modo de extração. Na extração direta a fibra é colocada diretamente em contato com a amostra em um sistema fechado sob aquecimento e agitação, sendo os analitos transferidos da amostra para o filme polimérico. (Figura 6).

Figura 6. Microextração por imersão direta .



No modo MEFS headspace, a fibra é colocada em contato com a fase gasosa da solução, em um sistema fechado sob aquecimento e agitação. Neste caso a extração está relacionada com o equilíbrio dos analitos voláteis nas 3 fases: a amostra, a fase gasosa, e o filme polimérico da fibra. (PAWLISZYN,1997)

As fases poliméricas devem ser selecionadas de acordo com a natureza química do analito. Compostos apolares, por exemplo, exigem fibras com revestimentos apolares. Além disso, deve-se observar a porosidade da fibra: pequena e média porosidade adsorvem compostos de baixo peso molecular.

2.7 O processo de biodegradação de pesticidas

Entre as ações para tratamento de resíduos e recuperação ambiental, o uso de microrganismos é técnica bem conhecida, rotineira nos sistemas de tratamento de águas residuárias. Esse processo baseia-se na capacidade dos microrganismos de metabolizar compostos orgânicos utilizando-os como fonte nutricional (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004).

A biorremediação, utilizando o mesmo princípio, baseia-se na exploração do potencial biológico para recuperação de áreas ambientais degradadas. Deste modo, a busca de microrganismos capazes de degradar poluentes com maior eficiência, menor produção de resíduos e com custo operacional mais baixo é o objetivo da pesquisa aplicada ao saneamento ambiental. Embora as possibilidades sejam vastíssimas em decorrência da grande diversidade microbiana existem limitações principalmente relacionadas à toxicidade dos resíduos para essas espécies e, na grande maioria dos casos, à complexidade dos poluentes.

A utilização de bactérias heterotróficas e fungos para biodegradação de pesticidas, já é bastante estudada. Estudos de biodegradação da trifluralina e do metilparation por estes microrganismos são relatados na literatura. (BELINASSO et. al, 2003; LIU et. al, 2007; PAKALA et. al, 2007; ZAMBLOTOWICH et. al,2001)

A biodegradação da trifluralina é uma etapa fundamental na sua depuração ambiental. Estudos identificaram uma variedade de microrganismos, tanto bactérias como fungos, que estão associados à degradação das dinitroanilinas.

BELINASSO et. al (2003) estudaram a biodegradação da trifluralina por diferentes bactérias isoladas do solo. Estes autores observaram uma redução na concentração do herbicida de 24.6% pela *Klebsiella* sp. , 16.4% por *Herbaspirillum* sp., 25 e 16% para duas espécies de *Bacillus* sp.e 21% por uma espécie de bactéria não identificada, indicando que os microrganismos têm papel considerável na recuperação de solos contaminados por esse herbicida.

ZAMBLOTOWICH et. al (2001) isolaram espécies de *Pseudomonas sp.* capazes de biodegradar a trifluralina via redução enzimática de grupos nitroaromáticos. Do mesmo modo, ZAYED et .al (1983) verificaram que após incubação da trifluralina por dez dias com *Aspergillus carneus*, *Fusarium oxysporim*, e *Trichoderma viride* um pequena porcentagem, menos de 10% do herbicida, foi recuperada. Esses resultados indicam a rápida degradação por estas espécies de fungos.

Organofosforados podem ser biodegradados por plantas, fungos, bactérias e cianobactérias. A chave deste processo são enzimas hidrolases e oxidases. Essas enzimas já foram identificadas em bactérias que degradaram o metilparation como *Acinetobacter radioresistens* que metabolizou este pesticida na concentração de 130mg /L em 2 horas. (LIU et. al, 2007)

Nesta perspectiva PAKALA et. al (2007) descreveram a rota de biodegradação do metilparation por *Serratia sp*, da qual foram isoladas enzimas que foram nomeadas de paration hidrolase e p-nitrofenol hidroxilase, que levaram a redução e hidrólise do pesticida.

Os estudos de biodegradação durante décadas estiveram direcionados unicamente para bactérias heterotróficas e fungos, porém nos últimos anos os estudos têm demonstrado que as cianobactérias representam um recurso muito pouco estudado, mas com grande potencial para sistemas de biodegradação. Estes microorganismos têm ampla distribuição e possuem mecanismos bem desenvolvidos de adaptação às condições ambientais, o que lhes confere grande resistência.

2.8 Estudos de biodegradação por cianobactérias

As cianobactérias são microrganismos de vida livre, desenvolvem-se em todas as regiões do planeta, e estão disseminadas no ambiente, inclusive naqueles poluídos. Algumas espécies podem fazer a fixação de nitrogênio e podem combinar o metabolismo aeróbico e anaeróbico. A viabilidade e a atividade metabólica das cianobactérias diferem de outras bactérias heterotróficas, já que são menos sensíveis à redução do crescimento pela diminuição da matéria orgânica. As cianobactérias têm apresentado uma ampla capacidade metabolizadora, tanto de produtos naturais quanto de xenobióticos. (BARTON et. al, 2004; LEES et. al, 2003).

Estudos do potencial de cianobactérias na degradação de substâncias orgânicas são descritos na literatura com resultados promissores.

A biotransformação do inseticida endossulfano pelas espécies de *Anabaena sp* PCC 7120 e *Anabaena flos aquae* foi relatada por LEES et. al (2003). Os autores observaram que a concentração de endossulfano decaiu até o quarto dia de incubação para menos de 10% da concentração inicial. O estudo demonstrou que as espécies de *Anabaena sp.* participam no processo de detoxificação do endossulfano, sendo potencialmente úteis para biorremediação de solos contaminados.

MANSY & BESTAWY (2002) avaliaram a biotransformação da Fluometurona por *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena cylindrica*, *Anabaena flos-aquae* e *Anabaena spiroides*. Os autores verificaram que todas as espécies apresentaram grande capacidade de metabolizar este herbicida organofosforado. Em cinco dias as espécies foram capazes de reduzir em 87.5% a 93,0% a concentração do pesticida no meio. O crescimento da cianobactéria, avaliado pela dosagem de clorofila foi afetado apenas nas concentrações maiores. Contudo no decorrer do ensaio as cianobactérias retomaram o crescimento e a remoção do pesticida do meio. Os autores sugeriram uma biotransformação redutiva via citocromo P450.

TANYA et. al (2008) estudaram a toxicidade e a biotransformação do pesticida organofosforado fenamifós e seus metabólitos pelas microalgas *Pseudokirchneriella subcapita* e *Chlorococcum sp.* Estas espécies foram capazes de oxidar o pesticida via citocromo P450. Os metabólitos foram isolados e testados, indicando uma menor toxicidade destes compostos comparados ao pesticida para as espécies em estudo.

RIBOO et. al (2002) ao analisarem a resposta fisiologica da cianobactéria *Chlorella vulgaris* exposta herbicidas triazínicos e feniluréias, contataram uma diminuição da concentração de clorofila nas maiores concentrações testadas, estímulo de produção de clorofila em concentrações mais baixas , indicando um grande potencial adaptativo da espécie em exposição ao pesticida.

BARTON et. al (2004) observaram o biotransformação redutiva do metilparation por *Anabaena sp.* . A redução do grupo nitro a grupo amino foi relacionada com a atividade da enzima NADPH Redutase presente no citocromo P450, como esta etapa não ocorre no escuro, indicando o envolvimento do Fotossistema da cianobactéria na biodegradação do pesticida.

Embora as cianobactérias tenham se mostrado promissoras em estudos de biodegradação destaca-se a necessidade de estudos direcionados para espécies adaptadas às condições locais, evitando-se a introdução de novas espécies e a investigação cuidadosa dos mecanismos envolvidos e da toxicidade de eventuais metabólitos formados para as espécies aquáticas e para humanos.

2.9 Metabolismo de xenobióticos por cianobactérias

A bioacumulação em ambientes aquáticos resultante da assimilação de contaminantes por organismos que vivem nos corpos d'água é contrabalanceada por processos catabólicos e de eliminação. Fatores hidrológicos (fluxo de água), geoquímicos (composição e granulometria dos sedimentos) e condições ambientais (temperatura, pH, salinidade) podem afetar a biodisponibilidade de compostos inorgânicos e orgânicos na fase aquosa, comprometendo o metabolismo de organismos aquáticos.(GUHA, 2004)

A biotransformação realizada por microorganismos de ambientes aquáticos visa acelerar a decomposição levando a detoxificação do meio. As cianobactérias possuem um papel importante para a redução de poluentes orgânicos do ambiente, por mecanismos de bioacumulação como a bioconcentração de bifenilas policloradas (WANG et. al, 1998) e hidrocarbonetos (KOWALEWSKA, 1999) por espécies de fitoplâncton e por processos de biodegradação de uma variedade de poluentes, entre eles hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (BOPP & LITTIERI, 2007), pirenos e flourantenos (LEI et. al, 2002, 2007) ,naftalenos e diariléteres. (TOOD et. al, 2002)

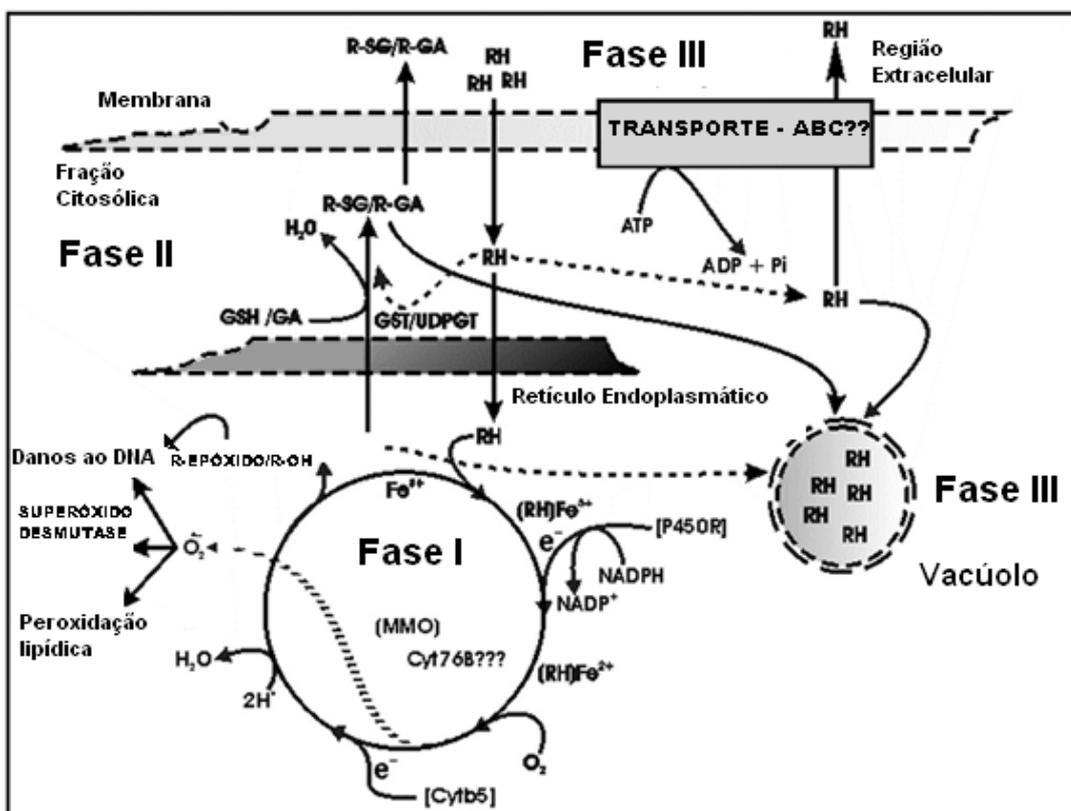
O metabolismo de xenobióticos por organismos fotossintetizantes acontece em três fases (Figura 7). A primeira fase (Fase I) é caracterizada pela adição de grupos funcionais reativos e envolve oxidação, redução ou hidrólise catalisada por enzimas microssomias Monooxigenases (MO) ou por Oxidases de funções mistas (MMO), oxidases do Sistema Citocromo P450 (Cyt P450). Os processos de redução em geral envolvem a NADPH, gerada na fotossíntese. (THIES et. al, 1996; PFLUGMACHER & SANDERMAN, 1998; BARQUE et. al, 2002).

As MO do Citocromo P450 são proteínas de membrana, geralmente localizadas no retículo endoplasmático. A característica mais importante das MO e MMO, é a habilidade de transformar xenobióticos lipofílicos em

compostos com maior solubilidade em água, facilitando sua excreção (ZANGAR et.al, 2004).

As reações de Fase I caracterizam-se pela transferência de elétrons, via sistema citocromo P450. O substrato (R-H) liga-se ao ferro trivalente do grupo Heme da enzima MO, reduzindo-o a divalente por catálise pela flavoprotéina redutase (P450R). O Oxigênio (O_2), um aceptor de elétrons, ao recebê-los forma o radical peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que é rapidamente convertido em água e oxigênio radicalar. Este radical livre possui afinidade pelo complexo Substrato-Ferrodivalente $(RH)Fe^{+2}$ transformando o substrato em compostos oxidados (R-OH ou R-epóxido). (STEGEMAN & HAHN, 1994)

Figura 7. Interação que ocorre entre os sistemas bioquímicos envolvidos na detoxificação de compostos químicos em microorganismos fotossintéticos aquáticos. (Moacir ET al ,2008)



As reações de Fase II consistem na conjugação do substrato oxidado com o Ácido Glicurônico(R-SG) e Glutadiona (R-AS) facilitando sua excreção. Alguns xenobióticos já possuem os grupos funcionais necessários (-COOH, -OH, -NH₂) à conjugação direta com os sistemas enzimáticos da Fase II, não passando pela Fase I. Na Fase II, as reações são catalizadas pelas enzimas: Glutadiona S-Transferase(GSTs) e UDP-Glicuronil Transferases (UDPGTs). (PFLUGMACHER et.al, 2000)

Em cianobactérias fotossintetizantes, ocorre uma terceira etapa que é caracterizada pela excreção dos xenobióticos conjugados através da parede celular. Pode ocorrer ainda o armazenamento dessas substâncias em vacúolos antes de serem excretadas. O transporte ativo transmembrana é responsável pela excreção do xenobiótico com a participação de proteínas transportadoras. (JABUSCH & SWACKHAMER, 2004; ALIVE et .al, 2005)

Alguns autores apontam evidências de que poluentes orgânicos podem induzir a produção de enzimas que conferem multiresistência a xenobióticos (MXR). Tais enzimas estariam envolvidas no Transporte Transmenbrana (ABC). Suspeita-se que, a presença destas enzimas acelerem a excreção por transporte ativo de contaminantes em cianofíceas aquáticas. (BARD et. al,2002; SMITAL et.al,2003)

As primeiras fases de detoxificação (Fases I e II) , são muito semelhantes as que ocorrem no fígado dos mamíferos. Por isso, as cianobactérias são chamadas de “Green – Liver” por muitos autores. (SANDERMAN, 1992, 1994, 2002; PFLUGMACHER & SANDERMAN, 1999).

As cianobactérias como importantes constituintes da biomassa dos sistemas aquáticos, podem significar uma importante ferramenta em estudos ecotoxicológicos e de biodegradação. Entretanto, maiores pesquisas são necessárias para elucidar os mecanismos envolvidos nos processos de detoxificação.

3 Contextualização do estudo

3.1 Cianobactérias

As cianobactérias são organismos procariontes, pois não possuem núcleo verdadeiro. Por não possuírem núcleo nem estruturas como cloroplastos e mitocôndrias, esses microrganismos são considerados semelhantes às bactérias, por isso o nome cianobactérias. Possuem rudimentar retículo endoplasmático localizados em membranas, chamadas de tilacóides. Os tilacóides possuem diferentes pigmentos fotossintéticos, tais como clorofila a (responsável pela coloração esverdeada), ficocianina (azul) e algumas espécies possuem a ficoeritrina, que é um pigmento vermelho. Como são fotossintetizantes e produtores primários, semelhantes às algas eucariontes, foram denominados cianofíceas pelos botânicos.

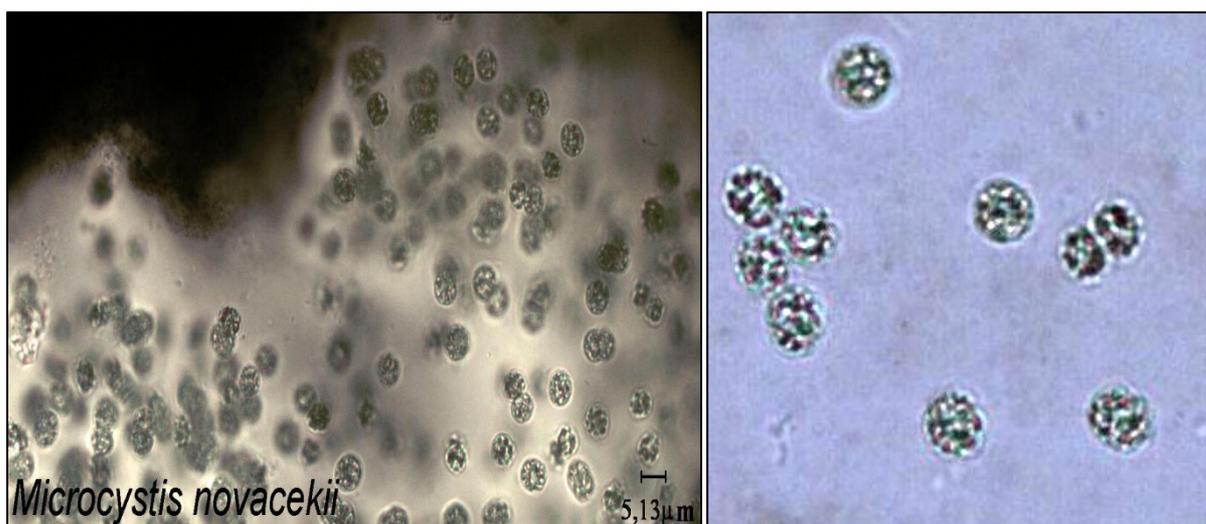
São microrganismos autotróficos e apresentam pequenas exigências nutricionais, alta capacidade de fotossíntese e de assimilação de nitrogênio. Seus processos vitais requerem somente água, dióxido de carbono, substâncias inorgânicas e luz. Exercem papel importante na manutenção do equilíbrio ambiental, pois constituem o fitoplâncton em ambientes aquáticos, sendo a base da cadeia alimentar. (VIDOTTI & ROLLEMBERG, 2004)

3.1.1 *Microcystis novacekii*

Essas espécies caracterizam-se por um denso arranjo celular no centro da colônia e com células isoladas na periferia. As colônias podem ser arredondadas, alongadas, lobadas ou irregulares com células esféricas, não estratificadas, distribuídas irregularmente na mucilagem de cor transparente. Possuem aerótopos, que são vacúolos gasosos que permitem a flutuação das colônias na coluna d'água. As espécies deste gênero são produtoras de mucilagem com adesão entre as células formando colônias. A mucilagem é composta de lipopolissacarídeos que funcionam como um envoltório que

agrega as células da espécie e as protege do ambiente. (KOMÁREK & KOMÁRKOVÁ, 2002).

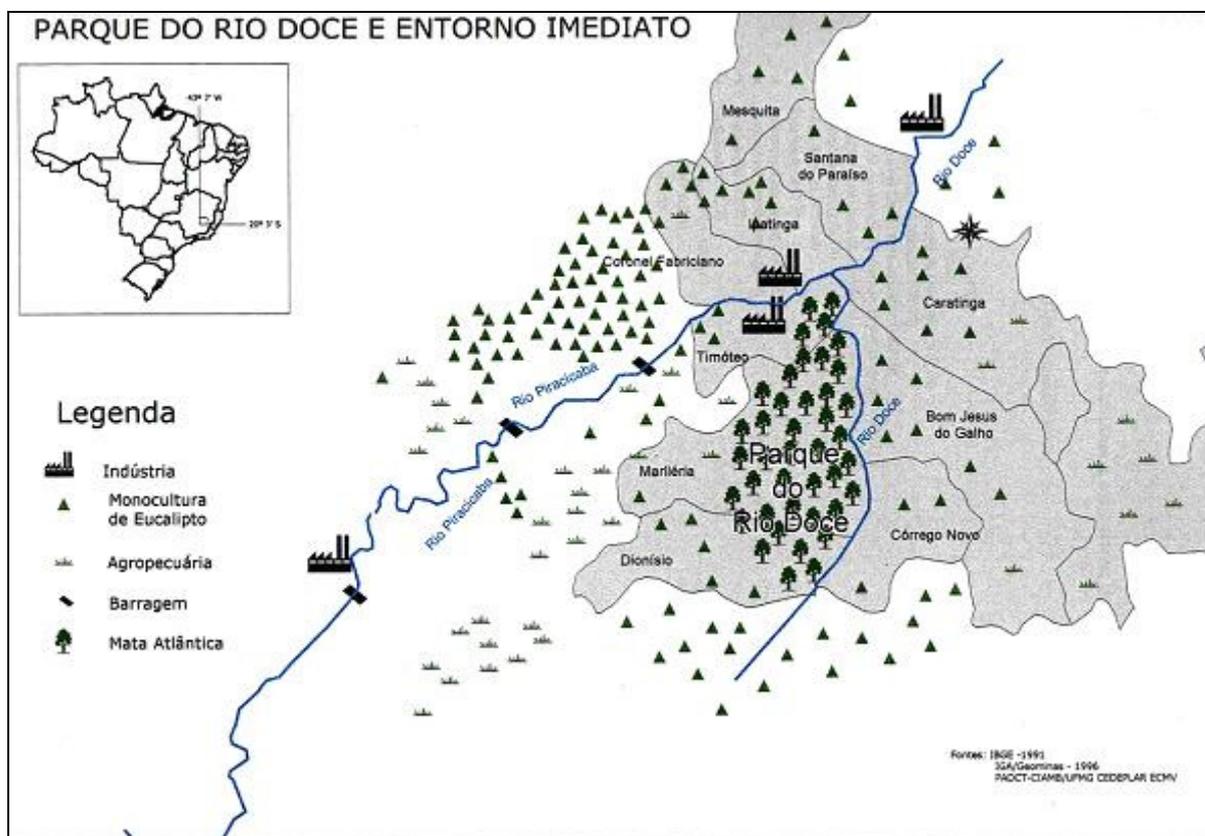
Figura 8 Foto da colônia (à esquerda) e das células (à direita) de *Microcystis novacekii*.



3.2 Parque Estadual do Rio Doce

O Vale do médio Rio Doce possui mais de 60% da biodiversidade da Mata Atlântica. O Parque Estadual do Rio Doce – PERD - localiza-se no trecho médio da bacia do Rio Doce e está inserido no bioma Mata Atlântica. As diferentes áreas de seu entorno recebem impactos antrópicos variados, destacando-se áreas ocupadas por extensas plantações de *Eucalyptus sp* para atender tanto a indústria siderúrgica como à de celulose. O restante dessas áreas é ocupado por pastagens e culturas diversificadas (Figura 9). Ocorre ainda a contaminação das águas por grandes áreas de mineração/garimpo que existem na cabeceira do Rio Piracicaba, um dos principais afluentes do trecho médio do Rio Doce, e por uma quantidade considerável de esgotos domésticos e industriais (BARBOSA, 2002).

Figura 9. Atividades antrópicas ao entorno do PERD



O laboratório de limnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG) desenvolve um amplo projeto de pesquisa no PERD e tem entre seus objetivos, identificar espécies de algas planctônicas nesse ambiente tropical. Estudos preliminares nos lagos da região identificaram várias espécies de algas planctônicas. Atualmente, esforços estão sendo concentrados na realização de estudos experimentais com essas espécies (BARBOSA,2002). Nesse contexto, culturas isoladas da cianobactéria *Microcystis novacekii*, vêm sendo mantidas pelo Laboratório de Limnologia do ICB-UFMG, com vistas à realização de estudos de biodegradação, explorando seu potencial metabólico.

3.3 Determinação analítica dos pesticidas

A determinação analítica dos pesticidas foi realizada no Departamento de Química – ICEX – UFMG, no laboratório de Espectrometria de Massas. Utilizou-se a metodologia de Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) e Detector de Massas com Ionização por eletrospray (ESI-MS).

4 Objetivo

Avaliar o potencial de remoção dos pesticidas Metilparation e Trifluralina do meio aquoso WC (water culture) pela cianobactéria *Microcystis novacekii*.

4.1 Objetivos Específicos

- Manter o cultivo em laboratório da cianobactéria *Microcystis novacekii*, isolada no PERD para fins de utilização nos testes de biodegradação e toxicidade;
- Estimar a eficiência dos processos de biodegradação;
- Verificar a toxicidade dos pesticidas estudados, para a *Microcystis novacekii*, estabelecendo a dose que causa 50% de inibição do crescimento (EC_{50});
- Propor e discutir os possíveis mecanismos de degradação dos pesticidas metilparation e trifluralina pela espécie *Microcystis novacekii*.

5 Material e métodos

5.1 Condições de cultivo da *Microcystis novacekii*

5.1.1 Banco de cianofíceas - Manutenção da cultura-mãe

A cultura de *M. novacekii*, isolada da lagoa Dom Helvécio no PERD (Parque Estadual do Rio Doce- MG) foi mantida pelo laboratório de Limnologia do Departamento de Biologia Geral/ Instituto de Ciências Biológicas/ Universidade Federal de Minas Gerais.

O meio utilizado no cultivo e nos experimentos utilizando *Microcystis novacekii*, com característica não-axênica, foi o meio líquido WC. (GUILLARD & LORENZEN, 1972) O cultivo foi mantido sob temperatura controlada a 25 (± 2) °C em câmara de germinação (FANEM mod. 347-CDG Microprocessada) sob irradiância de 98 $\text{mmoles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ e 12 horas de fotoperíodo.

5.1.2 Preparo do meio WC

O meio WC foi preparado por adição de 1 ml de cada uma das soluções estoque n° 1 a 6 (Tabela 6) e de 1 ml da solução 8 (Tabela 7) e diluídos para um litro com água destilada. Essa solução foi autoclavada a 120°C por 15 minutos. Após a esterilização, foram adicionados 1,0 ml de cloreto férrico (sol. n° 7) e 1,0 ml da solução de micronutrientes (sol. n° 9) (Tabela 8). O pH foi ajustado para 7.0 com solução de HCl ou NaOH 0,1 mol/L e tamponado com o tampão MOPS(ácido 3-(N-morfolino)propano-sulfônico), pKa = 7.2 a 25°C.

Tabela 6 - Preparo do meio WC para cultivo de *M novacekii*. Composição das Soluções estoque de 1 a 7:

Solução	Substância	Conc. da solução estoque (mg/L)
1	CaCl ₂ .2H ₂ O	36,76
2	MgSO ₄ .7H ₂ O	39,97
3	K ₂ HPO ₄	8,71
4	NaNO ₃	85,01
5	NaSiO ₃ .9H ₂ O	28,42
6	NaHCO ₃	12,60
7	FeCl ₃ .6H ₂ O	3,15

Tabela 7 - Composição da solução estoque 8

Substância	Concentração (mg/L)
Na ₂ EDTA	4,36 mg/L
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,01 mg/L
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,022 mg/L
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,01 mg/L
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,18 mg/L
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,006 mg/L
H ₃ BO ₃	1,0 mg/L

Tabela 8- Composição da solução estoque 9

Substância	Concentração (mg/L)
Tiamina.HCl	0,1 mg/L
Biotina	0,0005 mg/L
Vitamina B ₁₂	0,0005 mg/L

Todos os procedimentos são realizados em condições assépticas em capela de fluxo laminar equipada com luz ultravioleta(UV).

5.2 Vidrarias

Toda vidraria utilizada foi submetida à imersão em banho de hipoclorito de sódio (5%), lavada com detergente neutro Extran (Merck), e enxaguada exaustivamente com água de torneira seguido por água destilada. Toda vidraria foi esterilizada em autoclave a 121 °C por 20 minutos.

5.3 Pesticidas

5.3.1 Metilparation

O metilparation foi isolado de preparação comercial Folidol 600®(Bayer) 60%(m/v). Procedimento descrito no item 5.6.

A solução estoque de MP foi preparada pela diluição em metanol de 40.00mg do produto purificado, completando-se o volume para 10.00mL, obtendo-se uma concentração final de 4.00g/L.

5.3.2 Trifluralina

O padrão de trifluralina foi gentilmente cedido pela empresa MILENIA AGROINDUSTRIA LTDA. A solução estoque da trifluralina foi preparada pela diluição de 10.00mg do pesticida, completando-se o volume para 10.00mL obtendo-se concentração final de 1.00g/L.

5.4 Instrumentação

5.4.1 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM)

Para determinação analítica dos pesticidas foi utilizado cromatógrafo Trace-GC (Thermo Finnigan) equipado com injetor, com e sem divisão (split/splitless) e com detector seletivo de massas PolarisQ GC-MS. O detector foi mantido no modo de varredura (scan), utilizando a técnica por impacto de elétrons com energia de 70eV. Utilizou-se a coluna HP-5MS (Agilent Technologies INC.) com dimensões 30m x 0.25 mm x 0.25 um.

Soluções padrão do metilparation (2.00mg/L) e da trifluralina (0.60mg/L) em metanol foram analisadas por injeção direta de 2 μ L.

5.4.2 Espectrometria de massas com ionização por eletrospray(ESI-MS)

As análises foram realizadas em Espectrômetro de Massas, modelo LCQ-FLIT (Thermo scientific), com ionização por eletrospray e analisador ION TRAP.

Utilizou-se o modo positivo com adição de Ácido Fórmico 0.1M , na proporção de 1:1, com injeção direta com seringa(Hamiltol de 500 μ L).

5.4.3 Ressonância nuclear magnética (RMN)

Os espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C e RMN ^{31}P foram registrados no aparelho BRUKER AVANCE DRX-200 (Laremar, Departamento de Química, ICEX, UFMG), utilizando-se como referência interna o tetrametilsilano (TMS). O RMN foi feito para verificar a pureza do metilparation isolado de uma formulação comercial.

5.4.4 Curvas de calibração

As curvas de calibração foram realizadas nas mesmas condições de instrumentação para ambos os pesticidas. As concentrações testadas para o metilparation foram: 2.00mg/L, 1.00mg/L, 0.50mg/L, 0.25mg/L e 0.10mg/L. Para a trifluralina: 0.50mg/L, 0.25mg/L, 0.10mg/L, 0.05mg/L e 0.025mg/L.

5.4.5 Procedimento estatístico

Foram realizadas análises de variância (ANOVA) e aplicados o Teste t de student para comparação das médias dos procedimentos analíticos, curvas de calibração e correlações para dos testes de biodegradação e toxicidade.

5.4.6 Microextração em fase sólida (MEFS)

Os pesticidas foram extraídos do meio de cultura utilizando-se microextração em fase sólida Polidimetilsiloxano (PDMS) 100 μm (Supelco) usando-se suporte manual. A fase sólida foi condicionada a 250°C por 3-4 horas no injetor do cromatógrafo com divisão de fluxo aberta split.

5.5 Curva de crescimento da cultura de *M. novacekii*

5.5.1 Contagem celular

A curva de crescimento da cianobactéria foi monitorada pela contagem microscópica das células e pela densidade ótica no comprimento de onda 680 nm. Para contagem das células foram retiradas amostras do meio de cultura (2.00 ml), após homogeneização, as amostras foram adicionadas de 3 gotas de solução de Lugol, para fixação das células e para hidrólise alcalina da mucilagem foram adicionados 1,0 ml de solução de NaOH 0,1 mol/L e aquecimento em banho-maria a 80°C por 5 minutos.

Após a digestão da mucilagem, as amostras foram submetidas à agitação mecânica em Vortex por 1 minuto e contadas por meio de microscopia ótica em câmaras de Fuchs-Rosenthal.

5.5.2 Monitoramento por densidade ótica

A densidade ótica da cultura foi determinada em amostras de 5.00mL de cultura, retirados após homogeneização, transferidos para cubetas de quartzo com diâmetro de 10 mm para os ensaios de biodegradação e de 50 mm para ensaios de toxicidade. As amostras foram analisadas em espectrofotômetro UV/Visível Hitachi U-200 em comprimento de onda de 440 e 680nm.

Curvas de crescimento com duração de dez dias foram realizadas para a cianobactéria em estudo na ausência dos pesticidas para definição do comprimento de onda 440nm ou 680nm de melhor correlação com a contagem por microscopia.

O comprimento de onda 680nm foi selecionado e foram realizadas curvas na ausência e na presença do metilparation e trifluralina. Concentrações intermediárias das utilizadas nos ensaios de biodegradação foram utilizadas nesta etapa.

As amostras da cultura de *Microcystis novacekii* foram coletadas em dias alternados (1, 3, 5, 7 e 9), e foram avaliados por contagem celular e densidade ótica.

Os dados de densidade ótica e contagem celular foram analisados por regressão linear, sendo determinado o fator de conversão entre as variáveis.

5.6 Purificação do Metilparation

Adicionaram-se a 200,0mL da emulsão comercial do metilparation (Folidol 600®) 30 g de sulfato de sódio p.a. Após filtração, a solução do pesticida foi extraída com hexano (5X50mL). A fração hexânica foi lavada com água destilada (3X50mL) e secada com 30 gramas de sulfato de sódio. Após filtração e remoção do solvente em evaporador rotatório, o resíduo foi incorporado em coluna de sílica-gel e submetido a cromatografia.

A coluna foi eluída com o sistema hexano/clorofórmio. Para monitoramento da coluna cromatográfica utilizou-se cromatografia em camada delgada (CCD) revelada com solução de NaOH 10% e aquecimento.

O metilparation foi obtido das frações F127 a F168 as quais foram reunidas, dissolvidas em metanol e resfriados em geladeira, levando a cristalização do metilparation. Os cristais foram separados, lavados com metanol, secados sob vácuo e caracterizados por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-MS) e por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio, carbono e fósforo (RMN ^1H , ^{13}C e ^{31}P)

5.7 Ensaio de Biodegradação-

5.7.1 Preparação da cultura para os experimentos com pesticidas. Cultura-Teste

Após 2 horas de aeração da cultura-mãe, 2 alíquotas de 2 mL foram retiradas para contagem em microscópio óptico, obtendo-se a concentração de 10^7 células/mL, num volume total de 400mL. Volumes adequados de cultura mãe foram transferidos para o meio de cultura recém preparado para obtenção de uma concentração final de 10^5 cél/mL. Essas culturas-teste, então foram mantidas nas condições de cultivo, erlenmeyers de 2 mL, para inoculação do pesticida no 4° dia de crescimento.

5.7.2 Concentrações testadas

Volumes adequados da solução estoque dos pesticidas foram adicionados às culturas teste no quarto dia de cultivo, e transferidos para erlenmeyers de 200mL, a fim de se obter a concentração final dos pesticidas nos frascos testes (Tabela 9). Em seguida o volume é completado com a cultura de *M. novacekii*, em fase exponencial de crescimento (4° dia de cultivo).

Tabela 9. Concentrações testadas dos pesticidas nos ensaios de biodegradação

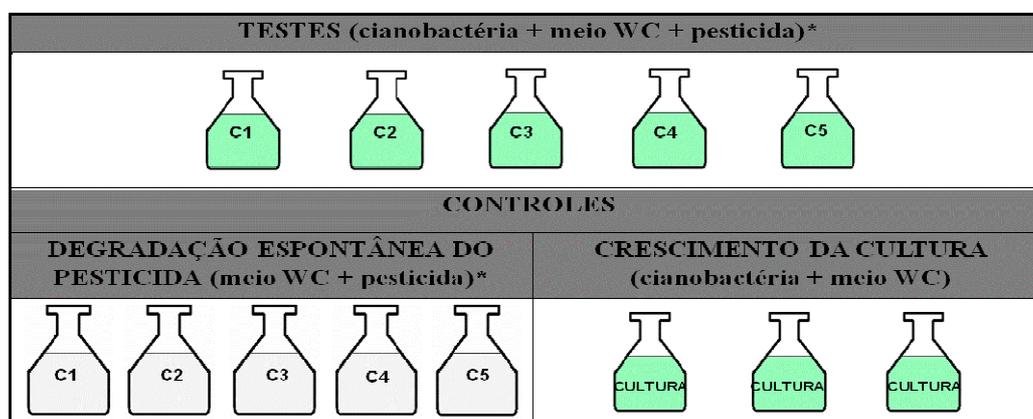
	Metilparation	Trifluralina
Solubilidade em água(mg/L)	50.00	0.60
Concentração Teste(mg/L)		
C1	2.00	0.50
C2	1.00	0.25
C3	0.50	0.10
C4	0.25	0.05
C5	0.10	0.025

Tanto para o Metilparation quanto para a Trifluralina foram testadas 5 concentrações. A escolha das concentrações foi baseada na solubilidade destes pesticidas em água. As concentrações escolhidas, abaixo do limite de solubilidade, encontram-se acima dos valores de contaminação encontrados nos corpos d'água.

As mesmas concentrações utilizadas nos frascos teste, também foram avaliadas nos controles de degradação espontânea dos pesticidas. Os experimentos foram realizados em triplicatas. (

Figura 10)

Figura 10: Esquema do ensaio de biodegradação. * Triplicatas para cada concentração.



5.7.3 Coleta de amostras

As culturas-teste foram mantidas nas condições de cultivo (temperatura a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas utilizando lâmpadas fluorescentes, $\text{pH} = 7.5 \pm 0.5$) durante 9 dias. Alíquotas de 10,0 mL dos testes e controles de degradação espontânea foram coletadas nos dias 1, 5 e 9, após homogeneização e filtradas em filtro de $0,45 \mu\text{m}$ (Millipore). O filtrado foi submetido a microextração em fase sólida para determinação analítica do pesticida. Adicionalmente foram retiradas as amostras para contagem celular e determinação da densidade ótica em dias alternados: dias 1, 3, 5, 7, 9. Todos os procedimentos foram realizados de forma asséptica utilizando capela de fluxo laminar e vidraria estéril.

5.8 Procedimento Analítico

5.8.1 Extração dos pesticidas em fase sólida

Utilizou-se um suporte manual para MEFS. A fase sólida PDMS (polidimetilsiloxano) foi imersa em cerca de 10 ml do meio de cultura, adicionada de NaCl e submetida às condições de extração (Tabela 10).

Tabela 10. Condição de microextração em fase sólida dos pesticidas

Pesticida	Condição de extração
Metilparation	Concentração de NaCl: 30%(m/v) Tempo de extração: 45 minutos Temperatura: 60°C Agitação:500rpm
Trifluralina	Concentração de NaCl: 15%(m/v) Tempo de extração: 25 minutos Temperatura: 60°C Agitação:500rpm

5.8.2 Condições de análise

Para análise dos pesticidas por CG-MS foram utilizadas as condições experimentais descritas na Tabela 11.

Tabela 11. Condições experimentais de análise do pesticida por GC-EM

Pesticida	Condições de análise (Temperatura do forno)
Metilparation	80°C por 2 minutos, 15°C por minuto até 190°C ,seguido de 10°C por minuto até 220°C e finalmente 10°C/min até 260°C mantendo a 260°C por 7 minutos.
Trifluralina	80°C,aumentando a 20 °C por minuto até 220 °C por 1 minuto, seguidos de 30 °C por minuto até 280, mantendo por 5 minutos.

5.9 Ensaio de Toxicidade

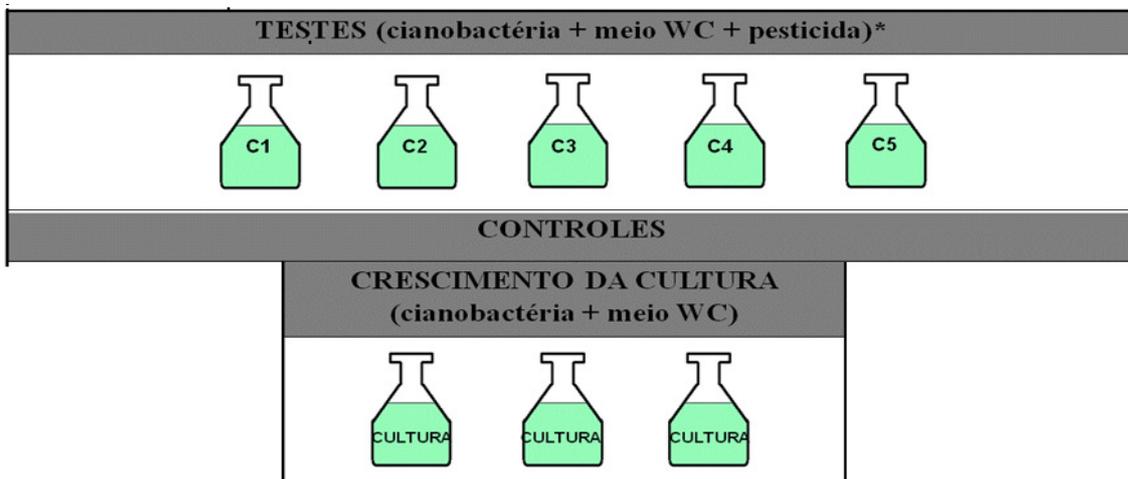
Às culturas-teste no quarto dia de crescimento foram adicionados volumes adequados da solução estoque dos pesticidas a fim de se obter a concentração final desejada dos pesticidas nos frascos testes, erlenmeyers de 200mL (Tabela 12). As concentrações testadas, em progressão geométrica, foram escolhidas para que atendessem a faixa de 5 a 75% de inibição do crescimento da cianobactéria (OECD 201, 2006). Os frascos foram mantidos em constante agitação em uma mesa giratória (Marconi- L200).

Tabela 12. Concentrações testadas no ensaio de toxicidade do metilpration.

Metilparation	
Concentração Teste	(mg/L)
C1	50.00
C2	25.00
C3	12.50
C4	6.25
C5	3.125

O experimento de toxicidade foi efetuado em triplicata seguindo os procedimentos descritos no item 5.7, alterando-se a concentração do pesticida. (Figura 11 e Tabela 12)

Figura 11. Esquema do ensaio de Toxicidade



* Triplicata para cada concentração

As culturas foram mantidas nas condições de cultivo (temperatura a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo de 12 horas utilizando lâmpadas fluorescentes, $\text{pH} = 7.5 \pm 0.5$) durante 72 horas. Amostras de 5 mL foram retiradas, de 24 em 24 horas, para monitoramento por densidade ótica (680 nm).

5.9.1 Determinações da EC₅₀ (Dose de pesticida que tem como resposta 50% de inibição do crescimento da *M. Novacekii*)

Seguindo o protocolo da OECD 201 (2006), calculou-se primeiramente a taxa de crescimento da cianobactéria nos testes e controles, durante o ensaio, utilizando-se a Equação 1 :

Equação 1.

$$\mu_{i-f} = (\ln X_f - \ln X_i) / (t_f - t_i)$$

Onde:

μ_{i-f} é a taxa de crescimento no período considerado.

X_i é a medida da biomassa no tempo inicial

X_f é a medida biomassa no tempo final

t_f é tempo final

t_i é o tempo inicial

As taxas de crescimento dos testes foram comparadas com as do controle obtendo a percentagem de inibição do crescimento utilizando a Equação 2.

Equação 2.

$$\%I = [(\mu_c - \mu_t) / \mu_c] \times 100$$

Onde:

$\%I$ é a percentagem de inibição do crescimento

μ_c é a taxa média de crescimento dos controles

μ_t é a taxa média de crescimento dos testes

A percentagem de inibição do crescimento em função do logaritmo das concentrações (mg/L) dos pesticidas foram inseridas em um gráfico e o valor da concentração que levou a 50% de inibição foi estabelecida por interpolação, utilizando-se a equação da reta.

6 Resultados e Discussões

6.1 Curva de crescimento *M.novacekii*

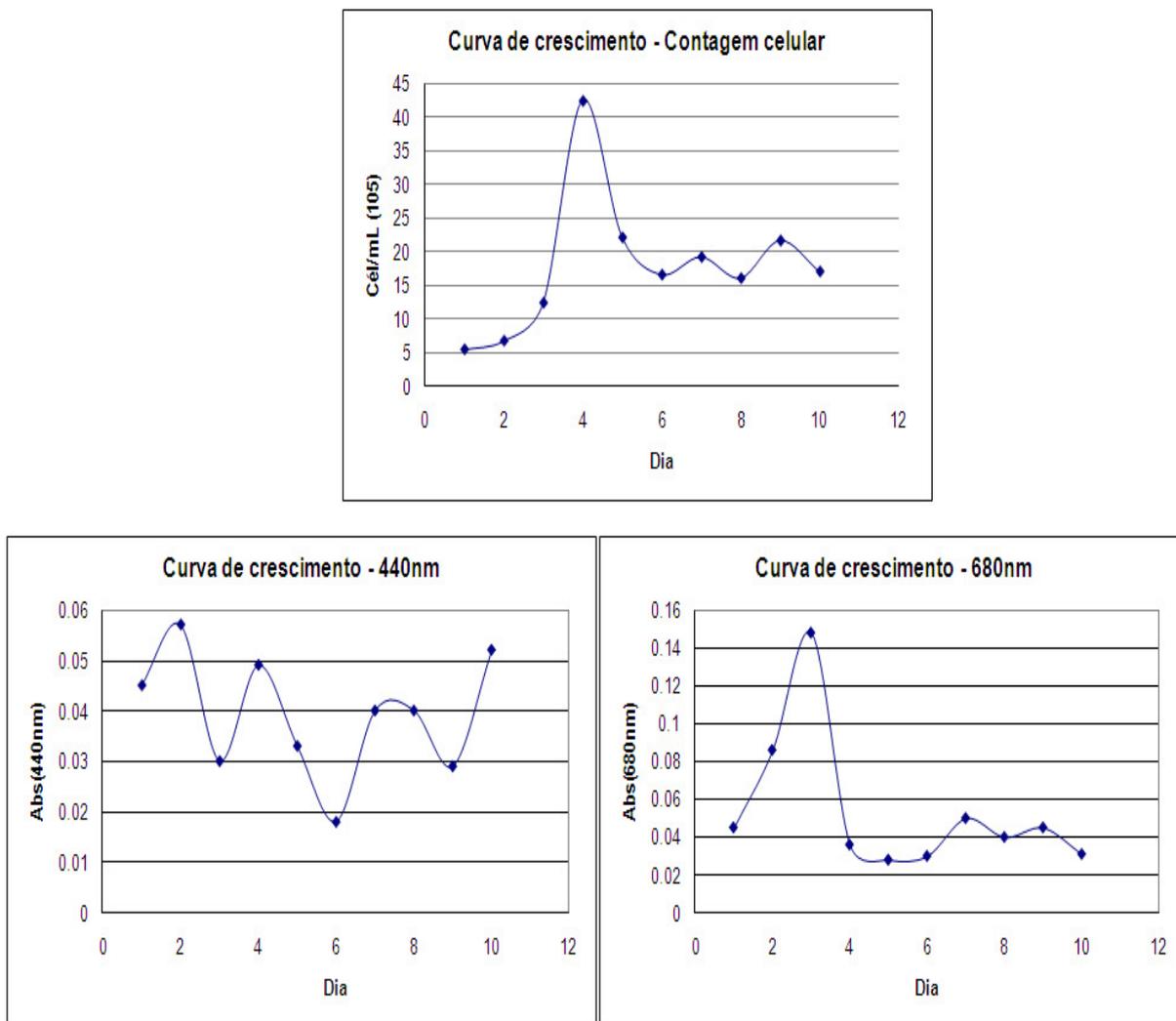
6.1.1 Escolha do comprimento de onda para monitorar o crescimento da cultura de *M. novacekii*

As cianobactérias são organismos fotossintetizadores, sendo a clorofila o principal responsável pela absorção de energia luminosa. A clorofila funciona também como centro de reação fotossintética e possui dois picos de absorção: um na região do azul (433 nm), e outro na região do vermelho (686 nm). (RICHARDSON,1996)

Estudos demonstram a viabilidade de se monitorar a curva de crescimento de cianobactérias por meio de densidades ótica (MA et. al 2004, 2005, 2006), particularmente na região do espectro de absorção da clorofila. No presente trabalho foi verificada a relação entre a curva de crescimento da *Microcystis novacekii* por contagem microscópica em câmara de Fuchs-Rosenthal e sua absorbância em 440nm e 680nm, comprimento de onda de absorção da clorofila *a*.

Não foi observada correlação entre a absorbância a 440nm e a contagem ao microscópio. Os experimentos foram realizados em triplicatas, e os resultados apresentados correspondem às médias obtidas. Em 680nm, que corresponde ao segundo pico da clorofila *a*, a densidade ótica mostrou-se mais regular, com coeficiente de correlação linear $R^2 = 0,97$, conforme pode ser observado na Figura 12.

Figura 12. Comparação da absorvância em 440 e 680nm com a contagem celular.



Estudos de MA et. al , 2004, 2005,2006, demonstraram também uma boa correlação entre o crescimento da cultura monitorado por contagem celular e a densidade ótica, corroborando com os dados do presente estudo.

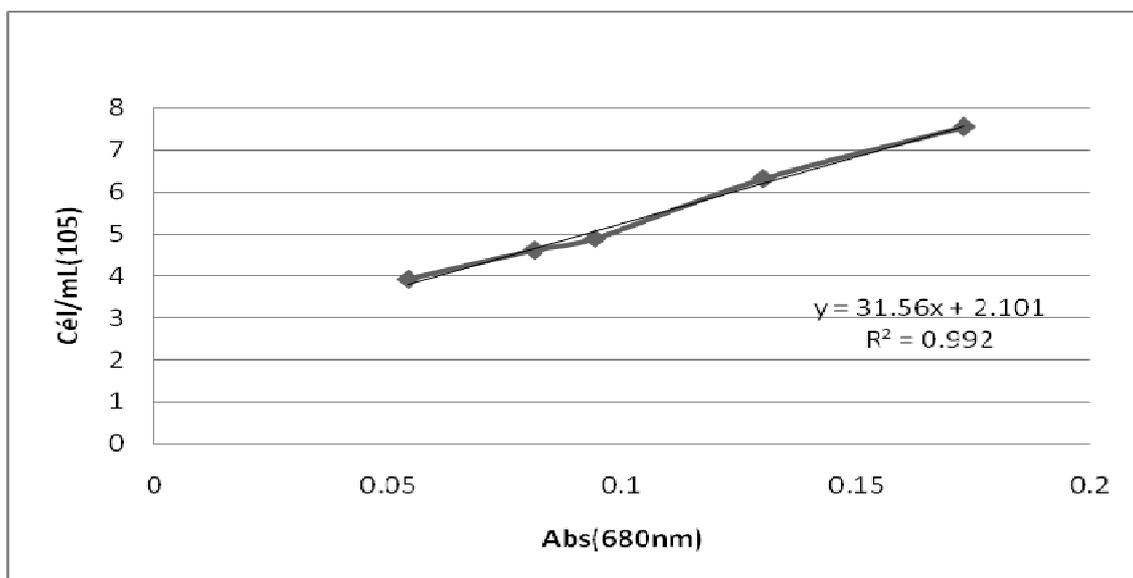
Deste modo, foi estabelecido o monitoramento do crescimento das culturas de *Microcystis novacekii* por densidade ótica no comprimento de onda 680 nm.

A contagem de células ao microscópio, embora um método simples e muito utilizado tenha a desvantagem de ser trabalhosa, demorada e apresentar grande variabilidade entre as contagens. Mediante o volume de experimentos, a seleção de um método mais prático e rápido é fundamental. A relação da absorbância da cultura em 680nm e o número de células se torna uma ferramenta importante de trabalho para a monitoração do crescimento celular.

Foi avaliada a correlação tanto na cultura sem os pesticidas quanto na presença dos mesmos, já que a exposição a xenobióticos poderiam interferir no espectro de absorção.

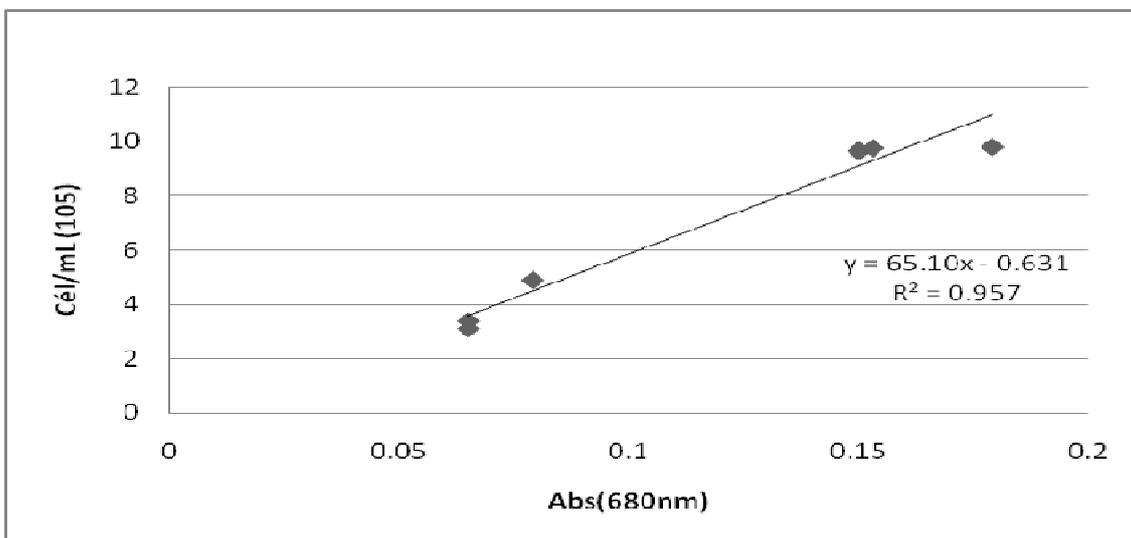
A leitura em 680nm e a contagem por microscopia nas culturas (sem os pesticidas) demonstraram uma boa correlação linear direta ($R^2=0,9964$). (Figura 13)

Figura 13. Correlação entre o crescimento monitorado por densidade óptica (Abs 680nm) e a contagem celular ao microscópio da cultura de *M.novacekii* sem a adição de pesticidas.



O mesmo foi verificado para o crescimento celular na presença de 2.00mg/L de metilparation. Observa boa correlação linear direta ($R^2 = 0,957$). (Figura 14)

Figura 14. Correlação entre o crescimento monitorado por densidade óptica (Abs 680nm) e a contagem celular ao microscópio da cultura de *M.novaceki* na presença do metilparation



Com a Trifluralina(0.60mg/L), manteve-se a correlação entre estas duas variáveis.(Figura 15)

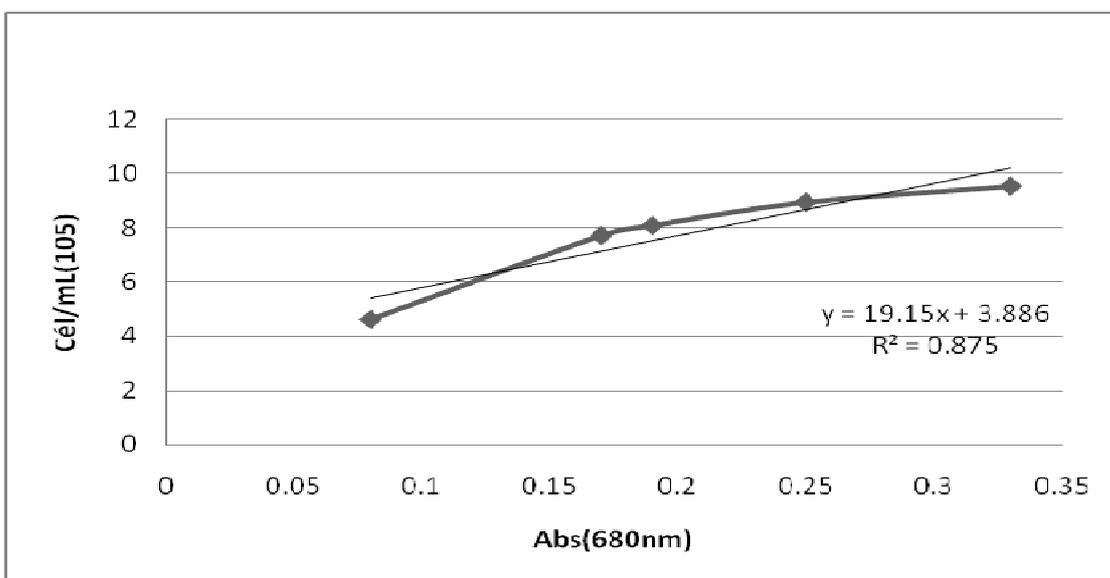
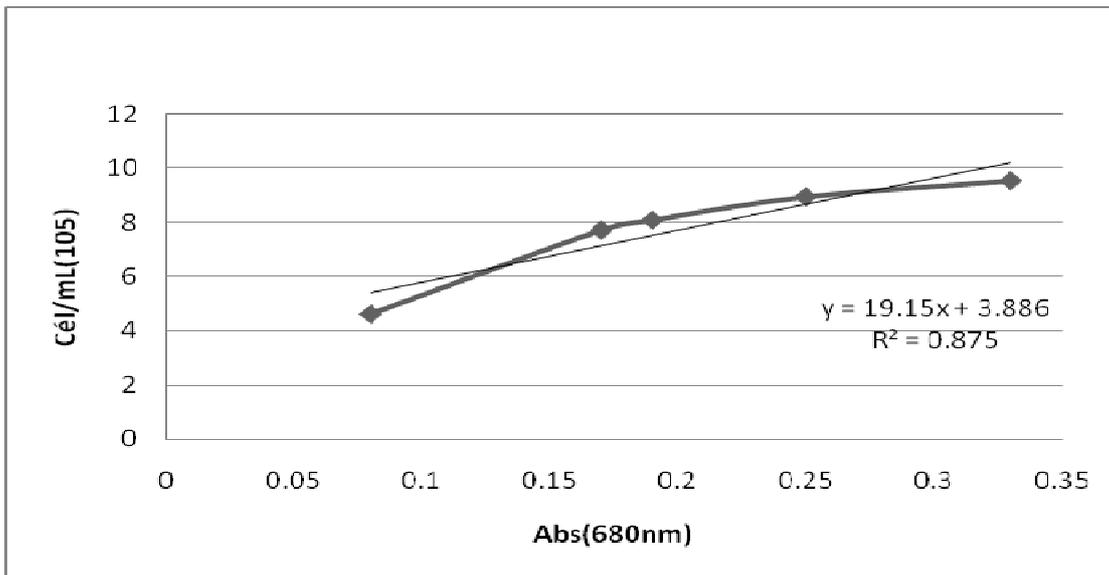


Figura 15. Correlação entre o crescimento monitorado por densidade óptica (Abs 680nm) e a contagem celular ao microscópio da cultura de *M.novaceki* na presença da trifluralina



6.2 Purificação do metilparation

O metilparation foi obtido a partir da formulação comercial Folidol 600®, com elevado teor de pureza. Após a cristalização do pesticida obteve-se 5,3317g do metilparation em forma de cristais na forma de agulhas.

A pureza do metilparation foi estimada utilizando a cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS), e por RMN de ¹³C, ¹H e ³¹P.

A injeção direta de 2 µL da solução padrão de metilparation 2mg/L no cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas, permitiu a observação de apenas um pico no cromatograma no tempo de retenção 12.51 minutos, indicando elevada pureza da solução. (Figura 16)

Comparando-se a fragmentação característica do metilparation na biblioteca eletrônica NIST (National Institute of Standards and Technology) com o espectro de massas obtido no tempo de retenção 12.51 minutos, observa-se alto grau de concordância indicando tratar-se do pesticida metilparation. (Figura 17 e Figura 18)

Figura 16. Cromatograma obtido a partir de uma solução padrão de metilparation (2mg/L).

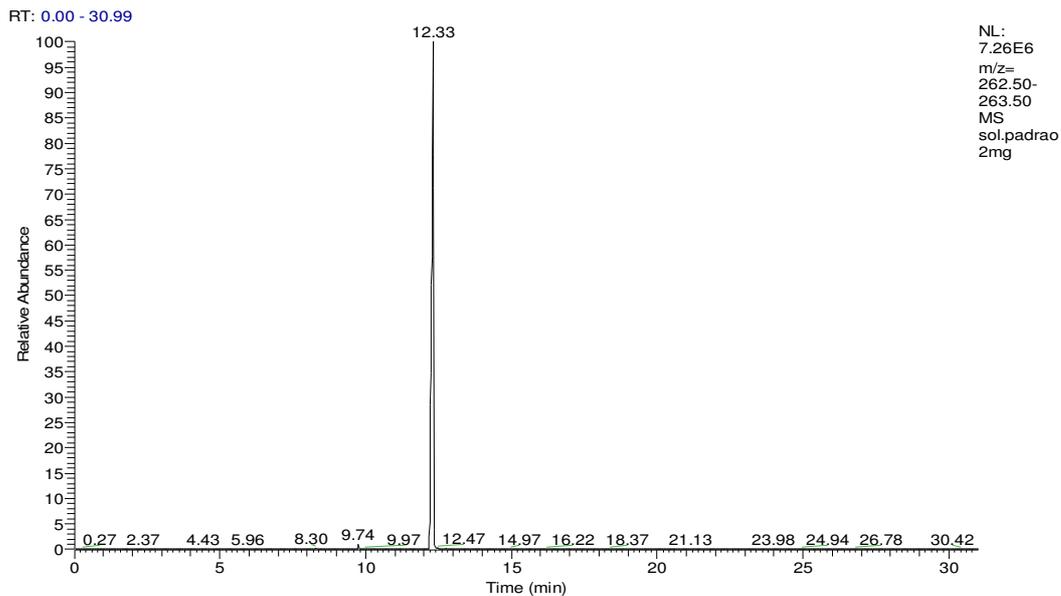


Figura 17 . Fragmentação característica do metilparation. Fonte NIST

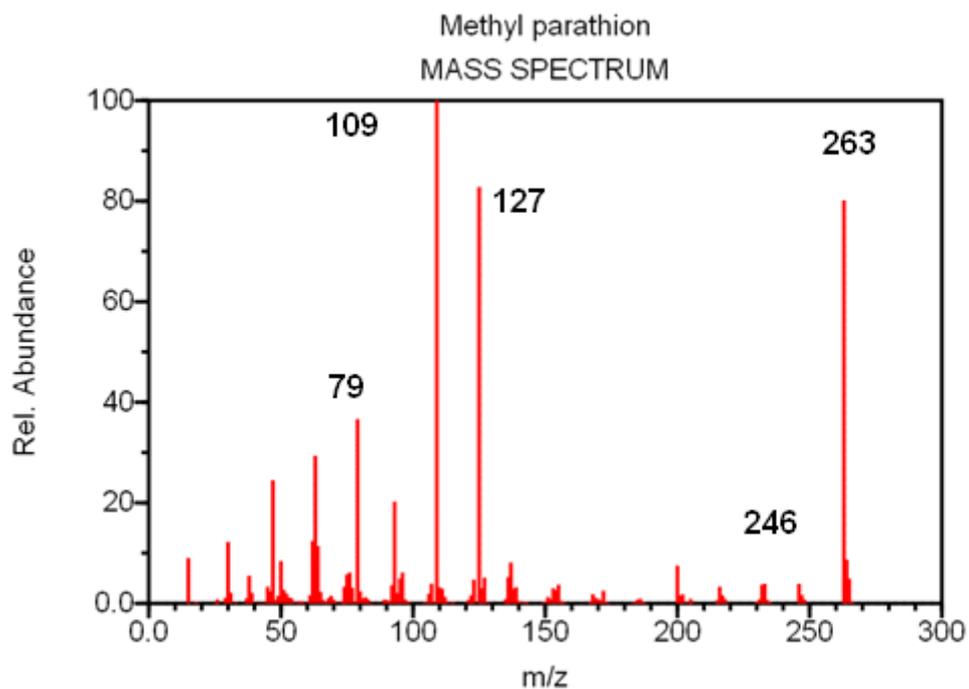
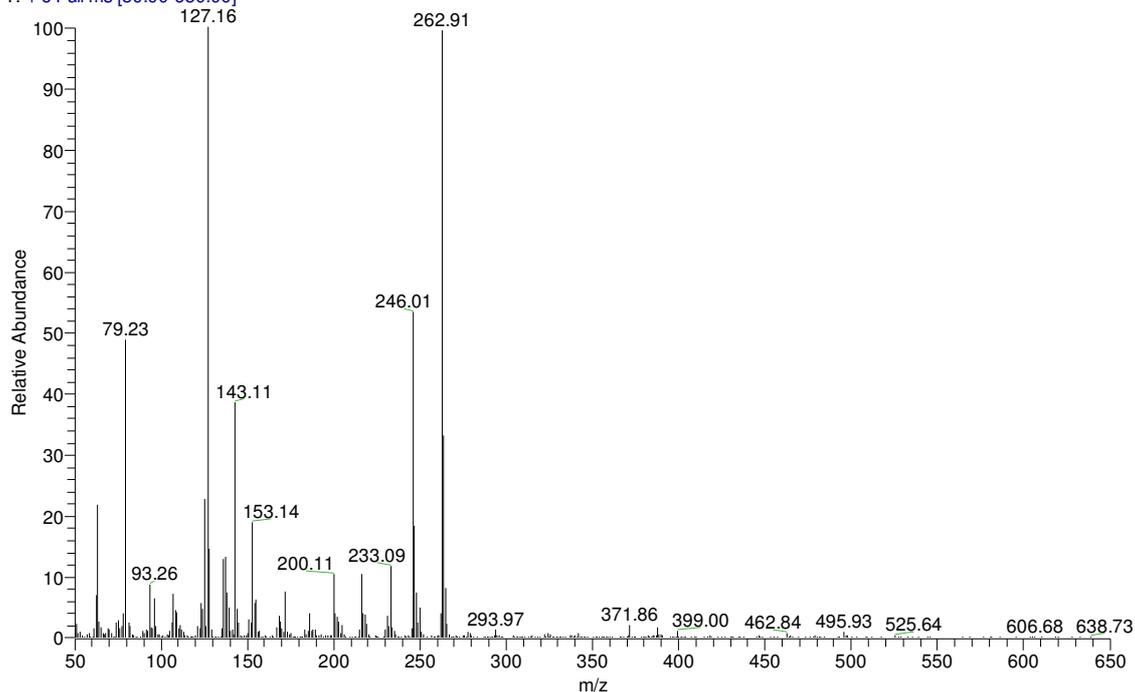


Figura 18. Fragmentação do metilparation no tempo de retenção de 12.51 minutos

sol.padrao 2mg #1240 RT: 12.33 AV: 1 SB: 548 12.89-18.22 , 12.14 NL: 7.29E6
T: + c Full ms [50.00-650.00]



6.2.1 RMN(Ressonância magnética nuclear)

As análises do metilparation por RMN ^{13}C , ^1H e ^{31}P , foram realizadas para confirmar o resultado obtido por CG-MS, que indica que o isolamento do metilparation foi realizado com sucesso. No espectro de RMN ^1H verifica-se a presença do deslocamento de 8 hidrogênios (Figura 19 e Figura 20). Em 8.2δ observa-se um duplete correspondente aos hidrogênios *Ha*, na posição orto ao grupo nitro. Um duplete em 7.3δ foi atribuído aos hidrogênios *Hb*. E os hidrogênios metílicos são observados com dois singletos em 3.93 e 3,86δ.

Figura 19. Estrutura do metilparation com identificação dos hidrogênios.

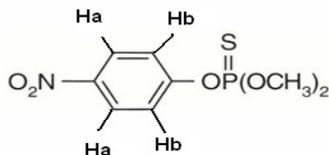
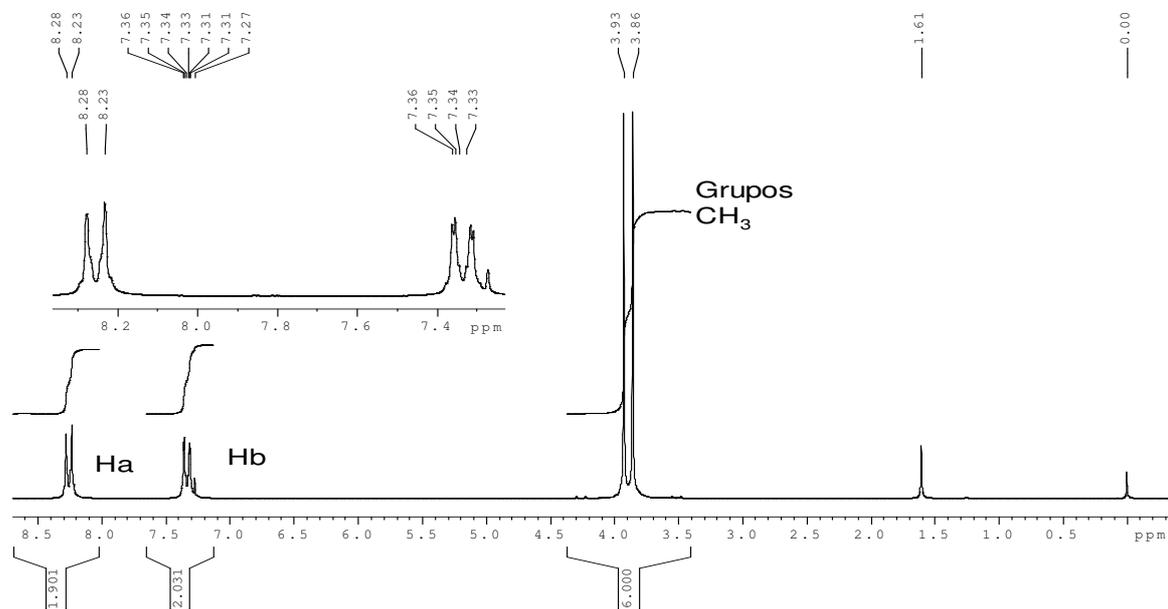
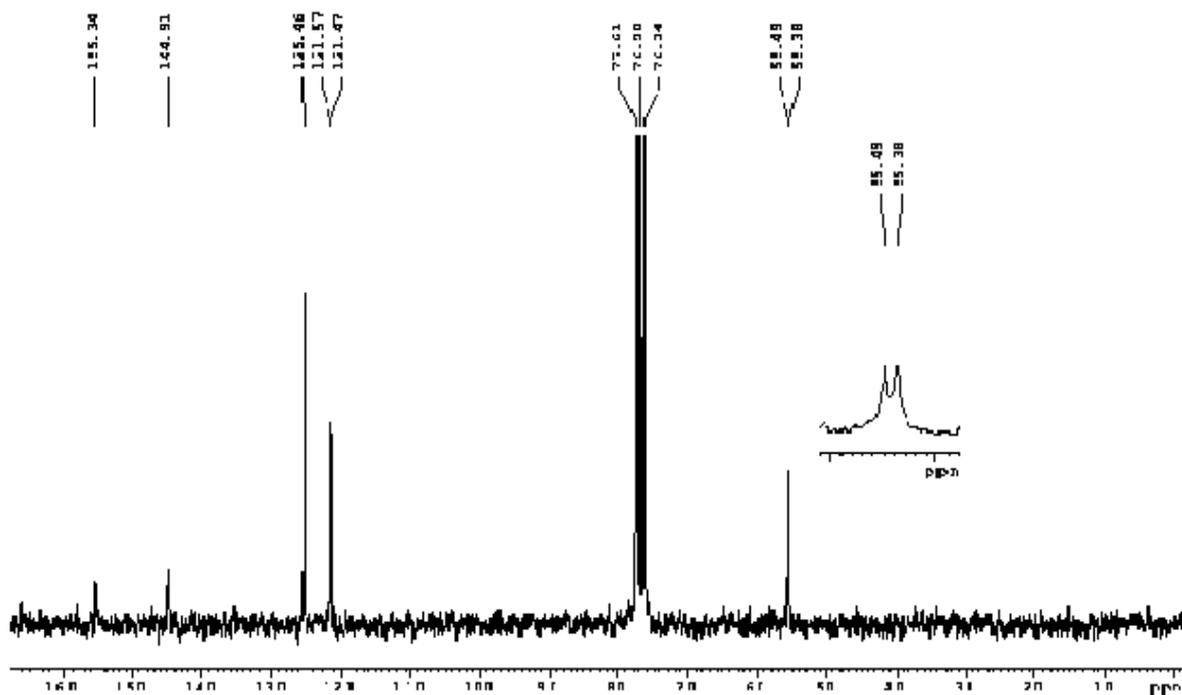


Figura 20. Espectros RMN ^1H 

Também foram realizados espectros de RMN ^{13}C e RMN ^{31}P , que confirmaram a presença do deslocamento químico de oito átomos de carbono (



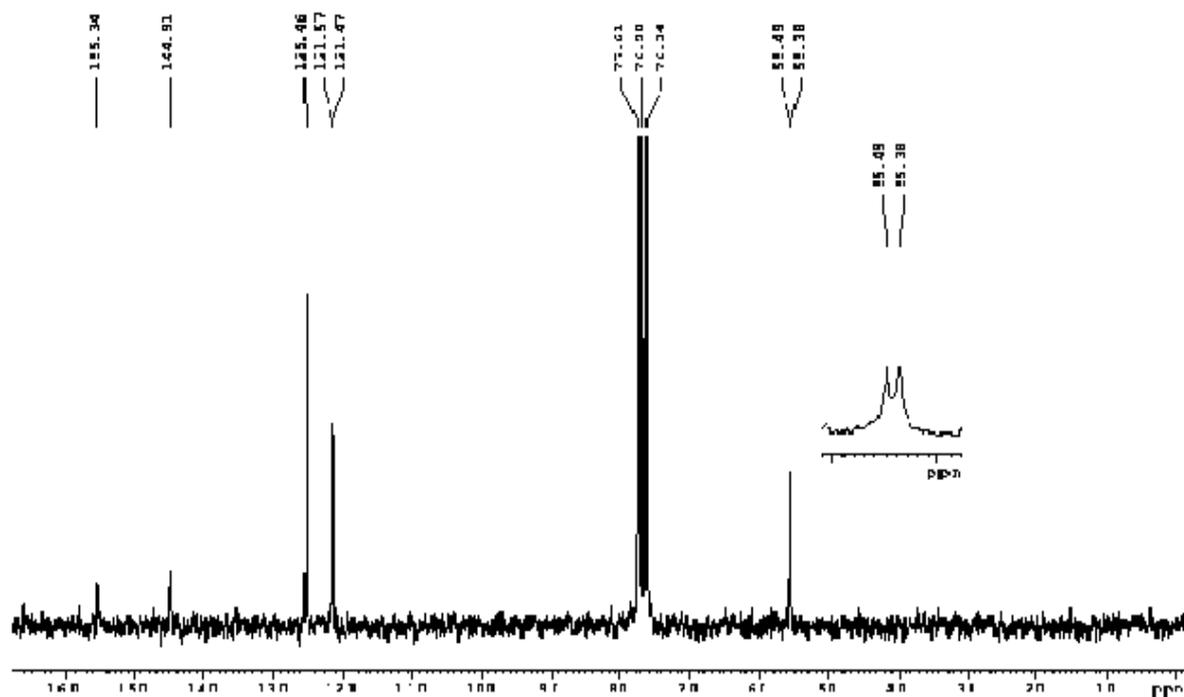


Figura 21. Espectro de RMN ^{31}P

Os procedimentos analíticos indicam pureza compatível com o uso do metilparation, como padrão nos experimentos de biodegradação.

6.3 Ensaios de biodegradação

6.3.1 Metilparation

O ensaio de biodegradação do metilparation transcorreu em um período de 9 dias. Amostras dos controles de degradação espontânea e dos testes do pesticida nas concentrações de 2.00mg/L, 1.00mg/L, 0.50mg/L, 0.25mg/L e 0.10mg/L foram coletadas nos dias 1 (imediatamente após montagem do ensaio), 5 e 9 para determinação analítica dos pesticida. Após microextração em fase sólida as amostras foram submetidas a CG-EM.

Ao logo do ensaio foi verificado o decaimento da área do pico do metilparation em 12.3 minutos dos testes em relação ao controle. (

Figura 22). A mesma tendência foi observada em todas as concentrações do pesticida. No decorrer do teste procedeu-se a monitoração da área do pico do metilparation de forma automática pelo software do CG-MS, observando-se o decaimento da sua área nos frascos testes em relação ao controle.

Na concentração de 1.00 mg/L no primeiro, quinto e nono dia de ensaio a tendência de decaimento nos testes pode ser observada nas Figuras 23, 24 e 26. Observa-se já no primeiro dia de experimento a ocorrência de outros picos nos tempos de retenção 8.28, 8.58, 9.21, 10.09, 10.72, 11.90, além do pico característico do metilparation em 12.72 minutos tanto nos testes quanto nos controles (Figura 22 e Figura 23). Tais picos são referentes a impurezas da fibra de PDMS 100µm ou a componentes do meio de cultura e produtos do metabolismo da cianobactéria. Estes picos não podem ser atribuídos a produtos de degradação do metilparation, já que ocorrem igualmente nos controles e nos testes. O pico com tempo de retenção de 12.30 minutos possui uma abundância relativa de 100% em relação aos demais.

Figura 22. Controle de degradação espontânea (1.0mg/L) : Cromatograma do primeiro dia de ensaio com pico referente ao metilparation (12.26minutos)

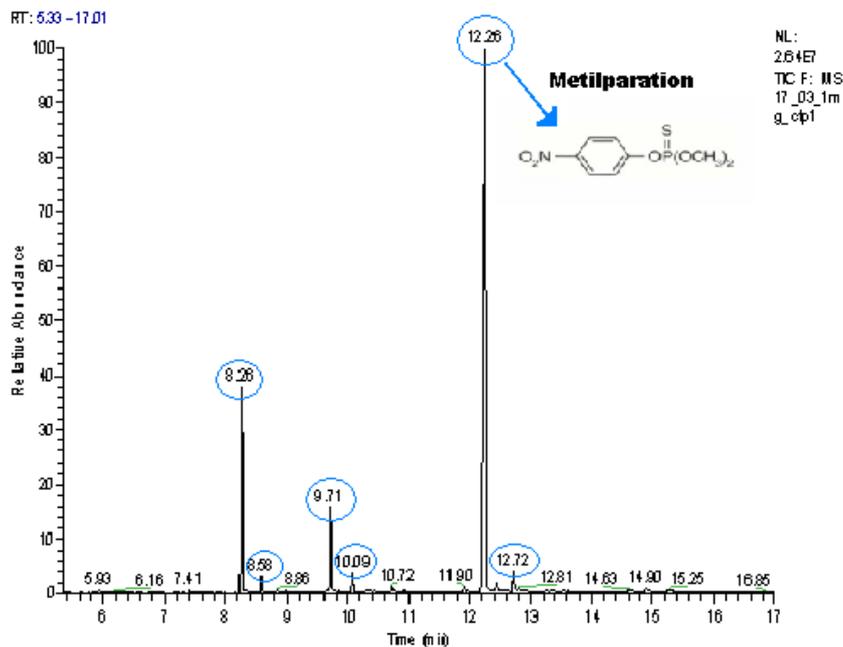
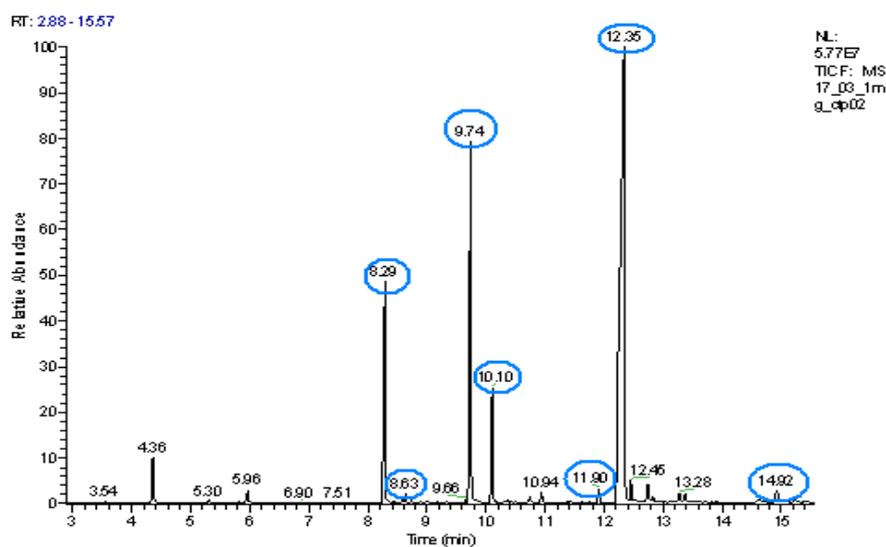


Figura 23. Teste (1.0mg/L). Cromatograma do primeiro dia de ensaio.

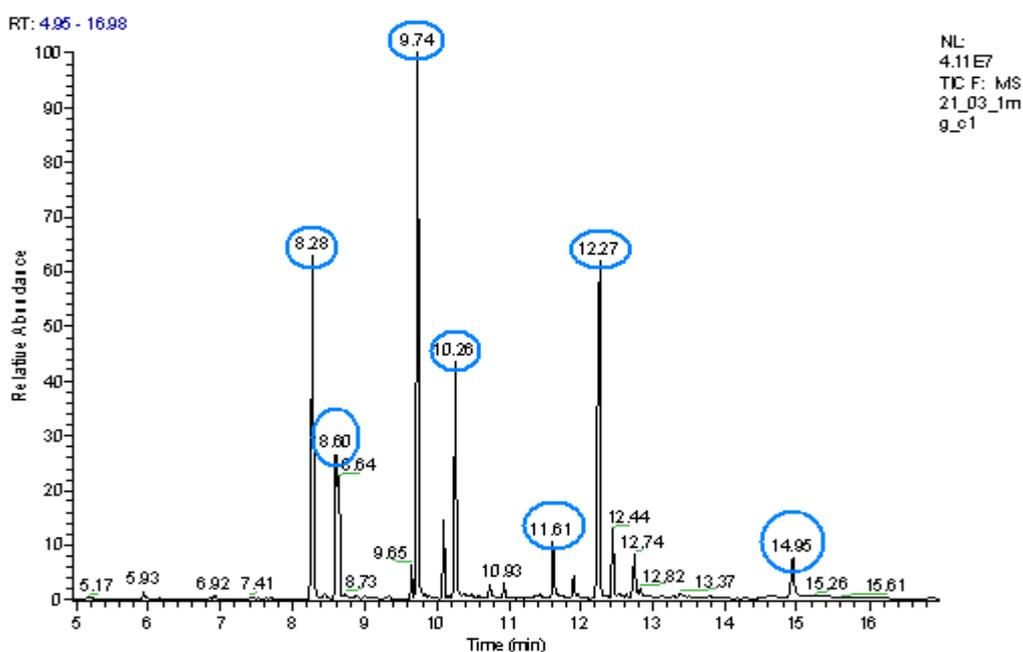


* Pico do metilparation em 12.36minutos.

No quinto dia de ensaio observa-se nos testes o decaimento do pico referente ao metilparation (Figura 24). A abundância relativa do mesmo caiu de 100% no primeiro dia para 60% no quinto dia. Os demais picos conseqüentemente, se sobressaem com 100% de abundância.

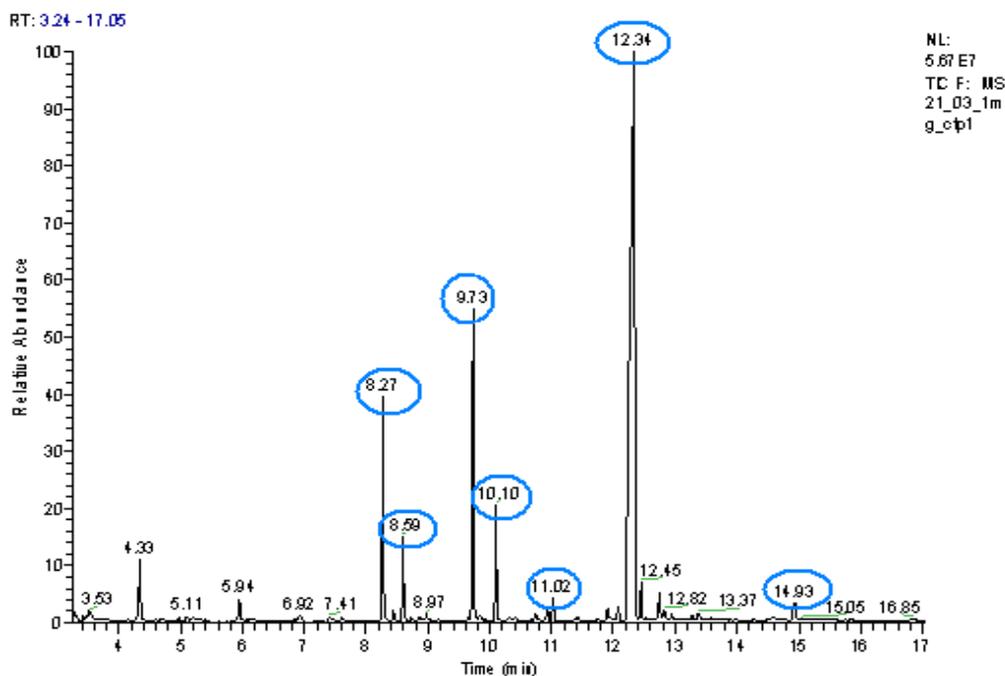
Nos controles não se verifica decaimento significativo da abundância relativa do pico referente ao metilparation (Figura 25) e os mesmos picos encontrados no teste também são observados no controle.

Figura 24. Teste(1mg/L). Cromatograma no quinto dia de ensaio.



* Pico do metilparation em 12.27 minutos

Figura 25. Controle de degradação espontânea (1.00mg/L). Cromatograma no quinto dia de ensaio.



* Pico do metilparation em 12.34 minutos

No nono dia de ensaio não se observa a presença do pico do pesticida no teste (Figura 26). Nos controles a abundância relativa do metilparation continua estável (100%) (Figura 27). Todas as concentrações testadas apresentaram o mesmo perfil, com decaimento acentuado da concentração do inseticida nos testes observados no 5° e 9° dias, com os controles se mantendo estáveis.

Estes resultados indicam que a cianobactéria *Microcystis novacekii* foi capaz de remover o pesticida metilparation do meio. A degradação espontânea do metilparation não parece ser significativa até o nono dia.

Figura 26. Teste(1.00mg/L). Cromatograma no nono dia de ensaio.

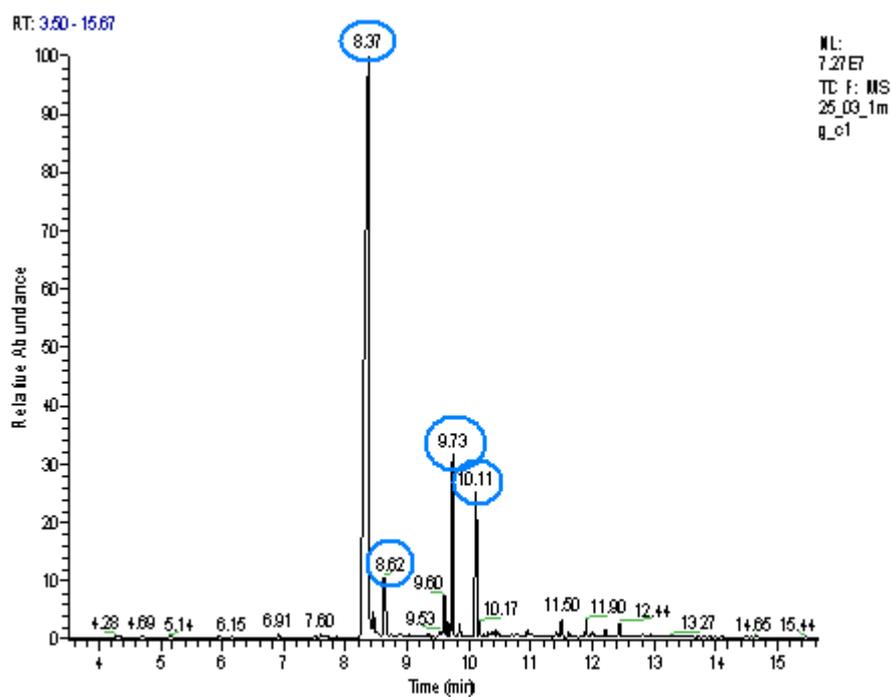
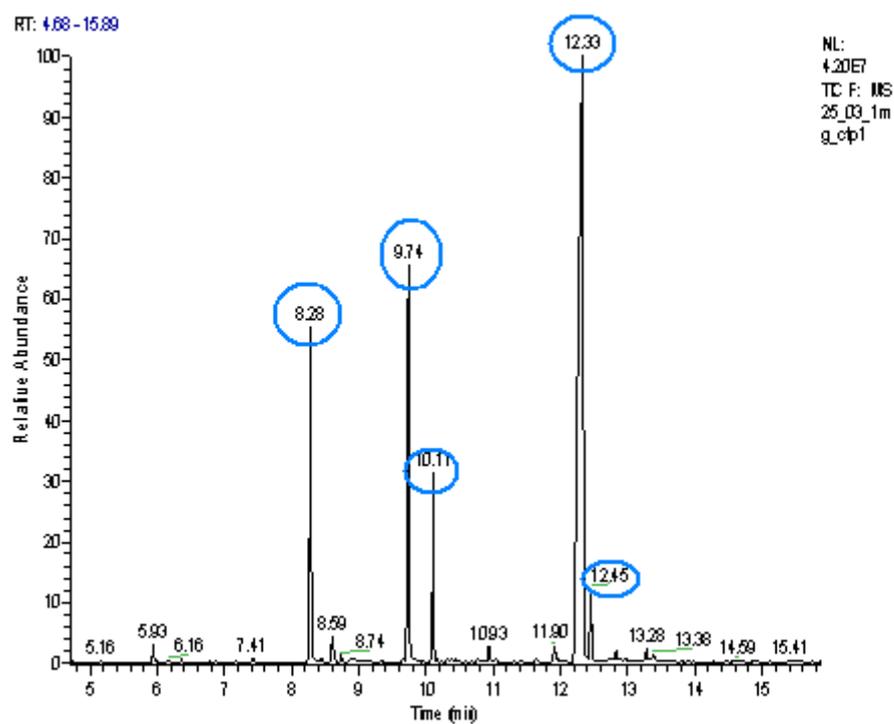


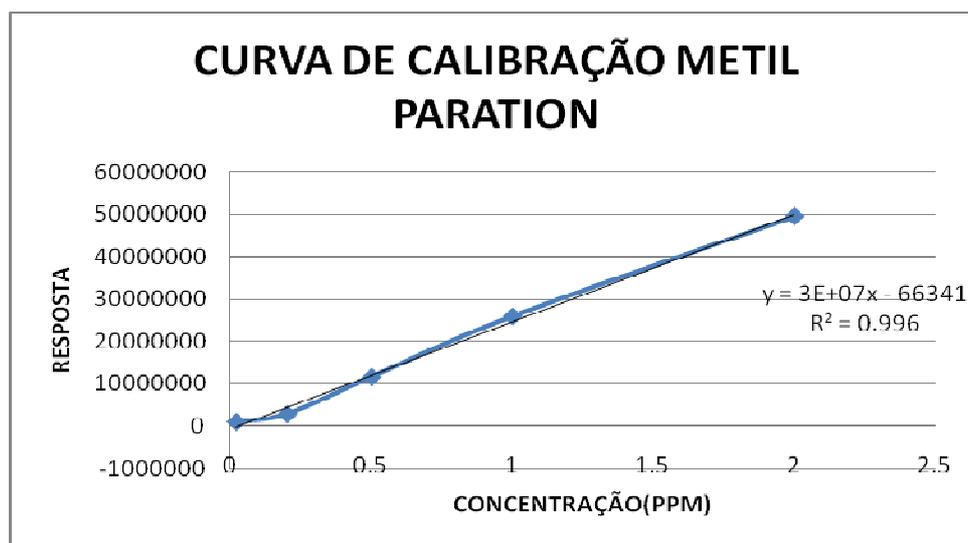
Figura 27. Controle de degradação espontânea (1mg/L). Cromatograma no nono dia de ensaio.



*Pico do metilparation em 12.33 minutos

A quantificação do metilparation foi obtida por integração da área do pico em 12.3, comparada a curva de calibração nas concentrações de 2.00mg/L, 1.00mg/L, 0.50mg/L, 0.25mg/L e 0.01mg/L (Figura 28). O limite de detecção calculado foi de 4,28ng/L

Figura 28. Curva de calibração do metilparation



O ensaio foi realizado em triplicata e a média das áreas foram interpoladas na curva de calibração, obtendo-se as concentrações do pesticida no meio .

Na Tabela 13, é apresentada a porcentagem de redução do pesticida no meio tanto para os testes quanto para os controles. As médias das concentrações dos testes e controles foram comparadas utilizando o Teste t, em cada dia de ensaio. No primeiro dia de ensaio, as médias das concentrações testes e controles são iguais, no quinto dia estas médias passam a divergir, com redução acentuada das concentrações do pesticida nos testes, comportamento observado em todas as concentrações. O mesmo é verificado no nono dia do experimento.

Até o quinto dia, há uma redução muito significativa da concentração do pesticida nos ensaios-teste. Nas concentrações mais elevadas (2.00mg/L, 1.00mg/L, 0.50mg/L) a remoção do pesticida oscila de 58 a 66%, enquanto que a degradação espontânea foi de 5 a 8%. Em concentrações mais baixas (0.25mg/L e 0.1mg/L) a remoção do pesticida foi mais eficiente, já no quinto dia de ensaio a remoção variou de 93 a 98%.

No nono dia de ensaio a remoção do metilparation nas concentrações de 2.00mg/L, 1.00mg/L, 0.50mg/L , variam de 76 a 98%. Nas demais concentrações não foi observado uma melhora significativa na eficiência da remoção após o quinto dia . Na concentração de 0.25mg/L a remoção do pesticida foi superior a 99% no nono dia de ensaio. Na concentração de 0.10mg/L houve um aumento de 4% na remoção do metilparation do quinto para o nono dia de experimento.

Tabela 13. Porcentagem de redução da concentração do metilparation nos testes e controles.

Concentração(mg/L)	% Redução				
	Dia_1	Dia_5	Dia_9	Dia_5	Dia_9
2.00mg/L					
Teste	1.763 ^(a)	0.686 ^(b)	0.121 ^(d)	61.09	93.12
Controle	1.841 ^(a)	1.742 ^(c)	1.652 ^(e)	5.38	10.27
1.00mg/L					
Teste	0.852 ^(a)	0.352 ^(b)	0.013 ^(d)	58.66	98.46
Controle	1.084 ^(a)	0.987 ^(c)	0.965 ^(e)	8.95	11.00
0.50mg/L					
Teste	0.432 ^(a)	0.145 ^(b)	0.102 ^(d)	66.37	76.32
Controle	0.441 ^(a)	0.415 ^(c)	0.429 ^(e)	5.84	2.72
0.25mg/L					
Teste	0.269 ^(a)	0.003 ^(b)	0.002 ^(d)	98.80	99.13
Controle	0.213 ^(a)	0.220 ^(c)	0.210 ^(e)	1.17	1.65
0.10mg/L					
Teste	0.106 ^(a)	0.006 ^(b)	0.002 ^(d)	93.73	97.78
Controle	0.112 ^(a)	0.106 ^(c)	0.109 ^(e)	5.59	2.57

*Comparação das médias por análise estatística (teste t). Letras iguais indicam médias estatisticamente iguais

Os mecanismos de remoção de pesticidas organofosforados descritos na literatura são distintos para bactérias e cianobactérias. As bactérias são capazes de metabolizar xenobióticos através de estimulação gênica e conseqüentemente produção de diferentes tipos de enzimas capazes de degradar estes compostos. (LIU et. al, 2007; ANG et. al, 2005). Para organismos fotossintetizantes, como as plantas e cianobactérias, é relatada a remoção de xenobióticos por ação das rotas usuais do Sistema Citocromo P450 para detoxificação de xenobióticos, utilizando compostos orgânicos como fonte de carbono e fósforo. (MUSKUNIENE et.al,1998; MACEDO et.al, 2008; PURCELL et.al, 1990, ZDENKO et.al, 2007).

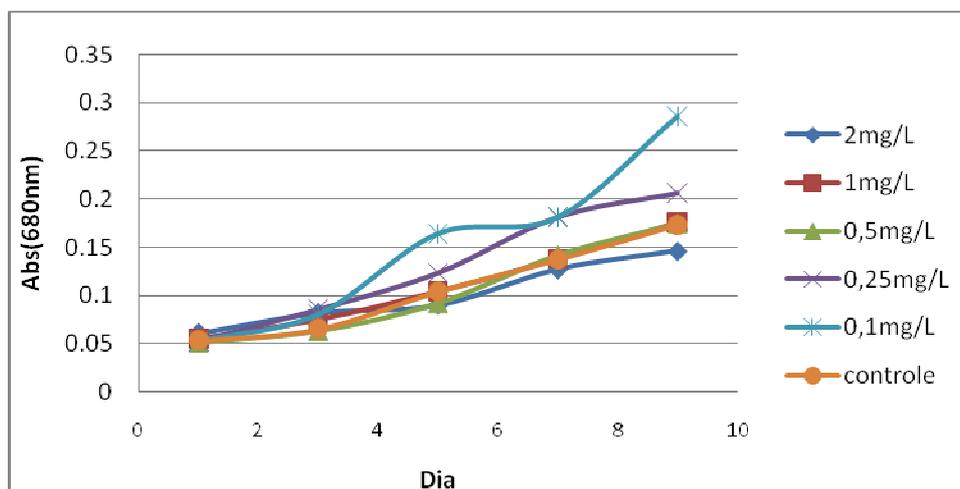
As menores taxas de remoção do metilparation do meio aquoso WC nas concentrações mais altas sugerem que o pesticida apresenta uma potencial toxicidade para a espécie.

Analisando a curva de crescimento da espécie durante o experimento (Figura 29), observa-se uma estimulação do crescimento nas concentrações de 0.25mg/L e 0.1mg/L.

Alguns autores relataram a toxicidade exercida por grupamentos nitro-fenólicos presentes em vários herbicidas e pesticidas para as cianobactérias. (ELANSKAYA et.al 1998; MEGHARAJ et.al,1994). O mecanismo de toxicidade sugerido é a inibição do Fotossistema II e conseqüentemente da fotossíntese, por grupos nitrofenólicos .(GUIKEMA & SHERMAN ,1980 ; ELANSKAYA et.al, 1998)

No presente estudo as alterações das taxas de crescimento mensuradas pela densidade ótica em 680nm, comprimento de absorção da clorofila, pode estar relacionado com a inibição da fotossíntese.

Figura 29. Crescimento da *M.novacekii* durante o ensaio de biodegradação do metilparation.



Tanto no quinto quanto no nono dia de ensaio pode-se observar uma inibição do crescimento da espécie nas maiores concentrações. Ao contrário, verifica-se uma estimulação do crescimento nas concentrações mais baixas. O crescimento da *M.novacekii*, durante os ensaios de biodegradação foram monitorados pela densidade ótica a 680nm.(Tabela 14).

Tabela 14. Inibição do crescimento da *M.novacekii* (%).

Dia	2.00mg/L	1.00mg/L	0.50mg/L	0.25mg/L	0.10mg/L
5	42.43	5.81	-1.67*	-26.58*	-66.21*
9	3.64	-3.31*	-27.00*	-9.09*	-6.07*

*Sinais negativos indicam estimulação do crescimento.

Uma possível explicação para este comportamento é que o mecanismo de detoxificação de xenobióticos pela espécie se dê via Citocromo P450. Em concentrações mais elevadas há uma inibição da fotossíntese, reduzindo a produção de clorofila, e a geração de moléculas redutoras (NADPH) como um efeito tóxico agudo. (ZDENKO et.al, 2007)

A fotossíntese ocorre pela absorção da luz na faixa de 400-700 nm por pigmentos fotossintéticos. Ela é responsável pela geração de um potencial redutor, basicamente NADPH, sem o qual a detoxificação de alguns compostos torna-se prejudicada, pois além de reduzir as moléculas de xenobióticos diretamente, é fundamental nas reações de transferências de elétrons e ativação do oxigênio molecular para oxidação de xenobióticos.

A inibição da fotossíntese leva a redução da síntese de clorofila e diminuição da eficiência de remoção do pesticida no presente estudo nas concentrações mais elevadas. (MOACIR et.al, 2008)

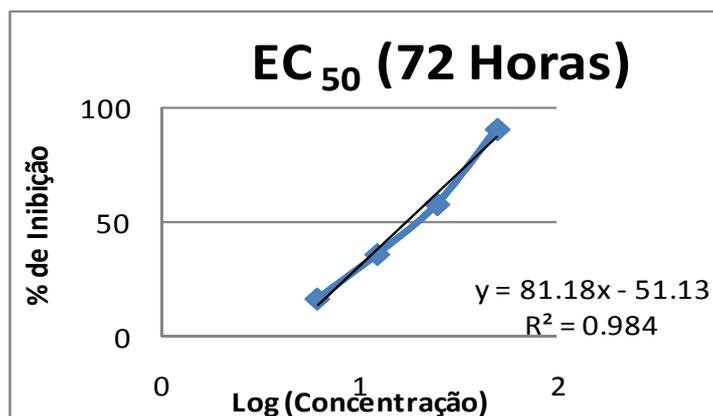
Nas concentrações mais baixas verifica-se estímulo do crescimento, indicando que a espécie deve ser capaz de utilizar o metilparation como fonte de carbono e fósforo, sem o comprometimento de outros sistemas metabólicos que interfiram no crescimento da espécie. Em concentrações mais altas os efeitos em outros sistemas metabólicos passam a comprometer seu crescimento.

Os dados embora com limitações, se extrapolados para ambientes aquáticos naturais, indicam que organismos planctônicos podem ser fundamentais para a depuração do ambiente em regiões impactadas pela contaminação por pesticidas. Paralelamente aponta a perspectiva de aprofundar esforços no sentido de selecionar espécies que possam contribuir de maneira efetiva para a biorremediação de ambientes contaminados.

6.3.2 Ensaio de Toxicidade

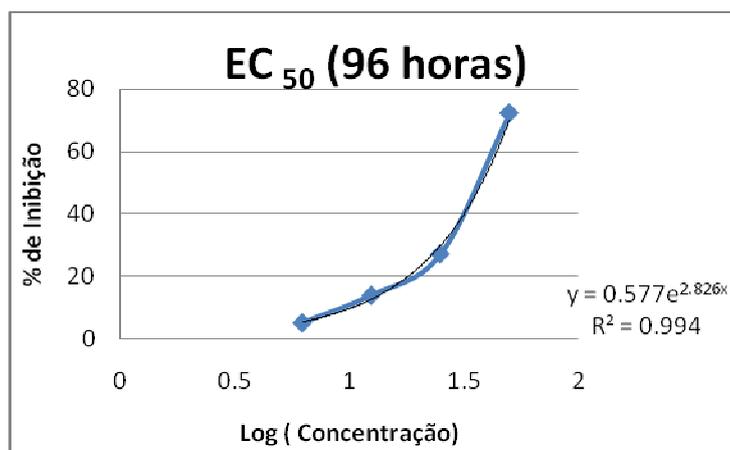
Os dados de toxicidade aguda do pesticida metilparation para a cianobactéria *M.novacekii*, são apresentados nas Figura 30 e Figura 31. As concentrações testados para o metilparation foram 50.00mg/L , 25.00mg/L , 12.50mg/L, 6.25mg/L e 3.125mg/L. Estas concentrações foram escolhidas de acordo com o protocolo (OECD 201,2006) que preconiza a utilização de cinco concentrações que permitam obter percentuais de 5 a 75% de inibição do crescimento da espécie microbiana. Em ensaios preliminares estas concentrações foram estabelecidas.

Figura 30. Porcentagem de inibição do crescimento da *M.novacekii* exposta a concentrações crescente de metilparation em 72 horas de ensaio.



A relação linear entre a % de inibição do crescimento e o logarítmico da concentração do pesticida foi observada no período de 72 horas. (Figura 30) . Considerando-se os resultados de 96h, observa-se uma tendência exponencial entre as variáveis (Figura 31). Esta alteração não interfere na determinação da EC₅₀. (OECD 201,2006) (Tabela 15)

Figura 31. Porcentagem de inibição do crescimento de *M.novacekii* exposta a concentrações crescentes do metilparation em 96 horas de ensaio.



Nos ensaios de biodegradação verifica-se que após o quinto dia, nas concentrações mais altas do metilparation (2.00 e 1.00mg/L) os processos adaptativos da espécie permitem a recuperação da tendência de crescimento, refletindo na redução da porcentagem de Inibição de 42.43% no quinto dia para 3.64% no nono dia . Na concentração de 1.00mg/L, no nono dia o crescimento o estímulo foi de 3.31%.(Tabela 14). Estes resultados indicam uma recuperação do crescimento da *M.novacekii* frente ao organofosforado metilparation. Estes resultados são consistentes com o fato das cianobactérias serem organismos simples, e possuírem resistência a um vários de xenobióticos, o que pode ser observado pela explosão de crescimento de cianofíceas em ambientes aquáticos eutrofizados (Bloom de Cianobactérias). Outros dados da literatura sugerem esta capacidade de adaptação e tolerância para outras espécies de cianobactérias na presença de pesticidas. (GIUSEPPE et.al, 2008, MANSY & EBSTESAM, 2002; RIBOO et. al, 2002)

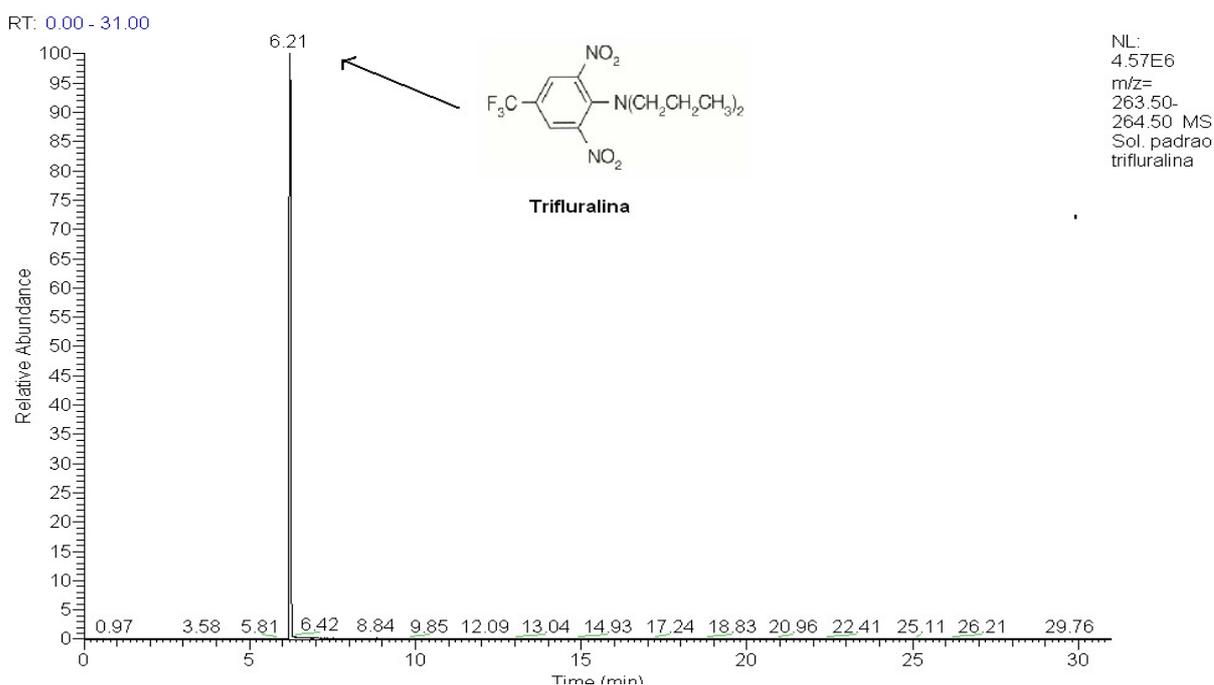
Tabela 15. EC₅₀ (mg/L) durante 72 e 96 horas de exposição ao metilparation

EC ₅₀ 72h	EC ₅₀ 96h
17.60mg/L	37.97mg/L

6.3.3 Trifluralina

Com o objetivo de verificar a pureza do padrão de Trifluralina cedido pela MILENIA AGROINDÜSTRIAS, 2µL de solução padrão na concentração de 0.50mg/L em metanol, foram analisados por injeção direta no cromatógrafo gasoso. Observa-se a presença de apenas um pico no tempo de retenção de 6.20 minutos. (Figura 32)

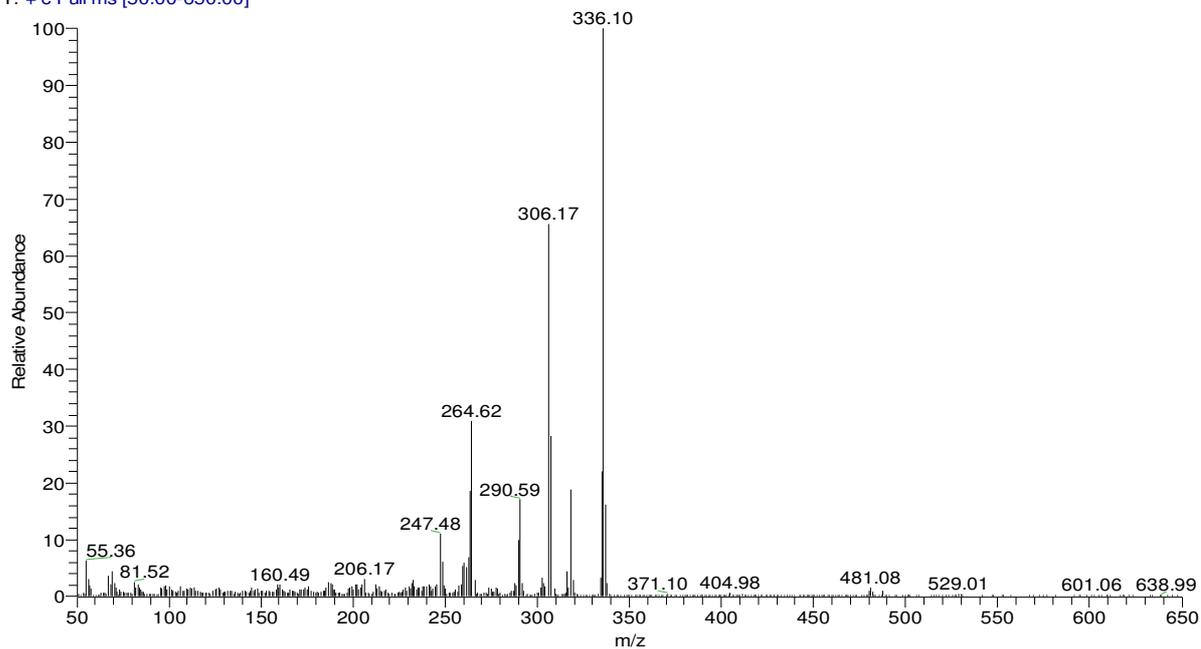
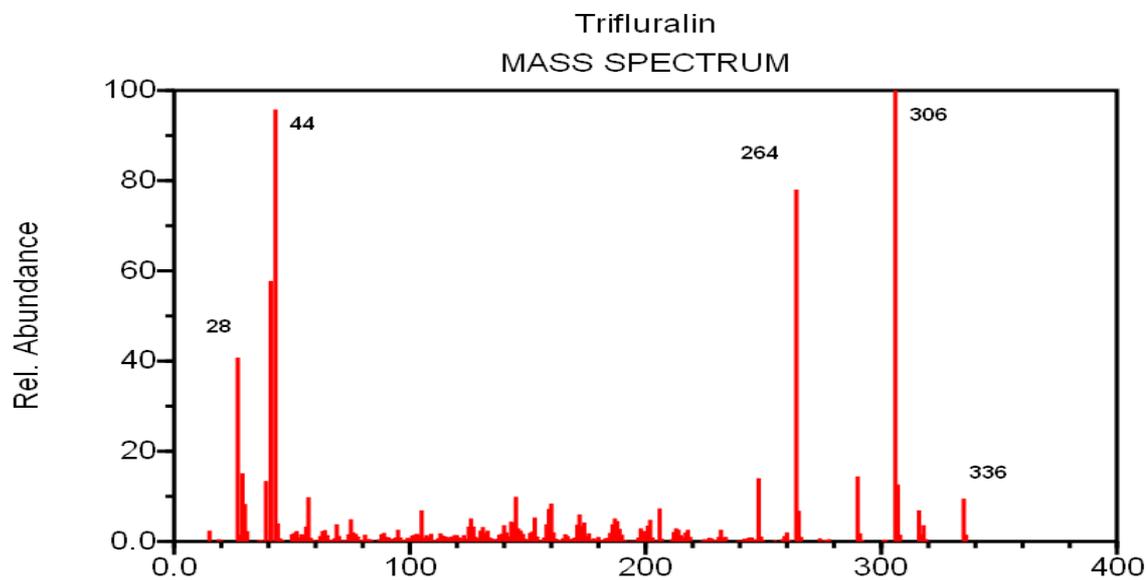
Figura 32. Cromatograma da trifluralina 0.50mg/L



Comparando-se a fragmentação característica da trifluralina na biblioteca eletrônica NIST, com o espectro de massas obtido no tempo de retenção 6.21 minutos, observa-se concordância entre os espectros, indicando tratar-se do herbicida trifluralina. (Figura 33 e Figura 34)

Figura 33. Espectro de massas do pico com tempo de retenção 6.21 minutos.

Sol. padrao trifluralina #584 RT: 6.25 AV: 1 SB: 1364 6.69-17.22 , 1.54-5.73 NL: 8.03E6
T: + c Full ms [50.00-650.00]

**Figura 34. Espectro de massas da trifluralina. Fonte : NIST**

O ensaio de biodegradação da trifluralina transcorreu em um período de 9 dias. Amostras dos controles de degradação espontânea e dos testes do pesticida nas concentrações do herbicida de 0.50mg/L, 0.25mg/L, 0.10mg/L, 0.05mg/L e 0.025mg/L foram coletadas nos dia 1, 5 e 9 para determinação analítica da concentração da trifluralina. Após microextração em fase sólida as amostras foram submetidas a cromatografia gasosa acoplada a um detector de massas

Verificou-se em no primeiro dia do experimento, o pico característico da trifluralina em de 6.20 minutos nos testes e controles. (Figura 35 e Figura 36)

Figura 35. Cromatograma do controle (0.5mg/L) no primeiro dia de ensaio com a Trifluralina no tempo de retenção de 6.17 minutos

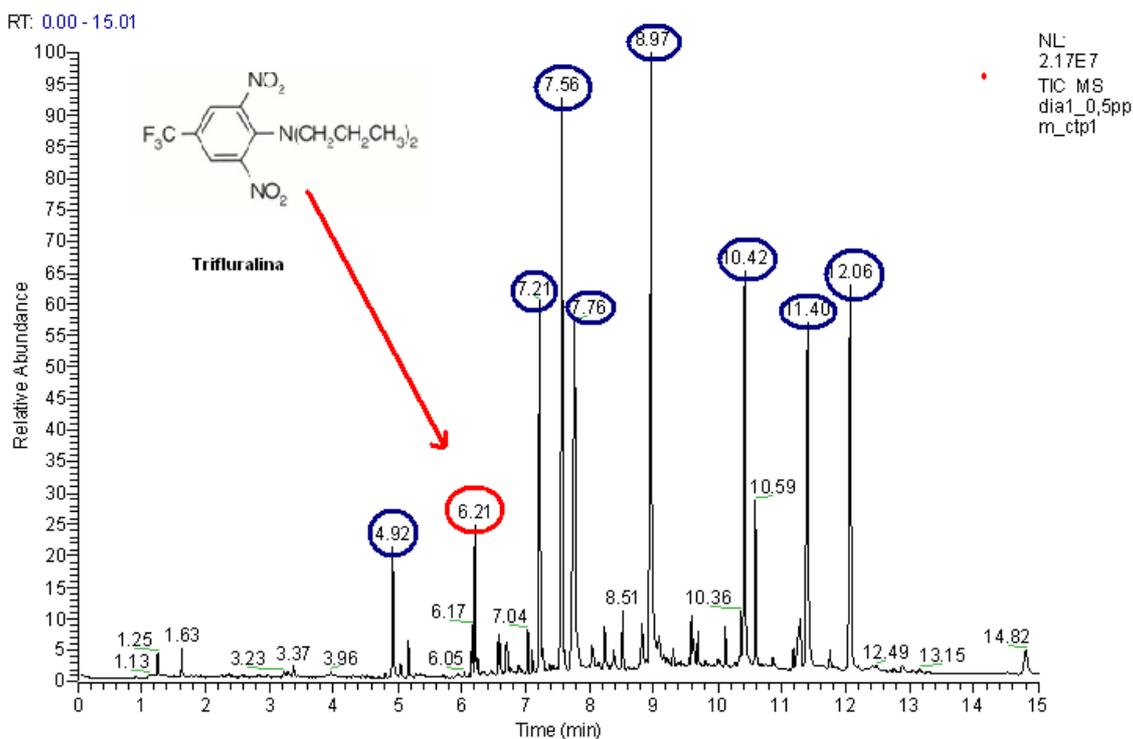
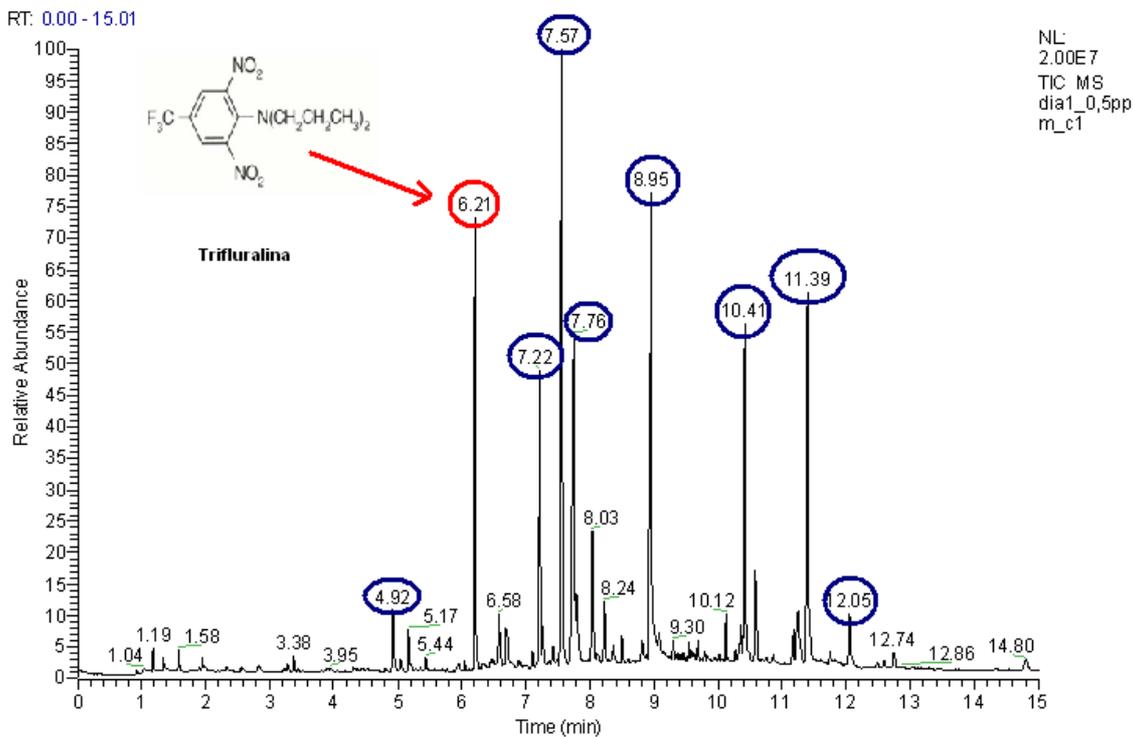


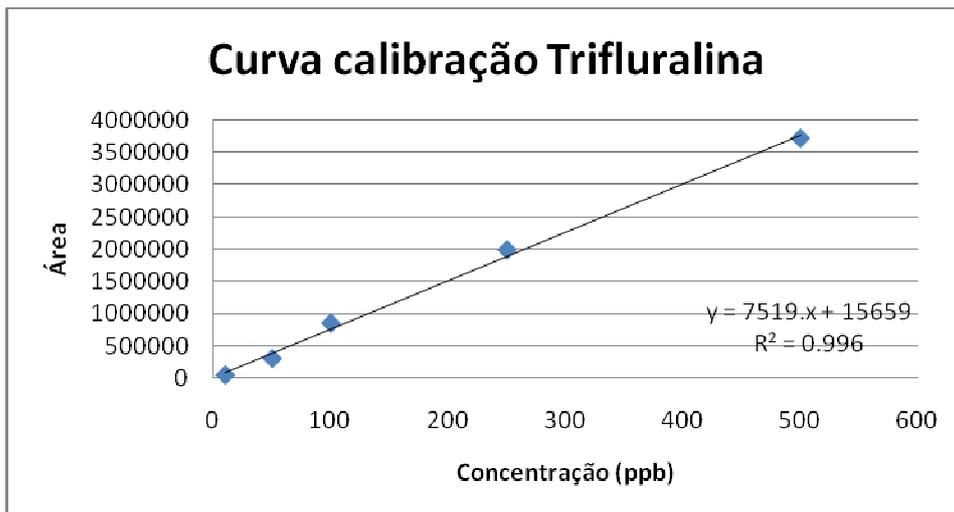
Figura 36. Cromatograma do teste (0.5mg/L) no primeiro dia de ensaio com a Trifluralina no tempo de retenção de 6.17 minutos



No quinto dia de experimento, já não se observa o pico referente à trifluralina nos testes e controlos. Foi necessária a busca no software do GC-MS, da massa molecular do herbicida para verificar sua concentração no quinto e nono dia de ensaio.

A quantificação da Trifluralina foi obtida por integração da área do pico em 6.17 minutos, comparada a curva de calibração nas concentrações de 10, 50, 100, 250 e 500ppm. O limite de deteção foi calculado e determinado em 10 ng/L. O ensaio foi realizado em triplicata e a média das áreas foi interpolada na curva de calibração, obtendo-se as concentrações do pesticida no meio.

Figura 37. Curva de calibração da Trifluralina



Na Tabela 16, é apresentada a porcentagem de redução do pesticida no meio tanto para os testes quanto para os controles. As médias dos testes e controles de cada concentração foram comparadas utilizando o Teste t, em cada dia de ensaio. No primeiro dia de ensaio, as médias das concentrações dos testes e controles em cada concentração são iguais, a partir do quinto dia estas médias passam a divergir, comportamento observado em todas as concentrações.

No quinto dia, há uma redução muito significativa da concentração do pesticida nos testes e controles. Nos testes, foi observado um maior decaimento na concentração da Trifluralina variando de 82 a 88%. Já os controles variaram de 53 a 84%. No ultimo dia de ensaio a redução da Trifluralina nos testes e controles foi intensa, em todas as concentrações testadas.

Tabela 16. Porcentagem de redução da concentração da trifluralina nos testes e controles.

Concentração(mg/L)			% Redução		
	Dia_1	Dia_5	Dia_9	Dia_5	Dia_9
0.50mg/L					
Teste	0.473 ^(a)	0.079 ^(b)	0.011 ^(d)	83.20	97.57
Controle	0.059 ^(a)	0.210 ^(c)	0.551 ^(e)	53.25	87.99
0.25mg/L					
Teste	0.273 ^(a)	0.039 ^(b)	0.024 ^(d)	85.39	91.13
Controle	0.241 ^(a)	0.111 ^(c)	0.019 ^(d)	53.86	91.88
0.10mg/L					
Teste	0.979 ^(a)	0.017 ^(b)	0.004 ^(d)	82.35	95.45
Controle	1.086 ^(a)	0.609 ^(c)	0.196 ^(e)	56.16	82.20
0.05mg/L					
Teste	0.036 ^(a)	0.004 ^(b)	0.0006 ^(d)	87.12	98.22
Controle	0.041 ^(a)	0.012 ^(c)	0.009 ^(e)	68.83	77.87
0.025mg/L					
Teste	0.019 ^(a)	0.0025 ^(b)	0.0004 ^(d)	88.37	97.54
Controle	0.020 ^(a)	0.0030 ^(c)	0.0014 ^(e)	84.97	92.62

Com a degradação pronunciada do herbicida nos frascos controles, não se pode afirmar que houve biodegradação pela *M.novacekii*. Outros processos de degradação ocorreram. Como a Trifluralina não é passível de hidrólise, a fotólise é a hipótese mais provável. As pesquisas de produtos de fotólise descritos na literatura corroboram com a hipótese de que a exposição cíclica a luz pode ter sido responsável pela degradação acelerada da trifluralina. (DIMOU et.al, 2004)

Em ambientes aquáticos o processo de fotodecomposição depende das características dos corpos d'água como teor de matéria orgânica, comprimento de onda da luz solar, época do ano, latitude e profundidade dos corpos d'água. Nos solos a fotólise é responsável, segundo GROOVER et. al (1997) pela degradação de 28% da trifluralina durante 30 dias sob luz fluorescente.

DIMOU et al (2004), investigaram a fotólise da trifluralina em diferentes amostras naturais de água (mar, rio e lago), assim como em água destilada, sob irradiação solar, com o objetivo de avaliar a influência da matéria orgânica dissolvida. A degradação em amostras de água naturais foi menor que em água destilada, indicando o efeito protetor da matéria orgânica com relação a fotodecomposição. Na concentração da trifluralina de 0,27mg/L, em amostras de águas de lago, os autores verificaram que a meia vida do herbicida foi de 50 minutos , seguido de águas de rio, mar e água destilada com 11 minutos. Os produtos de degradação foram identificados por CG-EM (cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas), e os mecanismos de sua formação seguem três rotas: dealquilação oxidativa dos grupos propil , ciclização e redução dos grupos nitro.

No presente estudo, por CG-EM não foram identificados produtos possivelmente gerados pela fotodecomposição da trifluralina. Amostras dos testes e controles foram então analisadas por detector de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS).

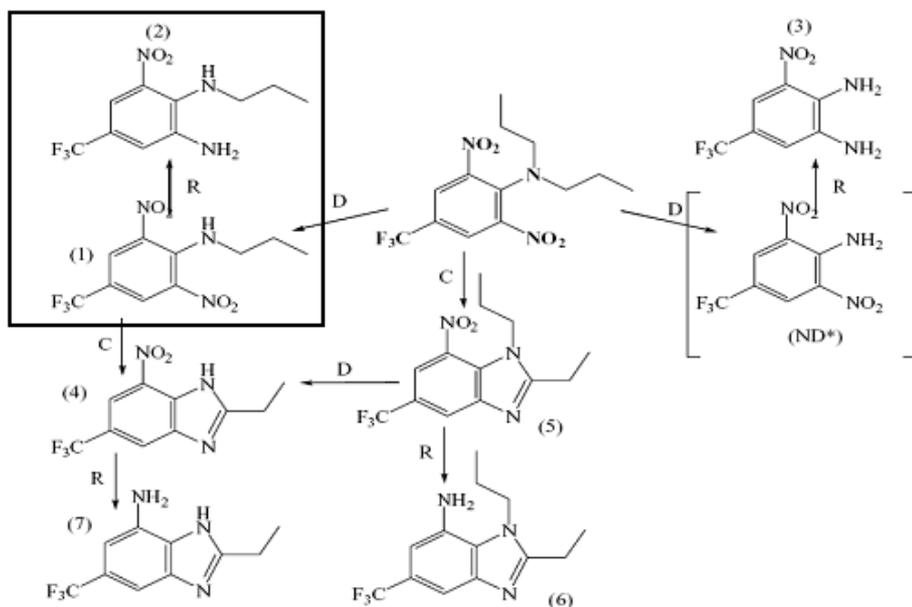
Dois produtos de degradação por via fotolítica foram encontrados, tanto nos testes quanto nos controles (Tabela 17). O composto 1 ($m/z=294$) é resultado da dealquilação de um grupo propil e o composto 2 ($m/z=263$) pela redução do grupo nitro e dealquilação de um grupo propil seguido de etil.

Tabela 17. Produtos de fotólise identificados por ESI-MS.

Composto	m/z
1 2,6-Dinitro- <i>N</i> -Propil-4-(trifluormetil)benzenoamina	294
2 3-Nitro- <i>N</i> ² -Propil-5-(trifluormetil)-1,2 Benzenodiamina	263

Assim, no presente estudo foram detectados os compostos 1 e 2 , com massa molecular compatível com os compostos descritos por DIMOU et al (2004), nos testes e controles , sugerindo que o mecanismo de redução da concentração seja a via fotolítica. DIMOU et al (2004) , detectaram 7 produtos, dois dos quais encontrados no presente estudo, e fizeram uma proposta de mecanismo para degradação (Figura 38). Segundo esses autores, a fotodecomposição da trifluralina: a dealquilação (D) , a ciclização (C), e a redução de grupos nitro(R).

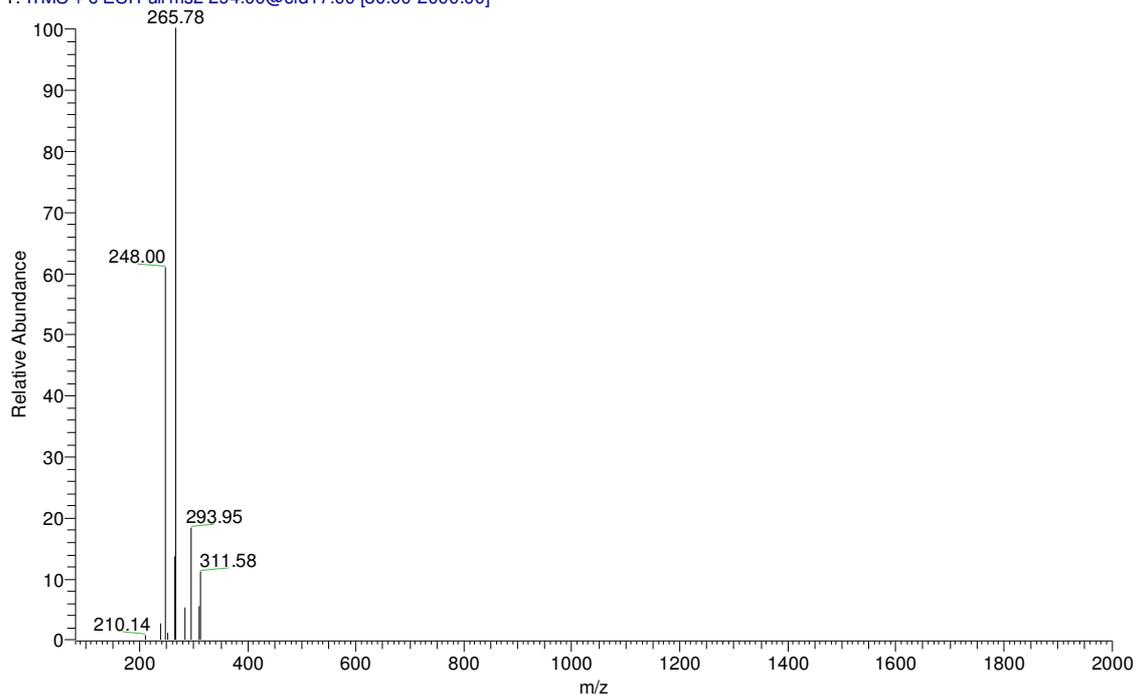
Figura 38. Proposta do mecanismo de fotólise da Trifluralina. (Dimou et. al ,2004)



Para confirmar que os compostos encontrados são os mesmos descritos na literatura, os compostos foram selecionados a partir da relação massa/carga (m/z) e aplicada energia de ionização de 20eV para que fossem novamente quebrados. O composto 1 com $m/z=293$, foi fragmentado em $m/z=266$ e $m/z=248$. Sugere-se que o fragmento com $m/z=266$ é correspondente a perda de água pela molécula. Já o fragmento com $m/z=248$, pode ser gerado devido a perda do grupo nitro da molécula do composto 1. (Figura 39)

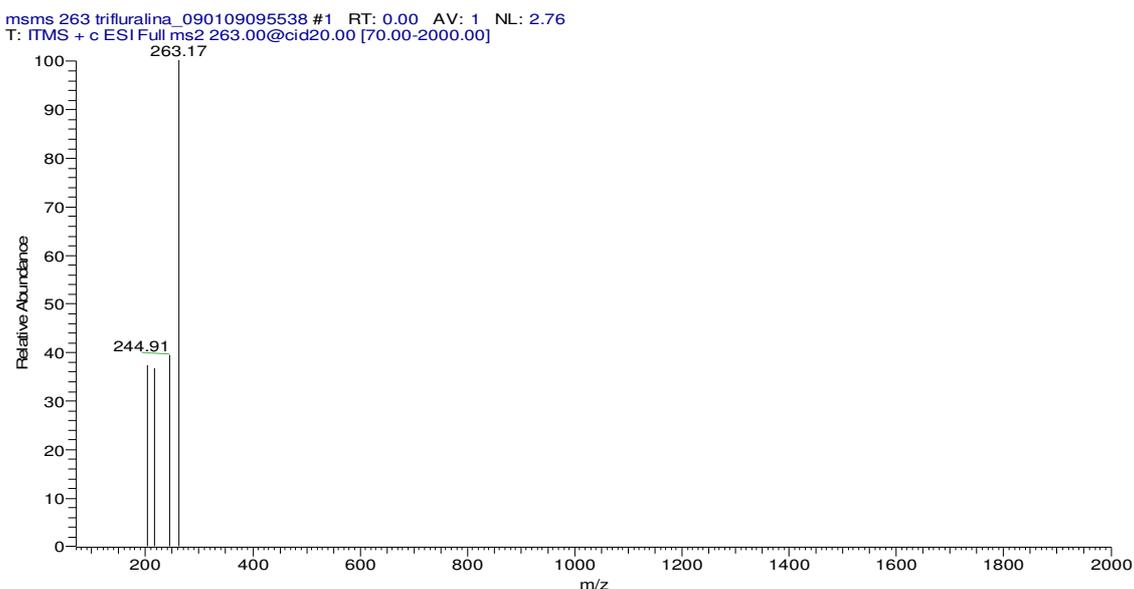
Figura 39. Espectro de massas do composto 1 e sua fragmentação.

msms 294trifluralina_090109095538 #1 RT: 0.00 AV: 1 NL: 1.55E2
T: ITMS + c ESI Full ms2 294.00@cid17.00 [80.00-2000.00]



O composto 2 com $m/z=263$ foi fragmentado em $m/z=244$. Sugere-se que a formação deste fragmento se dá pela perda de uma molécula de água que pode envolver rearranjos complexos. (Figura 40)

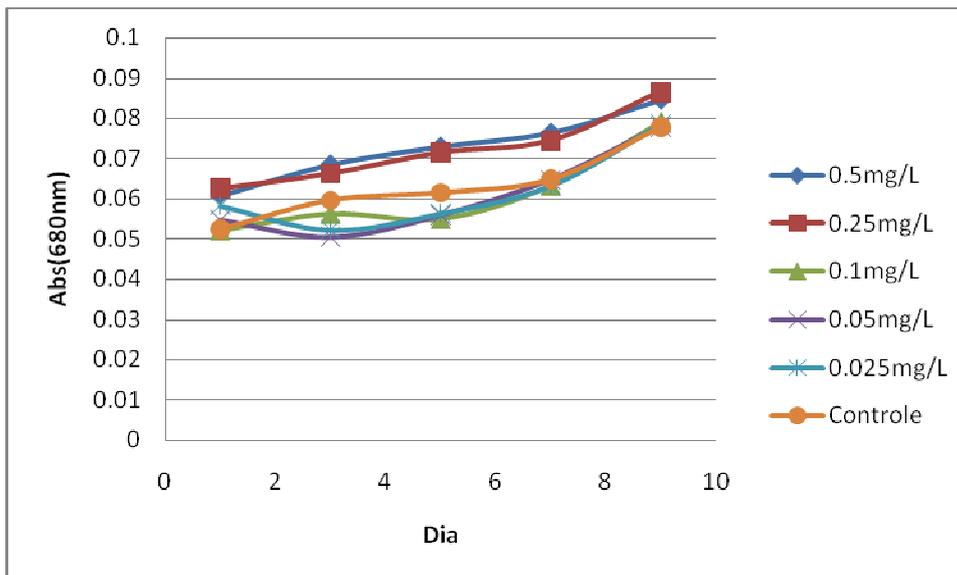
Figura 40. Espectro de massas do composto 2 e sua fragmentação.



Os resultados deste estudo indicam a possibilidade de que a degradação do herbicida seja por via fotolítica. A observação de dois produtos já descritos na literatura e a proposta de mecanismos de fragmentação dos mesmos condizentes com sua estrutura química sugerem a fotodecomposição.

Os possíveis produtos de fotólise não apresentaram toxicidade para a alga durante o experimento, indicando que estes produtos não comprometeram a viabilidade da espécie. (Figura 41)

Figura 41. Curva de crescimento durante a biodegradação da Trifluralina.



Ensaio de toxicidade para estabelecer a EC_{50} , não foram realizados, devido a curta meia vida da Trifluralina no meio de cultura. Apesar da degradação do herbicida, e de neste experimento ocorrer fotólise, a biodegradação também é uma via que pode ser importante de atenuação da toxicidade deste contaminante. Em ambientes naturais, a água é rica em matéria orgânica e dependendo do tipo de solo a água pode conter elevada turbidez, o que dificultaria a degradação pela via fotolítica.

O meio WC é preparado a partir de água destilada, acrescida de sais inorgânicos e poucas vitaminas, sendo límpido e com baixo teor de compostos orgânicos os quais poderiam funcionar como protetores da molécula do herbicida à energia radiante. Além disso, a luz fornecida pela lâmpada consegue penetrar em todo o frasco no ensaio *in vitro*, ao passo que a luminosidade é gradualmente reduzida com a profundidade da coluna d'água.

No meio ambiente sabe-se que a fotodecomposição da Trifluralina não ocorre com tanta facilidade, pois ela é encontrada como contaminante de mananciais. (DORES et.al, 2004; LANCHOTE et.al, 2000; LAABS et.al, 2002). Os corpos água possuem diferentes quantidades de incidência de luz na coluna d'água, quanto mais profundo menor a penetração da luz, podendo acumular xenobióticos que em superfície seriam degradados.

No entanto ensaios planejados para estudo de fotólise em ambientes naturais devem ser efetuados. Reações fotolíticas tão rápidas quanto as descritas podem comprometer o uso do herbicida e exigir técnicas especiais de aplicação. Segundo recomendações do fabricante o produto deve ser aplicado e incorporado ao solo na profundidade de 10 centímetros. Nestas condições a fotólise mesmo em condições de intensa insolação seria reduzida. Porém as condições de uso devem ser acompanhadas para evitar aplicação inadequada e contaminação dos solos e ambientes aquáticos.

7 Conclusão

A contaminação dos corpos d'água por pesticidas tem se tornado um problema ambiental. Atualmente as cianobactérias, têm demonstrado grande capacidade de adaptação em áreas impactadas, e passaram a ser alvos de estudos de biodegradação.

A cianobactéria, empregado neste estudo, foi isolada do Parque Estadual do Rio Doce-MG, região de plantações de eucalipto, e contaminadas por pesticidas. Portanto é uma espécie bem adaptada nestas condições, e pode contribuir com a recuperação de ambientes aquáticos.

A capacidade da *Microcystis novacekii* de metabolizar pesticidas foi demonstrada pela significativa remoção do pesticida metilparation do meio nos frascos teste. A degradação espontânea nos frascos controle não foi significativa, indicando degradação biológica.

Nas concentrações mais baixas (0.25mg/L e 0.1mg/L) a remoção do pesticida foi mais eficiente variando de 93 a 98% , com estímulo do crescimento, por provável utilização do pesticida como fonte de carbono e fósforo. Em concentrações mais elevadas do metilparation (2.00mg/L, 1.00mg/L, 0.50mg/L), a remoção foi de 76 a 98% no nono dia. Sugere-se que o pesticida em concentrações elevadas exerce efeito tóxico agudo, sobre o crescimento da espécie, enquanto que em concentrações menores o crescimento é estimulado, indicando que o composto foi usado como fonte de nutrientes. Os achados corroboram com a literatura que relatam que o mecanismo de degradação de xenobióticos por cianobactérias ocorre via Citocromo P450.

As concentrações que inibem o crescimento da espécie em 50% ($EC_{50} 72h = 17.60mg/L$ e $EC_{50} 96h = 37.97 mg/L$) são muito superiores às encontradas em ambientes aquáticos naturais. Isto demonstra que a *M.novacekii* tem grande capacidade de tolerância a xenobióticos e pode ser um importante agente de para biorremediação de ambientes contaminados.

A trifluralina foi rapidamente degradada no meio de cultura, nos frascos teste e controle, indicando não ser a degradação biológica a principal via de decomposição do pesticida. Os experimentos realizados não permitiram quantificar a contribuição da *M.novacekii* na degradação da trifluralina, nem determinar a EC_{50} para este herbicida.

A espécie *Microcystis novacekii* apresentou grande capacidade de adaptação frente aos pesticidas e seus produtos de degradação, demonstrada pelo crescimento frente altas concentrações desses agentes, particularmente do metilparation. Este trabalho mostra sua relevância no contexto de recuperação ambiental, servindo de base para novas investigações de biodegradação utilizando espécies locais, que possam contribuir para a biorremediação de corpos d'água contaminados.

8 Referências Bibliográficas

ALIVE S., TORRES C.M., MENDOZA M.E C., MORENO S. Z. R. Time-course development of the Cd²⁺ hyper-accumulating phenotype in *Euglena gracilis*. **Arch. Microbiol.** n.184, p.83–92, 2005.

ALVES P. J. **O uso de agrotóxicos no Brasil : Controle Social e interesses corporativos**. 1 ed. São Paulo : Annablume,2002,188p.

ANG E.L, ZHAO H.M, OBBARD J.P. Recent advances in the bioremediation of persistent organic pollutants via biomolecular engineering. **Enz. Microb Technol**, v.37,p. 487–496, 2005.

AZEVEDO, A.S.O.N., **Assessment and simulation of atrazine as influenced by drainage and irrigation. An interface between RZWQM and ArcView GIS**. Doctor Thesis. Iowa State University, Ames, Iowa,1998..

BARBOSA F.A.R.; MORENO P. Mata Atlântica e sistema lacustre do médio Rio Doce- site 4. In: SEELIGER U., CORDAZZO C., BARBOSA F. (Ed) **Os sites e o programa brasileiro de pesquisas ecológicas de longa duração**. Projeto Fapemig 184 p, Belo Horizonte: 2002.

BARD, S.M.; WOODIN, B.R.; STEGEMAN, J.J.. Expression of P-glycoprotein cytochrome P450 1A in intertidal fish (*Anoplarchus purpureus*) exposed to and environmental contaminants. **Aqua Toxicol.** v.60, p.17–32, 2002.

BARQUE,J.P.;ABAHAMID,A.;FLINOIS,J.P.;BAUNE,P.;BONALY,J.Constitutive overexpression of immunoidentical forms of PCP-induced (*Euglena gracilis*) CYP-450. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.298, p.277–281,2002.

BARTON J.W, KURITZ T., CONNOR L.E.O, MA C.Y., MASKARINEC M.P., DAVISON B.H. **Reductive transformation of methyl parathion by the cyanobacterium Anabaena sp. Strain PCC7120.** Appl. Microbiol. Biotechnol. v.65, n.3, p.330-335, 2004.

BELLINASSO M.L.;, GREER C. W. ; PERALBA M. C.; HENRIQUES J. A. P.; GAYLARDE C. C. Biodegradation of the Herbicide Trifluralin by Bacteria Isolated from Soil. **FEMS Microbiology Ecology**, n.43, p.191-194, 2003

BOPP,S.K.;LETTIERI,T. Gene regulation in the marine diatom (*Thalassiosira pseudonana*) upon exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). Cytochrome P450 in aquatic species. **Gene**96, v.56, p.293–302, 2007.

CÁCERES T, MEGHARAJ M & NAIDU R. Toxicity and transformation of fenamiphos and its metabolites by two micro algae *Pseudokirchneriella subcapita* and *Chlorococcum* sp. **Science of Total Environment**, v.389, p.53-59, 2008.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE- **Resolução CONAMA 20/86** - Disponível em <http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res86/res2086.html> . Acesso em 07 de janeiro de 2009.

CRUCIANE C.G; CHISTOFFOLETI P.J; MINAMI K. Comportamento de herbicida em solo de várzea com drenagem subterrânea. **Sci.agric.** v.53, p. 2-3, 1996.

DIMOU A. D.; SAKKAS V. A. ;ALBANIS T. A. Trifluralin photolysis in natural waters and under the presence of isolated organic matter and nitrate ions: kinetics and photoproduct analysis. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, n.163, p. 473–480,2004.

DORES E. F. G. C.; NAVICKIENE S.; CUNHA M. L. F.; CARBO L.;RIBEIRO M.; DE-LAMONICA-FREIRE E. M. Multiresidue Determination of Herbicides in Environmental Waters from Primavera do Leste.Region (Middle West of Brazil) by SPE-GC-NPD. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, n. 5, p.866-873, 2006

ELANSKAYA I.V., CHESNAVICHENE E.A., VERNOTTE C., ASTIER C. Resistance to nitrophenolic herbicides and metronidazole in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 as a result of the inactivation of a nitroreductase-like protein encoded by drgA gene. **FEBS Lett.** v. 428, p.188–192,1998.

ELLIOTT, J.A., CESNA, A.J., BEST, K.B., NICHOLAICHUK, W., TOLLEFSON, L.C. Leaching rates and preferential flow of selected herbicides through tilled and untilled soil. **J. Environ. Qual.** v.29, p.1650–1656, 2000.

ESTEVEZ M. A; PERIAGO E. L.; CARBALLO E. M. ;GANDARA J. S. ; MEJUTO J.C.; RIO L. G. The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. Review. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v.123, p.247–260, 2008.

FERRARI,A. **Agrotóxicos: a praga da dominação, o custo ambiental e social de uma agricultura dependente.** Porto Alegre: Mercado Aberto,1985,87p.

GALLI A, DE SOUZA D, GARBELLINI GS, COUTINHO CFB, MAZO LH, AVACA LA, MACHADO SAS. Utilização de técnicas eletroanalíticas na determinação de pesticidas em alimentos. **Quim. Nova**, v.20, n.1 p.105-112, 2006.

GIUSEPPE FORLANI , MAURO PAVAN, MAGDALENA GRAMEK , PAWE-KAFARSKI AND JACEK LIPOK. Biochemical Bases for a Widespread Tolerance of Cyanobacteria to the Phosphonate Herbicide Glyphosate. **Plant Cell Physiol.** v.49, n.3, p. 443–456, 2008.

GROOVER R.; WOLT J.D.; CESSNA A.J. ; SCHIEFER B.H. Environmental fate of trifluralin. **Rev. Environ Contam Toxicol**, v.153, p.1-64, 1997.

GUHA, H. Biogeochemical influence on transport of chromium in manganese sediments: experimental and modeling approaches. **J. Contam. Hydrol.** v.70, p.1–36, 2004.

GUIKEMA J.A., SHERMAN L.A. Metronidazole and the isolation of temperature-sensitive photosynthetic mutants in cyanobacteria. **J Bioenerg Biomembr** v.12, p.277–295, 1980.

GUILLARD, R.R.L. ; Lorenzen, C.J. **Yellow-green algae with chlorophyllide c.** **Journal Phycology.**, Laurence, v.8: p.10-14, 1972.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE .
Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/lspa/default.shtm> Acesso em: 2 de janeiro de 2008

JABUSCH, T.W.; SWACKHAMER, D.L. Subcellular accumulation of polychlorinated biphenyls in the green alga (*Chlamydomonas reinhardtii*). **Environ.Toxicol. Chem.** v.23, p.2823–2830,2004.

KNIPLING, E. F. **The Basic principles of Insect Population Suppression and management** . U.S. Dept. Agriculture Handbook v. 512, 1999

KOMÁREK, J.; KOMÁRKOVÁ, J. Review of the European Microcystis-morphospecies (Cyanoprokaryotes) from nature. **Czech Phycology**, v.2, p. 1-24, 2002.

KOWALEWSKA, G. Phytoplankton—the main factor responsible for transport of polynuclear aromatic hydrocarbons from water to sediments in the Southern Baltic ecosystem (extended abstract). **J. Mar. Sci.** , v.5, p. 219–222, 1999.

LAABS V.;AMELUNG W.;PINTO A. ; ZECH W. Fate of pesticides in tropical soil of Brazil under field conditions. **J Environ Qual.** v.31, p.256-268, 2002.

LANCHOTE, V.L., P.S. BONATO, A.L. CERDEIRA, N.A. SANTOS, D. DE CARVALHO, AND M.A. GOMES. HPLC screening and GC/MS confirmation of triazine herbicide residues in drinking water from sugar cana area in Brazil. **Water Air Soil Pollut.** v.118, p.329–337, 2000.

LARA,H.W. Pesticidas. **Química Nova**, v.15, n.2, p.161,1992

LARSON, S.J., CAPEL, P.D., MAJEWSKI, M.S. **Pesticides in surfacewaters: distribution, trends, and governing factors**. U.S.Environmental Protection Agency, EPA/600/9-88/005:Washington,DC.,1997.Disponível em: <http://water.usgs.gov/nawqa/pnsp/pubs/fs97039/> . Acesso em 10 janeiro de 2009.

LEES E., KIM J.S., KENNEDY I.R., PARK J.W., KWON G.S., KOH S.C., KIM J.E. Biotransformation of an organochlorine insecticide endosulfan by *Anabaena* species. **J. Agric. Food Chem.** v. 51, p. 1336-40, 2003.

LEI, A.P.; HU, Z.L.; WONG, Y.S.; TAM, N.F.Y. Removal of fuoranthene and pyrene by different microalgal species. **Bioresour. Technol.** v.98, p.273–280, 2007.

LEI, A.P.; HU, Z.L.; WONG, Y.S.; TAM, N.F.Y. Removal of pyrene by different microalgalspecies. **Water Sci. Technol.** v.46, p.195–201, 2002.

LIMA, A.D.F .**Seis anos na direção da defesa sanitária vegetal**. Rio de Janeiro: G.B. (Brazil),1960,118p.

LIU FANG-YAO, HONG MING-ZHANG, LIU DAN-MEI, LI YA-WEN, SHOU PEI-SHUN, YAN HAI., SHI GUO-QING. Biodegradation of methyl parathion by *Acinetobacter radioresistens* USTB-04. **Journal of Environmental Sciences.** v.19,p. 1257–1260,2007.

LUTZENBERGER, J. **Ecologia: do jardim ao poder**. Porto Alegre: L&PM Editores, 1985,102 p.

MA J , WANG P , HUANG C, LU N , QIN W , WANG Y. Toxicity of

organophosphorous Insecticides to three Cyanobacterial and five green algal species. **Environ. Contam. Toxicol.** v.75, p.490-496, 2005.

MA J, LU N, QIN W, XU R, WANG Y., CHEN X. Differential responses of eight cyanobacterial and green algal species to carbamate insecticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.63, p.268–274, 2006.

MA J. Differential sensitivity of three Cyanobacterial and five green algal species to organotins and pyrethroids pesticides. **Science of Total Environment**, v.341, p.109-117, 2004.

MACEDO R.S., LOMBARDI A.T. ,. OMACHI C, L.R. RO" RIG C. Effects of the herbicide bentazon on growth and photosystemII maximum quantum yield of the marine diatom *Skeletonema costatum*. **Toxicology in Vitro**, v.22, p. 716–722, 2008.

MANSY A.E. AND EL BESTAWY E. Toxicity and biodegradation of fluometuron by selected cyanobacterial species. **World Journal of Microbiology & biotechnology**. v.18, p.125-131,2002.

MARCHESAN E.; ZANELLA R.; AVILA L.A. ;. CAMARGO E. R; MACHADO S. L. O.;. MACEDO V. R. M. Rice Herbicide monitoring in two Brazilian rivers during the rice growing season. **Sci. Agric.** v.64, n.2, p.131-137, 2007.

MARJORS, E.M. **Sample preparation perspectives.** LC-GC, v.12, n.1, p.12, 1994.

MEGHARAJ M, MADHAVI DR, SREEINVASAULU C, UMAMAHESWARI A, VENKATESWARLU K .Biodegradation of methylparathion by soil isolates of microalgae and cyanobacteria. **Bull Environ Contam Toxicol.** v.53, p.292–

297, 1994.

MILLER Jr, G.T. **Living in environment** .Belmont,C.A.: Wadsworth,1990,118p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – **Portaria nº 518/ 2004**- Disponível em: http://www.agrolab.com.br/portaria%20518_04.pdf . Acessado em 07 de janeiro de 2009.

MUSKUNIENE V, SARALAIUSKAS J, JACQUOT J-P, CENAS N. Nitroreductase reactions of Arabidopsis thaliana thioredoxin reductase. **Biochim Biophys Acta**, v.1366, p.275–283,1998.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL-NRC. **The future role of pesticides in Us agriculture**.Washington, D.C.: Nation Academy Press., 2000,258p.

NIST MASS SPEC DATA CENTER- National Institute of Standards and Technology., Disponível em: <http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>. Acesso em: 25 novembro 2008.

OECD. Organization for economic co-operation and development . Guidelines for the testing of chemicals. Number 201/2006. **FreshWater Alga and Cyanobacterial, Growth Inhibition Test**. Disponível em : <http://www.oecdbookshop.org/oecd/display.asp?K=5LMQCR2K7S5H&lang=EN&sf1=SeriesIdentifier&st1=SER-00591E1&m=1&dc=27&plang=en>

PAKALA S. B. ; GORLA P. ; PINJARI A. B.; KROVIDI R.K. ; BARU R. ; YANAMANDRA M.; MERRICK M.; SIDDAVATTAM D. Biodegradation of methyl parathion and p-nitrophenol:evidence for the presence of a p-nitrophenol 2-

hydroxylase in a Gram-negative *Serratia* sp. strain DS001. **Appl Microbiol Biotechnol**, v.73, p.1452–1462, 2007.

PASCHOAL, A. D. **Pragas, praguicidas e a crise ambiental: problemas e soluções**. Rio de Janeiro, Fundação Getúlio Vargas, 1979. 102 p..

PAWLISZYN, J. **Solid Phase Microextraction : Theory and Practice**. 1 ed. New York: Wiley-VCH, Inc., 1997,554p.

PFLUGMACHER, S., WIENCKE, C., SANDERMANN, H., Activity of phase I and phase II detoxification enzymes in Antarctic and Arctic macroalgae. **Mar. Environ. Res.**v.48, p.23–36, 1999..

PFLUGMACHER,S., SCHRODER,P., SANDERMANN JR., H.,. Taxonomic distribution of plant glutathione S-transferases acting on xenobiotics. **Phytochemistry**, v.54, p.267–273, 2000.

PFLUGMACHER,S., SANDERMAN JR.,H. Cytochrome P450 monooxygenases for fatty acids and xenobiotics in marine macroalgae. **Plant Physiol.** v.117, p.123–128, 1998.

PURCELL, M., CARPENTIER, R., BE´LANGER, D., FORTIER, G., Immobilized plant thylakoid membranes as a biosensor for herbicides. **Journal of Biotechnology Techniques**, v.4 ,n.5, p.363–368, 1990.

RAO, P.S.C., BELLIN, C.A., BRUSSEAU, M.L. Sorption and Degradation of Pesticides and Organic Chemicals in Soil. **SSSA Special Publication**, n. 32, p. 1–26, 1993.

RIBOO, C., GONZALES,O.;HERRERO,C.,CID,A. Physiological responses of freshwater microalga (*Chlorella vulgaris*) to tryazine herbicides. **Aquatic toxicology**, v.59, p.225-235, 2002.

RICHARDSON, L.L.; Remote Sensing of algal bloom dynamics; New research fuses remote sensing of aquatic ecosystems with algal accessory pigment analysis. **BioScience**, v. 46, n. 7, p. 492-501, 1996

RISSATO S.R.; LIBANO M.; GIAFFERIS G. P; GERENUTTI M. Determinação de pesticidas organoclorados em água de manancial, água potável e solo na região de Bauru(SP) .**Quim. Nova**, v. 27, n. 5, p.739-743, 2004.

SAMPAIO D.P.A. ; GUERRA M.S. **Receituário agrônomo: guia prático para a nova lei dos agrotóxicos**, 2ª. edição, Editora Globo, São Paulo, 1991. 436p..

SANDERMANN JR., H. Plant metabolism of xenobiotics. **Trends Biochem. Sci.** v.17,p.82–84,1992.

SANDERMANN JR., H. Higher plant metabolism of xenobiotics: the “green liver”concept. **Pharmacogenetics**, v.4, p.225–241, 1994.

SANDERMANN JR., H., Molecular ecotoxicology of plants. **Trends Plant Sci.** v.9, p.17–32, 2002.

SINDAG -**SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA DEFESA AGRÍCOLA** . Disponível em : <http://www.sindag.com.br/> Acesso em 7 de janeiro de 2009.

SMITAL, T., SAUERBORN, R., HACKENBERGER, B.K. Inducibility of the P-glycoprotein transport activity in the marine mussels *mytilus galloprovincialis* and the freshwater mussel (*Dreissena polymorpha*). **Aquat. Toxicol.** v.65, p. 443–465, 2003.

SOBREIRA AEG.; ADISSI PJ. **Agrotóxicos: falsas premissas e debates.** Ciência & Saúde Coletiva, Rio de Janeiro, v. 8, n. 4, p. 985-990, 2003

STEGEMAN, J.J., HAHN, M.E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: current perspective on forms, functions and regulation. Publishers, CRC Press, **Boca Raton**, p. 87–206, 1994.

THE MERCK INDEX: **an encyclopedia of chemicals, drugs, and biological** Susan Budavari, editor emeritus ; Maryadele J. O'Neil . 13th. ed. Whitehouse Station, NJ : Merck, 2001.

THIES F.; BACKHAUS T.; BOSSMANN B.; CRIMME.H. Xenobiotic Biotransformation in Unicellular Green Algae. Involvement of Cytochrome P450 in the Activation and Selectivity of the Pyridazinone Pro-Herbicide Metflurazon. **Plant Physiol.** v.112,p. 361-370,1996.

TORRES M.A, BARROS M.P, CAMPOS S.C.G, PINO E, RAJAMANI S, SAYRE R.T , COLEPICOLO P. Biochemical biomarkers in algae and marine pollution: A review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.71, p. 1– 15, 2008.

TOOD, S.J., CAIN, R.B., SCHMIDT, S. Biotransformation of naphthalene and diarylethers by green microalgae. **Biodegradation**, v.13, p.229–238, 2002.

VALLE,S;COSTA,F.A.M. **As incertezas dos alimentos transgênicos.** Agroanalysis, p.35,1999.

VIDOTTI EC, ROLLEMBERG MCE. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à biorremediação e à química analítica. **Quim. Nova**, v.27, n.1, p.139-45, 2004.

WANG, J.S., CHOU, H.N., FAN, J-J., CHEN, C-M.,. Uptake and transfer of high PCB concentrations from phytoplankton to aquatic biota. **Chemosphere** v.36, 1998

WAUCHOPE, R.D.; BUTTLER, A.G.; HORNSBY, P.W.M.;AUGUSTIJN-BECKERS, P.W.M.; BURT, J.P. The SCS/ARS/CES pesticide properties database for environmental decision-making. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v.123, p. 1-164, 1992.

YUDELMAN M, RATT A, NYGAARD D. **Pest management and food production looking to the future. Food, Agriculture and Environment Discussion Paper 25.** Washington: IFPRI; 1998. Disponível em: <http://www.ifpri.org/2020/dp/dp25.pdf> Acesso em 7 de janeiro de 2009.

ZAMBLOTOWICZ RM; LOCKE MA ; HOAGLAND RE ; KNIGHT SS; CASH B. Fluorescent *Pseudomonas* isolates from Mississippi Delta oxbow lakes : in vitro herbicide biotransformation. **Environ Toxicol** , v.16, n.1 , p. 9-19, 2001.

ZANGAR, R.C., DAVYDOV, D.R., VERMA, S. Mechanisms that regulate production of reactive oxygen species by cytochrome P450. **Toxicol. Appl. Pharm.** 199,316–331, 2004.

ZAYED S.M., MOSTAFA I.Y., FARGHALY M.M. ; ATTABY H.S. ; ADAM Y.M. ; MAHDY F.M. Microbial degradation by *Aspergillus carneus*, *Fusarium oxysporum*, and *Trichoderma viride*. **J. environ. Sci Health B**, v.18, n.2, p.253-67, 1983.

ZDENKO GARDIAN, LADISLAV BUMBA, ADAM SCHROFEL, MIROSLAVA HERBSTOVA, JANA NEBESAROVA, FRANTISEK VACHA . Organisation of Photosystem I and Photosystem II in red alga *Cyanidium caldarium*: Encounter of cyanobacterial and higher plant concepts. **Biochimica et Biophysica Acta** v.17, n.67, p.725–731, 2007.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)