



SÉRGIO MURILO SOUSA RAMOS

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS DE SOLO PARA A
BIODEGRADAÇÃO DO PESTICIDA ORGANOFOSFORADO
CLORPIRIFÓS**

**RECIFE
FEVEREIRO/2014**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DE FUNGOS

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS DE SOLO PARA A
BIODEGRADAÇÃO DO PESTICIDA ORGANOFOSFORADO
CLORPIRIFÓS**

SÉRGIO MURILO SOUSA RAMOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Fungos do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Biologia de Fungos.

Área de Concentração: Micologia Básica

Orientadora: Dr^a. Neiva Tinti de Oliveira

Co-orientadora: Dr^a. Cristina Maria de Souza Motta

RECIFE
FEVEREIRO/2014

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Ramos, Sérgio Murilo Sousa

Isolamento e seleção de fungos de solo para biodegradação do pesticida organofosforado clorpirifós / Sérgio Murilo Sousa Ramos. – Recife: O Autor, 2014.

58 f.: il.

Orientadores: Neiva Tinti de Oliveira, Cristina Maria de Souza Motta
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Pós-graduação em Biologia de Fungos, 2014.
Inclui referências e

1. Fungos 2. Pesticidas 3. Biorremediação I. Oliveira, Neiva Tinti de (orient.) II. Motta, Cristina Maria de (coorient.) III. Título.

579.5

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2014-273

**ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS DE SOLO PARA A
BIODEGRADAÇÃO DO PESTICIDA ORGANOFOSFORADO
CLORPIRIFÓS**

SÉRGIO MURILO SOUSA RAMOS

Data da defesa: 25 de fevereiro de 2014.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr^a. Neiva Tinti de Oliveira (Orientadora)

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dr^a. Patrícia Vieira Tiago

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dr. Antonio Félix da Costa

Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA)

Dr^a. Mariele Porto Carneiro Leão (Suplente)

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dr^a. Janette Magali de Araújo (Suplente)

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dedico este trabalho a minha família que tanto amo.

Sérgio Ramos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha existência, pela família que tenho e por todas as alegrias que já me foram proporcionadas. Enfim, agradeço a Deus por ter me dado o dom da vida;

Agradeço aos meus pais, José Domingos Ramos e Maria do Carmo Souza Ramos, por terem me criado com dignidade e amor, ensinando-me a respeitar o próximo como a mim mesmo e por me transmitirem os princípios da boa convivência em sociedade;

Agradeço aos meus irmãos, Paulo Roberto Souza Ramos e Rossana Raquel Souza Ramos, pelo companheirismo, afeto, amor e apoio em tudo que faço na vida;

Agradeço a minha orientadora professora Dr^a. Neiva Tinti de Oliveira pela paciência, apoio, carinho e dedicação para que esse trabalho pudesse ser finalizado com tranquilidade e qualidade;

Agradeço a minha co-orientadora professora Dr^a. Cristina Maria de Souza Motta pelo apoio, colaboração e por estar sempre solícita e sorridente nos momentos em que mais precisei;

Agradeço a colaboração, apoio incondicional e extraordinário empenho do Dr. Antonio Félix da Costa do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), ajudando-me a resolver muitos dos contratemplos que esse trabalho proporcionou ao longo destes dois anos;

Agradeço à professora Dr^a. Patrícia Vieira Tiago e ao professor Sidney Turyassu Gomes Bastos pela colaboração intelectual, profissional e por serem sempre solícitos nos momentos em que mais precisei;

Agradeço ao Agrônomo Venézio Felipe dos Santos do Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA) pela enorme colaboração na estatística deste trabalho e pela aula que me foi ministrada sobre este assunto;

Agradeço ao Dr. Anesio Bianchini do Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR) pelo apoio e colaboração, pondo-me em contato junto às empresas produtoras de agrotóxico e na resolução de um dos grandes empecilhos que tive neste trabalho;

Agradeço a todas as amigas e amigos professores e funcionários do Colégio Educador Paulo Freire, à Gestora Rozeane Maria Cavalcanti de Almeida, à Gestora Adjunta Maria Marta de Macena Sobreira, às Técnicas Educacionais Alaiza Maria Lima de Oliveira da Silva e Luciana Barbosa da Silva, ao Coordenador Pedagógico João Luiz de Lima, à Assistente Administrativa Educacional Inelzira Jane de Melo Gouveia e,

especialmente, ao amigo e Secretário Paulo Fernando Alves de Queiroz por terem me apoiado, principalmente, nos momentos em que não foi possível conciliar as atividades do mestrado com o horário de trabalho;

Agradeço a todas as amigas e amigos professores do Colégio Invest, à Direção, Coordenação, Secretaria e Educadores de Apoio bem como a todos os funcionários desta instituição de ensino, em especial, ao Diretor Carlos Cezar Moura de Lima pela compreensão em todos os momentos em que não pude participar de atividades da escola em virtude das atribuições do mestrado;

Agradeço a todas as minhas amigas e amigos de turma pelos bons momentos que compartilhamos, pela colaboração e apoio ao meu trabalho e pelos vários ensinamentos que com todos aprendi;

Agradeço, especialmente, ao amigo Renan Barbosa do Nascimento pelo imprescindível apoio e colaboração, pela importante experiência de bancada que me proporcionou e pela amizade saudável e verdadeira, construída ao longo destes dois anos.

Agradeço aos demais amigos e amigas mestres, mestrandos, doutores e doutorandos do Departamento de Micologia que sempre me ajudaram e apoiaram no que precisei, em especial, às Doutoradas Thaís Emanuelle Feijó de Lima, Mariele Porto Carneiro Leão e Susane Cavalcanti Chang por toda a colaboração, apoio e amizade construída ao longo desta jornada;

Agradeço a todos os demais professores do Departamento de Micologia e demais funcionários por serem sempre solícitos e colaboradores dos projetos ali desenvolvidos;

Agradeço à tecnóloga da Micoteca URM Eliane Barbosa da Silva Nogueira pelo apoio, colaboração e por sempre providenciar os reagentes e materiais de que precisei durante os experimentos;

Agradeço ao meu amigo e irmão Irani Pinto da Paz pelo companheirismo, apoio a este trabalho e amizade verdadeira, construída ao longo de mais de cinco anos;

Agradeço aos meus amigos e irmãos Maurício Brainer Júnior, Leandro Galindo da Silva e Graciliano Canejo Martins pelo apoio e colaboração incondicionais a este trabalho e pela amizade sincera, construída há mais de 15 anos;

Agradeço ao casal de amigos Guilherme de Coimbra Santos e Genésia Tatiana Cordeiro Coimbra pelo incentivo e apoio a este trabalho e pelos longos anos de amizade;

Agradeço à FACEPE que fomentou estes dois anos de pesquisa e à Universidade Federal de Pernambuco pela oportunidade de crescimento intelectual desde a minha graduação até este momento;

RESUMO GERAL

ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS DE SOLO PARA A BIODEGRADAÇÃO DO PESTICIDA ORGANOFOFORADO CLORPIRIFÓS

A aplicação de agrotóxicos pela agricultura é uma importante fonte de contaminação do solo e representa perigo toxicológico para a população humana em geral. Os fungos estão entre os principais agentes de degradação dos produtos agroquímicos. O clorpirifós é um agrotóxico organofosforado. Linhagens de fungos foram isoladas de solos agricultáveis dos municípios de Bezerros e Caruaru, no Estado de Pernambuco, e selecionadas *in vitro* no Departamento de Micologia da UFPE. Dentre as espécies selecionadas, após identificação por taxonomia clássica, oito foram objeto de estudo, quatro provenientes de Bezerros e quatro de Caruaru. Dentre as espécies de Bezerros estavam o *Aspergillus terreus*, *Penicillium Corylophilum*, *Fusarium oxysporum* e *Trichoderma harzianum*. As espécies de Caruaru foram *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus tamarii* e *Aspergillus japonicus*. Todas estas espécies foram expostas a cinco concentrações do agrotóxico cujo princípio ativo é o clorpirifós, além do grupo controle. Para isto, acresceram-se 0,1mL; 0,2mL; 0,3mL; 0,4mL e 0,5mL do agrotóxico, separadamente, a frascos de Erlenmeyer contendo 200 mL do meio de cultura extrato de malte-ágar, obtendo-se as concentrações em mL/L de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5, respectivamente. O controle foi o extrato de malte-ágar sem o agrotóxico. O experimento foi realizado em triplicata. O crescimento foi avaliado medição dos diâmetros das colônias no decorrer de sete dias. Os esporos foram contados na Câmara de Neubauer, além de ter sido realizado o teste da fenoloxidase. Todas as espécies mostraram-se tolerantes ao agrotóxico. O número de esporos apresentou-se variado frente ao agrotóxico. As espécies *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus terreus* foram positivas para o teste da fenoloxidase. Todos os fungos testados são biorremediadores de ambientes impactados pelo agrotóxico clorpirifós. Como perspectiva futura será realizado o teste líquido para quantificar o percentual de degradação deste agrotóxico por estes fungos.

Palavras-chaves: fungos, organofosforado, clorpirifós, biorremediação.

ABSTRACT

ISOLATION AND SELECTION OF SOIL FUNGI FOR BIODEGRADATION OF THE ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDE CHLORPYRIFOS

The application of pesticides in agriculture is an important source of soil contamination and represents toxicological hazard to the human population in general. The fungi are among the main agents of degradation of agrochemicals. Chlorpyrifos is an organophosphate pesticide. Strains of fungi were isolated from croplands of Bezerros and Caruaru municipalities in the State of Pernambuco and selected in vitro in the Department of Mycology UFPE. Among selected after identification by classical taxonomy species, eight were the object of study, four from Bezerros and four from Caruaru. Among the species of Bezerros were *Aspergillus terreus*, *Penicillium Corylophilum*, *Fusarium oxysporum* and *Trichoderma harzianum*. Caruaru's species were *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus tamaris* and *Aspergillus japonicus*. All these species were exposed to five concentrations of the pesticide whose active ingredient was chlorpyrifos beyond control group. For this, further compounded 0.1 mL, 0.2 mL, 0.3 mL, 0.4 mL and 0.5 mL of pesticides separately in Erlenmeyer flasks containing 200 ml of culture medium malt extract agar, obtaining the concentrations mL/L of 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5, respectively. The control was the malt extract agar without pesticides. The experiment was performed in triplicate. Growth was monitored by measuring the diameters of the colonies during seven days. The spores were counted in a Neubauer chamber, addition of the phenol oxidase test was carried out. All species were tolerant to pesticides. The species *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus terreus* tested were positive for phenol oxidase. All tested fungi are bioremediator of impacted environment by chlorpyrifos. As a future perspective fluid testing will be performed to quantify the percentage of degradation of this pesticide by these fungi.

Key-words: fungi, organophosphate, chlorpyrifos, bioremediation.

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1- Fórmula estrutural do Clorpirifós	16
Figura 2- Fórmula estrutural dos metabólitos do Clorpirifós TCP e TMP.....	17
Figura 3- Mecanismo de Hidrólise do Clorpirifós	17
Figura 4 - Procedimento de Coleta do Solo	32
Figura 5- Isolamento dos Fungos	34
Figura 6- Teste de tolerância ao agrotóxico organofosforado clorpirifós	35
Figura 7- Teste da Fenoloxidase-Reação de Bavendamm	37

Lista de tabelas

	Pág.
Tabela 1- Classificação toxicológica dos agrotóxicos baseados na Dose Letal 50 e na Concentração Letal 50 de formulações líquidas e sólidas	14
Tabela 2- Informações sobre a classificação toxicológica e ingestão diária aceitável dos inseticidas organofosforados	15
Tabela 3- Propriedades físico-químicas do Clorpirifós	18
Tabela 4- Uso do Clorpirifós na Agricultura	19
Tabela 5- Análise física do solo em área de cultivo de hortaliças do Sítio Sapucarana, localizado em Bezerros-PE	32
Tabela 6- Análise química do solo em área de cultivo de hortaliças do Sítio Sapucarana, localizado em Bezerros-PE	33
Tabela 7- Análise física do solo em área de cultivo de hortaliças do Sítio Peladas, localizado em Caruaru-PE	33
Tabela 8- Análise química do solo em área de cultivo de hortaliças do Sítio Peladas, localizado em Caruaru-PE	33
Tabela 9- Análise do Crescimento das espécies no Teste de Tolerância	44
Tabela 10- Análise do Crescimento das espécies no Teste de Tolerância	45
Tabela 11- Médias de crescimento dos fungos ao interagirem com distintas concentrações do agrotóxico	47
Tabela 12- Produção de Esporos dos fungos ao interagirem com distintas concentrações do agrotóxico	49
Tabela 13- Teste da Fenoloxidase	50

SUMÁRIO	Pág.
1.INTRODUÇÃO	12
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	
2.1. Agrotóxico organofosforado clorpirifós: definição, classificação, toxicidade e aplicabilidade.....	13
2.2. Isolamento e seleção de fungos do solo para a degradação de agrotóxicos.....	21
2.3. Fatores associados à degradação de agrotóxicos a serem considerados em relação a biodegradação.....	22
2.4. A biorremediação como atividade essencial nos mecanismos de descontaminação de solos impactados com agrotóxicos.....	25
2.5. Fungos e agrotóxicos: interação que resulta na remediação dos solos impactados.....	27
2.6. Ferramentas experimentais utilizadas para quantificar o teor de resíduos agroquímicos em ambientes contaminados pelos mesmos.....	30
3. MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 Coleta do Solo.....	
3.1.1 Área de coleta.....	31
3.1.2 Procedimento de Coleta.....	31
3.1.3 Análise Físico-Química do Solo.....	32
3.1.4 Isolamento dos Fungos do Solo.....	33
3.1.5 Critérios de Seleção dos isolados com base em um teste de tolerância piloto.....	34
3.1.6 Procedimento de Identificação das colônias.....	35
3.1.7 Teste de Tolerância.....	35
3.1.8 Análise do Crescimento dos isolados no Teste de Tolerância.....	35
3.1.9 Contagem do Número de Esporos na Câmara de Neubauer.....	36
3.2 Teste da Fenoloxidase.....	36
3.3 Análise Estatística.....	37
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
4.1 Seleção das Unidades Formadoras de Colônia (UFC).....	
4.2 Colônias Identificadas.....	38
4.3 Teste de Tolerância.....	38
4.4 Análise do crescimento micelial dos fungos frente às diferentes concentrações do clorpirifós conforme dados estatísticos.....	45
4.5 Esporulação dos fungos em diferentes concentrações de clorpirifós conforme dados estatísticos	47
4.6 Teste da Fenoloxidase.....	49
5. CONCLUSÕES	51
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

A aplicação intensiva de agrotóxicos (herbicidas, inseticidas e fungicidas) pela agricultura convencional é uma importante fonte de contaminação do ecossistema edáfico, compromete a atividade da biodiversidade microbiana do solo e representa perigo toxicológico para a população humana em geral. Em virtude disso, pesquisas associadas à biodegradação de pesticidas e compostos relacionados despertaram o interesse dos pesquisadores (ARAÚJO, 2000).

Biodegradação é a degradação biológica de um composto químico orgânico em outra forma e pode ser a alteração em um átomo da molécula, ou até a degradação em água e CO₂. A biodegradação ideal seria a mineralização, que é a transformação em água, CO₂, compostos orgânicos e inorgânicos iguais aos existentes na natureza não tóxicos (RAYMOND et al., 2001).

Além das bactérias e dos actinomicetes, os fungos estão entre os principais agentes de transformação e degradação dos produtos agroquímicos. Fungos geralmente transformam pesticidas e outros xenobióticos (compostos químicos sintetizados pelo homem que incluem plásticos, solventes, lubrificantes, detergentes, agrotóxicos e uma ampla variedade de subprodutos da indústria química com diferentes modos de ação e toxicidade) pela introdução de pequenas mudanças estruturais em moléculas não tóxicas. O pesticida biotransformado é liberado no solo onde estará susceptível de ser degradado agora por bactérias (GIANFREDA; RAO, 2004).

O mecanismo biológico de biorremediação, mediante a existência de várias tecnologias que utilizam processos químicos e/ou físicos para a descontaminação de ambientes poluídos, é a alternativa ecologicamente mais adequada e eficaz para o tratamento de ambientes contaminados por agroquímicos orgânicos e de difícil degradação (GAYLARD; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

Fungos apresentam ação direta na ciclagem dos nutrientes do ecossistema solo e, portanto, são influentes remediadores de ambientes impactados por agrotóxicos e outros xenobióticos na vida do planeta (MOREIRA; SIQUEIRA apud BERNA, 2001).

O ecossistema edáfico é um excelente reservatório para o isolamento de microorganismos. Assim, fatores inerentes ao solo como a localização geográfica, a temperatura, o tipo, o pH, o conteúdo de matéria orgânica, o cultivo, a aeração e a umidade devem ser considerados como determinantes da biodiversidade existente num solo em particular

(Davis & Williams, 1970). Deste modo, a análise físico-química do solo, após a coleta, deve ser feita para referências futuras.

Na etapa de seleção dos fungos com potencial para degradar agrotóxicos utilizam-se meios de cultura seletivos (Hankin & Anagnostakis, 1977).

A estrutura molecular do agrotóxico, sua concentração no solo, a temperatura, a umidade e características físico-químicas do solo são fatores determinantes para a disponibilidade de um pesticida para plantas, animais e micro-organismos em geral (Anderson, 1984).

Os pesticidas organofosforados são todos inseticidas menos tóxicos aos vertebrados que os organoclorados. Constituem o grupo químico de agrotóxicos formados por ésteres de ácido fosfórico e outros ácidos à base de fósforo. Na década de 40, foram os primeiros a substituírem os representantes do grupo dos organoclorados, aos quais os insetos já apresentavam resistência (SUCEN, 2007).

A cromatografia e a espectrometria de massas são duas importantes ferramentas utilizadas na quantificação de resíduos de agroquímicos em ambientes contaminados pelos mesmos (Degani, A. L. G., Cass, Q. B., & Vieira, P. C., 2011).

Este trabalho tem o objetivo de isolar e selecionar fungos do solo que apresentem a capacidade de degradar agrotóxicos do grupos dos organofosforados, especificamente o organofosforado clorpirifós, aplicado em um amplo espectro de pragas do campo em culturas economicamente importantes.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. AGROTÓXICO ORGANOFOSFORADO CLORPIRIFÓS: DEFINIÇÃO, CLASSIFICAÇÃO E APLICABILIDADE

Segundo o Artigo 2º da Lei 7.802 de 11 de julho de 1989, agrotóxicos e produtos afins são aqueles agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de: produção, armazenamento e beneficiamento; produtos agrícolas; nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas; outros ecossistemas; e também ambientes urbanos, hídricos e industriais com a finalidade de alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.

Os agrotóxicos, em conformidade com o mecanismo de ação, são divididos em piretroides, piretrinas e inibidores de colinesterase, como os organofosforados e os carbamatos (OGA, 2003).

Quanto ao grau de toxicidade, conforme dados de 2002 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), os agrotóxicos estão distribuídos em quatro classes: classe I – Extremamente Tóxico; classe II – Altamente Tóxico; classe III – Medianamente Tóxico e classe IV – Pouco Tóxico.

A classificação toxicológica dos agrotóxicos está apresentada na Tabela 1, tendo como parâmetros a Dose Letal (DL₅₀) e a Concentração Letal (CL₅₀), que representam as doses estatisticamente derivadas a partir da administração única de uma substância química a qual se espera causar a morte de 50% dos animais de uma dada população de organismos expostos, de acordo com a via de administração, em condições experimentais definidas.

Tabela 1. Classificação toxicológica dos agrotóxicos baseados na Dose Letal₅₀ e na Concentração Letal₅₀ de formulações líquidas e sólidas

Classe	Toxicidade	DL ₅₀ oral (mg kg ⁻¹)		DL ₅₀ dérmica (mg kg ⁻¹)		CL ₅₀ inalatória
		Líquido	Sólido	Líquido	Sólido	
I	Extremamente	≤ 20	≤ 50	≤ 40	≤ 10	≤ 0,2
II	Altamente	20-200	5-50	40-400	10-100	0,2-2,0
III	Medianamente	200-2000	50-500	400-4000	100-1000	2,0-20,0
IV	Pouco tóxico	>2000	>500	> 4000	>1000	> 20,0

DL: Dose Letal CL: Concentração Letal
 Fonte: AMARAL, 2007.

Houve um aumento no uso de agrotóxicos organofosforados no Brasil e nos demais países em desenvolvimento devido a sua aplicabilidade ser bem diversificada. Eles são utilizados como inseticidas (doméstico, agrícola e veterinário), acaricidas, nematicidas, fungicidas e herbicidas, no controle de parasitas em fruticultura, horticultura, cultura do algodão, cereais, sementes e plantas ornamentais. São rapidamente hidrolisados, tanto no meio ambiente, como nos meios biológicos, e altamente lipossolúveis, com alto coeficiente de partição óleo/água (OGA, 2003).

Muitos organofosforados estão envolvidos em intoxicações acidentais, ocupacionais e suicidas, o que resulta em sequelas ou mortes devido à exposição aos mesmos (ROCHA JÚNIOR et al., 2004). Estes produtos são biodegradáveis, com persistência curta no solo, de 1 a 3 meses. O principal meio de degradação no ambiente passa pela hidrólise sob condições de alcalinidade. É importante que estes compostos sejam estáveis em pH neutro,

devido as suas formulações em óleos concentrados, solventes miscíveis em água e grânulos inertes, para aplicação direta ou após dispersão em água (PENA et al. 2003).

Em seu estudo, RUSSO et al. (2002) encontraram organofosforados em tecidos humanos de rins, fígado e tecido adiposo de pacientes saudáveis e afetados por câncer. Os níveis destes foram quantificados em nanogramas de agrotóxico por grama de tecido.

No Brasil há autorização para o uso pelo agricultor de 37 ingredientes ativos de agrotóxicos do grupo químico dos organofosforados. Dez recebem a classificação toxicológica I (extremamente tóxico), dezesseis a classificação II (altamente tóxico), nove a classificação III (medianamente tóxico) e dois a classificação IV (pouco tóxico). É importante destacar que a maioria destes agroquímicos autorizados estão classificados como extremamente tóxico e altamente tóxico (como o clorpirifós, por exemplo) para o ser humano (Amaral, 2007). Alguns estão demonstrados na Tabela 2.

Tabela 2. Informações sobre a classificação toxicológica e ingestão diária aceitável (IDA) dos inseticidas organofosforados

IA/nome comum	IDA (mg Kg ⁻¹ mc)	Classe Toxicológica	IA/nome comum	IDA (mg Kg ⁻¹ mc)	Classe Toxicológica	IA/nome comum	IDA (mg Kg ⁻¹ mc)	Classe Toxicológica
Acefato	0,03	III	Etiona	0,002	II	Naledo		III
Azametifós		III	Etoprofós	0,004	I	Piridafetiona		IV
Bromofós	0,04	II	Fenclorfos		III	Profenofós	0,01	II
Cadusafós	0,0003	I	Fenitrotiona	0,005	II	Protiofós		II
Clorpirifós	0,01	II	Fentoato		II	Tebupirinfós	0,0002	I
Diazinona	0,002	II	Forato	0,0005	I	Temefós		III
Diclorvós	0,004	II	Iodofenfós			Terbufós	0,0002	I
Dimetoato	0,002	II	Malationa	0,3	III	Triazofós	0,001	II
Dissulfotom	0,0003	I	Metamidofós	0,004	I	Triclorfom	0,01	II

Fonte: AMARAL, 2007

O clorpirifós é um agrotóxico organofosforado. Foi introduzido em 1965 pela The Dow Chemical Company para uso generalizado como inseticida foliar para as culturas como arroz, cereais, algodão, tabaco, frutas, hortaliças, pastagens e plantas de horticultura ornamental (Kale et al., 1999; Mallick et al., 1999 apud Yu et al., 2008). Além de ser altamente tóxico (classe II), apresenta uma elevada lipossolubidade e é absorvido pela pele, bem como pelas membranas mucosas e vias respiratórias (PENA et al. 2003).

A estrutura molecular do clorpirifós é mostrada na Figura 1:

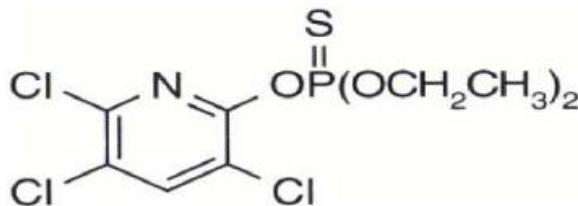


Figura 1. Fórmula estrutural do clorpirifós

O clorpirifós age na inibição da enzima acetilcolinesterase que resulta no acúmulo da acetilcolina, um neurotransmissor extremamente tóxico presente em animais, causando a interrupção dos impulsos nervosos e consequentemente a morte desses organismos (Mori, 2006).

A meia-vida do clorpirifós no solo é geralmente entre 60 e 120 dias, mas pode variar de duas semanas a mais de um ano, dependendo do tipo de solo, clima e outras condições (Iqbal, 2009). Devido à elevada lipossolubilidade que apresenta, é absorvido pelo organismo humano, especialmente pela pele, além de membranas mucosas e pela via respiratória (PENA et al., 2003). Os sinais de intoxicação por clorpirifós são: dor de cabeça, vertigem, perda de coordenação, espasmos, tremores, náuseas, diarreia e insalivação (MORI, 2006).

O clorpirifós é amplamente aplicado em solos norte-americanos no controle de cupins em uma dose de 1000mg.kg⁻¹. Cerca de 50% do uso desse veneno é no setor agrícola e 50% em setores não-agrícolas. Estima-se que 24% de todo o uso de clorpirifós é como termicida (SARDAR e KOLE, 2005).

Um dos produtos da hidrólise do clorpirifós é o composto 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), apresentando uma maior solubilidade em água do que o clorpirifós e provoca a contaminação generalizada nos solos e no ambiente aquático. Na degradação do clorpirifós, o TCP prejudica o rendimento no processo, pois possui uma alta atividade antimicrobiana, além de ser persistente à degradação por micro-organismos (Racke *et al.*, 1990; Caiceres *et al.*, 2007 e Feng et al., 1997 apud Iqbal *et al.*, 2009). Outro produto da degradação do clorpirifós é a substância 3,5,6-tricloro-metoxipiridina (TMP). A Figura 2 mostra a fórmula estrutural dos metabólitos do clorpirifós.

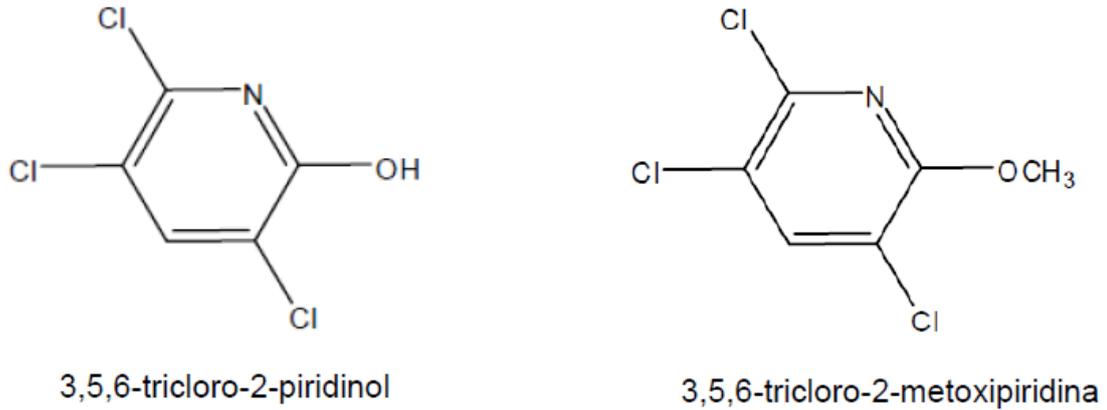


Figura 2. Fórmula estrutural dos metabólitos do Clorpirifós TCP e TMP.

A degradação do clorpirifós também tem sido estudada por cloração, ozonização, radiação e hidrólise (Xu *et al.*, 2008; Anwar *et al.*, 2009; Mohan *et al.*, 2004; Duirk e Collete, 2006; Acero *et al.*, 2008; Kralj *et al.*, 2007). A Figura 3 mostra o mecanismo de hidrólise do clorpirifós:

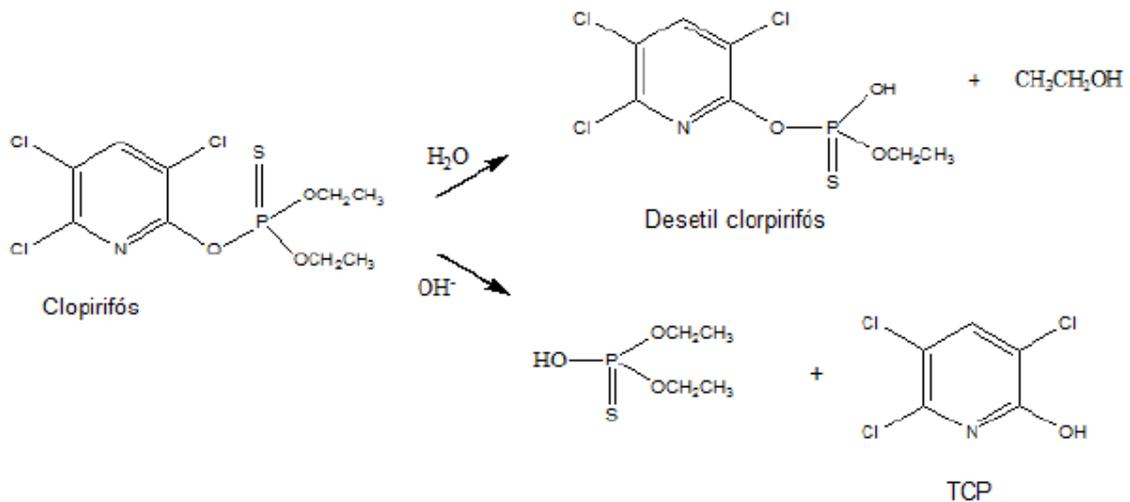


Figura 3. Mecanismo de Hidrólise do Clorpirifós.

Na Tabela 3 são apresentadas as principais propriedades físico-químicas do clorpirifós (DOW AGROSCIENCE, 2011).

Tabela 3. Propriedades físico-químicas do Clorpirifós

Propriedades	Características
Nome Químico	O,O-dietil-(3,5,6-tricloro-2-piridila) fosforotioato
Nome Comum	Clorpirifós
Massa Molar	350,6 g mol ⁻¹
Fórmula Estrutural	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS
Estado Físico	Sólido Cristalino
Cor	Branca
Odor	Mercaptana
Ponto de Fusão (°C)	41.5 – 42.5
Ponto de Ebulição (°C)	300
Pressão de Vapor a 25 °C	2,51 x 10 ⁻⁵ mmHg
Densidade a 21 °C	1,51 g/mL
Solubilidade	Acetona: 400 g/L a 20 °C
	Diclorometano: 400 g/L a 20 °C
	Hexano: 400 g/L a 20 °C
	Tolueno: 400 g/L a 20 °C
	Acetato de etila: 400 g/L a 20 °C
Coeficiente de partição n-octanol/água	Água: 1,05 mg/L a 25 °C
	50000
Estabilidade a 25 °C	pH 4,7 – 63 dias
	pH 6,9 – 35 dias
	pH 8,1 – 23 dias

Fonte: DOW AGROSCIENCE, 2011.

O limite máximo permitido para resíduos de clorpirifós (em grãos, vegetais e pastagens) varia de acordo com a cultura. Está registrado para o controle de diversas pragas (moscas, lagartas, ácaros, pulgões e outros) que atacam diversas culturas, entre as quais milho, soja, trigo, sorgo, feijão, café, algodão, citros, maçã, banana, batata, cenoura, repolho, tomate, couve e fumo (PENA et al., 2003). Na tabela 4, tem-se uma lista das pragas controladas pelo clorpirifós em diferentes tipos de cultura (MORI, 2006).

Tabela 4. Uso do Clorpirifós na Agricultura

Tipo de Cultura	Pragas Controladas
Algodão	Curuquere Ácaro Branco
Batata	Pulgão-verde Bicho mineiro
Café	Broca Bicho mineiro
Cevada	Pulgão amarelo das folhas Pulgão das espigas
Citrus	Mosca das frutas Cochinilha parlatoria
Couve e repolho	Pulgão Curuquere
Feijão	Broca da vagem Lagarta da vagem
Milho	Lagarta do cartucho Lagarta rosca

Fonte: DOW AGROSCIENCE, 2011.

O comportamento dos pesticidas difere nos diversos compartimentos naturais (água, ar, solo) em função de suas propriedades físicas, métodos de aplicação e condições ambientais (NAVARRO et al., 2004).

Muitos destes agrotóxicos sofrem alterações em sua estrutura química na água para a qual foram carreados, nos vegetais em que foram aplicados e no solo em que foram adsorvidos. Indivíduos que entram em contato com tais fontes de contaminação ingerem estes metabólitos ou o próprio produto e manifestam sérios problemas de saúde (LIMA et al., 2001).

A utilização dos inseticidas na agricultura para controle de pragas ainda é a principal fonte de contaminação ambiental. Outras formas de contaminação são: o uso em residências, para combater insetos como baratas e formigas; e em áreas urbanas, nas campanhas de saúde para controle de vetores que transmitem a febre amarela, dengue, doença de Chagas e malária (MORI, 2006).

No campo, uma vez aplicado o inseticida, parte fica retida nas folhagens e a porção maior atinge o solo, por gotejamento ou pela ação da água da chuva ou de irrigação. Na interação solo/inseticida o resultado poderá ser a volatilização, retenção ou percolação, o que depende das propriedades físico-químicas do inseticida e das características do solo. Além disso, há a possibilidade do contaminante sofrer um deslocamento superficial pela ação de chuvas torrenciais e atingir rios e lagos (SILVA E SILVA, 2007).

De acordo com os estudos de Racke et al. (1994) em solos americanos, as principais vias de degradação do clorpirifós são: a abiótica (pH, temperatura, etc...) e a microbiana, que resultam na formação de seus metabólitos principais, isto é, o TCP e o TMP.

Ao estudarem o potencial de contaminação de oito inseticidas de diferentes polaridades, incluindo o clorpirifós, em solos do cerrado brasileiro, Laabs et al. (2000) obtiveram resultados que mostraram o clorpirifós como sendo altamente dissipado por volatilização, o que foi favorecido pelas condições climáticas, com temperatura diária máxima variando de 35° a 45°C.

Estudos relacionados com a persistência e o metabolismo de clorpirifós em solos da Índia, bem como o seu efeito sobre a disponibilidade de nutrientes para as plantas (N, P e K) foram desenvolvidos por Sardar e Kole (2005). Os resultados apresentados mostram que o metabólito primário (TCP) foi detectado já no 3º dia após a aplicação, atingindo um nível máximo no 30º dia, com uma diminuição progressiva a níveis não detectáveis (ND) em 120 dias. Já o metabólito secundário (TMP) foi encontrado em diferentes tempos (30º, 15º e 7º dia), dependendo da dose aplicada, diminuindo a ND em um intervalo de 90 a 120 dias. Tal estudo mostrou uma diminuição significativa da disponibilidade de N e teor de P no solo.

No solo, os agrotóxicos podem interagir com a fase sólida, líquida e gasosa por diferentes processos que envolvem transformações químicas, físicas e biológicas. Como consequência, detecta-se no solo, a persistência desses compostos, o desaparecimento dos mesmos e o aparecimento de seus produtos de degradação que podem ser mais ou menos tóxicos que o produto original. Desta forma, essas informações irão determinar a utilidade dos agrotóxicos ou os efeitos prejudiciais causados pela persistência maior do que seria necessária para o controle (SILVA e SILVA, 2007).

Agrotóxicos, como o clorpirifós, que apresentam baixa solubilidade em água, têm tendência de se ligarem ao solo, diminuindo a sua movimentação e aumentando sua estabilidade (LEE e WYLIE, 1991).

O processo de sorção está entre os fatores mais importantes que regem o destino dos agrotóxicos no meio ambiente. Tal processo condiciona a acessibilidade desses compostos para os organismos alvos e seu potencial para atingir organismos não-alvos. A sorção pode resultar em uma diminuição da atividade biológica, um acréscimo na taxa de degradação e um atraso da movimentação por lixiviação (ELSHAFEI et al., 2009).

O mecanismo de sorção de inseticidas é muito complexo devido às numerosas interações com os constituintes das diferentes frações do solo. O comportamento de um inseticida no solo é dependente das características da matriz, como por exemplo, conteúdo de matéria orgânica do solo, capacidade de troca catiônica, pH, área superficial, composição mineralógica e conteúdo de argila (ZAMBONIN e PALMISANO, 2000).

As frações orgânicas e argila são as principais influenciadoras nos processos de sorção e, conseqüentemente, na movimentação dos agrotóxicos no solo (BOIVIN *et al.*, 2005). Outros fatores podem influenciar a sorção, tais como: temperatura, natureza do inseticida, granulometria do solo, presença de outros íons na solução do solo, formulação usada, concentração dos produtos adicionados e aplicações prévias (PRATA et al., 2001).

2.2. ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS DO SOLO PARA A DEGRADAÇÃO DE AGROTÓXICOS

O isolamento e seleção dos fungos do solo, dos quais se deseja estudar o potencial degradante sobre agrotóxicos ou outros xenobióticos, requer alguns cuidados operacionais para maximizar as chances de sucesso.

Coletas de amostras de solo com o intuito de isolar micro-organismos degradadores de agrotóxicos não precisam ser representativas da área em estudo. Coleta-se as amostras diretamente do local, com o cuidado de coletar pequenas sub-amostras, misturá-las e homogeneizá-las. É necessário considerar o transporte e as condições de armazenamento do solo como procedimentos que exigem cautela. Alterações na população microbiana podem ocorrer depois de poucas horas de obtenção da amostragem. Logo, recomenda-se que as amostras sejam analisadas, aproximadamente seis horas após a coleta (JENSEN, 1968).

Com o objetivo de minimizar problemas relacionados à aeração e à umidade, sugere-se coletar grandes blocos de solo e fracioná-los em pequenas porções antes do uso

(PAUL & CLARCK, 1989). A profundidade das amostras coletadas é outro dado a ser ressaltado. Em geral, coleta-se o solo rizosférico com cerca de 20 cm de profundidade.

Em laboratório, as amostras devem ser colocadas em sacos de polietileno, porque garantem uma boa aeração, e para manter a umidade, selam-se esses sacos em outros contendo gotas de água (CASIDA, et al., 1964).

Os meios de cultura seletivos utilizados para cultivar os fungos potencialmente degradadores de agrotóxicos são constituídos de uma solução de sais minerais suplementada com o agrotóxico em estudo, o qual é usado, via de regra, como fonte de carbono (HANKIN & ANAGNOSTAKIS, 1977). O isolamento do fungo em meio enriquecido com o agrotóxico e a medição do crescimento micelial em placa de Petri são parâmetros utilizados para determinar o efeito da toxidez do composto sobre o fungo e um indicador do potencial degradador deste ser vivo.

No trabalho de Colla et al., 2008, fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* apresentaram elevada capacidade de crescimento em meio contendo 50 ppm de atrazine, um indicativo da ação biorremediadora destes micro-organismos.

Um dos problemas associados à suplementação de pesticidas ao meio de cultura é o alto grau de toxicidade, insolubilidade em água, alta volatilidade ou instabilidade térmica do agrotóxico. Esses fatores, isolados ou associados, podem evitar ou inibir o crescimento dos fungos no meio de cultura suplementado, o que impossibilita o isolamento (BARTHA, 1990). Por outro lado, considerando que fungos degradadores de agrotóxicos são minoria no solo, essa técnica torna-se vantajosa como procedimento seletivo de micro-organismos biorremediadores, porque lhes dá uma vantagem seletiva frente aos micro-organismos mais abundantes no ambiente edáfico estudado.

2.3 FATORES ASSOCIADOS À DEGRADAÇÃO DE AGROTÓXICOS A SEREM CONSIDERADOS EM RELAÇÃO À BIORREMEDIAÇÃO

A extensão da adsorção e a taxa de dessorção das partículas sólidas do solo determinam a disponibilidade do agrotóxico para plantas, animais e micro-organismos.

Adsorção é o mecanismo pelo qual a molécula do agrotóxico é transferida da fase móvel (líquida ou gasosa) para a fase estacionária (sólida). Trata-se de um processo reversível e pode seguir ambas as direções adsorção ou dessorção. Desse modo, a adsorção

está relacionada com a mobilidade do produto químico. A baixa mobilidade é um indicativo de alta adsorção.

Fisicamente, o meio edáfico é subdividido em três partes: o material mineral (argila, silte e areia), a porção porosa preenchida de ar ou água e a matéria orgânica. Esta, por sua vez, é fracionada em três porções: a primeira é o componente macroscópico, particulado, constituído de restos de plantas e animais em diferentes estágios de decomposição. A segunda, é um conjunto de vários componentes orgânicos simples disponíveis, originários dos resíduos vegetais e animais (carboidratos, aminoácidos, proteínas). A terceira é o húmus, um componente complexo, de coloração escura, bastante aromático e polimérico, relativamente resistente à degradação (CERRI et al., 1991). O período de reciclagem (*turnover*) dos derivados orgânicos, compostos solúveis e húmus é, respectivamente, de 2-5 anos, 5-25 anos e 250-2500 anos (STEVENSON, 1982).

A degradação de poluentes pelos micro-organismos do solo é considerada a principal via determinante da persistência e do destino de um agrotóxico no solo. Dentre os seres que compõem a microbiota edáfica, os fungos se destacam nos processos de reciclagem de compostos recalcitrantes. Além disso, são efetivos e versáteis, pois apresentam capacidade enzimática de degradar substratos bastante complexos e poliméricos, como celulose, hemicelulose, lignina, amido, quitina, caseína, queratina e albumina. Todavia, as bactérias geralmente são efetivas na decomposição de produtos solúveis simples (RACKE, 1990).

O material mineral, isto é, a argila, a areia, o silte e a matéria orgânica são relevantes no processo de adsorção do agrotóxico ao solo. O tipo e a concentração dos solutos na solução circundante, o tipo e quantidade de minerais de argila e o teor de matéria orgânica, temperatura, pH, as propriedades do composto químico envolvido bem como o tipo de cátion que satura a argila, por exemplo, íons de Ca, Fe, Al ou H também são fatores igualmente importantes a serem considerados em estudos de degradação. Além disso, quanto mais argiloso é o solo e mais elevado é o teor de matéria orgânica maior é a adsorção, porque tanto a argila quanto o húmus apresentam grande superfície por unidade de volume. Para se ter uma ideia, um grama de argila pode ter uma área de 20 a 80 m² (ALEXANDER, 1994).

O teor de água no solo é imprescindível para a produção de novas células, bem como para a difusão de nutrientes e movimentação dos micro-organismos. Solos muito secos promovem a morte de células vegetativas. Por outro lado, se o nível hídrico for

excessivo, há o comprometimento do metabolismo microbiano aeróbio pela indisponibilidade de oxigênio, já que a porção porosa do solo está preenchida por água (LEAHY; COLWELL, 1990; MOREIRA; SIQUEIRA, 2006; TRINDADE, 2002).

O perfil da microbiota do solo também sofre influência do teor hídrico. Os fungos, por exemplo, suportam solos mais secos, porém não se desenvolvem em solos muito saturados. Já as bactérias apresentam um comportamento oposto (DEOTTI, 2005). O nível de água ideal no solo para o crescimento microbiano está em torno de 25% a 85% da capacidade de campo, dependendo do tipo de solo e do contaminante (SEABRA, 2005).

A temperatura do solo é outro fator influente no crescimento microbiano e no mecanismo de biodegradação. Temperaturas muito baixas reduzem a fluidez e a permeabilidade da membrana celular, o que inibe a absorção de nutrientes e do agroquímico (ALVAREZ, 2004; MAIER; PEPPER; GERBA, 2009). Em contrapartida, o elevado nível térmico, em torno de 40°C a 50 °C incapacita algumas células, resultando, em alguns casos, em morte, quando a temperatura atinge cerca de 70°C a 85°C devido à desnaturação de enzimas, proteínas e ácidos nucleicos (MOREIRA; SIQUEIRA, 2006).

Frehse (1983) definiu os termos comportamentais **persistência** e **persistente** como sendo o período no qual um agrotóxico permanece inalterado, ou seja, descreve o período em que o agrotóxico permanece depositado em uma superfície. Por sua vez, **recalcitrante** é uma terminologia utilizada para indicar substâncias persistentes no ambiente por vários anos sem modificações.

Os agrotóxicos, em pequenas proporções, apresentam alta persistência, isto é, têm seus resíduos detectados no solo vários anos após sua aplicação. Alguns fatores relacionados à persistência dos agrotóxicos no ambiente foram elencados por Alexander (1966), como: perda de potencial enzimático e biológico para decompor um dado produto; toxidez ambiental existente, que compromete o crescimento do micro-organismo capaz de degradar o agrotóxico; incapacidade do agroquímico penetrar na célula; a capacidade do agroquímico inibir o crescimento do micro-organismo bem como a produção de suas enzimas; a molécula do biocida pode estar inacessível, devido à adsorção ou recoberta por compostos de difícil penetrabilidade; a estrutura estérica do agrotóxico dificulta ou impede o ataque enzimático; a indisponibilidade ao ataque microbiano, por ser insolúvel.

A presença de substratos alternativos aos micro-organismos lhes permitem metabolizar agroquímicos como fonte de carbono e energia. Trata-se do fenômeno da **cometabolização**, isto é, o organismo metaboliza um composto alternativo e para isso

utiliza o agroquímico como fonte de carbono e energia. Horvath (1972) observou o cometabolismo em ambiente natural. Boa parte dos micro-organismos não cometabolizam, logo, trata-se de mais um fator favorecedor da persistência do biocida no ambiente. Além disso, alguns agrotóxicos que são decompostos *in vitro* persistem no ambiente, pois os micro-organismos responsáveis pela sua metabolização perderam a capacidade de competição e tornaram-se raros no ambiente.

2.4. A BIORREMEDIAÇÃO COMO ATIVIDADE ESSENCIAL NOS MECANISMOS DE DESCONTAMINAÇÃO DE SOLOS IMPACTADOS COM AGROTÓXICOS

A contaminação de águas subterrâneas e a perda de propriedades do ambiente edáfico está associada à introdução de contaminantes no solo. Isso atinge negativamente a cadeia alimentar, os diversos ecossistemas e o homem (RODRIGUES; DUARTE, 2003).

Em virtude do problema em questão, a pressão do governo aliada à opinião pública e ao estabelecimento de leis internacionais, que regulam a gestão ambiental, dedicam esforços para o desenvolvimento de tecnologias mais limpas para o tratamento de resíduos e a remediação de ambientes contaminados (BRITO et al., 2004).

O sucesso da biorremediação está ligado diretamente a uma ampla compreensão das condições físicas, químicas, biológicas e de uma minuciosa avaliação da aplicabilidade das técnicas “*in situ*” e “*ex situ*” (SANTOS, et al., 2007).

É essencial o investimento em métodos alternativos de tratamento de resíduos, assim como de remediação de áreas contaminadas. (CORRÊA et al., 2005).

A resistência a condições ambientais adversas, o alto potencial degradativo e biossortivo (remoção de metais e corantes) favoreceram a utilização de fungos filamentosos em processos de biorremediação nas últimas décadas (CONCEIÇÃO et al., 2005).

O primeiro estudo sobre a capacidade de degradação de poliuretano (PUR) por fungos endófitos define as promissoras fontes de diversidade desses micro-organismos quando se trata de atividades importantes para biorremediação (RUSSEL et al., 2011).

As características fúngicas que os tornam fundamentais e potencializadores dos sistemas de biorremediação são: a capacidade de crescer sob estresse ambiental limitante para o crescimento bacteriano; a maneira como crescem, induzidos quimioestaticamente em direção à fonte de carbono orgânico, pelo alongamento e ramificação das hifas, as quais

permitem a colonização de grandes áreas e o sistema de biodegradação fúngico, realizado por enzimas extracelulares. Tudo isso possibilita a otimização do contato superficial com o contaminante, o aumento da biodisponibilidade deste e, conseqüentemente, sua biodegradação (CHANDER; ARORA; BATH, 2004).

Dentre as estratégias de biorremediação, conforme Bento, Camargo e Okeke (2003), incluem-se a utilização de micro-organismos autóctones, isto é, do próprio local, sem qualquer interferência de tecnologias ativas de remediação (biorremediação intrínseca ou natural); a adição de agentes estimulantes como biosurfactantes, nutrientes e oxigênio (bioestimulação) e a inoculação de consórcios microbianos enriquecidos (bioaumento).

A biorremediação pode acontecer *in situ* ou *ex situ*. A primeira ocorre na própria área, sem haver a remoção do material contaminado. Como não há movimento de solos de um ambiente contaminado para outros locais destinados ao tratamento, evita-se, neste caso, custos e distúrbios ambientais associados a esta movimentação (MARIANO, 2006). A segunda é caracterizada pela remoção do solo contaminado para ser tratado em outro local. Este tipo é aplicado quando há possibilidades de contaminação de pessoas e do ambiente próximo do solo a ser biorremediado ou quando as concentrações do contaminante são elevadas e demanda a utilização de técnicas como biorreatores, compostagem entre outras (JACQUES et al., 2007).

A biorremediação intrínseca ou natural, um tipo de biorremediação *in situ*, por depender exclusivamente de processos naturais como biodegradação, volatilização (quebra de moléculas em substâncias voláteis), diluição (diminuição da concentração inicial do poluente) e sorção (adsorção dos poluentes à parede celular), pode ser muito lenta, o que exige a utilização conjunta de outras técnicas e, obrigatoriamente, o monitoramento da área por períodos longos com o intuito de proteger a saúde humana e o ambiente (JACQUES et al., 2007).

A bioaugmentação e a bioestimulação, também técnicas de biorremediação *in situ*, são utilizadas quando há um baixo percentual de degradação no solo devido à inexistência ou número reduzido de micro-organismos hábeis na decomposição de agrotóxicos. A primeira é caracterizada pela inoculação de micro-organismos com alto potencial de degradação dos agroquímicos na área contaminada (EDGEHILL, 1999). A segunda atua na estimulação da atividade dos micro-organismos nativos degradadores de poluentes pela introdução de nutrientes orgânicos e inorgânicos no solo (JACQUES et al., 2007).

A compostagem, uma das técnicas de biorremediação *ex situ*, é caracterizada pela remoção do solo a ser tratado (por estar contaminado com altos níveis de agrotóxico) do local de origem e colocação deste na forma de pilhas, num local que permita o controle da lixiviação e do escoamento superficial dos líquidos originados dessas pilhas. Desse modo, nesse solo, será desencadeado um mecanismo de degradação dos contaminantes orgânicos por micro-organismos aeróbios e a transformação destas substâncias tóxicas em material orgânico estabilizado, CO₂ e água (AHTIAINEN et al., 2002).

A utilização de biorreatores (semelhantes a tanques aéreos fechados), outra técnica *ex situ*, consiste na mistura de solo contaminado com água para obter uma suspensão com 10 a 40% de sólidos, que é mecanicamente aerada por meio de rotações. A formação dessa suspensão no interior do biorreator favorece o aumento da exposição dos contaminantes aos micro-organismos degradadores e a eliminação da heterogeneidade da distribuição dos contaminantes no solo, duas grandes limitações da biorremediação *in situ* (MACLEOD & DAUGULIS, 2005).

2.5 FUNGOS, AGROTÓXICOS E OUTROS COMPONENTES TÓXICOS: INTERAÇÃO QUE RESULTA NA REMEDIAÇÃO DOS SOLOS IMPACTADOS

O agrotóxico benomil é um fungicida sistêmico do grupo dos benzimidazois. Este grupo de agroquímico apresenta elevada seletividade e é utilizado no tratamento de sementes, do solo e em aplicações foliares. Um dos produtos da hidrólise do benomil é a substância carbendazin.

Carbendazim e benomil compartilham o mesmo modo de ação, isto é, interferem na mitose dos fungos, inibindo principalmente o desenvolvimento dos tubos germinais, a formação dos apressórios e o crescimento micelial (DAVIDSE, 1982; TOMLIN, 2000).

Fungos com potencial de degradar o benomil foram isolados e selecionados de três diferentes solos da região de agricultura irrigada do município de Guaíra, SP, com histórico de aplicação intensiva de fungicidas benzimidazois. Entre 10 linhagens de fungos isoladas, *Alternaria alternata* apresentou menor inibição em meio acrescido de 100 mg.mL⁻¹ de Benomil (21,84%) e, as demais linhagens apresentaram inibição de crescimento na dose máxima do fungicida, que variou entre 21% e 99%. Esse resultado indicou o elevado potencial de *Alternaria alternata* em degradar pesticidas do grupo dos benzimidazois frente a outros fungos do solo (SILVA, C.M.M.S et al.,1999).

Herbicidas como o picloram, ácido 4-amino 3,5,6 tricloro-2-piridinacarboxílico, são aplicados na formação e manutenção de pastagens. Todavia, uma das desvantagens dessa aplicação é a intoxicação de culturas sensíveis ao mesmo como a soja, o feijão e o algodão (CARMO, M. L., et al., 2008).

Piriformospora indica é um fungo endofítico de raiz que é facilmente cultivável em culturas axênicas (meio de cultura puro, não contaminado, livre de micro-organismos), o qual pode acumular compostos tóxicos ou prevenir a absorção destes pelas plantas (SUN, C., JOHNSON, J. M., CAI, D., SHERAMETI, I., OELMÜLLER, R., & LOU, B., 2010).

Teixeira, C.C et al submeteram *P.indica* ao picloram nas concentrações 0, 30, 120, 240 e 480 g.ha⁻¹ e observaram seu crescimento micelial. Até a concentração de 240 g.ha⁻¹, a massa seca do fungo foi influenciada positivamente, todavia, para 480 g.ha⁻¹ houve uma queda dessa massa. Isso foi explicado pela diminuição do aproveitamento do meio de cultura em função da exposição ao agrotóxico bem como pelo alto nível de pesticida aplicado, o que o tornou tóxico para o fungo em questão (MATTOS et al., 2010). Estes resultados demonstraram o quanto *Piriformospora indica* é tolerante ao pesticida picloram e revelam o potencial degradador do mesmo.

Fungos das espécies *Aspergillus flavus*, *A. sydowii*, *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Emericella nidulans*, *Fusarium oxysporum* e *Penicillium crysogenum* foram isolados da palha de trigo, selecionados e expostos a seis pesticidas pertencentes a quatro grupos de agrotóxicos organofosforados. Dentre os pesticidas utilizados, citam-se: derivados do ácido Fosforotioico como o inseticida Metil-pirimifós e o fungicida Pyrazofós; derivados do ácido Fosforoditioico como os inseticidas Dimetoato e Malation; derivados do ácido fosfônico como o herbicida Lancer e derivados do ácido fosfórico como o inseticida profenfós. Além disso, testou-se *in vitro* a atividade da enzima fosfatase produzida por aqueles fungos e a capacidade daquelas espécies degradarem no solo os defensivos agrícolas citados. Nesse experimento, os venenos rurais foram utilizados pelos fungos como única fonte de fósforo e nitrogênio. Das oito espécies cultivadas em meio líquido enriquecido e suplementado com 0,5 mmol/L dos pesticidas citados, sete cresceram em meio com metil-pirimifós e com pyrazofós, de onde obteve-se cerca de 58 a 81% e 50 a 101% de massa seca, respectivamente, quando comparado ao controle (0,5 mmol/L de KH₂PO₄). Além disso, *A. sydowii*, seguido de *F. oxysporum*, *A. niger*, *E. nidulans* e *A. flavus* apresentaram melhor tolerância em relação às demais espécies (HASAN, H. A. H., 1999).

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAPs) são compostos químicos formados unicamente de átomos de carbono e hidrogênio, arrançados na forma de dois ou mais anéis aromáticos. Em função da possível fusão de um número variável de anéis e das várias posições em que estes anéis podem se ligar entre si, há atualmente mais de 100 HAPs reconhecidos pela IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Por outro lado, apenas alguns HAPs são considerados importantes industrial, ambiental e toxicologicamente. São eles: acenaftaleno, acenaftileno, antraceno, benzo (b) fluoranteno, benzo (k) fluoranteno, benzo (g,h,i) pirelino, criseno, dibenzo (a,h) antraceno, fenantreno, fluoranteno, fluoreno, indeno (1,2,3-c,d) pireno, naftaleno e pireno (POTIN et al., 2004).

Os HAPs são gerados naturalmente pela combustão incompleta de substâncias orgânicas, como resíduos vegetais, madeira, matéria orgânica, etc. Além disso, a produção industrial de HAPs (para fabricação de corantes, de fibras sintéticas, de preservantes de madeira, etc.) é uma atividade antropogênica responsável pela contaminação do solo.

Duas categorias de fungos atuam na metabolização dos HAPs: os lignolíticos (degradadores da lignina) e os não-lignolíticos. O *Pleorotus ostreatus* é um fungo lignolítico que oxida o fenantreno, transformando-o em 9,10-fenantrenoquinona e, por clivagem deste anel, em 2,2'-difenoato. A partir deste metabólito, pode ser formado 2,2'-bifenildimetanol ou CO₂, este último por uma via bioquímica ainda não elucidada. Dentre os não-lignolíticos, a *Cunninghamella elegans* ao atuar na degradação de HAPs apresenta como um de seus metabólitos finais o 9-fenantril-beta-D-glicopiranosídeo (JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O., 2007).

O HCB ou hexaclorobenzeno, um agrotóxico organoclorado, é resultante da reação entre o benzeno sob excesso de cloreto, catalisada por cloreto férrico (Toledo, 2002). Além disso, pode ser originado como resíduo da fabricação de tetracloreto de carbono e percloroetileno (Verschueren, 1983). Não se observa a sua ocorrência natural no ecossistema (Matheus, 2003). Em função de sua elevada toxicidade e persistência no meio ambiente, a produção e comercialização de HCB foram proibidas, desde 1960, em muitos países (Toledo, 2002).

O HCB já foi utilizado principalmente como fungicida para preservar sementes e grãos de cereais, como constituinte de preservativos de madeira e de fogos de artifício, na fabricação do alumínio, de corantes vinil policlorados e de borracha sintética para produção de pneus (Barber et al., 2005).

Matheus et al. (2000) selecionaram fungos basidiomicetes capazes de degradar e mineralizar o hexaclobenzeno em condições laboratoriais. Este estudo foi baseado na velocidade do crescimento fúngico, capacidade de descoloração do corante Azul de Remazol Brilhante R e na tolerância às altas concentrações de HCB. O destaque desta atividade biorremediadora foi para os fungos *Psilocybe castanella* e *Lentinus crinitus*, os quais foram capazes de remover cerca de 3150 e 1400 mg de HCB.Kg⁻¹ de solo, respectivamente.

Obanda et al. (2008) utilizaram, para estudos de biodegradação do fungicida tebuconazole, uma cepa de *Trichoderma harzianum*, que foi isolada de madeira tratada com este agrotóxico para conservação. Além de resistente a esse xenobiótico, o fungo foi capaz de degradar 68% do tebuconazole (concentração inicial de 20mg.L⁻¹) após 21 dias de cultivo submerso realizado em incubadora com agitação na temperatura de 25°C. Como o *Trichoderma harzianum* degradou tebuconazole em meio de cultura suplementado com 10g.L⁻¹ de glicose, sugeriu-se que este fungo utiliza o mecanismo de co-metabolismo para a degradação do xenobiótico.

2.6 FERRAMENTAS EXPERIMENTAIS UTILIZADAS PARA QUANTIFICAR O TEOR DE RESÍDUOS AGROQUÍMICOS EM AMBIENTES CONTAMINADOS PELOS MESMOS

A migração diferencial de componentes de uma mistura em função de diferentes interações entre duas fases, a móvel e a estacionária, caracteriza o método físico-químico de separação denominado cromatografia. O método cromatográfico serve para a identificação de compostos, por comparação com padrões previamente existentes, para a purificação de substâncias, separando-se os componentes indesejáveis e para a separação dos constituintes de uma mistura (Degani, A. L. G., Cass, Q. B., & Vieira, P. C., 2011).

Se por um lado, a cromatografia apresenta as vantagens de alta seletividade e eficiência de separação, por outro, a espectrometria de massas promove a obtenção de informação estrutural, massa molar e aumento adicional de seletividade. Desse modo, o acoplamento de um cromatógrafo com o espectrômetro de massas combina as vantagens de ambos os equipamentos (Vékey K., 2001).

Em geral, a cromatografia gasosa (“gas chromatography”)-CG e a cromatografia líquida de alta eficiência (“high performance liquid chromatography”) – CLAE são as

técnicas acopladas à espectrometria de massas (“mass spectrometry”) – EM (Ardrey, R. E., 2003).

Embora a análise de multirresíduos de agrotóxicos em alimentos, utilizando a Cromatografia Gasosa, tenha revelado níveis consideráveis destes compostos, separações difíceis destas substâncias tóxicas dos alimentos são, geralmente, conseguidas mais facilmente utilizando a CLAE do que a Cromatografia em Fase Gasosa (GUIMARÃES, L. F. L.;1993).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do Solo

3.1.1 Área de Coleta

O solo foi coletado em propriedades rurais localizadas nos municípios de Caruaru e Bezerros. Em Caruaru, o solo foi coletado no Sítio Peladas, de propriedade do senhor Nivaldo Gomes da Silva, localizado no 1º Distrito desta cidade, próximo à BR 232 e a 14km da sede do município. Este sítio tem uma área de aproximadamente 7 ha e o cultivo local é basicamente de hortaliças (cebolinha, alface, chuchu, repolho,...). Em Bezerros, o solo foi coletado no Sítio Sapucarana de propriedade do senhor José Ferreira da Silva Filho, localizado no 2º Distrito deste município, próximo à BR 232 e a 15km da sede da cidade. Este sítio tem uma área de 2 ha, onde, além de hortaliças são cultivadas outras culturas como milho, feijão e macaxeira. Ambos os sítios apresentam um histórico de aplicação de agrotóxicos de mais de 10 anos, incluindo os organofosforados.

3.1.2 Procedimento de Coleta

Foram realizadas coletas de solo em áreas de cultivo de hortaliças nos municípios de Caruaru e Bezerros. Tanto em Bezerros quanto em Caruaru, escolheram-se três canteiros. Em cada canteiro, de ambas as localidades, foram coletadas cinco amostras compostas em pontos equidistantes, de modo a abranger todo o canteiro. Cada amostra composta foi constituída de três subamostras, coletadas a uma profundidade de 15cm de forma equidistante, dispostas triangularmente. O esquema de coleta é demonstrado na Figura 4.

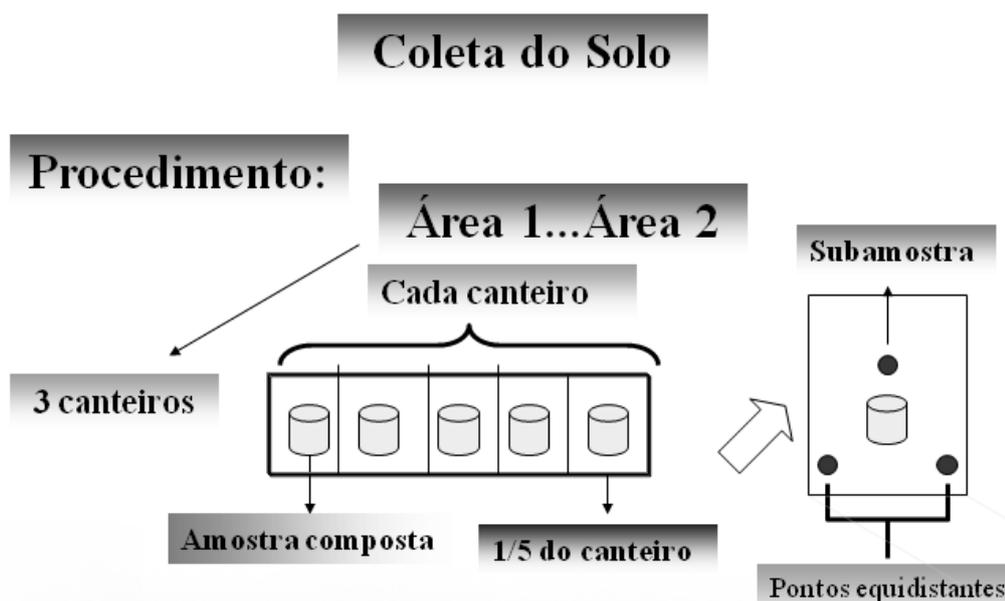


Figura 4: Procedimento de Coleta do Solo.

(Fonte: Autor)

3.1.3 Análise Físico-Química do Solo

De cada área (Caruaru/Bezerros) foi coletado solo para a realização posterior de análises química (fertilidade) e física do mesmo. Os procedimentos de análises serviram, basicamente, para caracterizar as áreas físico-quimicamente de onde os fungos estudados foram isolados e, posteriormente, selecionados e identificados. Estas foram realizadas pelo Instituto Agrônomo de Pernambuco (IPA), Recife-PE. Nas tabelas 5, 6, 7 e 8 observam-se os resultados dessas análises.

Tabela 5. Análise física do solo em área de cultivo de hortaliças do Sítio Sapucarana, localizado em Bezerros-PE

Caracterização Física						
	Composição	Argila	Grau de	Classe	Umidade	Água
g/cm ³	Granulométrica (%)	Natural (%)	Floculação(%)	Textural	Residual(%)	Disponível(%)
*Dap 1,43	Areia Grossa – 38	8	56	***FA	1,5	5,62
**Dr 2,56	Areia Fina - 30					
	Silte- 14					mm/cm
	Argila- 18					0,8

*Dap=Densidade Aproximada **Dr=Densidade Relativa *** FA= Franco Arenoso

Tabela 6. Análise química do solo em área de cultivo de hortaliças do Sítio Sapucarana, localizado em Bezerros-PE

Caracterização Química												
P	pH	cmolc/ dm ³							Sugestão de Adubação*(Kg/ha)		Calagem	
mg/dm ³	H ₂ O	Ca	Mg	Na	K	Al	H	S	Tomate de mesa		-	
92	6,30	4,80	2,40	0,70	0,60	0,00	1,70	8,5	P ₂ O ₅	K ₂ O	%	
									60	30	V	m
											81	0

(*) Fonte: Recomendações Adubação-PE. 2. ed. rev. 1998

P=Fósforo; H₂O=Água; Ca=Cálcio; Na=Sódio; K=Potássio; Al=Alumínio; H=Hidrogênio;S=Enxofre; Mg= Magnésio; P₂O₅=Pentóxido de Fósforo; K₂O= Óxido de Potássio.

Tabela 7. Análise física do solo em área de cultivo de hortaliças do Sítio Peladas, localizado em Caruaru-PE

Caracterização Física						
	Composição	Argila	Grau de	Classe	Umidade	Água
g/cm ³	Granulométrica (%)	Natural (%)	Floculação(%)	Textural	Residual(%)	Disponível(%)
*Dap 1,52	Areia Grossa - 52	2	83	***FA	1,1	3,33
**Dr 2,57	Areia Fina - 29					
	Silte- 7					mm/cm
	Argila- 12					0,51

*Dap=Densidade Aproximada **Dr=Densidade Relativa *** FA= Franco Arenoso

Tabela 8. Análise química do solo em área de cultivo de hortaliças do Sítio Peladas, localizado em Caruaru-PE

Caracterização Química												
P	pH	cmolc/ dm ³							Sugestão de Adubação*(Kg/ha)		Calagem	
mg/dm ³	H ₂ O	Ca	Mg	Na	K	Al	H	S	Cenoura		-	
123	6,40	4,20	0,90	0,16	0,28	0,00	1,31	5,5	P ₂ O ₅	K ₂ O	%	
									60	60	V	m
											81	0

(*) Fonte: Recomendações Adubação-PE. 2. ed. rev. 1998

P=Fósforo; H₂O=Água; Ca=Cálcio; Na=Sódio; K=Potássio; Al=Alumínio; H=Hidrogênio;S=Enxofre; Mg= Magnésio; P₂O₅=Pentóxido de Fósforo; K₂O= Óxido de Potássio.

3.1.4 Isolamento dos Fungos do Solo

Vinte e cinco gramas das amostras compostas de solo, oriundas de cada área de coleta, separadamente, foram homogeneizadas em 250 mL de água destilada esterilizada (ADE), e, em seguida, realizadas diluições em série (CLARK, F.E., 1965). Da diluição 10⁻² foi retirada uma alíquota de 0,1 mL e colocada em placas de Petri contendo Meio Mínimo (PONTECORVO et al., 1953) suplementado separadamente com 1,5 mL.L⁻¹ da formulação comercial, de nome fantasia KLORPAN, do inseticida organofosforado, cujo

princípio ativo foi o clorpirifós, e cloranfenicol ($0,2\text{mg.L}^{-1}$) como fator seletivo, com cinco repetições. As culturas foram incubadas no escuro, a 28°C , por sete dias. As colônias desenvolvidas foram contadas, isoladas e identificadas pelas características microscópicas, após o preparo da técnica de cultura sob lamínula e utilizando literatura específica. A Figura 5 exemplifica a metodologia de isolamento dos fungos do solo utilizada .

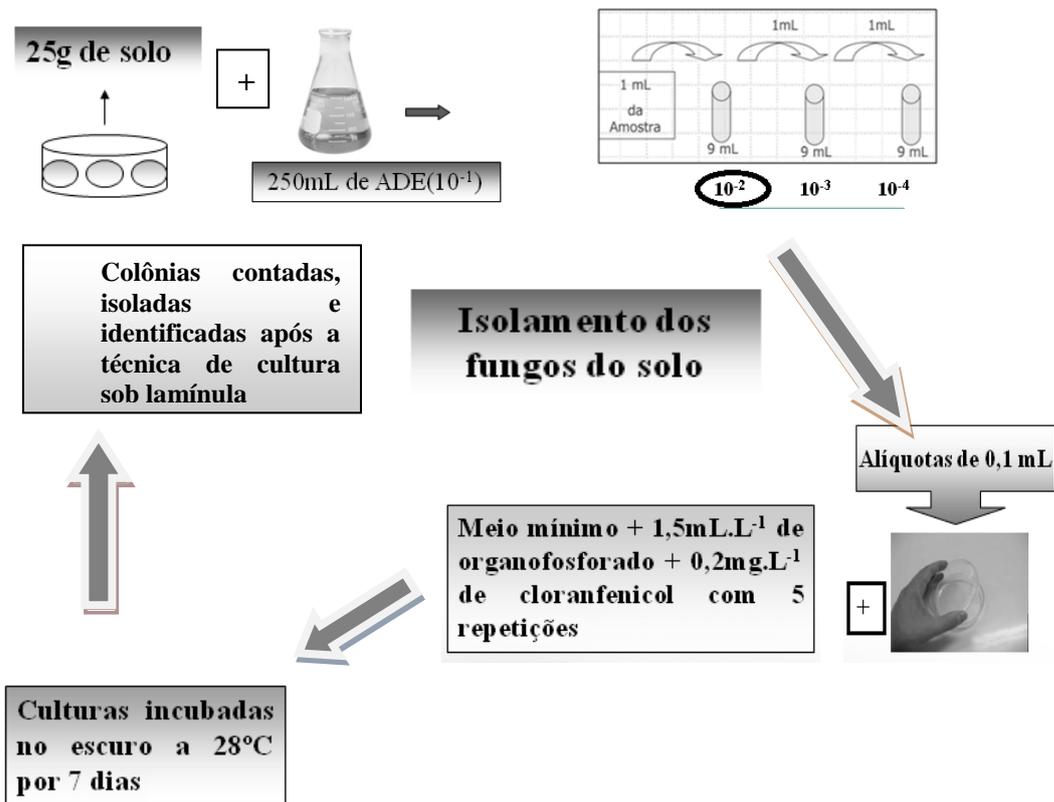


Figura 5: Isolamento dos Fungos.

Fonte: Autor

3.1.5 Critérios de seleção dos isolados com base em um teste de tolerância piloto

Foi realizado um teste de tolerância piloto com a concentração do agrotóxico recomendada pelo fabricante, isto é, cerca de 30 mL da formulação do agrotóxico para cada 20L de água. A partir de então, adotou-se como critérios para a seleção das linhagens fúngicas: a frequência dos isolados (maior ou menor), as espécies distintas, e o crescimento semelhante, inferior ou superior em relação ao grupo controle.

3.1.6 Procedimento de Identificação das colônias

A identificação das colônias foi realizada pelas técnicas utilizadas na Taxonomia Clássica pela equipe da Coleção de Culturas – Micoteca URM da UFPE (WCDM 604), observando-se as características macro e microscópicas em meios de cultivo adequado para cada gênero (MEA, CZ, CYA, G25N para *Aspergillus* e *Penicillium* e BDA para os demais), utilizando recomendações e chaves da literatura específica como Klich & Pitt, 1988; Klich, 2002 e Ellis, 1971,1976.

3.1.7 Teste de Tolerância

O teste de tolerância consistiu em expor os isolados a cinco concentrações distintas do agrotóxico. Os fungos com sete dias de crescimento, em extrato de malte-ágar, foram transferidos para placas de Petri contendo extrato de malte-ágar acrescido das concentrações em mL/L de 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5, respectivamente, sendo realizados inóculos centrais. O controle foi o extrato de malte-ágar sem o agrotóxico. O experimento foi realizado em triplicata (TOMASINI et al., 2001). Observou-se o crescimento destes durante sete dias. Com o auxílio de uma régua milimetrada as colônias foram medidas diametralmente em duas medições transversais, calculando-se a média. A Figura 6 ilustra a metodologia do teste de tolerância.

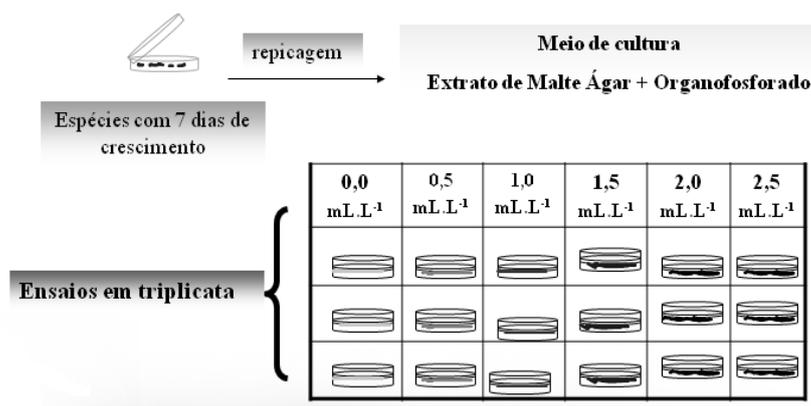


Figura 6. Teste de tolerância ao agrotóxico organofosforado clorpirifós (Fonte: Autor)

3.1.8 Análise do Crescimento dos isolados no Teste de Tolerância

Para o acompanhamento do crescimento dos isolados no teste de tolerância, realizaram-se cálculos baseados nas expressões seguintes:

$$\begin{aligned} \text{a) Taxa de Crescimento (\%)} &= \frac{\text{MCSA}^{**}}{\text{MCC}^*} - 1 \times 100 \\ \text{b) Taxa de Crescimento Relativa para Cada Espécie (\%)} &= \frac{\text{MCC}}{\text{MCSA}} \times 100 \\ \text{c) Taxa de Inibição Máxima do Crescimento em Cada Espécie (\%)} &= \frac{\text{MCSA} - \text{MCC}}{\text{MCSA}} \times 100 \end{aligned}$$

* **MCC: Média de Crescimento em Cada Concentração**

** **MCSA: Média de Crescimento no Meio sem o Agrotóxico**

(TOMASINI et al., 2001).

Para os cálculos baseados nas expressões acima foram elaborados quadros de acompanhamento do crescimento de cada linhagem fúngica ao longo de sete dias. Para cada linhagem foram realizadas medições transversais, em **cm**, em cada placa e foi calculada a média aritmética destas medidas. No sétimo dia de cultivo as placas foram fotografadas.

3.1.9 Contagem do Número de Esporos na Câmara de Neubauer

Uma vez fotografados os isolados, após sete dias de crescimento no meio controle e nas cinco concentrações testadas com o agrotóxico, com o auxílio de um furador metálico, com 6mm de diâmetro, transferiram-se de cada placa três blocos de micélio-ágar de todos os isolados para tubos de ensaio contendo 10mL de Tween 80, 0,01%. Posteriormente, 200µL da suspensão de esporos, de cada cepa, foram transferidos para câmara de Neubauer, para a contagem dos esporos. Foi utilizado o campo da câmara de Neubauer de fator de correção $2,5 \times 10^5$ (ALVES, S.B., 1986; MORAES, R.O., 1993). Esses dados foram colocados em uma planilha e expostos numa tabela.

3.2 Teste da Fenoxidase

Os isolados foram submetidos ao teste da fenoxidase, um teste qualitativo e indicativo da capacidade de um micro-organismo degradar compostos fenólicos. A técnica

denominada “Reação de Bavedam” foi o procedimento utilizado para determinar a atividade fenólica (Nobles, 1948).

O ensaio consistiu em misturar 400 mL de extrato de malte-ágar com uma solução constituída de 2,5g de ácido gálico dissolvido em 100 mL de água destilada. Assim, obteve-se uma solução final com concentração equivalente a 0,5% de ácido gálico. O controle foi caracterizado pelo extrato de malte-ágar desprovido do ácido gálico e adicionado do inóculo fúngico para cada isolado em questão. Devido à provável hidrólise do ágar, acondicionou-se o ácido em frasco separado, contendo 100 mL da água destilada utilizada no meio de cultura. Esterilizou-se em autoclave durante 10min, a 121°C e 1 atm sob pH=3. Os fungos foram inoculados centralmente no grupo teste e no controle, em quintuplicata e, durante 7 dias, foi acompanhada a formação do halo de degradação do composto fenólico. Esse halo é caracteristicamente de tonalidade marrom e, geralmente, forma-se em torno da colônia fúngica. A Figura 7 ilustra a metodologia do teste da fenoloxidase.



Figura 7. Teste da Fenoloxidase

Fonte: Autor

3.3 Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em arranjo fatorial 8 x 6 (8 fungos x 6 níveis de concentração) com três repetições, compondo um total de 144 parcelas.

Foi utilizado o programa ASSISTAT 7.0, realizada a Análise de Variância (ANOVA) e posteriormente o teste de Tukey a 5% de probabilidade.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Seleção das Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

A partir do teste de tolerância piloto e dos critérios de seleção dos isolados a esse teste associados, das 15 amostras compostas do solo proveniente de Caruaru foram obtidas 83 UFC (Unidades Formadoras de Colônia), enquanto das 15 amostras compostas oriundas de Bezerros foram obtidas 70 UFC, totalizando 153 UFC. Desse universo de UFC, obtiveram-se oito linhagens de fungos, sendo quatro de Caruaru e quatro de Bezerros.

4.2 Colônias Identificadas

Dentre as linhagens fúngicas isoladas em Bezerros foram identificadas as seguintes espécies: *Aspergillus terreus*, *Penicillium corylophilum*, *Fusarium oxysporum* e *Trichoderma harzianum*. Dentre os isolados de Caruaru foram identificados: *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus tamaritii* e *Aspergillus terreus*.

4.3 Teste de Tolerância

Todos os fungos mostraram-se tolerantes ao agrotóxico organofosforado clorpirifós.

Aspergillus terreus, proveniente de Bezerros, apresentou uma regressão de seu crescimento ao longo de sete dias nas placas de Petri que continham uma maior quantidade de agrotóxico, exceto em relação à concentração 0,5mL/L, cujo crescimento superou o grupo controle desprovido do inseticida. Assim, a sua taxa de crescimento, caracterizada pela razão entre o crescimento no grupo controle em relação ao crescimento no meio com o agrotóxico apresentou-se negativa para a concentração 0,5mL/L e positiva para as demais concentrações do agrotóxico. Sua taxa de crescimento relativo, caracterizada pela razão entre o crescimento no meio com agrotóxico em relação ao grupo controle, apresentou uma queda de 40,53% entre a maior e a menor concentração do agrotóxico

aplicada no meio de cultura. Logo, o fungo não teve seu crescimento inibido para a concentração de 0,5mL/L, no entanto, apresentou inibição mínima de 14,74% para a concentração de 1mL/L e máxima de 37,67% para a de 2,5mL/L.

Aspergillus terreus, oriundo de Caruaru, apresentou um quadro de crescimento bastante irregular. Houve um decréscimo sutil entre o controle e a concentração de 0,5mL/L. Além de um aumento entre as concentrações de 1mL/L e 1,5mL/L (esta última apresentou crescimento máximo) e entre 2,0 mL/L e 2,5mL/L ocorreu uma nova diminuição. Dessa maneira, a taxa de crescimento deste fungo apresentou-se negativa para a concentração recomendada para uso no campo, isto é, 1,5mL/L e positiva para as demais quantidades de agrotóxico aplicadas no teste de tolerância. Além disso, a taxa de crescimento relativo foi crescente entre 0,5mL/L e 1,5mL/L e voltou a cair a partir de 2,0mL/L até 2,5mL/L. Portanto, não houve inibição do crescimento deste fungo para a quantidade de agrotóxico sugerida para aplicação no campo, porém, a menor taxa de inibição foi de 8,2% para a concentração de 1mL/L e a máxima de 44,65% para a de 2,5mL/L.

De acordo com Kuo; Regan, 1992, fungos da espécie *Aspergillus terreus* têm se mostrado hábeis em degradar o inseticida carbaril da família dos carbamatos. Em se tratando da degradação do clorpirifós, ambos os *A. terreus* mostraram adaptação ao ambiente impactado pelo inseticida. Isto é evidenciado pela não inibição do crescimento destes fungos para algumas concentrações do agrotóxico aplicadas. Embora *A. terreus*, proveniente de Caruaru, não tenha apresentado inibição de crescimento para a concentração de 1,5mL/L, para a concentração de 2,5mL/L, seu crescimento foi inibido em 44,65% em relação ao *A. terreus* de Bezerros, que apresentou apenas 37,67% para a mesma quantidade de agrotóxico.

Fusarium oxysporum, coletado em Bezerros, apresentou uma diminuição de crescimento bem regular em relação ao agrotóxico. À medida que a concentração do inseticida aumentou houve uma queda gradativa no crescimento deste fungo. Assim sendo, a taxa de crescimento foi crescente de 0,5mL/L até 2,5mL/L e a de crescimento relativo foi decrescente no mesmo sentido. Além disso, apresentou uma taxa de inibição crescente entre 0,5mL/L e 2,5mL/L, sendo a menor de 47,14% e a maior taxa inibitória de 79,08%.

Fusarium oxysporum, isolado de área agricultável em Caruaru, apresentou um aumento de crescimento ao longo de 7 dias entre o controle e a concentração de 0,5 mL/L. A partir de 1ml/L até 2,0 mL/L houve um decréscimo e um razoável aumento na

concentração de 2,5mL/L. Assim, a taxa de crescimento foi ínfima para a concentração de 2mL/L e negativa para as demais concentrações. Já a taxa de crescimento relativo foi decrescente entre 0,5mL/L e 2,0mL/L. Por outro lado, foi relativamente grande na concentração de 2,5mL/L. Logo, houve uma taxa inibitória ínfima de 1,30% para a concentração de 2,0mL/L, mas não ocorreu inibição para as demais concentrações do agrotóxico.

De acordo com Ellis; Ellis (1997), *Fusarium oxysporum* apresentou sensibilidade aos herbicidas da classe das triazinas. Quando colocado na presença de diferentes concentrações destes, apresentou alterações na pigmentação e na velocidade de crescimento. Assim, sua utilização como bioindicador foi considerada promissora para o monitoramento de solos e águas contaminadas por herbicidas (Galvão et al., 2003).

Neste estudo, *F. oxysporum* de Bezerros revelou grande sensibilidade à ação do clorpirifós, pois teve seu crescimento inibido em até 79,08%. Ao passo que, *F. oxysporum*, proveniente de Caruaru, evidenciou adaptação ao ecossistema edáfico impactado pelo agrotóxico, porque não apresentou inibição significativa de seu crescimento frente às distintas concentrações do clorpirifós testadas.

Penicillium corylophilum, proveniente de horticultura em Bezerros, apresentou uma queda no crescimento ao longo de 7 dias do grupo controle até a concentração de 1,5 mL/L. Volta a crescer a partir da concentração de 2mL/L até 2,5 mL/L. Houve um crescimento similar para as concentrações 0,5mL/L e 2,5mL/L. Dentre os meios com o agrotóxico, a concentração 2,0mL/L foi a que evidenciou maior crescimento para esta espécie. Assim, a taxa de crescimento maior foi a para a concentração recomendada no campo, isto é, 1,5mL/L. Além disso, a maior taxa de crescimento relativa foi de 81,85% para a concentração de 1mL/L e esta espécie teve 30,44% de inibição de seu crescimento para a quantidade de agrotóxico recomendada no campo, porém obteve a menor inibição para a concentração de 1mL/L, ou seja, 18,15%.

Martinez et al (2008) realizaram um estudo de caracterização e isolamento de fungos envolvidos na degradação de sulfentrazona, um tipo de herbicida muito utilizado, em solos sem histórico de aplicação de outros herbicidas, mas suplementados com crescentes concentrações de sulfentrazona. Dentre os fungos identificados e com potencial de degradação deste herbicida estavam os gêneros *Cladosporium* sp., *Eupenicillium* sp., *Paecilomyces* sp., ***Penicillium*** sp., *Chrysosporium* sp. e *Metarrhizium* sp.

Em relação ao clorpirifós, *Penicillium corylophilum* apresentou, para a maioria das concentrações, taxas de inibição do seu crescimento inferiores a 21%. Além disso, cresceu em relação ao controle no meio com o agrotóxico a taxas superiores a 80% para a maioria das quantidades de clorpirifós aplicadas *in vitro*. Isto revela sua adaptação ao ambiente impactado por este pesticida e o sinaliza como um potencial remediador de solos contaminados pelo organofosforado.

Trichoderma harzianum, oriundo de área agricultável em Bezerros, apresentou uma diminuição de seu crescimento, ao longo de 7 dias, à medida que o teor de agrotóxico aumentava. Dessa maneira, cresceu mais no grupo controle, desprovido de inseticida, e menos, na concentração de 2,5mL/L (maior concentração de pesticida aplicada). Portanto, a taxa de crescimento aumentou da menor para a maior quantidade de agrotóxico aplicada e a taxa de crescimento relativo diminuiu da menor para a maior concentração de inseticida colocada. Além disso, a máxima inibição do crescimento deste fungo atingiu cerca de 77,77% para a concentração de 2,5mL/L.

Fungos do gênero *Trichoderma* são muito aplicados em áreas de interesse ambiental e industrial (Espósito; Silva, 1998). *Trichoderma harzianum* atua na decomposição de diversos pesticidas organoclorados, como o DDT, dieldrin, endosulfan, pentacloroni-trobenzeno e pentaclorofenol (Katayama; Matumura, 1992; Smith, 1995).

De acordo com Oku et al., 1979, solos tratados com o fungicida benomil após 35 dias, quando comparados a solos não tratados, apresentaram fungos tolerantes ao mesmo. Dentre os gêneros predominantes neste solo estavam *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma*.

Quanto à degradação do organofosforado clorpirifós, *T. harzianum*, apesar da habilidade em degradar compostos organoclorados e de tolerar a ação de fungicidas como o benomil, apresentou inibição de seu crescimento oscilando entre 42,15% para a menor concentração e 77,77% para a maior concentração do inseticida aplicada *in vitro*.

Com o objetivo de avaliar o potencial enzimático biodegradante de alguns fungos de origem marinha, diferentes cepas de *Aspergillus sydowii* bem como o *Penicillium decaturense*, *Penicillium raistrickii* e *Trichoderma* sp. foram expostos aos pesticidas organofosforados clorpirifós, metil paration e profenofós em meio líquido de malte 2%. Dentre estes micro-organismos, os fungos que melhor se adaptaram ao clorpirifós foram uma das cepas de *A. sydowii* e o *Trichoderma* sp. Já na presença do metil paration, outra cepa de *A. sydowii* e o *P. decaturense* foram mais tolerantes. Por sua vez, os que mais se

adaptaram ao profenofós foram a mesma cepa de *A. sydowii* tolerante ao metil paration e *P. raistrickii*. A degradação do metil paration chegou a 100% em 20 dias de exposição aos micro-organismos mais tolerantes, anteriormente citados. Na presença de *A. sydowii* e do *Trichoderma* sp., o clorpirifós apresentou a menor degradação, isto é, uma taxa de 63 e 72% de decomposição ao longo de 30 dias de reação. Por fim, o agrotóxico profenofós apresentou uma degradação completa com o fungo *P. raistrickii* com 30 dias de reação e de 70% com a mesma cepa de *A. sydowii* tolerante ao metil paration para o mesmo período. Esse estudo comprova a eficiência de fungos de origem marinha na biodegradação de pesticidas organofosforados (SILVA, NATÁLIA ALVARENGA DA., 2013).

O fungo *Aspergillus japonicus*, obtido em solo para o cultivo de hortaliças em Caruaru, apresentou um comportamento quanto ao crescimento bastante irregular. Cresceu mais no meio controle e apresentou menor crescimento na concentração de 1,5mL/L. Todavia, o crescimento nas concentrações de 1mL/L, 2,0 mL/L e 2,5mL/L foram superiores em relação à concentração recomendada no campo para este agrotóxico. O crescimento na concentração 1mL/L foi próximo do existente no meio controle. Logo, a maior taxa de crescimento foi de 373,84% para a concentração de 1,5mL/L, isto é, no grupo controle este fungo cresceu quase 4(quatro) vezes mais em relação ao meio com o agrotóxico para esta concentração. Como houve uma relativa aproximação entre o crescimento no meio controle e na concentração de 1mL/L, esta última apresentou uma taxa de crescimento em torno de apenas 3,40%. Assim, a maior taxa relativa de crescimento foi de 96,72% para a concentração de 1mL/L. Já o maior grau de inibição foi de 78,90% para a concentração de 1,5mL/L.

Fungos do gênero *Aspergillus* atuam na decomposição de uma larga faixa de compostos aromáticos como a lignina e de forma mais eficiente do que outros fungos. Além disso, *Aspergillus japonicus*, comparado a *Aspergillus terreus*, *Aspergillus niger* ou *Aspergillus flavus*, tem revelado maior eficiência nesta atividade de degradação. *A. japonicus* atua em descarboxilações oxidativas e não oxidativas, oxidação de alcoóis aromáticos e aldeídos, redução de ácidos aromáticos, hidroxilação e clivagem do anel aromático bem como na desmetilação de compostos aromáticos (Ziino et al.,1999).

Apesar do composto clorpirifós não ser aromático, *Aspergillus japonicus* apresentou um crescimento relativo de 77,78%, 96,72% e 79,66% para as concentrações 0,5mL/L, 1,0mL/L e 2,0 mL/L, respectivamente. Para estas mesmas concentrações a inibição de seu crescimento não ultrapassou 23%. Mesmo apresentando uma inibição de

crescimento de 78,90% e de 66,85% para as concentrações de 1,5ml/L e 2,5mL/L, *A. japonicus* evidenciou sua capacidade adaptativa em solos impactados com este organofosforado, além de revelar-se como um potencial degradador deste pesticida.

A espécie *Aspergillus tamarii*, proveniente da horta de Caruaru, surpreendentemente, cresceu menos no grupo controle, ao longo de 7 dias, e mais na concentração de 2,5mL/L (maior quantidade de agrotóxico aplicada no teste de tolerância). Além disso, houve uma queda no crescimento deste fungo a partir de 0,5mL/L até 2,0mL/L. Dessa maneira, a taxa de crescimento deste fungo apresentou-se negativa, a taxa de crescimento relativo foi totalmente positiva e não houve inibição de crescimento para este fungo.

No trabalho de Maciel, C. D. C. S., Takaki, G. M., & Gusmão, N. B. (2010), o fungo *A. tamarii* foi avaliado quanto a sua capacidade de degradação de óleos combustíveis, os quais após o processo de queima tornam-se recalcitrantes e causam sérios impactos ambientais. Nesse trabalho foi utilizado o indicador 2,6-diclorophenol-indofenol que avalia o tempo de oxidação biológica indicador de biodegradação. Assim, *A. tamarii* realizou a oxidação biológica, indicativa de degradação, após apenas 2h de contato com o óleo antes da queima bem como repetiu o feito em menos de 8h para o óleo após a queima. Isso revelou sua habilidade em degradar lubrificantes automotivos limpos ou usados.

As tabelas 9 e 10 reúnem todos os dados referentes ao teste de tolerância para as concentrações mencionadas.

Tabela 9. Análise do Crescimento das espécies no Teste de Tolerância

Fungo	Origem	Conc. mL/L	MC (cm)	TC (%)	TCR (%)	IC (%)
<i>Aspergillus terreus</i>	Bezerros	0	2,097	-	-	-
		0,5	2,157	- 2,78	102,86	-2,86
		1,0	1,788	17,28	85,26	14,74
		1,5	1,598	31,27	76,18	23,82
		2,0	1,410	48,78	67,21	32,79
		2,5	1,307	60,44	62,33	37,77
<i>Aspergillus terreus</i>	Caruaru	0	1,574	-	-	-
		0,5	1,155	36,33	73,35	26,65
		1,0	1,445	8,93	91,80	8,20
		1,5	1,688	-6,74	107,23	-7,23
		2,0	0,886	77,74	56,26	43,74
		2,5	0,871	80,66	55,25	44,65
<i>Fusarium oxysporum</i>	Bezerros	0	4,734	-	-	-
		0,5	2,502	89,19	52,86	47,14
		1,0	1,560	203,59	32,94	67,06
		1,5	1,048	280,19	26,30	73,70
		2,0	1,048	350,91	22,13	77,87
		2,5	0,990	377,98	20,92	79,08
<i>Fusarium oxysporum</i>	Caruaru	0	1,645	-	-	-
		0,5	2,786	-40,94	169,32	-69,32
		1,0	2,279	-27,80	138,49	-38,49
		1,5	1,721	-4,43	104,63	-4,63
		2,0	1,624	1,32	98,70	1,30
		2,5	4,514	-63,55	274,38	-174,38

Conc.=Concentração do clorpirifós; **MC**=Média de Crescimento; **TC**=Taxa de Crescimento; **TCR**=Taxa de Crescimetno Relativo; **IC**=Inibição Máxima de Crescimento.

Tabela 10. Análise do Crescimento das espécies no Teste de Tolerância

Fungo	Origem	Conc. mL/L	MC (cm)	TC %	TCR %	IC %
<i>Trichoderma harzianum</i>	Bezerros	0	6,779	-	-	-
		0,5	3,921	72,86	57,85	42,15
		1,0	2,683	152,62	39,59	60,41
		1,5	2,217	205,80	32,70	67,30
		2,0	1,693	300,42	24,97	75,3
		2,5	1,507	349,76	22,23	77,77
<i>Penicilium corylophilum</i>	Bezerros	0	1,472	-	-	-
		0,5	1,190	23,64	80,88	19,12
		1,0	1,205	22,17	81,85	18,15
		1,5	1,024	43,77	69,56	30,44
		2,0	1,171	25,65	79,59	20,41
		2,5	1,190	23,64	80,88	19,12
<i>Aspergillus tamarii</i>	Caruaru	0	1,817	-	-	-
		0,5	3,281	-44,63	180,60	- 80,60
		1,0	2,783	-34,73	153,21	- 53,21
		1,5	2,148	-15,41	118,22	- 18,22
		2,0	1,874	-3,05	103,15	- 3,15
		2,5	3,781	-51,95	208,13	- 108,13
<i>Aspergillus japonicus</i>	Caruaru	0	3,407	-	-	-
		0,5	2,650	28,57	77,78	22,22
		1,0	3,295	3,40	96,72	3,28
		1,5	0,719	373,84	21,10	78,90
		2,0	2,714	25,53	79,66	20,34
		2,5	1,130	201,64	33,15	66,85

Conc.=Concentração do clorpirifós; MC=Média de Crescimento; TC=Taxa de Crescimento; TCR=Taxa de Crescimetno Relativo; IC=Inibição Máxima de Crescimento.

4.4 Análise do crescimento micelial dos fungos frente às diferentes concentrações do clorpirifós conforme dados estatísticos

As concentrações do agrotóxico tiveram efeitos diversos sobre os isolados testados, alguns isolados não foram afetados pelo aumento da concentração do clorpirifós, como é o

caso do isolado *Penicillium corylophilum*. Por outro lado, à medida que a concentração do pesticida aumentou, fungos das espécies *Trichoderma harzianum* e *Fusarium oxysporum* (oriundo de Bezerros) apresentaram decréscimo em seu crescimento micelial, o que demonstra maior sensibilidade desses fungos à ação do inseticida. A inibição foi maior para *F. oxysporum* (Bezerros).

As duas linhagens de *Aspergillus terreus* testadas apresentaram uma sutil inibição frente às distintas dosagens do agrotóxico. Todavia, *Aspergillus japonicus* teve uma considerável inibição de seu crescimento micelial quando comparado a *A. terreus*.

Aspergillus tamarii teve um comportamento irregular, pois seu crescimento foi estimulado na concentração 0,5mL/L em relação ao controle, inibido na concentração 1,0; 1,5 e 2,0mL/L e, novamente estimulado na concentração 2,5mL/L. Por sua vez, *F. oxysporum* (proveniente de Caruaru) apresentou um crescimento significativo na concentração de 2,5 mL/L e inibição do mesmo de 0,5mL/L até a concentração de 2,0mL/L.

Para a concentração 0,5mL/L, *A. Tamarii* cresceu mais quando comparado às duas linhagens *F. oxysporum*, às espécies *A. terreus* (Caruaru) e *A. japonicus*. Dessa concentração até 1,5 mL/L, *T. harzianum* apresentou um crescimento micelial superior a *A. Tamarii*. Contudo, na concentração 2,5 mL/L, *A. Tamarii* supera *T.harzianum*.

P. Corylophilum e *A. terreus* (Bezerros) apresentaram diferenças significativas, quanto à inibição do crescimento, à medida que a concentração do agrotóxico aumentou. Todavia, *A. terreus* (Bezerros) foi mais inibido do que *P. Corylophilum* frente ao clorpirifós.

Apesar de *A. terreus* (Bezerros) e *T.harzianum* apresentarem o crescimento inibido com o aumento da concentração do agrotóxico, *T. harzianum* teve maior crescimento micelial. De maneira similar, *F. oxysporum* (Bezerros) e *A. terreus* (Caruaru) foram inibidos conforme o aumento do teor de clorpirifós, mas *F. oxysporum* (Bezerros) apresentou maior crescimento micelial em relação a *A. terreus* (Caruaru).

Quando se compara *A. terreus* (Caruaru) com *A. japonicus*, notamos que o primeiro apresentou maior crescimento micelial na concentração de agrotóxico recomendada para o campo, isto é, 1,5mL/L. Já, o segundo, obteve maior desempenho na concentração 1,0mL/L. Por outro lado, a taxa de inibição de *A. terreus* (Caruaru) foi maior na concentração 2,5mL/L, já *A. japonicus* foi mais inibido na concentração 1,5mL/L.

Ao compararmos *A. tamaritii* com *A. japonicus*, percebemos que na concentração 2,5mL/L, o primeiro fungo apresentou um crescimento maior do que o segundo. Por outro lado, a concentração 2,0mL/L inibiu bastante *A. tamaritii*. A tabela 11 reúne os dados acima mencionados.

Tabela 11. Médias de crescimento dos fungos ao interagirem com distintas concentrações do agrotóxico

Médias de Interação (A-Fungos x B-Concentração do Clorpirifós em mL/L)						
B(1-6)	0 mL/L	0,5mL/L	1,0mL/L	1,5mL/L	2,0mL/L	2,5mL/L
A1	2.4333 eA	1.8000 eA	1.8500 gA	1.7000 dA	1.8000 cdA	1.8167 deA
A2	3.9000 cA	4.0167 dA	3.4000 deAB	2.9167 bcBC	2.6000 bcC	2.4833 cdC
A3	8.5000 aA	7.2000 aB	5.4167 abC	3.9833 aD	3.0167 bE	2.7833 cE
A4	8.5000 aA	4.7167 cdB	2.7500 efC	2.1667 cdCD	1.8667 cdD	1.8000 deD
A5	2.7000 deAB	2.0500 eBC	2.5500 fgAB	2.9500 bcA	1.5667 dC	1.3833 eC
A6	5.6000 bAB	4.6833 cdC	5.8333 aA	1.4667 dD	5.0500 aBC	2.2000 cdD
A7	3.4333 cdC	5.9167 bA	4.7667 bcB	3.5833 abC	3.1333 bC	6.0500 bA
A8	2.9500 deD	4.9667 cB	4.1167 cdC	3.2167 abD	3.0000 bD	8.1667 aA

dms para colunas = 0.8002 dms para linhas = 0.7518

Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

dms- diferença mínima significativa, A1- *Penicillium corylophilum* (Bezerros), A2- *Aspergillus terreus* (Bezerros), A3- *Trichoderma harzianum* (Bezerros), A4- *Fusarium oxysporum* (Bezerros), A5-*Aspergillus terreus* (Caruaru), A6-*Aspergillus japonicus* (Caruaru), A7- *Aspergillus tamaritii* (Caruaru), A8- *Fusarium oxysporum* (Caruaru).

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade com $p \leq 0,05$.

4.5 Esporulação dos fungos em diferentes concentrações de clorpirifós conforme dados estatísticos

Os fungos das espécies *Penicillium corylophilum*, *Aspergillus terreus* (Bezerros e Caruaru), *Trichoderma harzianum* e *Fusarium oxysporum* (Bezerros) não apresentaram alterações significativas quanto à capacidade esporulante à medida que a concentração do agrotóxico aumentou.

Aspergillus japonicus apresentou inibição significativa quanto à capacidade de esporular em relação ao controle, principalmente na concentração do clorpirifós recomendada para o campo, isto é, 1,5mL/L.

Aspergillus tamarii teve sua esporulação inibida para a concentração de 0,5mL/L e estimulada para as demais concentrações. Em contrapartida, *Fusarium oxysporum* (Caruaru) não foi afetado até a concentração de 1,5mL/L. Porém, esporulou bastante nas maiores concentrações aplicadas, ou seja, 2,0 e 2,5mL/L.

Ao compararmos as esporulações desses organismos entre si para as distintas quantidades de clorpirifós aplicadas, notamos diferenças significativas.

P. corylophilum esporulou mais do que *A. terreus* (Bezerros e Caruaru) nas concentrações 0,5; 1,5 e 2,5mL/L. Além disso, para essas mesmas concentrações, *T. harzianum* esporulou mais do que *A. terreus* (Bezerros e Caruaru), *A. japonicus* e *F. oxysporum* (Bezerros).

T. harzianum e *P. corylophilum* não apresentaram diferenças significativas quanto à esporulação em função das distintas quantidades de clorpirifós, exceto no controle em que *T. harzianum* esporulou mais.

F. oxysporum (Bezerros) e *A. japonicus* não apresentaram diferenças significativas quanto à capacidade esporulante em relação à *A. terreus* (Caruaru). No entanto, para o controle, *A. terreus* (Caruaru) esporulou mais do que *F. oxysporum* (Bezerros) e *A. japonicus* esporulou mais do que *A. terreus* (Caruaru).

A. tamarii apresentou esporulação superior em relação a *A. japonicus* e *T. harzianum* para todas as concentrações. Além disso, *A. tamarii* apresentou igual comportamento quando comparado a *F. oxysporum* (Caruaru), exceto para a concentração 2,0mL/L em que não apresentaram diferenças significativas quanto à capacidade de esporular. A tabela 12 reúne os dados acima mencionados.

Tabela 12. Produção de Esporos dos fungos ao interagirem com distintas concentrações do agrotóxico

Médias de Interação (A- N° de Esporos Fúngicos x B-Concentração do Clorpirifós em mL/L)						
B(1-6)	0m/L	0,5mL/L	1,0 mL/L	1,5 mL/L	2,0 mL/L	2,5mL/L
A1	4.8667 cA	6.1333 abA	6.6667 bA	9.4000 bcA	11.4667 bA	12.4000bcA
A2	5.5333 cA	5.4000 bA	5.9333 bA	1.7333 cA	1.6000 bA	4.2000cA
A3	8.8667 bcA	10.8000 abA	14.0667 bA	12.8667 bcA	19.3333 bA	17.9333bcA
A4	1.4000 cA	1.0000 bA	1.5333 bA	1.6667 cA	2.0667 bA	2.5333cA
A5	8.1333 bcA	2.5333 bA	1.5333 bA	1.2667 cA	1.3333 bA	1.5333cA
A6	27.0667 abA	1.0667 bB	0.4667 bB	0.2667 cB	2.1333 bB	0.9333cB
A7	42.0667 aAB	27.2000 aB	52.3333 aA	60.8667 aA	59.8667 aA	55.6000aA
A8	7.7333 bcC	8.8667 abC	10.8000 bC	23.8667 bBC	49.2000 aA	31.6667bAB

dms para colunas = 21.2728 dms para linhas = 19.9858
 Classific.c/letras minúsculas Classific.c/letras maiúsculas

dms- diferença mínima significativa, A1- *Penicillium corylophilum* (Bezerros), A2- *Aspergillus terreus* (Bezerros), A3- *Trichoderma harzianum* (Bezerros), A4- *Fusarium oxysporum* (Bezerros), A5-*Aspergillus terreus* (Caruaru), A6-*Aspergillus japonicus* (Caruaru), A7- *Aspergillus tamarisii* (Caruaru), A8- *Fusarium oxysporum* (Caruaru).

As médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Foi aplicado o Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade com $p \leq 0,05$.

O fungo *Beauveria bassiana* que atua como inimigo natural da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* teve sua atividade de controle biológico testada frente a vários agrotóxicos e apresentou alterações fisiológicas quanto ao crescimento e à capacidade de esporular. Para os agrotóxicos aplicados nesse experimento: imidaclopride, tiametoxam, glifosato, pencicuirom, dimetilurea e carbofuran não houve alterações na viabilidade dos conídios de *B. bassiana*. Por outro lado, os pesticidas azafenidine, quintozene, simazine + ametrine, acetoclor, oxifluerfem e 2,4-D reduziram a germinação deste fungo e apresentaram diferenças em relação à testemunha. Em se tratando da ação dos três últimos agrotóxicos, estes não possibilitaram nem a germinação dos conídios (Andaló, Vanessa, et al., 2004).

4.6 Teste da Fenoxidase

Fungos filamentosos foram isolados e selecionados do Rio Atibaia e de uma Refinaria de Petróleo, localizados na região industrial do município de Paulínia, SP, com o intuito de testar a resistência dos mesmos às condições adversas dessa área, impactada por compostos fenólicos. Os fungos selecionados foram submetidos ao teste da fenoxidase.

Dos 257 selecionados, 43% apresentaram a formação do halo indicativo da capacidade de degradar compostos fenólicos (Conceição, D. M., et al., 2005).

Em relação às 8 espécies testadas neste trabalho, *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus terreus* foram positivas para o teste da fenoloxidase. Assim, além do potencial biorremediador para a decomposição do organofosforado clorpirifós, estes fungos podem atuar em áreas contaminadas por poluentes tóxicos de natureza fenólica. A Tabela 13 ilustra estes dados.

Tabela 13. Teste da Fenoloxidase

Fungos (nº de representantes)	Formação do Halo de Degradação
<i>Aspergillus terreus</i> (2)	(+)
<i>Fusarium oxyporum</i> (2)	(+)
<i>Penicillium corylophilum</i> (1)	(-)
<i>Trichoderma harzianum</i> (1)	(+)
<i>Aspergillus japonicus</i> (1)	(-)
<i>Aspergillus tamaris</i> (1)	(-)
(+) presença de halo (-) ausência de halo	

5. CONCLUSÕES

O inseticida organofosforado cujo princípio ativo é o clorpirifós interfere na fisiologia da microbiota de ambientes edáficos por ele impactados, como as áreas para o cultivo de hortaliças de Bezerros e Caruaru aqui mencionadas.

Os oito isolados responderam de maneira diferente às distintas concentrações do clorpirifós.

De acordo com os dados estatísticos, as espécies de fungos *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium corylophilum*, *Trichoderma harzianum*, *Aspergillus japonicus* e *Aspergillus tamaritii*, apesar de apresentarem variações quanto ao crescimento e à esporulação mediante a ação do agrotóxico clorpirifós, são potenciais agentes biorremediadores de ecossistemas contaminados pelo mesmo.

Conforme o teste de fenoloxidase realizado, como os fungos *Trichoderma harzianum*, *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus terreus* formaram halo de degradação, sugere-se que esses fungos sejam também potenciais biorremediadores de ambientes susceptíveis ao descarte de resíduos fenólicos provenientes de diversas indústrias.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACERO, J.L, BENÍTEZ, F.J, REAL, F.J, GONZÁVEL, M. Chlorination of organophosphorus pesticides in natural waters. *Journal of Hazardous Materials*, 153, 320-328, 2008.
- AHTIAINEN, J. et al. Microbial toxicity tests and chemical analysis as monitoring parameters at composting of creosotecontaminated soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, San Diego, v.53, n.3, p.323-329, 2002.
- ALEXANDER, M. *Biodegradation and Bioremediation*. New York: Academic Press, 1994. 302p.
- ALVES, S. B.1986 (Coord.). *Controle microbiano de insetos*. São Paulo, Manole, 407 p.
- ALVAREZ, P. J. Princípios e aplicações da biorremediação de BTEX. In: MOERI, Ernesto; COLELHO, Rodrigo; MARKER, Alessandra (Ed.) *Remediação e revitalização de áreas contaminadas. Aspectos técnicos, legais e financeiros*. São Paulo: Signus, 2004. Parte 2, p. 93-107.
- AMARAL, E. H. Resíduos de agrotóxicos organofosforados: validação de método de cromatografia a gás e quantificação em produtos agrícolas, 2007. 127 p. Dissertação (Mestrado em Ciência de alimentos) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.
- ANDALÓ, VANESSA, et al. "Compatibilidade de *Beauveria bassiana* com agrotóxicos visando o controle da cochonilha-da-raiz-do-cafeeiro *Dysmicoccus texensis* Tinsley (Hemiptera: Pseudococcidae)." *Neotropical entomology* 33.4 (2004): 463-467.
- ANDERSON, J.P.E. Herbicide degradation in soil: influence of microbial biomass. *Soil Biology & Biochemistry*, v.13, n.5, p.483-489, 1984.
- ANVISA. Resolução - RDC n. 347, de 16 de dezembro de 2002. Dispõe sobre o significado de Limite Máximo de Resíduos – LMR e Ingestão Diária Aceitável – IDA. *Diário Oficial da União*, Brasília, 08 jan 2002, p. 1-12.
- ARAÚJO, A. C.P., NOGUEIRA, D.P. & AUGUSTO, L.G.S. 2000. Impacto dos praguicidas na saúde: estudo da cultura do tomate. *Revista de Saúde Pública* 34, 309-313.
- ARDREY, R. E.; *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, Wiley: Huddersfield, 2003.
- BARBER, J. L., SWEETMAN, A. J., WIJK, D. V. & JONES, K. C. 2005. Hexachlorobenzene in the global environment: Emissions, levels, distribution, trends and processes. *Science of the Total Environment* 349: 1-44
- BARTHA, R. Isolation of microorganisms that metabolize xenobiotic compounds. In.: LABADA, D.P., ed. *Isolation of Biotechnological Organisms from Nature*. McGraw Hill, 1990. p.283-307.
- BARUA A. S.; JAYANTA, S.; CHAUDHURI, S.; CHOWDHURY, A.; ADITYACHAUDHURI, N. 1990. Degradation of pendimethalin by soil fungi. *Pesti. Sci.*, 29: 419-425.
- BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, v.34, supl.1, p. 65-68, Nov. 2003.
- BERNA, V. *Como fazer educação ambiental*. São Paulo: Paulus, 2001.
- BOIVIN, A.; CHERRIER, R.; SCHIAVON, M. A comparison of five pesticides adsorption and desorption processes in thirteen contrasting field soils. *Chemosphere*, 61, 668-676, 2005.

- BRASIL. Lei nº. 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 12 jan 1990.
- BRITO, N. N. et al. Utilização de fungos na remediação de efluentes industriais. In: FÓRUM DE ESTUDOS CONTÁBEIS, 4., 2004, Rio Claro. Anais. Rio Claro: Faculdades Integradas Claretianas, 2004.
- CARMO, M. L., et al. "Seleção de plantas para fitorremediação de solos contaminados com picloram." *Planta Daninha* 26.2 (2008): 301-313.
- CASIDA, LE.;KLEIN, D.SATORO, T. Soil dehydrogenase activity. *Soil Science*, v.98, p.371, 1964.
- CERRI, C.C. Changes in organic matter in an Oxisol from the central Amazonian forest during eight years as pastures, determined by ¹³C isotopic composition. In: BERTHELIN, J. (Ed.). *Diversity of environmental biogeochemistry*. Amsterdam: Elsevier, 1991. p. 397-405.
- CHANDER, M.; ARORA, D. S.; BATH, H. K. Biodecolourisation of some industrial dyes by white-rot fungi. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Hampshire, v. 31, n. 2, p. 94-97, 2004.
- CHEW, V. Comparing treatment means: a compendium. *Hortscience*, Alexandria, v. 11, n. 4, p. 348-35, 1976.
- COLLA, LUCIANE MARIA, et al. "Isolamento e seleção de fungos para biorremediação... 809 ISOLAMENTO E SELEÇÃO DE FUNGOS PARA BIORREMEDIAÇÃO A PARTIR DE SOLO CONTAMINADO COM HERBICIDAS TRIAZÍNICOS." (2008).
- CONCEIÇÃO, D. M. et al. Fungos filamentosos isolados do rio Atibais, SP e refinaria de petróleo biodegradadores de compostos fenólicos. *Arquivos do Instituto Biológico*, São Paulo, v. 72, n. 1, p. 99-106, jan./mar. 2005.
- CORRÊA, L. B. et al. O saber resíduos sólidos de serviços de saúde na formação acadêmica: uma contribuição da educação ambiental. *Interface: comunicação, saúde, educação*, Rio Grande do Sul, v. 9, n. 18, p. 571-84, set./dez. 2005.
- CULLIMORE, D. R. The enumeration of 2,4-D degraders in Saskatchewan soils. *Weed Science*, Champaign, v. 29, p. 440-443, 1981.
- DAVIS, F.L.; WILLIAMS, S.T. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. In: The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. *Soil Biochemistry*, v.2, p.227-238, 1970.
- DAVIDSE, L.C. Benzimidazole compounds: selectivity and resistance. In: DEKKER, J.; GEORGOPOULOS, S.G. eds. *Fungicide resistance in crop protection*. Wageningen: Centre of Agricultural Publishing and Documentation, 1982. P. 60-70.
- DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C. Cromatografia: um breve ensaio. *Atualidades em Química*, n.7, p.21-25, mai.1998.
- DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIEIRA, P. C."Cromatografia um breve ensaio." *Química Nova na Escola* (2011).
- DEOTTI, L. O. G., 2005 Controle de pH na Técnica de Biorremediação Eletrocínética. Dissertação de Mestrado em Ciências da Engenharia Civil. Universidade Federal do Rio de Janeiro – RJ.
- DOW AGROSCIENCE. Physical/chemical properties. Disponível em: <http://.dowagro.com/chlorp/science/pro.htm>. Acesso em fev. 2011.

- DUIRK, S.E., COLLETTE, T.W. Degradation of chlorpyrifos in aqueous chlorine solutions: pathways, kinetics and modeling. *Environmental Science Technology*, 40, 546-551, 2006.
- EDGEHILL, R.U. et al. Bioremediation by inoculation with microorganisms. In: ADRIANO, D.C. et al. (Ed). *Bioremediation of contaminated soils*. Madison: ASA/CSSA/SSSA, 1999. p.290-314.
- ELLIS, M.B., 1971. *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycology Institute, England.
- ELLIS, M.B., 1976. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycology Institute, England.
- ELSHAFEI, G.M.; NASR, I. N.; HASSAN, A. S. M.; MOHAMMAD, S. G. M. Kinetics and thermodynamics of adsorption of cadusafos on soils. *Journal of Hazardous Materials*, 172, 1608-1616, 2009.
- FREHSE, H.; ANDERSON, J.P.E Pesticides residues in soil- problems between concept and concern. In: GREENHALG, R.; DRESCHER, N (Ed.) *Pesticide chemistry, human welfare and the environment*. Oxford: Pergamon Press, 1983. v. 4, p. 23-32.
- GALVÃO, JG.; GUERREIRO, M.C.; SOUZA, J.A.; COURA, S.M.C. Uso do fungo *Fusarium oxysporum* como indicador de Ametrina, através da medida de biomassa, pela quantificação do ergosterol. *Ciências Agrotecnológicas*, v.27, n.4, p.840-845, 2003.
- GAYLARD, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Aspectos biológicos e técnicas da biorremediação de xenobióticos. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, Brasília, v. 8, n. 34, jan./jun. 2005.
- GIANFREDA L., RAO, M. 2004. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme Microb. Tech.* 35, 339–354.
- GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. *Introdução a métodos cromatográficos*. Campinas: UNICAMP, 1993. p.183-238.
- HANKIN, L. ANAGNOSTAKIS , S. G. (1975), The use of solid media for detection of enzyme production by fungi. *Mycol.*, v.67, p.597-607.
- HANKIN, L.; ANAGNOSTAKIS, S.L. Solid media containing carboxymethylcellulose to detect Cx cellulose activity of micro-organisms. *Journal of General Microbiology*, v.98, p.109-115, 1977.
- HASAN, H. A. H. "Fungal utilization of organophosphate pesticides and their degradation by *Aspergillus flavus* and *A. sydowii* in soil." *Folia microbiologica* 44.1 (1999): 77-84.
- HORVATH, R. S., and B. W. KOFT. 1972. Degradation of alkyl benzene sulfonate by *Pseudomonas* species. *Appl. Microbiol.* 23:407-414.
- IPA - Instituto de Pesquisa Agropecuária de Pernambuco. *Recomendações de adubação para o estado de Pernambuco (2ª aproximação)*. 2.ed. Recife: IPA, 1998. 198p.
- IQBAL, S., ANWAR, S., LIAQUAT, F., KHAN, Q.M., KHALID. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1. *Journal of Hazardous Materials*, 168, 400-405, 2009.
- JACQUES, R. J. S. et al. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.
- JENSEN, V. The plate count technique. In: GREY, T.R.G.; PARKINSON, D., ed. *The ecology of soil bacteria*. Liverpool: Liverpool University Press, 1968. P.158-170.
- KATAYAMA, A.; MATSUMURA, F. 1992. Degradation of organochlorine pesticides particularly ensosulfan by *Trichoderma harzianum*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 1059-1060.

- KLICH, M. A. Biogeography of *Aspergillus* species in soil and litter. *Mycologia*, New York, v. 94, n. 1, p. 21-27.2002.
- KLICK, M.A., PITT, J.I. 1988. A Laboratory Guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. CSIRO Division of Food Processing, Australia, pp.116.
- KRAJ, M.B., FRANKO, M., TREBSE, P. Photodegradation of organophosphorus insecticides- Investigations of products and their toxicity using gas chromatography-mass spectrometry and Ache-thermal lens spectrometric bioassay. *Chemosphere*, 67, 99-107, 2007.
- KUO, W.S.; REGAN, R.W. Degradation of carbaryl and 1-naphthol by spent mushroom compost microorganisms. *Water Science Technology*, v.26, n.9/11, p.2081-2084, 1992.
- LAABS, V.; AMELUNG, W.; PINTO, A.; ALTSTAEDT, A.; ZECH, W. Leaching and degradation of corn and soybean pesticides in a oxisol of the Brazilian cerrados. *Chemosphere*. 41 (9), 1441-1449, 2000.
- LEAHY, J.G.; COLWELL, R.R. Microbial Degradation of Hydrocarbons in The Environment. *Microbiological Reviews*, v. 54, n. 3, p. 305-315, 1990.
- LEE, S. M.; WYLIE, P. L. Comparison of the atomic emission detector to other element-selective detectors for the gas chromatographic analysis of pesticide residues. *J. Agr. Food Chem.*, 39 (12), 2192-2199, 1991.
- LIMA, F. J. C.; MARQUES, P. R.B. O.; NUNES, G. S.; TANAKA, S. M. C. N. Inseticida organofosforado metamidofós: aspectos toxicológicos e analíticos. *Agrotóxicos: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, 11, 17-34, 2001.
- MACIEL, C. D. C. S., TAKAKI, G. M., & GUSMÃO, N. B. (2010). Potencialidade de fungos filamentosos em degradar óleos lubrificantes. *Revista Eletrônica de Biologia (REB)*. ISSN 1983-7682, 3(1), 58-64.
- MACLEOD, C.T.; DAUGULIS A.J. Interfacial effects in a two-phase partitioning bioreactor: degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by a hydrophobic *Mycobacteriu*. *Process Biochemistry*, Oxon, v.40, n.5, p.1799–1805, 2005.
- MAIER, R. M. PEPPER, I. L. & GERBA, C. P.. 2009. *Environmental Microbiology*, 2nd ed., Academic Press. Elsevier, San Diego California. 585 pp.
- MARIANO, A. P. Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel. 147 f. 2006. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.
- MARTINEZ, C. O.; SILVA, C. M. M. S.; FAY, E. F.; ABAKERLI, R. B.; MAIA, A. H. N.; DURRANT, L. R. The effects of moisture and temperature on the degradation of sulfentrazone. *Geoderma*, v.147, p.56–62, 2008.
- MATTOS, M. L.T. et al. Metodologia para Obtenção de Fungos Degradadores do Herbicida Glifosato. Embrapa Clima Temperado, 2010. 24 p. – (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 308).
- MATHEUS, D. R., BONONI, V. L. R. & MACHADO, K. M. G. 2000. Biodegradation of hexachlorobenzene by basidiomycetes in soil contaminated with industrial residues. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 16 (5): 415-421.
- MATHEUS, D. R. 2003. Otimização da biodegradação de HCB por fungos basidiomicetos em solos contaminados com resíduos industriais. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. 161p.
- MOHAN, S.V., SIRISHA, K., RAO, N.C, SARMA, P.N., REDDY, S.J. Degradation of chlorpyrifos contaminated soil by bioslurry reactor operated in sequencing batch mode: bioprocess monitoring. *Journal of Hazardous Materials B*, 116, 39-48, 2004.
- MORAES, R. O. 1993. Determinação da viabilidade de *Bacillus thuringiensis* após processos de secagem. Dissertação de Mestrado, FEA/Unicamp, Campinas, 92 p.

- MOREIRA, F.M.S. & SIQUEIRA, J.O. Microbiologia e bioquímica do solo. 2.ed. Lavras, Universidade Federal de Lavras, 2006. 729p.
- MORI, M.N. Descontaminação de embalagens de clorpirifós utilizando o processo de oxidação avançada por radiação ionizante. Dissertação, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN), Brasil, 2006.
- NAVARRO, S.; VELA, N.; GIMÉNEZ, M. J.; NAVARRO, G. Persistence of four s-triazine herbicides in river, sea and groundwater samples exposed to sunlight and darkness under laboratory conditions. *Science of the Total Environment*, 329, 87-97, 2004.
- NOBLES, M. K. Studies in forest pathology; identification of cultures of wood-rotting fungi. *Canadian Journal*. v. 26. p. 281-432. 1948.
- OBANDA, D. N. Resistance of *Trichoderma harzianum* to the biocide tebuconazol – Proposed biodegradation pathways. *Hulzforschung*, Berlin. v. 62. p. 613 – 619. 2008.
- OELMÜLLER, R. et al. *Piriformospora indica*, a cultivable root endophyte with multiple biotechnological application. *Symbiosis*, v.49, p.1–17, 2009.
- OGA, S. Fundamentos de Toxicologia. 2. ed.. São Paulo: Atheneu, 2003, 474 p.
- OKU, H.; OKI, K.; SHIRAIISH, T.; SATO, K.; OUCHI, S. Effects of fungicides benomil and thiran on soil microflora and some soil inhabitant fungi. *Science Reporter Faculty of Agronomy. Okayama University, Japan*, v. 54, p.1, 1979.
- PAUL, E.A.; CLARCK, F.E. Soil microbiology and biochemistry. London: Academic Press, 1989. 275p.
- PENA, M. F.; AMARAL, E. H.; SPERLING, E. V.; CRUZ, I. Método para determinação de resíduos de clorpirifós em alface por cromatografia líquida de alta eficiência, *Pesticidas: R. Ecotoxicol. e Meio Ambiente*, 13: 37-44 2003.
- POTIN, O. et al. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*, Oxford, v.54, n.1, p.45-52, 2004.
- PRATA, F.; LAVORENTI, A.; REGITANO, J.B.; TORNISIELO, V.L. Degradação e sorção de ametryn em dois solos com aplicação de vinhaça. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 36 (7), 975-981, 2001.
- RACKE, D.K.. Implications of enhanced biodegradation for the use and study of pesticides in the soil environment. In: RACKE, D. K. & COATS, J.R., eds. *Enhanced biodegradation of pesticides in the environment*. Washington, DC, ACS, 1990. p.269-282. (ACS Symposium Series, 426)
- RACKE, K. D.; FONTAINE, D. D.; YODER, R. N.; MILLER, J. R. Chlorpyrifos degradations in soil at termicidal application rates. *Pestic. Sci.* 42, 43-51, 1994.
- ROCHA JÚNIOR, D. S. et al. Síndromes Neurológicas Induzidas por Praguicidas Organofosforados. *Saúde em Revista, Piracicaba*, v.6, n.14, p. 53-60, 2004.
- RAYMOND, J. ROGERS, T., SHONNARD, D., KLINE, A. 2001. A review of structure-based biodegradation estimation methods, *J. Hazard. Mater.* 84, 189–215.
- RODRIGUES, S.; DUARTE, A. C. Poluição do solo: revisão generalista dos principais problemas. In: CASTRO, A.; DUARTE, A.; SANTOS, T. (Ed.). *O ambiente e a saúde*. Lisboa: Instituto Piaget, 2003. p. 136-176.
- RUSSELL, J.R., et al. Biodegradation of Polyester Polyurethane by Endophytic Fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, doi:10.1128/AEM.00521-11 AEM Accepts, published online ahead of print, 2011.
- RUSSO, M. V.; CAMPANELLA, L.; AVINO, P. Determination of organophosphorus pesticide residues in human tissues by capillary gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry analysis, *Journal of Chromatography B*, 780: 431-441, 2002.

- SANTOS, E.A.; SANTOS, J.B.; FERREIRA, L.R.; COSTA, M.D. & SILVA, A.A. Fitoestimulação por *Stizolobiumaterrimum* como processo de remediação de solo contaminado com trifloxysulfuron sodium. *Planta Daninha*, 25:259-265, 2007.
- SARDAR, D.; KOLE, R. Metabolismo of chlorpirifos in relation to its effects on the availability of some plant nutrients in soil. *Chemosphere*, 61, 1273-1280, 2005.
- SEABRA, P.N.C. Aplicação de biopilha na biorremediação de solos contaminados com petróleo, 169p, 2005. Tese D. SC. submetida ao Programa de Engenharia Química da COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2005.
- SILVA, CMMS, et al. "Isolamento de fungos degradadores de carbendazim." *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 34.7 (1999): 1255-1264.
- SILVA, A. A.; SILVA, J. F. Tópicos em Manejo de Plantas Daninhas. Editora UFV, Viçosa, MG. Primeira edição, 367, 2007.
- SILVA, F. DE A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. de. Principal Components Analysis in the Software Assisat-Statistical Attendance. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.
- SILVA, F. DE A. S. E. & AZEVEDO, C. A. V. de. A New Version of The Assisat-Statistical Assistance Software. In: WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 4, Orlando-FL-USA: Anais... Orlando: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. p.393-396.
- SILVA, NATÁLIA ALVARENGA DA. Biodegradação dos pesticidas clorpirifós, metil paration e profenofós por fungos de origem marinha. São Carlos: Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2013. Dissertação de Mestrado em Química Orgânica e Biológica.
- SPESSOTO, A. M. Biodegradação do herbicida 14C-propanil em solos secos e alagados. Piracicaba: CENA/USP, 1996. 103p. Dissertação de Mestrado.
- STEVENSON, F.J. Origin and distribution of nitrogen in soil. In: STEVENSON, F.J., ed. Nitrogen in agricultural soils. Madison, American Society of Agronomy, 1982. p.1-42.
- SUCEN- SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS. Disponível em: <http://www.sucen.sp.gov.br/docstec/seguranca/cap12cla.pdf>. Acesso em: 04 fev. 2007.
- TOLEDO HHB de. 2002. Hexaclorobenzeno. In: FERNÍCOLA NAGG de OLIVEIRA S de S. (Coord.). Poluentes Orgânicos Persistentes POPs. Série Caderno de Referências Ambiental. CRA, 13: 385-416.
- TOMASINI, A. et al. An isolate of *Rhizopus nigricans* capable of tolerating and removing pentachlorophenol. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, Leiden. v. 17. p. 201-205. 2001.
- TOMLIN, C.D.S. (ed.) *The pesticide manual*. 12. ed. Farnham: The British Crop Protection Council, 2000. p.135
- TRINDADE, P.V.O. (2002). Avaliação das técnicas de bioaumentação e bioestimulação no processo de biorremediação de solo contaminado por hidrocarbonetos de petróleo. Tese M. Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, Brasil, 127p.
- VERSCHUEREN, K. 1983. Handbook of environmental data on organic chemicals. New York. 363p.
- VÉKEY, K.; *J. Chromatogr., A* 2001, 921, 227.
- WECHSLER, F.S. Fatoriais fixos desbalanceados: uma análise mal compreendida. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 33, n. 3, p. 231-262, 1998.
- XU, G., ZHENG, W., LI, Y., WANG, S., ZHANG, J. YAN, Y. Biodegradation of chlorpyrifos and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by a newly isolated *Paracoccus* sp. Strain TRP. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 62, 51-56, 2008.

- YU, Y.L, FANG, H. XIANG, Y.Q., HAO, Y.J., CHU, X.Q., PAN, X.D, YU, J.Q. Fungal degradation of chlorpyrifos by *Verticillium* sp. DSP in pure cultures and its use in bioremediation of contaminated soil and pakchoi. *Internacional Biodeterioration & Biodegradation*, 61, 294-303, 2008.
- ZAMBONIN, C. G.; PALMISANO; F. Determination of triazines in soil leachates by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 874, 247-255, 2000.
- ZIINO, M., CURTO, R.B.L., SALVO, F., SIGNORINO, CHIOFALO, B., GIUFFRIDA, D. Lipid composition of *Geotrichum candidum* single cell protein grown in continuous submerged culture. *Bioressour. Technol.*, 7-11, 1999.