

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL  
CÂMPUS APUCARANA/LONDRINA**

**GEORGE MITSUO YADA JUNIOR**

**BIOTRANSFORMAÇÃO DO INSETICIDA FLUBENDIAMIDA POR FUNGOS  
DE SOLO E LACASE; ANÁLISE DOS METABÓLITOS POR  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)**

**DISSERTAÇÃO**

**LONDRINA**

**2016**

**GEORGE MITSUO YADA JUNIOR**

**BIOTRANSFORMAÇÃO DO INSETICIDA FLUBENDIAMIDA POR FUNGOS  
DE SOLO E LACASE; ANÁLISE DOS METABÓLITOS POR  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS (LC-MS/MS)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Tecnológica Federal do Paraná como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Feijó de Souza Daniel

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aneli de Melo Barbosa Dekker

**LONDRINA**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Biblioteca UTFPR - Câmpus Londrina

Y12b Yada Junior, George Mitsuo  
Biotransformação do inseticida flubendiamida por fungos de solo e lacase;  
análise dos metabólitos por espectrometria de massas (LC-MS/MS) / George  
Mitsuo Yada Junior. – Londrina: [s.n.], 2016.  
123 f.: il.; 30 cm.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana Feijó de Souza Daniel  
Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Aneli de Melo Barbosa Dekker  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Londrina, 2016.  
Bibliografia: f. 117-123.

1. Pesticidas – Aspectos Ambientais. 2. Espectrometria de Massa. 3.  
Fungo - Biodegradação. I. Daniel, Juliana Feijó de Souza, orient. II. Dekker,  
Aneli de Melo Barbosa, coorient. III. Universidade Tecnológica Federal do  
Paraná. IV. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. V.  
Título.

CDD: 628



**Ministério da Educação**  
**Universidade Tecnológica Federal do Paraná**  
Pró-reitora de Pesquisa e Pós Graduação  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental  
Campus Apucarana/Londrina



**TERMO DE APROVAÇÃO**  
**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO**

por

**George Mitsuo Yada Junior**

Dissertação de mestrado apresentada no dia 26 de Fevereiro de 2016 como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Câmpus Apucarana/Londrina, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. O Candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho Aprovado.

---

Prof. Dr<sup>(a)</sup>- Juliana Feijó de Souza Daniel  
(UTFPR)

---

Prof. Dr<sup>(a)</sup>- Maria Inês Rezende  
(UEL)

---

Prof. Dr<sup>(a)</sup>- Teresinha de Jesus Faria  
(UEL)

---

Prof. Dr Edson Fontes de Oliveira  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental

Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me dar forças e motivação nos momentos de cansaço e impotência.

À minha orientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Juliana Feijó de Souza Daniel, pela orientação, ensinamentos, sugestões, atenção e paciência, essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

À minha coorientadora, Prof<sup>a</sup>. Dra. Aneli de Melo Barbosa Dekker, pelo fornecimento do *Botryosphaeria rhodina* à pesquisa. Além disso, por toda contribuição, sugestão, apoio e suporte em todo o trabalho.

À banca de qualificação, composta pelos professores Dr. Luis Fernando Cabeça e Dr. Ricardo Nagamine Costanzi, pela leitura crítica e contribuições fornecidas.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná campus Londrina, pela estrutura fornecida e disponibilidade de tudo que fosse necessário.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental e a todo seu corpo docente, administrativo, pela oportunidade de cursar o mestrado, apoio e aprendizado.

À CAPES e CNPq pela bolsa concedida, que permitiu suporte financeiro para o desenvolvimento da pesquisa em nosso laboratório.

À International Foundation for Science, IFS, que forneceu auxílio financeiro para a compra de equipamentos do laboratório, essenciais a realização da pesquisa.

À Bayer Crop Science, pelo interesse na pesquisa e pela concessão do inseticida flubendiamida.

Ao produtor rural Sr. Junior, da Fazenda São Manoel, pelo fornecimento da área experimental e coleta de solo.

Aos colegas do grupo de pesquisa QuiMiBio, Isabela, Bruna, Igor, Letícia, Wellington, Fernando, Pâmela, Mariane, Larissa e Adriano, por toda ajuda, auxílio e amizade.

Aos técnicos de laboratório da UTFPR, Luciana, José Rafael, Carlos e Amanda, por todo auxílio técnico e vidrarias fornecidas.

Ao Prof. Dr. Janksyn Bertozzi, pela constante assistência no espectrofotômetro.

À Prof. Dra. Suzana Nixdorf, pela concessão do uso do equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência.

Aos colegas do Laboratório de Apoio à Pesquisa Agropecuária (LAPA- UEL), Yasmin, Letícia, Tiago, Mariana, Yuri, Lício e João, pela ajuda e colaboração na utilização do equipamento de cromatografia.

Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho, pela parceria e disponibilidade do cromatógrafo acoplado à espectrometria de massas no laboratório da USP- São Carlos.

À doutoranda Marília, pela dedicação e auxílio nas análises no cromatógrafo do laboratório da USP- São Carlos.

À doutoranda Jeseka, por todo auxílio nas análises de lacase no laboratório da UEL.

À meus pais, George e Inês, e minha irmã Marcela, pela inspiração e razão pela qual esse trabalho se concretiza.

À minha namorada, Danielle, que me acompanhou e auxiliou em todas as etapas desde a graduação até o término deste trabalho. Além de todo amor, incentivo, apoio e companheirismo durante todos esses anos.

À todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

YADA JUNIOR, George Mitsuo. **Biotransformação do Inseticida Flubendiamida por Fungos de Solo e Lacase; Análise dos Metabólitos por Espectrometria De Massas (LC-MS/MS)**. 2016. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)- Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Londrina, 2016.

O alto consumo de pesticidas no Brasil tem levado à preocupação pública sobre sua disposição, contaminação e acúmulo no ambiente. A flubendiamida, N<sup>2</sup> - [1,1- dimethyl-2- (methylsulfonyl) ethyl] - 3- iodo-N<sup>1</sup>-[2-methyl- 4- [1,2,2,2-tetrafluoro-1-(trifluoromethyl)ethyl]phenyl]-1,2- benzenedicarboxamide, é um inseticida persistente ao meio ambiente (classe III) e também tóxico para os microcrustáceos. Diante disto, este trabalho teve como principais objetivos: selecionar fungos isolados de solo pelo teste de inibição de crescimento com inseticidas Actara e Belt; analisar os produtos da biotransformação do inseticida flubendiamida por fungos isolados do solo, pelo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 e pela enzima lacase; e avaliar se os inseticidas Belt®, Actara® e o padrão flubendiamida da Bayer® atuam como indutores de lacase. O teste de inibição de crescimento foi realizado em meio sólido BDA com os fungos isolados de solo e com o *B. rhodina*. Este fungo e os que demonstraram melhores resultados de crescimento foram conduzidos ao experimento de biotransformação da flubendiamida, junto com o extrato de lacase do fungo *B. rhodina*. Os metabólitos foram avaliados por LC-MS/MS. A atividade lacase foi quantificada utilizando o ABTS como substrato. O resultado do teste de inibição destacou o crescimento dos fungos JUSOLCL039 e JUANT070, além do fungo *B. rhodina* MAMB-05. No experimento de biotransformação, foram detectados 47 metabólitos. Entre eles, a rota metabólica do íon m/z 587 obtida pelo fungo MAMB-05 foi proposta, através da perda do iodo e uma reação de hidroxilação. O metabólito m/z 663 foi encontrado no extrato do fungo JUANT070 e no extrato da enzima lacase. Sua rota metabólica foi proposta, indicando uma reação de desalogenação do flúor, confirmada pela espectrometria de massas em Tandem. O metabólito de íon m/z 697 foi formado pela reação de hidroxilação e identificado no extrato da enzima lacase. Os resultados do experimento de biotransformação apresentaram metabólitos formados pela enzima lacase e por outras enzimas presentes nos fungos JUANT070, JUSOLCL039 e *B.rhodina*. Estes fungos mostraram-se produtores constitutivos de lacase, na presença dos inseticidas Actara, Belt e no padrão analítico de flubendiamida. Entretanto, não demonstraram atuarem como indutores de lacase para os três fungos.

**Palavras-chave:** Biotransformação, Enzima lacase, Espectrometria de massas em Tandem.

## ABSTRACT

YADA JUNIOR, George Mitsuo. **Biotransformation of Flubendiamida Inseticide by Soil Fungi and Laccase; Metabolites Analysis by Mass Spectrometry (LC-MS/MS)**. 2016. 123 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental)- Federal Technology University of Paraná. Londrina, 2016.

The high consumption of pesticides in Brazil has led to public concern about their disposal, contamination and accumulation in the environment. Flubendiamide, N<sup>2</sup> - [1,1- dimethyl-2- (methylsulfonyl) ethyl] - 3- iodo-N<sup>1</sup>-[2-methyl- 4- [1,2,2,2-tetrafluoro-1-(trifluoromethyl)ethyl]phenyl]-1,2-benzenedicarboxamide is toxicologically classified as persistent to the environment (class III) and also toxic to microcrustaceans. This study mainly aimed to: selecting fungi isolated from soil by growth inhibition test using Belt and Actara insecticides; analyze the flubendiamide biotransformation product by soil fungi isolated, by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 and by the laccase enzyme fungi; and evaluate if Belt®, Actara® and flubendiamide Bayer standard ® insecticides act as laccase inducers. The growth inhibition test was on solid medium PDA with the fungi isolated from soil and with *B. rhodina*. This fungus and those which showed the best growth results were conducted to the flubendiamide biotransformation experiment, together with the laccase extract of the fungus *B. rhodina*. The metabolites were assessed by LC-MS / MS. Determination of laccase activity was measured using ABTS as substrate. The result of the inhibition test emphasizes the growth of JUSOLCL039 and JUANT070 fungi. In addition to *B. rhodina* MAMB-05, biotransformation experiment detected 47 metabolites. The metabolic route from ion m / z 587 by the fungus MAMB-05 was proposed, through loss of iodine and hydroxylation reaction. The metabolite m / z 663 was found in the extract of JUANT070 fungi and in the laccase extract. The metabolic route suggested a dehalogenation reaction of fluoride, following by its confirmation through Tandem mass spectrometry. The metabolite m / z 697 formed by the hydroxylation reaction was identified in the laccase enzyme extract. The results showed metabolites which were formed by the laccase enzyme, or by JUANT070, JUSOLCL039 and *B.rhodina* other enzymes. These fungi were shown to be constitutive producers of laccase in the presence of the insecticide Actara, Belt and the analytical standard flubendiamide. However, these insecticides demonstrated not act as laccase inducers for the three fungi.

**Keywords:** Biotransformation, Laccase Enzyme, Tandem Mass Spectrometry.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do inseticida flubendiamida, constituída de três partes: 1) um grupo heptafluoro-isopropílico na fração de anilida, 2) um grupo sulfonilalquila na fração amida alifática e 3) um átomo de iodo na terceira posição da fração do ácido ftálico.....	23
Figura 2: Estrutura: (a) Flubendiamida: (b) Do metabólito des-iodo flubendiamida. Adaptado de BATTU et. al., (2008).....	26
Figura 3: Estrutura do thiamethoxam.....	27
Figura 4: Cromatograma de íons totais (TIC) e de íons selecionados (SIC).....	39
Figura 5: Etapa da inoculação do micélio fúngico ao centro da placa de Petri, para avaliação do crescimento dos microrganismos em meio com/sem inseticida.	43
Figura 6: Etapa de extração, resultando nos extratos codificados: Após a extração. O Extrato Cultivo corresponde ao extrato do meio de cultura, fungo e inseticida; O Extrato Controle A corresponde ao extrato do meio de cultivo com fungo; O Extrato de Controle B equivale ao extrato do meio de cultivo e inseticida; O Extrato Cultivo micélio é referente ao extrato do micélio com inseticida; E o Extrato Controle C denota o extrato do micélio sem insetica.....	46
Figura 7: Isolados fúngicos selecionados para o teste em meio sólido. (I1) JUSOL003; (I2) JUANT028; (I3) JUSOLCL039; (I4) JUSOLCL05; (I5) JUSOLTH034; (I6) JUSOLTH039; (I7) JUSOLCL043; (I8) JUSOLCL049; (I9) JUSOLCL054; (I10) JUSOL042; (I11) JUANT001 (isolado de inseto); (I12) JUANT070 (isolado de inseto); (I13) <i>B. rhodina</i> MAMB-05.....	53
Figura 8: Taxa de inibição do <i>B. rhodina</i> MAMB-05 na presença de concentrações crescentes de Actara (0 a 30 g/L), observado durante sete dias de incubação em BOD.....	55
Figura 9: Crescimento do isolado JUANT070 no teste de inibição. Da esquerda para direita, foram adicionadas as concentrações 0.00, 3.00, 7.00, 21.00 e 35.00 g.L <sup>-1</sup> de Actara®.....	57
Figura 10: Avaliação da porcentagem de inibição do crescimento (%) dos isolados fúngicos cultivados em concentrações crescentes de Actara (3, 7, 21 e 35 g/L).....	58
Figura 11: Crescimento do isolado JUSOLCL039, possivelmente do gênero <i>Trichoderma</i> , no teste de inibição. Da esquerda para direita, foram adicionadas as concentrações 0.00, 3.00, 7.00, 21.00 e 35.00 g.L <sup>-1</sup> de Actara®.....	58
Figura 12: Taxa de inibição do <i>B. rhodina</i> MAMB-05 na presença de concentrações crescentes de Belt (0 a 80 g/L). ....	59
Figura 13: Avaliação da porcentagem de inibição do crescimento (%) dos isolados fúngicos cultivados em concentrações crescentes de Belt (1.22, 4.88, 19.52, e 39,04 g/L).....	61

	10
Figura 14: Crescimento do <i>B. rhodina</i> MAMB-05 no teste de inibição. Da esquerda para direita, foram adicionadas as concentrações 0.00, 1.22, 4.88, 19.52, 39.04 g.L <sup>-1</sup> de Belt <sup>®</sup> .....	62
Figura 15: Cromatograma do padrão analítico da flubendiamida (A) e perfil de absorção da flubendiamida no UV (B).....	70
Figura 16: Cromatograma em 210 nm do extrato da parte líquida do fungo JUANT070 cultivado com flubendiamida.....	70
Figura 17: Cromatograma em 210 nm do extrato da parte do micélio do fungo JUANT070 cultivado com flubendiamida.....	71
Figura 18: Perfil de absorção no UV dos picos no tempo de retenção 14.27 e 10.46 minutos.....	71
Figura 19: Cromatograma em 210 nm do controle do fungo JUANT070.....	72
Figura 20: Cromatograma em 210 nm do extrato da parte líquida do fungo JUSOLCL039, cultivado com flubendiamida.....	72
Figura 21: Cromatograma em 210 nm do extrato controle do fungo JUSOLCL039.....	73
Figura 22: Cromatograma em 210 nm do extrato da parte líquida do fungo MAMB-05, cultivado com flubendiamida.....	73
Figura 23: Cromatograma em 210 nm do extrato da parte do micélio do fungo MAMB-05, cultivado com flubendiamida.....	74
Figura 24: Cromatograma em 210 nm do extrato controle do fungo <i>B. rhodina</i> .....	74
Figura 25: TIC no modo ESI-positivo do composto padrão de flubendiamida.....	76
Figura 26: Cromatograma de íons totais do padrão flubendiamida no modo ESI negativo.....	77
Figura 27: Comparação dos espectros de massas obtidos pela ionização por eletrospray no modo negativo (A) RT:7.46 – 7.68; e positivo (B) RT: 7.67.....	78
Figura 28: Comparação do espectro de massas no intervalo de massa 678 – 688, no tempo de retenção entre 7.42 – 7.59 minutos. (A): Massas obtidas do composto padrão com ionização negativa; (B): Massa simulada da flubendiamida, a partir da sua formula molecular.....	79
Figura 29: Cromatograma de íon selecionado, indicando que a massa de m/z 681 corresponde ao tempo de retenção 7.53 minutos e é a flubendiamida.....	80
Figura 30: Cromatograma de íon selecionado, indicando que a massa de m/z 555 corresponde ao tempo de retenção 7.08 minutos e é o metabólito desidro-flubendiamida.....	81

Figura 31: Cromatograma de íons selecionados dos extratos obtidos da parte líquida do cultivo do fungo JUANT070 em meio com flubendiamida, em triplicata I, II e III, comparados com o SIC do extrato controle do fungo, a partir dos m/z: A) 225. B) 289. C) 377. D) 911. E) 474. F) 542. G) 339.....	83
Figura 32: Espectro de massas do tipo TANDEM do íon de massa m/z 225.....	85
Figura 33: Cromatograma de íons selecionados dos extratos obtidos da parte micelial do cultivo do fungo JUANT070 em meio com flubendiamida, em triplicata A, B e C, comparados com o SIC do extrato controle do fungo, a partir dos m/z: A) 513. B) 427. C) 665. D) 663. E) 669. F) 315.....	87
Figura 34: Espectro de massas do tipo TANDEM do íon de massa (A): m/z 315; (B): m/z 663.....	89
Figura 35: Provável rota de biotransformação da flubendiamida pelo fungo JUANT070.....	90
Figura 36: Comprovação da estrutura do fragmento formado do íon m/z 663, pelo espectro de massas Tandem com elucidação do fragmento m/z 256.06.....	91
Figura 37: Cromatograma dos extratos obtidos da parte líquida do cultivo do fungo JUSOLCL039 em meio com flubendiamida, em triplicata A, B e C, comparados com o SIC do extrato controle do fungo, a partir dos m/z: A) 286. B) 365. C) 301. D) 214. E) 265. F) 265. G) 474.....	93
Figura 38: Espectro de massas do tipo TANDEM do íon de massa (A): m/z 365; (B): m/z 265.....	96
Figura 39: Cromatograma de íons selecionados dos extratos obtidos da parte líquida do cultivo do fungo MAMB-05 em meio com flubendiamida, em triplicata A, B e C, comparados com o SIC do extrato controle do fungo, a partir dos m/z: A) 749. B) 441. C) 717. D) 727. E) 771. F) 744.....	97
Figura 40: Espectro de massas do tipo Tandem do íon de massa (A): m/z 441; (B): [M+Cl] <sup>-</sup> 717.....	99
Figura 41 (a): Cromatograma (parte 1) dos extratos obtidos da parte micelial do cultivo do fungo MAMB-05 em meio com flubendiamida, em triplicata A, B e C, comparados com o SIC do extrato controle do fungo, a partir dos m/z: A) 499. B) 459. C) 543. D) 503. E) 587. F) 631. G) 635. H) 719.....	101
Figura 41 (b): Cromatograma (parte 2) dos extratos obtidos da parte micelial do cultivo do fungo MAMB-05 em meio com flubendiamida, em triplicata A, B e C, comparados com o SIC do extrato controle do fungo, a partir dos m/z: I) 763. J) 807. K) 851. L) 326. M) 329. N) 310. O) 669.....	102
Figura 42: Espectro de massas do tipo Tandem do íon de massa (A): m/z 326; (B): m/z 310.....	105
Figura 43: Proposta de rota metabólica do íon de m/z 587.....	106

- Figura 44: Cromatograma dos extratos obtidos da enzima lacase em meio com flubendiamida, comparados com o SIC do extrato controle da lacase, a partir dos m/z: A) 391. B) 663. C) 807. D) 697. E) 513. F) 679. G) 665..... 107
- Figura 45: Espectro de massas Tandem, comparando os fragmentos do íon m/z 663: (A) do extrato do cultivo do fungo JUANT070; (B) da enzima lacase..... 110
- Figura 46: Provável rota de biotransformação da flubendiamida, na presença da enzima lacase, formando os metabólitos flubendiamida-benzílico (isômero A) ou flubendiamida-hidroxy (isômero B)..... 111
- Figura 47: (A)Espectro de massas Tandem contendo os fragmentos do metabólito m/z = 697. (B)Proposta de fragmentação do íon m/z = 697 por MS/MS 112
- Figura 48: (A)Espectro de massas Tandem contendo os fragmentos do metabólito m/z = 697.(B)Proposta de fragmentação do íon m/z = 697 por MS/MS. 113
- Figura 49: Espectro de massas do tipo Tandem do íon de massa : m/z 513; m/z 665 e m/z 807..... 114

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais características da flubendiamida.....	24
Tabela 2: Principais características do thiamethoxam.....	27
Tabela 3: Concentrações utilizadas no teste, para os inseticidas Actara® e Belt.	43
Tabela 4: Condições do LC-MS utilizadas para analisar as amostras.....	47
Tabela 5: Sistema de incubação avaliar a atividade de lacase dos fungos selecionados, cultivados na presença dos inseticidas Belt, Actara e padrão analítico flubendiamida (98,5 %).	50
Tabela 6: Propriedades físicas dos solos das três áreas avaliadas.....	52
Tabela 7: Propriedades químicas dos solos das três áreas avaliadas.....	52
Tabela 8: Inibição do crescimento (%) dos fungos selecionados a partir de isolados do solo, em placas de Petri em meio BDA. As concentrações de Actara® avaliadas foram 3, 7, 21 e 35 g.L-1.....	56
Tabela 9: Inibição do crescimento (%) dos fungos selecionados a partir de isolados do solo, em placas de Petri em meio BDA. As concentrações de Belt® utilizadas foram de 1.22, 4.88, 19.52 e 39.04 g.L-1.....	60
Tabela 10: Atividade enzimática de lacase com os inseticidas Actara® e Belt®. O controle é constituído apenas do meio de cultivo líquido com inseticida, sem a presença dos microrganismos.....	64
Tabela 11: Valores médios dos valores de pH final dos cultivos com os inseticidas Actara® e Belt®.....	65
Tabela 12: Atividades de lacase do isolado fúngico JUSOLCL039, JUANT070 e o fungo MAMB-05 na presença e ausência da flubendiamida, determinadas com o substrato ABTS. O controle refere-se a amostra apenas com inseticida, ausente de cultivo com microrganismos. As letras A-B-C-D indicam as repetições .....	67
Tabela 13: Metabólitos oriundos da biotransformação ou produzidos pelo isolado JUANT070 induzidos pelo inseticida.....	84
Tabela 14: Metabólitos do micélio oriundos da biotransformação do inseticida ou produzidos pelo isolado JUANT070.....	88
Tabela 15: Metabólitos da parte líquida do cultivo oriundos da biotransformação do inseticida ou produzidos pelo isolado JUSOLCL039.....	94
Tabela 16: Metabólitos da parte líquida do cultivo oriundos da biotransformação do inseticida ou produzidos pelo fungo <i>B. rhodina</i> .....	98

Tabela 17: Metabólitos do micélio do cultivo, oriundos da biotransformação do inseticida ou produzidos pelo fungo MAMB-05..... 104

Tabela 18: Metabólitos da incubação com a lacase, oriundos da biotransformação do inseticida..... 108

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS - 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, 2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate.

BDA – Batata Dextrose Ágar.

BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio.

CID – Dissociação Induzida por Colisão.

DMF – Dimetilformamida.

ELC – Extrato Livre de Células.

ESI – Ionização por Eletrospray.

HPLC – High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta eficiência).

LC-MS – Liquid Chromatography – Mass Spectrometry (Cromatografia Líquida-Espectrometria de Massas).

M/Z – Massa/Carga.

PDA – Photo Diode Array (Detector de Arranjo de Fotodiodos).

SIC - Cromatograma de Íons Seleccionados.

TIC – Cromatograma de Íons Totais.

CONTROLE A – Extrato do cultivo com fungo sem inseticida.

CONTROLE B – Extrato do meio de cultivo com inseticida.

CONTROLE C – Extrato do micélio do fungo sem inseticida.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>3. REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>20</b>
3.1 PESTICIDAS: CONSUMO, PERSISTÊNCIA E IMPACTO AMBIENTAL....	20
3.1.1 Inseticida flubendiamida.....	22
3.1.2 Inseticida thiamethoxam.....	26
3.2 BIOTRANSFORMAÇÃO DE PESTICIDAS POR MICRORGANISMOS.....	28
3.2.1 Lacases: Descrição, Mecanismo de Ação e Aplicações.....	31
3.2.2 <i>Botryosphaeria rhodina</i> como Produtor de Lacase.....	34
3.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	35
3.3.1 Instrumentação e Fontes de Ionização.....	36
3.3.2 Analisadores de Massas e Detectores.....	37
3.3.3 Espectrometria de Massas do tipo Tandem-MS.....	38
3.4 CROMATOGRAMA DE ÍON TOTAIS (TIC) E CROMATOGRAMA DE ÍONS SELECIONADOS (SIC).....	39
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
4.1 INSETICIDAS E PRODUTOS QUÍMICOS.....	40
4.2 ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS.....	40
4.2.1 Coleta do Solo.....	40
4.2.2 Isolamento de Microrganismos.....	41
4.2.3 Conservação dos Isolados Fúngicos.....	42
4.3 TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO FÚNGICO EM MEIO SÓLIDO NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS INSETICIDAS..	42
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	44
4.5 EXPERIMENTO DE BIOTRANSFORMAÇÃO.....	44
4.4.1 Cultivo dos Isolados JUANT070, JUSOLCL39 e do fungo <i>B. rhodina</i> MAMB-05 em Meio Líquido.....	44
4.4.2 Extração da Flubendiamida e de seus Metabólitos e detecção por HPLC E LC-MS/MS.....	45



4.4.3 Análise da Flubendiamida e Metabólitos por LC-MS.....	47
4.6 AVALIAÇÃO DA MODIFICAÇÃO QUÍMICA DO INSETICIDA FLUBENDIAMIDA <i>IN VITRO</i> , PELA LACASE DE <i>B. RHODINA</i> PRODUZIDA EM ALCOOL VERATRÍLICO, POR LC-MS.....	48
4.6.1 PRODUÇÃO DE LACASE UTILIZANDO-SE ÁLCOOL VERATRÍLICO (AV) COMO AGENTE INDUTOR. ....	48
4.6.2 ANÁLISE DA MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA FLUBENDIAMIDA POR LC-MS.....	48
4.7 PRODUÇÃO DE LACASE PELOS ISOLADOS SELECIONADOS <i>E B. rhodina</i> EM INSETICIDAS COMERCIAIS E FLUBENDIAMIDA PADRÃO ANALÍTICO.....	49
4.7.1 Cultivo em meio líquido e obtenção do extrato livre de células (ELC).	49
4.7.2 Interrupção dos cultivos dos microrganismos e determinação da atividade de lacase.....	50
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SOLO E ISOLAMENTO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS.....	52
5.2 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS INSETICIDAS ACTARA E BELT EM MEIO SÓLIDO; UTILIZANDO <i>BOTRYOSPHERIA RHODINA</i> MAMB-05 COMO REFERÊNCIA.....	54
5.3 VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL INDUTOR DE ACTARA, BELT E FLUBENDIAMIDA NA PRODUÇÃO DE LACASE PELOS ISOLADOS JUANT070, JUSOLCL039 E PELO <i>BOTRYOSPHERIA RHODINA</i> MAMB-05 EM MEIO LÍQUIDO.....	64
5.3.1 Ação indutora de Actara e Belt.....	64
5.3.2 Ação indutora de flubendiamida (padrão analítico 98,5%).....	66
5.4 DETERMINAÇÃO DE FLUBENDIAMIDA E SEUS POSSÍVEIS METABÓLITOS EM EXTRATOS DOS CULTIVOS LÍQUIDOS COM OS FUNGOS JUANT070, JUSOLCL039 E <i>BOTRYOSPHERIA RHODINA</i> MAMB-05 POR HPLC – UV.....	69
5.4.1 Identificação de metabólitos do extrato JUANT070.....	70
5.4.2 Identificação de metabólitos do extrato JUSOLCL039.....	72
5.4.3 Identificação de metabólitos do extrato MAMB-05.....	73

5.5 ANÁLISE DOS METABÓLITOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	75
5.5.1 Determinação das condições de ionização utilizando o padrão analítico de flubendiamida.....	75
5.5.2 Determinação do tempo de retenção da flubendiamida e desiodo-flubendiamida .....	79
5.5.3 Determinação dos metabólitos de biotransformação do isolado JUANT070 extraído do meio líquido.....	81
5.5.3.1 Espectrometria de massas do meio líquido JUANT070 usando a técnica Tandem, ms/ms ou ms <sup>2</sup> .....	84
5.5.4 Determinação dos metabólitos de biotransformação do cultivo com o isolado JUANT070 extraído do micélio.....	86
5.5.4.1 Espectrometria de massas do micélio do fungo JUANT070 usando a técnica Tandem, ms/ms ou ms <sup>2</sup> .....	89
5.5.5 Determinação dos metabólitos de biotransformação do cultivo com o isolado JUSOLCL039 extraído do meio líquido.....	92
5.5.5.1 Espectrometria de massas da parte líquida do fungo JUSOLCL039 usando a técnica Tandem, ms/ms ou ms <sup>2</sup> .....	95
5.5.6 Determinação dos metabólitos de biotransformação do cultivo com fungo <i>B. rhodina</i> extraído meio líquido.....	96
5.5.6.1 Espectrometria de massas da parte líquida do fungo MAMB-05 usando a técnica Tandem, ms/ms ou ms <sup>2</sup> .....	98
5.5.7 Determinação dos metabólitos de biotransformação do cultivo com fungo <i>B. rhodina</i> extraído do micélio.....	100
5.5.7.1 Espectrometria de massas do micélio do fungo MAMB-05 usando a técnica Tandem, ms/ms ou ms <sup>2</sup> .....	104
5.5.8 Determinação dos metabólitos de biotransformação pela enzima lacase .....	106
5.5.8.1 Espectrometria de massas do extrato de lacase usando a técnica Tandem, ms/ms ou ms.....	109
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>115</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>117</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização dos inseticidas na agricultura promoveu diversas consequências à saúde e ao meio ambiente. Estes compostos são formados por novas moléculas orgânicas, denominados xenobióticos, visto que são estranhos aos organismos vivos e não fazem parte do metabolismo. Por isso, a maioria dos xenobióticos permanece no solo, no local de aplicação, ou são carregados aos lençóis freáticos e aos rios. Em consequência disto, há uma preocupação com o acúmulo de seus resíduos nos alimentos e na água.

Por isso, houve a necessidade de desenvolver métodos seguros, convenientes e economicamente viáveis para a remediação de inseticidas. Através da biotransformação, modificação de estrutura de uma molécula catalisada por reação enzimática, compostos orgânicos vêm sendo estudados e testados, utilizando principalmente fungos filamentosos e ligninolíticos. Estes têm sido explorados como fábricas celulares para a produção de enzimas e de uma grande variedade de metabólitos.

A detecção destes metabólitos é auxiliada por técnicas cromatográficas, de alta definição e sensibilidade. A espectrometria de massas possibilita a identificação de diversos compostos em baixas concentrações.

As enzimas fúngicas estão entre os mais importantes produtos biotecnológicos porque possuem um amplo campo de aplicação. A enzima lacase, por exemplo, tem sido foco de várias pesquisas nos últimos anos, devido à sua capacidade de oxidar compostos fenólicos altamente recalcitrantes, colaborando na degradação dos mesmos. Além disso, sua aplicação inclui a degradação de lignina, visto ser uma enzima ligninolítica, além de também colaborar na degradação de poluentes, em processos de tratamento de resíduos e na biorremediação de ambientes contaminados.

A investigação de novos metabólitos de biotransformação pode auxiliar nos processos de remediação em ambientes contaminados. A avaliação de inseticidas que induzem a atividade de lacase pode contribuir com diversas aplicações industriais, além do uso potencial em tratamento de efluentes.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os produtos da biotransformação do inseticida flubendiamida por fungos isolados do solo, pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, e pela enzima lacase;

Avaliar se os inseticidas Belt®, Actara® e o padrão flubendiamida da Bayer® atuam como indutores de lacase.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar fungos filamentosos de solo de lavoura de soja da fazenda São Manoel na região de Londrina;
- Selecionar os isolados que apresentaram maior potencial de crescimento em concentrações elevadas de flubendiamida e thiamethoxam em meio sólido;
- Avaliar a produção de lacase pelos isolados selecionados quando cultivados em meio líquido na presença dos inseticidas flubendiamida e thiamethoxam e do padrão flubendiamida da Bayer (98,5%);
- Verificar a capacidade indutora dos inseticidas na produção de lacase, utilizando como referência o ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05.
- Avaliar as transformações estruturais da flubendiamida, provenientes do ensaio de biotransformação dos fungos isolados solo, *B. rhodina*, e pelo extrato de lacase.

### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 PESTICIDAS: CONSUMO, PERSISTÊNCIA E IMPACTO AMBIENTAL

O alto consumo de pesticidas no Brasil fez com que o país se tornasse o maior mercado consumidor de agrotóxicos do mundo. Em 2009, o volume superou as 986,5 mil toneladas comercializadas em 2008, totalizando 1,06 milhões de toneladas no ano, segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Defesa Agrícola (CASALI et al., 2015).

O emprego de inseticidas específicos, ou seletivos, vem sendo utilizado nas lavouras agrícolas para a minimização da exposição de inimigos naturais e, ao mesmo tempo, controle de determinadas pragas. Na agricultura moderna, os pesticidas devem ser utilizados somente quando esgotadas todas as alternativas de controle e, de maneira emergencial, por meio de produtos seletivos (BOLLER et al., 2004).

A persistência dos resíduos de agrotóxicos no solo agrega um significado econômico e ambiental, e é um termo frequentemente utilizado como um indicador-chave para os impactos ambientais da utilização inconsciente. A persistência de pesticidas no solo depende de propriedades químicas intrínsecas e de fatores ambientais extrínsecos. As principais propriedades intrínsecas dos pesticidas podem ser exemplificadas como: pressão de vapor, solubilidade em água, atividade biológica e resistência às modificações químicas. Por outro lado, dentro dos fatores extrínsecos estão a atividade microbiana no solo, teor de carbono orgânico, temperatura do solo, radiação solar e precipitação. Assim, estes fatores podem influenciar consideravelmente o destino dos pesticidas (DAS E MUKHERJEE, 2012).

O uso indiscriminado de uma variedade de pesticidas tem levado à preocupação pública sobre sua disposição, contaminação e acumulação no ambiente, que pode ser afetado pela sua toxicidade. De acordo com Kouzayha et al. (2012), os pesticidas são considerados um dos contaminantes mais perigosos ao meio ambiente, porque além de serem compostos muito tóxicos, podem bioacumular e fazerem parte de processos químicos, físicos e biológicos na natureza.

Diante da problemática, há uma crescente preocupação com os efeitos adversos ao meio ambiente e à saúde, resultantes da produção, uso e disposição de substâncias presentes no cotidiano das pessoas e que afetam a economia. Segundo Cabana et al. (2007), os produtos químicos em geral são liberados ao meio ambiente, mesmo depois de processos de tratamento incapazes de removê-los.

Durante o século passado, um grande número de inseticidas foi introduzido no mercado. Neste período, a cada década uma nova classe química de pesticidas foi criada e vendida. Dentre eles estão os pesticidas organofosforados, os carbamatos, os organoclorados, os piretróides sintéticos e os neonicotinóides que têm ajudado os agricultores a proteger as suas culturas. No entanto, alguns destes agrotóxicos resultaram em diversos impactos ambientais e também à saúde. Após décadas de pesquisa, pequenas moléculas de novas classes ainda foram descobertas, com novos mecanismos de ação e com perfis mais ambientais, conforme seus registros e catálogos indicam.

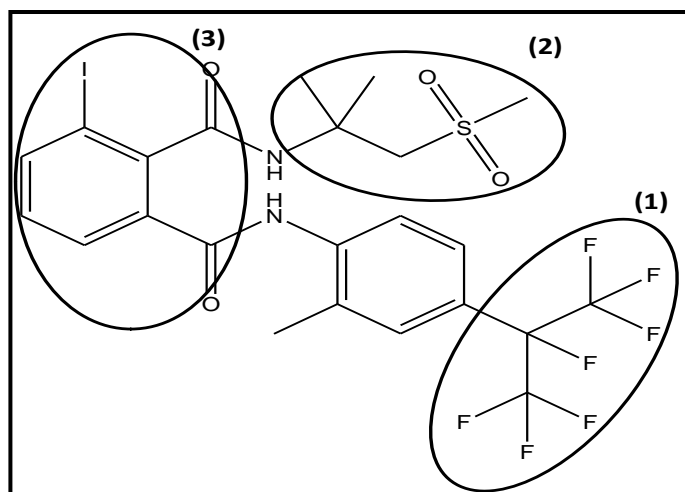
O aumento da conscientização do potencial de impacto dos agentes persistentes na proteção das culturas tem levado ao desenvolvimento de novas moléculas menos tóxicas, para assegurar o mínimo risco para o homem e ao ambiente. A aceleração do desenvolvimento de novos inseticidas com "risco reduzido" para a saúde humana resultou em uma alta redução no uso de inseticidas organofosforados em horticulturas. O surgimento de novas alternativas incluem os neonicotinóides e as diamidas, e, apesar de serem menos tóxicos, ainda afetam diversos fatores ambientais (BOSTANIAN et al., 2009a).

### 3.1.1 INSETICIDA FLUBENDIAMIDA

Durante a década de 90, a empresa japonesa Nihon Nohyaku iniciou um programa de desenvolvimento de novos inseticidas, cujo avanço foi mais significativo em 1998, utilizando-se as ftalamidas. Esta nova classe tem uma alta eficiência contra pragas lepidópteras, e também não tem sinal de fitotoxicidade. Seu melhor composto, a flubendiamida, foi desenvolvido pela Bayer Crop Science, na Alemanha, em colaboração com a Nihon Nohyaku Co. Ltd., Tóquio, Japão. A introdução pública do flubendiamida foi em julho de 2005 e seu primeiro registro foi obtido nas Filipinas em 2006, em seguida no Japão, Paquistão, Chile, Índia e Tailândia, em 2007 (NISHIMATSU et al., 2005). Flubendiamida é a substância ativa dos produtos fitofarmacêuticos Phoenix<sup>®</sup>, produzida pela Nihon Nohyaku (Tóquio, Japão), e Belt<sup>®</sup>, produzido pela Bayer CropScience (Monheim, Alemanha) (Tonishi et al., 2005).

Devido às exigências dos procedimentos de regulamentação, destino e comportamento dos novos pesticidas em diferentes ambientes, qualquer inseticida sempre precisa ser investigado pelos produtores industriais antes de serem introduzidos no mercado. No entanto, estes dados não são publicados para diversos inseticidas. Isto é válido para a flubendiamida, sendo o primeiro exemplo de um inseticida moderno pertencente ao grupo diamida do ácido ftálico (TSUBATA et al., 2007).

O inseticida flubendiamida (Figura 1), 3-iodo-N'-(2-metil-1,1-dimetiletil)-N-{4-[1,2,2,2-tetrafluoro-1-(trifluorometil)etil]fenil} ftalamida, é amplamente utilizado para controlar pragas de lepidópteros em uma variedade de culturas anuais e perenes, incluindo aquelas resistentes aos inseticidas neonicotinóides e piretróides. O pesticida é registrado pela Environmental Protection Agency (EPA) para ser aplicado nas lavouras de milho, algodão, tabaco, nozes, uvas e hortaliças (USEPA 2008).



**Figura 1: Estrutura química do inseticida flubendiamida, constituída de três partes: 1) um grupo heptafluoro-isopropílico na fração de anilida, 2) um grupo sulfonilalquila na fração amida alifática e 3) um átomo de iodo na terceira posição da fração do ácido ftálico (Tonishi et al. 2005).**

A estrutura química da flubendiamida apresenta uma cadeia heptafluoro isopropílica, que confere um caráter lipofílico, condição necessária para uma alta atividade do inseticida. Além disso, sua composição apresenta um substituinte de iodo, que é muito incomum para um composto de proteção das culturas agrícolas.

A respeito das características do pesticida flubendiamida, diversos trabalhos relatam que este inseticida é hidroliticamente estável, e de baixa mobilidade no solo. Este fato é comprovado pelos vários estudos de lixiviação e detecção da flubendiamida em solos, frutas e legumes (BATTU et al., 2008; DAS e MUKHERJEE, 2012). Diante disso, a classificação toxicológica adotada pelos órgãos competentes a definem como classe III (ANVISA, 2015), ou seja, é um produto persistente no meio ambiente, e também é altamente tóxico para os microcrustáceos (APVMA, 2009).

As propriedades da flubendiamida (Tabela 1) são expressas pela ação bioquímica deste composto, que afeta o equilíbrio de íons de cálcio dos insetos, e assim provoca contrações dos músculos esqueléticos dos insetos (MASAKI et al., 2006). A Tabela 1 indica as principais características deste inseticida.



Tabela 1: Principais características da flubendiamida.

Classe	Fórmula empírica	Grupo Químico	Massa Molar (g.mol <sup>-1</sup> )	Solubilidade em Água (mg.L <sup>-1</sup> )	Classificação toxicológica
Inseticida	C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> F <sub>7</sub> IN <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	Diamida do ácido ftálico	682,39	0.029	Classe III (moderadamente tóxico)

Fonte: (ANVISA, 2015).

Em contraste com a maioria dos outros pesticidas comercialmente disponíveis que atuam sobre o sistema nervoso, a flubendiamida funciona a partir de perturbações musculares, agindo sobre os receptores de rianodina (canais intracelulares de Ca<sup>2+</sup>). Este receptor é especializado na liberação rápida e maciça de Ca<sup>2+</sup> a partir de reservas intracelulares, que é um passo essencial na contração muscular, levando à rápida paralização da alimentação, letargia, paralisia parcial, falha do músculo cardíaco e regurgitação (MASAKI et al., 2006). Assim, o pesticida perturba o equilíbrio de cálcio nos músculos dos insetos, agindo nos receptores rianodina, que afetam a contração do músculo (KATO et al., 2009).

Dessa forma, as características deste pesticida enquadram-se como uma excelente ferramenta ao programa de manejo integrado de pragas (MIP) em uma variedade de culturas. No entanto, vários estudos visaram quantificar a flubendiamida em diversas culturas, como o arroz (GOPAL E MISHRA, 2008), tomate (KOONER et al., 2010) e outras frutas e legumes (BATTU et al., 2008), a fim de determinar os níveis de persistência nos alimentos.

Os resultados dos testes de incubações de solo contaminado por flubendiamida em laboratório, sob condições aeróbicas no escuro, mostraram que o inseticida apresentou alta persistência, formando o metabólito NNI-0001-des-iodo. Este produto de degradação atingiu níveis que determinam uma persistência muito alta nas águas subterrâneas. De acordo com a European Food Safety Authority (EFSA, 2013), a mineralização do ácido ftálico e o anel anilina em dióxido de carbono foi relatada com 90 - 91 dias sob degradação aeróbica.

O comportamento da flubendiamida vem sendo alvo de diversos estudos em órgãos governamentais. Segundo a United States Environmental Protection

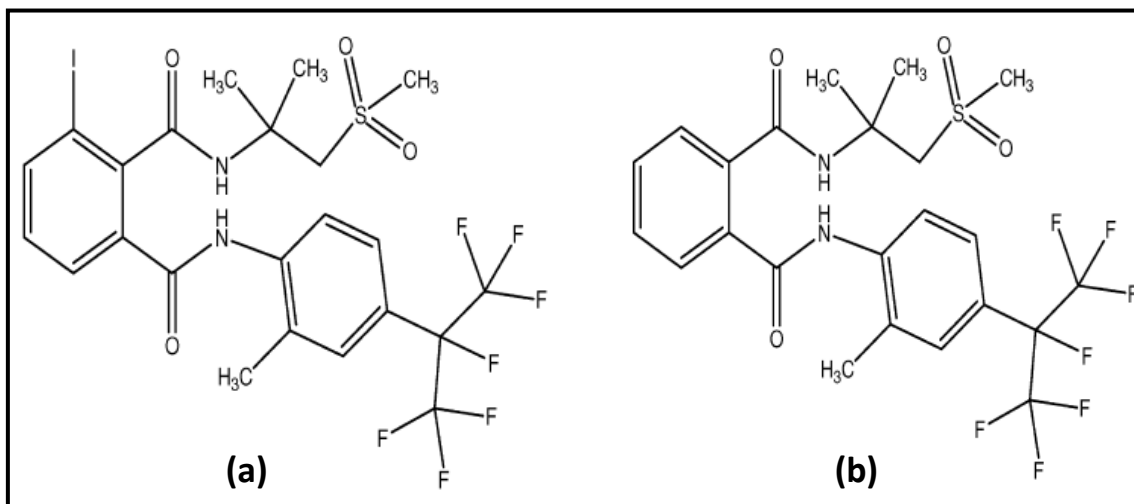
Agency (EPA, 2008), a flubendiamida é estável à hidrólise sob condições de laboratório, e a fotólise direta pode ser a principal rota de degradação. A estimativa da degradação do flubendiamida a seu metabólito desiodo flubendiamida em solo de campo, por fotólise, resultou em um tempo de meia-vida de 11,56 dias. Além disso, a Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA, 2009) relatou que a quebra fotolítica da flubendiamida em um solo de superfície apresentou um tempo de meia vida de 11,4 dias.

Estudos de degradação microbiana de pesticidas em solos com diferentes propriedades físico-químicas são essenciais para avaliação da persistência dos pesticidas. Como exemplo, a degradação da flubendiamida foi estudada por Das e Mukherjee (2012) em dois tipos de solo da Índia, um solo vermelho e outro solo de aluvião, sob condições estéreis e não estéreis. Em solo vermelho sob condições estéreis e não estéreis, verificou-se um tempo de meia vida de 140,3 e 93,7 dias, respectivamente, enquanto no solo de aluvião foi de 181,1 e 158,4 dias, respectivamente.

Embora este estudo não tenha realizado a identificação dos fungos envolvidos, este experimento conduzido em laboratório demonstrou um tempo superior na degradação em comparação aos experimentos *in situ*. A importância e a influência do uso de fungos selecionados podem auxiliar na degradação de inseticidas mais tóxicos, reduzindo seu tempo de meia vida. Diante dos resultados no campo, é preciso aferir quais fungos estão envolvidos nesta degradação química, e se as enzimas, como a lacase, influenciaram no tempo de degradação do inseticida.

Frequentemente os fungos filamentosos isolados de solo são estudados por sua capacidade enzimática, que demonstra interferir diretamente na degradação de compostos xenobióticos. (SOUZA-MOTTA et.al., 2003; RUEGGER E TAUKE-TORNISIELO, 2004). O conhecimento da degradação microbiana da flubendiamida no solo colabora com a correta aplicação do pesticida na lavoura agrícola e para a segurança ambiental.

A detecção e quantificação da flubendiamida pode ser realizada utilizando-se técnicas cromatográficas. Battu et al. (2008), Das e Mukherjee (2012) empregaram um método analítico para a estimativa de resíduos de flubendiamida e de seu metabólito desiodo flubendiamida em vários substratos (repolho, tomate, pimentão, solo). A flubendiamida e seu metabólito apresentaram picos distintos nos tempos de retenção de 10,01 - 11,07 e 7,99 – 8,6 minutos, respectivamente (Figura 2).



**Figura 2: Estrutura: (a) Flubendiamida: (b) Do metabólito des-iodo flubendiamida. Adaptado de BATTU et. al., (2008).**

Vários trabalhos de detecção da flubendiamida em legumes, frutas e solo demonstram a importância de estudos visando elucidar a estrutura dos metabólitos. A técnica para detecção e quantificação de flubendiamida mais utilizada é a espectrometria de massas. Neste aspecto, este trabalho é o primeiro estudo que objetiva determinar a estrutura de possíveis metabólitos da flubendiamida e propor uma rota metabólica.

### 3.1.2 INSETICIDA THIAMETHOXAM

Um outro inseticida conhecido mundialmente é o thiamethoxam (Figura 3), (3-(2-cloro-tiazol-5-ilmetil)-5-metil-[1,3,5] oxadiazinan-4- ilideno-N-nitroamina). Comercialmente vendido pela Syngenta como Actara 250 WG, ele pertence à classe de insecticidas neonicotinóides e tem sido amplamente utilizado devido à sua toxicidade mais baixa e uma elevada atividade contra

pragas e insetos, através de pulverização sobre as folhas, incorporação ao solo através de grânulos ou diluído em água e tratamento de sementes. (SCORZA JÚNIOR e RIGITANO, 2009). Porém, os estudos de Castro (2005) o descrevem como um composto de um alto potencial de lixiviação no solo.

O uso deste inseticida deve ser monitorado e cauteloso. De acordo com Zabar et al. (2012), em abril de 2011 um grande número de colônias de abelhas morreram no setor oriental da Eslovênia, apesar de todas as precauções tomadas para evitar o envenenamento de abelhas. Devido à repetição desses eventos, a Administração Fitossanitária da Eslovênia proibiu totalmente o thiamethoxam, clothianidin e imidacloprid para qualquer tratamento de sementes.

Ao contrário da flubendiamida, este inseticida é altamente solúvel em água, e sua massa molar é inferior também (Tabela 2). Isto possibilita uma infiltração do inseticida no solo pela água, e possivelmente contaminar lençóis freáticos.

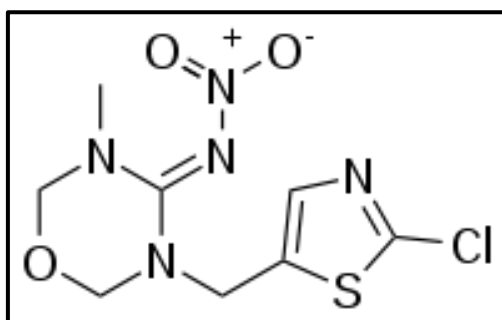


Figura 3: Estrutura do thiamethoxam.

Tabela 2: Principais características do thiamethoxam.

Agrotóxico	Classe	Grupo Químico	Classificação toxicológica	Massa Molar (g.mol <sup>-1</sup> )	Solubilidade em Água (mg.L <sup>-1</sup> )
Thiamethoxam	Inseticida	Neonicotinóides	Classe III (moderadamente tóxico)	291,7 g.mol <sup>-1</sup>	4100

### 3.2 BIOTRANSFORMAÇÃO DE PESTICIDAS POR MICRORGANISMOS

A presença de uma enorme diversidade de comunidades microbianas no ambiente oferece o potencial para uma ampla gama de reações. Desta maneira, a remediação dos resíduos de pesticidas no meio ambiente pode ser conduzida por meio de processos microbianos, químicos e fotoquímicos. A biorremediação está relacionada com a utilização de organismos vivos em tratamento de ambiente contaminado para reduzir a concentração dos poluentes a níveis não detectáveis, não tóxicos ou aceitáveis, isto é, dentro dos limites estabelecidos pelas agências de controle ambiental (LITCHFIELD, 2005). Ela pode ser desenvolvida tanto *ex situ* como *in situ*, e muitas vezes é usada no tratamento de águas subterrâneas, solos e outros ambientes poluídos.

A taxa de degradação dos pesticidas no solo depende da comunidade microbiana presente no solo e das diferentes propriedades físico-químicas como a textura do solo, composição de matéria orgânica, o pH do solo, o modo de ação dos pesticidas químicos, estrutura, etc. Assim, a taxa de degradação varia entre tipos de solos, e pode, portanto, ser resultado das diferentes propriedades físico-químicas do solo, bem como da composição da comunidade microbiana. (WALKER et al. 2001).

Neste contexto, as biotransformações consistem em reações químicas realizadas por um agente biológico em que há conversão de um substrato em um ou mais produtos de catalisadores enzimáticos. De maneira geral, esses processos levam a um menor custo, alta especificidade e maior robustez. (ADELIN et al., 2011). Ou seja, a degradação microbiana é considerada o principal processo de degradação dos pesticidas no solo, representando um método seguro, menos danoso e mais eficaz em termos de custos. (GAVRILESCU, 2005). A utilização de microrganismos como agentes degradadores de corantes, cosméticos, detergentes, remédios e produtos químicos agrícolas é um método eficaz para reduzir o dano ambiental. A compreensão do nível de toxicidade dos pesticidas e a avaliação de seus produtos de degradação também são relevantes aspectos a serem analisados (KANEKAR et al, 2004).

Alguns microrganismos apresentam rápido crescimento e metabolismo apropriado para se desenvolverem em ambientes pobres em nutrientes. Conseqüentemente, a capacidade de biotransformação desses microrganismos abrange uma variedade de compostos químicos, que acabam contribuindo para a biodegradação dos mesmos (Yu et al, 2011). Neste contexto, os fungos se destacam e desempenham um papel importante na biotransformação de xenobióticos. O reino fungi é um dos mais numerosos, com cerca de 1 milhão e quinhentas mil espécies de fungos espalhados pelo mundo. Entretanto, apenas 5% já foram catalogadas, dentre estas já existem muitas espécies de grande importância, as quais destacam na fabricação de alimentos, bebidas, ácidos orgânicos, fármacos e outros. Através da continuidade das pesquisas espera-se descobrir novas espécies com grande potencial e valor biotecnológico (ZANG E DEMIAN, 2005).

Os fungos se reproduzem em ciclos assexuais, sexuais e parassexuais. A reprodução assexuada ocorre através de brotamento, fragmentação e produção de conídios. Os esporos assexuados às vezes são chamados de conídios; mais freqüentemente, contudo, esse termo é reservado para os esporos assexuados que se formam nos terminais ou nos lados das hifas. (PELCZAR, CHANG, KRIEG, 1996).

O aumento no interesse de usar fungos para degradar poluentes orgânicos resultou em diversas estratégias e vias bioquímicas que levam a parcial ou completa remoção das substâncias tóxicas. Por apresentarem um alto potencial biodegradativo, biossortivo e mecanismos de resistência em condições ambientais adversas, a utilização de alguns fungos filamentosos e seus metabólitos nos processos de biodegradação está aumentando (CONCEIÇÃO et al., 2005). Segundo Sankaran *et al.* (2010) o interesse pelo uso de fungos em mecanismos de biorremediação é devido a alta diversidade de espécies, alto potencial enzimático e elevada extensão de hifas.

O emprego de seus metabólitos nos processos de biorremediação se mostrou promissores e eficientes. O estresse ambiental limita o uso de bactérias em tratamentos biológicos. A eficiência das bactérias na degradação de compostos insolúveis em água ou ligados ao solo é baixa. Os fungos, entretanto, são capazes de crescer sob as condições de estresse que limitam o crescimento bacteriano. Eles são adaptáveis a condições adversas e

encontram meios de se desenvolverem mesmo em ambientes inóspitos. Possuem crescimento acelerado, baixo custo de cultivo e, principalmente, apresentam um sistema enzimático capaz de transformar uma grande variedade de compostos químicos não naturais ao sistema biológico (YU et al., 2011).

Algumas espécies de fungos são patogênicas, mas a grande maioria participa de processos biotecnológicos importantes para os seres humanos. O ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* foi selecionado previamente para ser utilizado em processos de biorremediação. Ele cresceu em uma ampla gama de compostos fenólicos e compostos aromáticos e produziu a enzima polifenoloxidase, denominada lacase (DEKKER et al., 2002). Em 2005, Rezende et. al., (2005) avaliou a biodegradação do pesticida Scepter®, cujo princípio ativo é imazaquin, utilizando este ascomiceto. O *Botryosphaeria rhodina* se desenvolveu muito bem na presença deste herbicida, tanto em meio sólido como líquido de cultivo. Através das análises cromatográficas foi constatada uma remoção de 80% do pesticida, demonstrando seu potencial biodegradador de compostos xenobióticos.

Neste contexto de organismos potenciais para biodegradação, os fungos filamentosos do gênero *Trichoderma* têm se destacado nos trabalhos que avaliam a remoção de contaminantes. Eles são resistentes a metais tóxicos e pesticidas, proporcionando maior desenvolvimento em ambientes com altas concentrações desses poluentes (BEHKI et al, 1993). Além disso, participam ativamente do ciclo do carbono e nitrogênio na biosfera, através de sua capacidade de degradação de materiais orgânicos.

Algumas espécies de *Trichoderma* produzem antibióticos, antifúngicos e tem sido muito utilizadas em processos biotecnológicos para produzir enzimas extracelulares. Outras espécies também são degradadoras de matéria orgânica, sobretudo em condições de concentrações limitadas de nutrientes (MONTE, 2001).

O gênero *Trichoderma* tem a capacidade de degradar de forma eficaz uma série de polímeros naturais, principalmente celulose e hemicelulose, que fornecem as bases para o uso comercial do fungo no controle de fitopatógenos. De acordo com os estudos de biotransformação envolvendo fungos, o *Trichoderma asperellum* foi reportado por Su et al. (2011) como um

microrganismo resistente ao arsênio e com potencial biodegradador deste composto.

Esse gênero já demonstrou ser eficiente diante de estudos de biodegradação envolvendo pesticidas. O fungo *T.harzianum* CBMAI 1677 foi capaz de biodegradar pentaclorofenol a  $20 \text{ mg.L}^{-1}$ , além dos principais metabólitos deste composto químico como o pentacloroanisol e 2,3,4,6-tetracloroanisol (VACONDIO et al., 2015).

Assim, de acordo com diversos estudos sobre biodegradação descritos na literatura científica, nos quais fungos tem sido utilizados, observa-se que esta tecnologia constitui uma alternativa ecologicamente mais segura e eficiente para reduzir a poluição por contaminantes orgânicos. Nas últimas décadas tem sido relatado que os fungos filamentos possuem atributos que os distinguem das outras formas microbianas nos processos de degradação, como o crescimento micelial, o qual confere uma vantagem sobre as células unicelulares, bactérias e leveduras, especialmente no que concerne à colonização de substratos insolúveis. (WARD et al., 2003).

### 3.2.1 Lacases: descrição, mecanismo de ação e aplicações.

Os fungos são microrganismos interessantes no estudo dos processos metabólicos, visto que são de fácil manejo, apresentam crescimento rápido e utilizam meios bem caracterizados quimicamente. Podem produzir enzimas como lípases, invertases, proteinases, amilases etc., que hidrolisam lipídeos, sacarose, proteínas, amido, etc, respectivamente, convertendo estes substratos em moléculas menores, tornando-os mais assimiláveis através de mecanismos de transporte ativo e passivo. As lacases são polifenol oxidases multi-cúpricas que podem contribuir na degradação de compostos fenólicos e não fenólicos. Muitas espécies fúngicas podem se desenvolver em meios mínimos, contendo amônia ou nitritos, como fontes de nitrogênio. As substâncias orgânicas, de preferência, são carboidratos simples como D-glicose e sais minerais como sulfatos e fosfatos. Outros elementos como ferro, zinco, manganês, cobre, molibdênio e cálcio são exigidos em pequenas quantidades. (GOMPERTZ et al., 2004)



A metabolização dos poluentes orgânicos por microrganismos é influenciada pela especificidade das enzimas que catabolizam a degradação dos compostos naturais e pela estrutura química desses pesticidas, que influenciam as taxas e a extensão da biodegradação (PEREIRA e FREITAS, 2012). Segundo Seo et. al. (2009), os fatores ambientais mais significativos são a umidade, temperatura e matéria orgânica. Além desses, TONINI et. al. (2010) também citam o oxigênio dissolvido, pH, nutrientes, e a presença de co-metabólitos como fatores que interferem diretamente na biodegradação microbiana de poluentes.

As enzimas são consideradas um dos mais importantes produtos biotecnológicos. Elas podem ser utilizadas de diversas maneiras e o seu mercado está cada vez mais promissor. A lacase se tornou foco de muitas pesquisas nos últimos anos devido, principalmente, à sua elevada capacidade de decompor compostos fenólicos altamente recalcitrantes. Desta forma, o conhecimento e a compreensão sobre as enzimas envolvidas na biodegradação de xenobióticos constitui uma etapa muito importante.

Conseqüentemente, estudos sobre a produção de enzimas por fungos filamentosos são importantes para futuras aplicações em processos de biorremediação de ambientes contaminados. Tradicionalmente, estes estudos têm investigado métodos de cultivo e enriquecimento com o próprio pesticida, embora os organismos selecionados para uso nestes processos podem não refletir nos organismos que atuam *in situ* (NEWBY et. al., 2000).

As lacases (EC 1.10.3.2: benzenodiol: oxigênio oxidoreductase) são polifenol-oxidases encontradas em algumas bactérias, fungos, plantas e também em alguns insetos. As mais estudadas tem sido isoladas de fungos. O primeiro registro com identificação foi realizado na árvore *Toxicodendron vermiciflua*. Posteriormente, outros organismos também foram reportados com a presença desta enzima, tais como insetos e fungos, em especial os basidiomicetos ligninolíticos (MIKOLASCH e SCHAUER, 2009).

As lacases são também denominadas enzimas azuis devido possuírem átomos de cobre em sua estrutura química. Geralmente elas possuem três átomos de cobre em seu centro catalítico, sendo também conhecidas como enzimas multicúpricas. Segundo Morozova et al. (2007), estas enzimas possuem massa molar entre 50 a 130 kDa, sendo que a fração de carboidratos

em lacases fúngicas é constituída principalmente de N-acetilglicosamina, manose e galactose (10-20 %).

As isoformas de lacase podem variar, com diferentes massas molares. Este fato pode estar associado, segundo Pezzela et al., (2009), essencialmente, à presença de algum indutor no meio de cultivo, como íons de cobre. Além disso, as condições de cultivo e o estado fisiológico do microrganismo são fatores que podem também influenciar.

A enzima pode catalisar a oxidação de uma grande variedade de estruturas aromáticas (DEKKER, BARBOSA E SARGENT, 2002), especialmente estruturas fenólicas, como mono, di, polifenóis e metoxi-fenóis. O mecanismo de oxidação do substrato é via retirada de um elétron com a formação inicial de fenoxi-radical e cátion radical. O ciclo catalítico desta enzima envolve sucessivas transferências de um elétron entre os átomos de cobre, na qual a oxidase catalisa as reações de oxidação, na ausência de  $H_2O_2$  utilizando oxigênio ( $O_2$ ) como oxidante, que é reduzido a  $H_2O$  num processo de oxidação. Além disso, catalisam diversas reações, como a clivagem da ligação alquil-fenol, de ligações  $C\alpha-C\beta$  e de dímeros fenólicos de lignina, desmetoxilação, desmetilação, polimerização e despolimerização.

Essas enzimas são importantes porque oxidam tanto os compostos tóxicos e substratos não tóxicos. Possuem amplas aplicações tais como na indústria têxtil, de alimentos, indústria de transformação de madeira, farmacêutica e química. Esta enzima é ecologicamente sustentável e um catalisador eficiente. Além disso, desempenham um papel importante na biorremediação do solo e na biodegradação de poluentes ambientais, como compostos fenólicos (BRIJWANI et al., 2010).

Do ponto de vista fisiológico, as lacases fúngicas estão envolvidas em processos de morfogênese, degradação de lignina, patogênese, destoxificação e formação de pigmentos (MOROZOVA *et al.*, 2007). Na degradação de lignina, as lacases atuam em sinergia com outras enzimas, ou na remoção de compostos tóxicos formados durante o processo de degradação mediado por outras enzimas (BALDRIAN, 2006).

Lacases fúngicas podem ser utilizadas nos mais diversos processos de tratamento. Além disso, as lacases utilizam o oxigênio molecular como acceptor final de elétrons, reduzindo o custo de sua aplicação quando comparada às

outras enzimas utilizadas em tratamento de efluentes, como as peroxidases que necessitam da adição de peróxido de hidrogênio (ARORA e SHARMA, 2009).

Vários são os substratos utilizados para a determinação da atividade de lacase. Existem alguns sintéticos como o ABTS (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)) e a siringaldazina (4-Hidroxi-3,5-Dimetoxibenzaldeidazina); enquanto outros são naturais como os oxidantes de difenóis, monofenóis como o 2,6-dimetoxifenol (1,3-dimetoxi-2-hidroxibenzeno) e o guaiacol (2-metoxifenol), sobre os quais a lacase também apresenta um bom poder de oxidação (ARORA e SHARMA, 2009).

A adição de compostos indutores de lacase ao meio de cultivo pode influenciar a produção de lacase, pois afetam a síntese destas enzimas pelo fungo. Compostos aromáticos como 2,5-xilidina, álcool veratrílico são conhecidos como indutores de lacase. O álcool veratrílico (álcool 3,4-dimetoxibenzílico) é também um indutor de lacase para o fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina*, tendo aumentado 42 vezes os títulos de produção de lacase (VASCONCELOS et. al., 2000).

Vários corantes têxteis, xenobióticos, e agroquímicos foram também avaliados como indutores de lacase em  $\gamma$ -Proteobacterium JB. Os corantes "Neutral Red", "Indigo Carmine", "Naphthol Base Borears" e "Sulphast Ruby" aumentaram a atividade em 3,7, 2,7, 2,6 e 2,3 vezes, respectivamente. Xenobióticos como *p*-toluidina, 8-hidroxiquinolina e antrazina também aumentaram em 3,4, 2,8 e 2,3 vezes, respectivamente. Os pesticidas Atrazina e "tricyclozole" levaram a um acréscimo na atividade de 1,95 e 1,5 vezes, respectivamente. (SINGH et al., 2009).

Não há estudos descritos que tenham investigado o inseticida flubendiamida como indutor de lacase tanto em bactérias como em fungos, até o presente.

### 3.2.2 *Botryosphaeria rhodina* como produtor de lacase

Entre os ascomicetos do grupo Botryosphaeriaceae, a espécie *Botryosphaeria rhodina* tem sido descrita como produtora de lacases ligninolíticas. Esta espécie fúngica demonstrou-se capaz de crescer em uma

vasta gama de compostos fenólicos e aromáticos.(DEKKER E BARBOSA, 2001).

O potencial biodegradador de compostos xenobióticos pelo *Botryosphaeria rhodina* foi relacionado com a atividade enzimática de lacase. Por exemplo, nos estudos de Rezende et al.,(2005), este fungo demonstrou potencial degradação do herbicida Scepter, e sua atividade enzimática foi quantificada em concentrações de até 25% do pesticida.

Os estudos de Vasconcelos et. al. (2000) mostraram que alguns compostos podem induzir ao aumento da atividade lacase deste fungo. O veratrílico, introduzido no cultivo pelos autores, elevou a produção de lacase em comparação ao cultivo ausente do álcool ( $0,13 \text{ U.mL}^{-1}$  -  $5,40 \text{ U. mL}^{-1}$ ).

### 3.3 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Espectrometria de massas é uma técnica analítica que permite a identificação da composição química de um determinado composto isolado, ou de diferentes compostos em misturas complexas, através da determinação de suas massas moleculares na forma iônica, (ou seja, com carga elétrica líquida, positiva ou negativa), baseada na sua movimentação através de um campo elétrico ou magnético. Esta movimentação é determinada pela razão entre a massa de um determinado composto (analito) e sua carga líquida, designada por  $m/z$  (mass to charge ratio). Desta forma, conhecendo-se o valor de  $m/z$  de uma molécula, e de seus respectivos fragmentos, é possível inferir sua composição química elementar e, com isso, determinar sua estrutura (Van BRAMER, 1998).

A espectrometria de massas pode ser utilizada em análises quantitativas. Entretanto seu destaque está em análises qualitativas, como a identificação de compostos em misturas e caracterização estrutural de compostos desconhecidos.

A espectrometria de massas também é utilizada na determinação de razões isotópicas. Por exemplo, a análise de uma amostra de NaCl. Em solução os íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{Cl}^-$  estarão dissociados, e quando analisados em modo de detecção de íons positivos, será obtido apenas um íon de  $m/z$  23 referente ao  $\text{Na}^+$ . Entretanto, quando analisamos esta mesma solução em modo de

detecção de íons negativos veremos o aparecimento de dois íons, um de  $m/z$  35 sendo este o íon base (aquele aparece representando 100%) e outro de  $m/z$  37, que deverá representar cerca de 1/3 do íon base. Estes resultados devem-se à relação isotópica apresentada pelos íons analisados. (BUDZIKIEWICZ E GRIGSBY, 2006). Moléculas orgânicas são formadas por átomos de carbono e hidrogênio, e ambos contêm dois isótopos principais, no caso do carbono temos o isótopo leve  $^{12}\text{C}$  (~99%) e o pesado  $^{13}\text{C}$  (~1%) (BUDZIKIEWICZ E GRIGSBY, 2006).

### 3.3.1 Instrumentação e fontes de ionização

Um espectrômetro de massas é composto por 3 módulos principais: fonte de íons, analisadores de massas e os detectors.

A ionização é o processo físico/químico de conversão de um átomo ou molécula em um íon, adicionando ou removendo partículas carregadas como elétrons ou outros íons. Este processo ocorre de forma distinta caso o íon produzido seja positivo ou negativo. Um íon de carga positiva é produzido quando um elétron ligado a um átomo (ou molécula) absorve energia suficiente para escapar da barreira elétrica que o limitava, desfazendo assim seu vínculo com o núcleo, e expelido para fora da eletrosfera. A quantidade de energia necessária é chamada de potencial de ionização. Um íon negativamente carregado é produzido quando um elétron livre choca com um átomo e é então capturado, ficando no interior da barreira do potencial elétrico (DASS, 2007).

O surgimento de novas técnicas de ionização, como a ionização por Electrospray (ESI) expandiu a gama de moléculas que podem ser analisadas por espectrometria de massas, incluindo moléculas de alta polaridade, elevada massa molecular e grande complexidade estrutural. Esse tipo de ionização permite a transferência de espécies da solução para a fase gasosa de forma suave, permitindo inclusive que espécies fracamente ligadas permaneçam intactas (HOFFMAN E STROOBANT, 2007).

ESI-MS tornou-se uma das técnicas analíticas mais poderosas e amplamente utilizadas. Vantagens como alta sensibilidade e seletividade, consumo reduzido de amostra e facilidade de uso priorizam a escolha dela. Dentre as substâncias analisadas, incluem-se proteínas, ácidos nucleicos, e

até mesmo complexos metálicos, desde que sejam iônicos ou apresentem sítios ácidos ou básicos (HECK, 2004).

Segundo Hoffman e Stroobant (2007), três benefícios fazem com que ESI seja considerada uma técnica distinta das outras técnicas de ionização. A primeira é a capacidade para produzir íons multiplamente carregados, reduzindo assim a razão  $m/z$ , permitindo analisar compostos de elevada massa molecular. A segunda é que as amostras devem ser introduzidas em solução, o que faz com que seja possível o acoplamento com muitas técnicas de separação. O terceiro é a técnica de ionização suave, provocando pouca (ou nenhuma) fragmentação dos analitos.

### 3.3.2 Analisadores de massas e detectores

A fonte de ionização é a parte do espectrômetro de massas que produz os íons a partir dos analitos, e realiza sua transferência para a fase gasosa. Estes íons vão para o interior do espectrômetro, sob um ambiente de vácuo, até o detector. Segundo Heck (2004), os analisadores são diferenciados pelo seu princípio de medição da razão  $m/z$  dos íons, que são:

- ✓ dispersão dos íons com base no seu tempo e energia cinética
- ✓ separação em tempo, com base na velocidade dos íons (TOF)
- ✓ transmissão de íons através de um campo eletrodinâmico (quadrupolo)
- ✓ movimento periódico em um campo magnético, ou eletrodinâmico (íon trap)

Os detectores compreendem a porção final dos espectrômetros de massas, sua função é detectar os íons que chegam até eles e amplificar o sinal. Uma vez que os íons são separados por um analisador de massa, eles atingem o detector de íons, o qual gera uma corrente de sinal para os íons incidentes. Os detectores funcionam pela conversão dos feixes de íons em sinais elétricos, que podem ser armazenados e traduzidos em imagens (Van Bramer, 1998).

### 3.3.3 Espectrometria de massas do tipo Tandem-MS

Tandem-MS pode ser entendido como espectrometria de massas de modo seqüencial, ou seja, uma seqüência de análise que envolve pelos menos alguns estágios. Em geral, se induz a colisão de determinados íons com um gás (em geral He), em seguida analisa-se o espectro de massas dos fragmentos formados. A fragmentação é induzida através de um processo denominado “dissociação induzida por colisão” [*collision-induced dissociation* (CID)], na qual um íon é introduzido em uma célula de colisão. O íon selecionado colide com um gás (He \*u Ar), o que resulta em fragmentação. Os fragmentos gerados são separados em um setor de análise, gerando um “espectro de fragmento”. Assim, pode-se gerar um espectro de fragmento de fragmento de fragmento (MS/MS/MS), quantas vezes se quiser (MS<sub>n</sub>). Esta técnica é utilizada para se estudar a fragmentação de moléculas grandes (DASS, 2007).

Para realização de análises do tipo tandem-MS, também chamadas de MS/MS, é necessário equipamentos apropriados que permitam a seleção específica de cada íon desejado. As configurações mais comuns são os triploquadropólos (Q-Q-Q), quadropólo-TOF, TOF/TOF, que são equipamentos que apresentam três componentes em seqüência, sendo dois analisadores separados por uma câmara de fragmentação. Nestes casos o íon precursor é selecionado no primeiro analisador (chamado de MS<sub>1</sub>) e então somente ele passa pelo segundo quadropólo, que é uma câmara adaptada para realizar a fragmentação do íon precursor, chamado de câmara de colisão. Neste caso, o modo mais comum de se obter fragmentos é através da dissociação induzida por colisão (CID – *collision induced dissociation*). (DASS, 2007).

Os fragmentos formados são analisados pelo terceiro quadropólo (segundo analisador - MS<sub>2</sub>) antes de chegar até o detector (HOFFMANN e STROOBANT, 2007; DASS, 2007). Estes espectrômetros são capazes realizar apenas um ciclo de fragmentação, devido à sua arquitetura. Existem outras plataformas que permitem vários ciclos de fragmentação, permitindo realização de MS<sup>n</sup>, no qual n representa “infinitos” ciclos de fragmentação. Estes espectrômetros são construídos com a tecnologia dos traps, os quais são capazes de aprisionar seletivamente os íons por vários ciclos (MARCH, 2005).

### 3.4 CROMATOGRAMA DE ÍON TOTAIS (TIC) E CROMATOGRAMA DE ÍONS SELECIONADOS (SIC)

O cromatograma contendo todos os íons produzidos pelo espectrômetro de massas é denominado "cromatograma de íons totais" ("*total ion chromatogram*") – TIC. Ou seja, é representado pelo somatório (total) da intensidade de sinais de íons em cada um dos espectros de massas de uma série adquirida em função do tempo de retenção cromatográfico.

Em complemento a ele, o cromatograma constituído apenas pelos íons de interesse pode ser obtido pelo "cromatograma de íons selecionados" – SIC. Através da escolha dos íons de interesse, esse cromatograma ajusta o detector de massas para que sejam observados apenas os íons de razão  $m/z$  de interesse ou selecionando-os a partir de um banco de dados que contenha os espectros de massas completos (NETO E NUNES, 2003). A Figura 4 mostra primeiramente o TIC, e logo abaixo o cromatograma de cada íon específico.

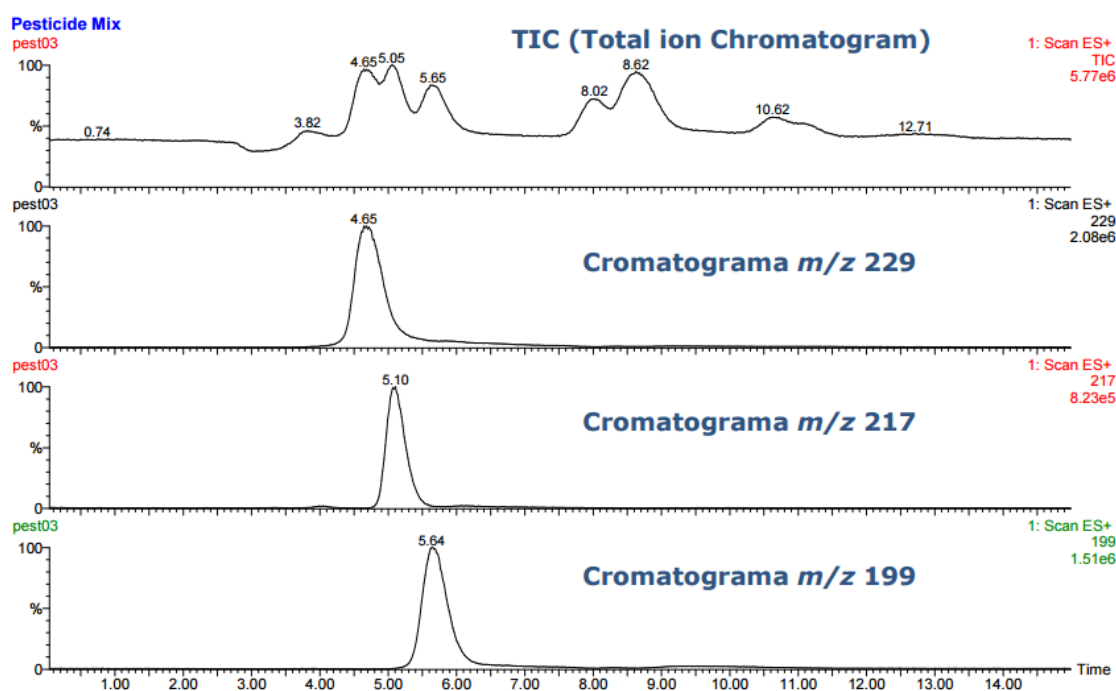


Figura 4: Cromatograma de íons totais (TIC) e de íons selecionados (SIC).



## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 INSETICIDAS E PRODUTOS QUÍMICOS

O padrão analítico do inseticida flubendiamida (98,5%) e sua formulação comercial (Belt<sup>®</sup>), utilizados no presente trabalho, continham 48 % do princípio ativo; ambos foram cedidos pela empresa Bayer S.A<sup>®</sup>. Um outro padrão analítico da flubendiamida (PESTANAL, HPLC 98,6 %) foi adquirido da “Fluka Analytical”. O padrão analítico do inseticida thiamethoxam (99%) foi cedido pela Sigma-Aldrich<sup>®</sup>, e o seu correspondente produto comercial, denominado Actara<sup>®</sup>, foi obtido da Syngenta<sup>®</sup>. Este produto apresentava 25 % de thiamethoxam em sua composição.

Acetato de etila e dimetilformamida (DMF) foram adquiridos da Anidrol Química (São Paulo, Brasil), enquanto que o substrato 2,2'-azino-bis(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) foi adquirido da Sigma Aldrich<sup>®</sup>.

O meio de cultivo sólido foi preparado com Ágar Bacteriológico da Himedia e a D-glicose Anidra foi da Synth. Para o preparo do meio de cultivo líquido, utilizou-se o meio de Vogel (Vogel, 1956).

### 4.2 ISOLAMENTO DE FUNGOS FILAMENTOSOS

#### 4.2.1 Coleta do solo

Os fungos foram isolados de solo de uma área agrícola, na qual foi cultivada previamente de soja, na Fazenda São Manoel, cuja área totaliza 840 m<sup>2</sup>. Esta fazenda está situada no município de Londrina e fica ao lado da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) tendo as seguintes coordenadas geográficas 23°18'25”S, 51°06'34”O. A área cultivada com soja nesta fazenda foi dividida em três partes distintas para comparar o tratamento com os respectivos inseticidas:

1<sup>a</sup>- Área com aplicação do inseticida Platinum<sup>®</sup>neo - produto comercial com princípio ativo thiamethoxam (SOLTH) ;

2<sup>a</sup>- Área com aplicação do inseticida Prêmio<sup>®</sup> - produto comercial com princípio ativo clorantraniliprole (SOLCL);

3<sup>a</sup>- Área sem aplicação de inseticida (SOL).

As coletas de solo foram realizadas uma vez por semana, em março de 2014 até maio de 2014, no período matutino. Em cada parte da área agrícola, foram coletadas 10 amostras de 100 gramas por semana, de forma aleatória, na profundidade 0 - 15 cm conforme descrito por Kulshrestha e Kumari (2011).

As características físicas e químicas do solo foram realizadas no Instituto Agrônomo do Paraná (IAPAR): textura do solo, pH, teores de carbono, e concentrações de alumínio, fósforo, nitrogênio, potássio e magnésio.

#### 4.2.2 Isolamento de microrganismos

Os fungos foram isolados dos solos coletados nas três áreas descritas no item 4.2.1. Utilizou-se o método da diluição seriada descrito por Colla e colaboradores (2008): 10 gramas do solo de cada área foram transferidos para frascos de Erlenmeyers de 500 mL contendo 90 mL de água destilada esterilizada, os quais foram mantidos a 150 rpm por 15 minutos, em mesa agitadora orbital Quimis<sup>®</sup>.

Em seguida, as amostras foram diluídas na ordem de  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  e  $10^{-4}$ . Alíquotas de 0,1 mL destas respectivas diluições foram transferidas para placas de Petri, que continham 20 mL de meio de BDA (batata-dextrose-agar). Este meio foi preparado no laboratório, com extrato de batata ( $200,0 \text{ g.L}^{-1}$ ), D-glicose anidra Synth<sup>®</sup> ( $20 \text{ g.L}^{-1}$ ) e ágar bacteriológico Himedia<sup>®</sup> ( $15 \text{ g.L}^{-1}$ ). Depois de todos os constituintes terem sido misturados, aquecidos e esterilizados, o meio de cultura foi vertido em placas de Petri com 9 cm de diâmetro, assepticamente, no interior de uma câmara de fluxo laminar Pachane<sup>®</sup>.

As placas foram armazenadas em uma estufa incubadora (Tecnal<sup>®</sup> BOD Demanda Bioquímica de Oxigênio), à temperatura de 25 °C por 7 dias, e os fungos obtidos foram repicados sucessivamente em novas placas de Petri, até obtenção de colônia pura, segundo descrito por COLLA e colaboradores (2008).

#### 4.2.3 Conservação dos isolados fúngicos

Após a obtenção das colônias puras no meio de cultivo BDA, os isolados estudados foram armazenados e conservados em tubos de ensaio contendo meio de BDA inclinado, em placas de Petri e também no meio de Castelanni (RODRIGUES et al., 1992). Os isolados foram depositados na micoteca do grupo QuiMiBio, na UTFPR-LD.

As colônias dos diferentes isolados de fungos foram submetidas à análise das características micro e macroscópicas, para a identificação preliminar dos gêneros dos fungos. Dessa maneira, os isolados foram identificados e diferenciados através de suas respectivas morfologia e pelas suas características específicas do aspecto da cultura indicadas em suas colônias. A caracterização macroscópica foi baseada nos estudos de Klich (2002): taxa de crescimento, aspecto, cor, consistência, contorno, borda, topografia da superfície e do reverso, e o tamanho. As análises microscópicas foram aplicadas para a identificação quanto ao gênero pelas características das colônias, a partir da preparação de microcultivos em lâminas, e com o uso de azul de lactofenol para observação ao microscópio das estruturas e arranjos característicos apresentados pelo micélio reprodutivo dos fungos.

#### 4.3 TESTE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO FÚNGICO EM MEIO SÓLIDO NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS INSETICIDAS

O teste de inibição de crescimento dos fungos foi realizado com o objetivo de determinar e selecionar os microrganismos capazes de se desenvolverem em concentrações variadas de inseticida. Neste experimento, doze fungos da micoteca foram cultivados em placas de Petri contendo meio sólido Batata-Dextrose-Ágar, onde foram aplicadas crescentes concentrações dos inseticidas comerciais Belt (48% flubendiamida) e Actara (25% thiamethoxam) no meio. A avaliação do crescimento foi aferida pelo tamanho do diâmetro dos fungos, após o tempo de incubação em BOD. Os cultivos foram realizados em três replicatas para cada concentração.

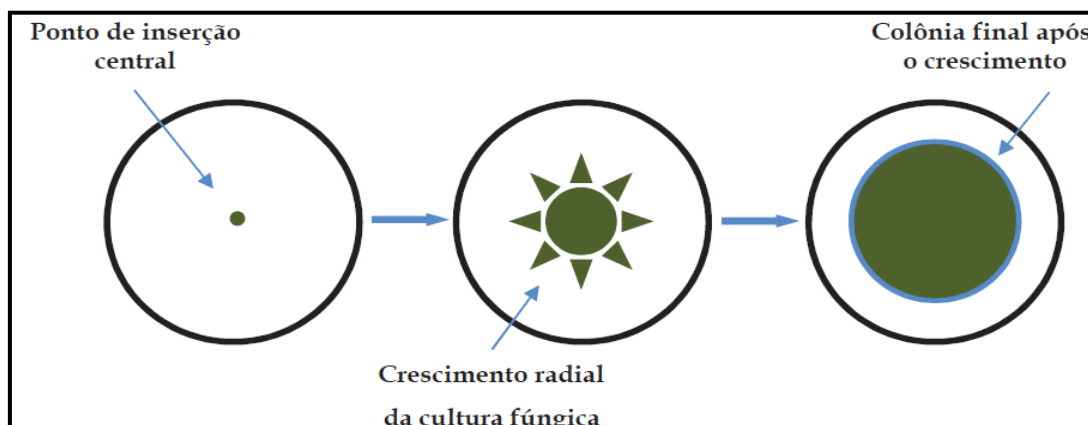
As concentrações dos inseticidas Actara e Belt estão na Tabela 3.

**Tabela 3: Concentrações utilizadas no teste, para os inseticidas Actara® e Belt®.**

Inseticida	Concentração (g/L)			
Actara®	3,00	7,00	21,00	35,00
Belt®	1,22	4,88	19,52	39,04

A escolha dessas concentrações foi baseada no teste de inibição de crescimento utilizando o fungo *Botryosphaeria rhodina* como referência. Este fungo foi utilizado por apresentar um alto e rápido crescimento em meio sólido, sob concentrações baixas e altas de inseticida.

O experimento se iniciou com a aplicação de inseticida na placa com meio de cultivo ainda líquida. Após a solidificação, um disco de ágar de 1 cm de diâmetro colonizada por hifas de um dos isolados fúngicos foi transferida para o centro da placa de Petri (Figura 5). As placas foram incubadas durante 7 dias a 28°C em BOD.



**Figura 5: Etapa da inoculação do micélio fúngico ao centro da placa de Petri, para avaliação do crescimento dos microrganismos em meio com/sem inseticida. (BIROLLI, 2014).**

A inibição de crescimento foi estimada determinando-se o diâmetro da colônia fúngica crescida nas placas (centímetros por dia), em comparação com as culturas controle (BIROLLI et. al., 2014), sem a presença do inseticida. A Equação 1 mostra como inibição do crescimento dos microrganismos, influenciada pelos pesticidas, foi calculada.

**Inibição de crescimento:**  $I = (C_b - C_i) / C_b * 100\%$  (Equação 1)

$I$  = taxa de inibição de crescimento (%);

$C_b$  = a média do crescimento (diâmetro) no meio controle (sem inseticida), em cm;

$C_i$  = a média do crescimento no meio com pesticida, em cm.

A escolha dos isolados fúngicos que participaram do teste foi baseada nas características macroscópicas dos isolados (taxa de crescimento, cor, consistência, tamanho), histórico de produção de lacase, e revisões de literatura envolvendo estudos de biodegradação de xenobióticos. Dos 12 isolados testados, a cepa JUANT070 e JUANT001 foram isoladas de inseto, cedido pela micoteca do grupo QuiMiBio. O fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 foi cedido pela Dra. Aneli de Melo Barbosa Dekker, co-orientadora deste trabalho.

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental do teste de inibição de crescimento em meio sólido foi inteiramente casualizado, no esquema fatorial 13x4 (isolados fúngicos x concentração dos pesticidas), com três repetições. Os resultados foram avaliados através de Análise de Variância (ANOVA) e as médias comparadas através do teste de Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade.

#### 4.5 EXPERIMENTO DE BIOTRANSFORMAÇÃO

##### 4.4.1 Cultivo dos isolados JUANT070, JUSOLCL39 e do fungo *B. rhodina* MAMB-05 em meio líquido

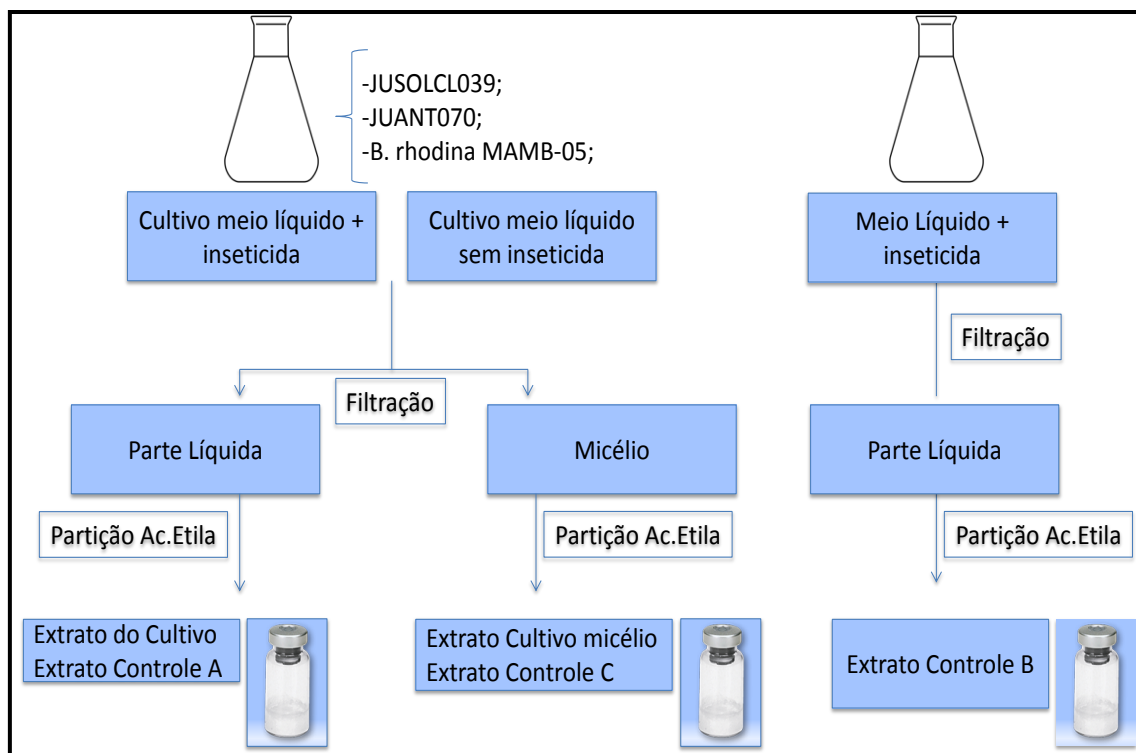
O teste de crescimento microbiano do item 4.3 permitiu selecionar os fungos para o experimento de biotransformação, em meio líquido. Foram preparados 50 mL de meio mínimo de Vogel (VOGEL, 1956) em frascos de Erlenmeyers de 125 mL, com glucose (1% massa/volume) como fonte de carbono (REZENDE et. al., 2005).

A inoculação em meio líquido foi realizada no fluxo laminar Pachane<sup>®</sup>, em condições estéreis. Os fungos foram previamente cultivados durante 7 dias na câmara de germinação TECNAL<sup>®</sup> TE-4020 LED, e posteriormente foram retiradas seis discos de 1 cm de diâmetro de cada placa e transferidos para o meio líquido. Ao isolado com elevada esporulação, a inoculação foi realizada a partir de uma suspensão de  $4 \times 10^{-4}$  U.mL<sup>-1</sup> esporos com Tween80<sup>®</sup> 0,1% (adaptado de SILVA, ROSA e MELO, 1999) na qual foram adicionados  $10^{-4}$  conídios no meio líquido (SU et. al., 2011).

Os cultivos permaneceram em agitação no shaker TECNAL TE-4200<sup>®</sup> por 48 horas, a 180 rpm e 28 °C para o crescimento prévio dos microrganismos. Após esse período, o meio foi suplementado com 5,0 mg de flubendiamida diluído em Dimetilformamida (concentração final 100 mg.L<sup>-1</sup>) (Gandomkar e Habibi, 2014) e incubados em shaker novamente, sob as mesmas condições. Mantidos em triplicata, os cultivos foram interrompidos e com 5, 10 e 20 dias (adaptado PERLATTI et. al., 2013).

#### 4.4.2 Extração da flubendiamida e de seus metabólitos e detecção por HPLC e LC-MS/MS

As amostras foram filtradas em papel de filtro e funil de Büchner acoplado em um Kitassato de 500 mL e bomba à vácuo TECNAL<sup>®</sup> TE-058 para separação do micélio e do meio líquido de cultivo (sob banho de gelo). O fluxograma da Figura 6 demonstra a etapa de extração e a codificação dos extratos.



**Figura 6: Etapa de extração, resultando nos extratos codificados: Após a extração. O Extrato Cultivo corresponde ao extrato do meio de cultura, fungo e inseticida; O Extrato Controle A corresponde ao extrato do meio de cultivo com fungo; O Extrato de Controle B equivale ao extrato do meio de cultivo e inseticida; O Extrato Cultivo micélio é referente ao extrato do micélio com inseticida; E o Extrato Controle C denota o extrato do micélio sem inseticida.**

Posteriormente, as amostras foram ressuspensas em acetonitrila, para as análises cromatográficas. Os extratos obtidos a partir dos cultivos dos fungos *B. rhodina* MAMB-05, JUANT070 e JUSOLCL039 foram analisados no laboratório da UEL-LAPA, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – HPLC SHIMADZU, com detector UV.

Os extratos foram dissolvidos em 2 mL de acetonitrila (grau HPLC) e levados ao banho de água ultrassônica TECNAL<sup>®</sup>. Em seguida, foram filtrados em filtros de seringa CHROMAFIL<sup>®</sup> com porosidade 0,20 µm e armazenados em vials de 2 mL para injeção no cromatógrafo. O material foi eluído com uma mistura isocrática, que representou a fase móvel na proporção 60:40 (Acetonitrila:água Milli-Q).

A coluna acoplada ao HPLC foi uma C18 Phenomenex de fase reversa. O volume de injeção da amostra foi de 20 µL, com fluxo da fase móvel de 1 mL.min<sup>-1</sup> e temperatura do forno 25 °C (BATTU et. al., 2008). O tempo de análise de cada extrato foi de 35 minutos.

A absorção no ultravioleta foi avaliada no comprimento de onda 210 nm para o padrão analítico e também para os extratos do cultivo líquido.

#### 4.4.3 Análise da flubendiamida e metabólitos por LC-MS/MS

Após a análise preliminar utilizando HPLC, a parceria com o prof. Edson Rodrigues Filho permitiu que os extratos fossem analisados no laboratório da USP de São Carlos, pelo espectrômetro de massas de alta resolução LTQ Orbitrap Velos equipado com interface de ionização por electrospray (ESI).

Os extratos foram dissolvidos em 2 mL de acetonitrila (grau LC-MS) e conduzidos ao banho de água ultrassônica TECNAL<sup>®</sup>. Em seguida, foram filtrados em filtros de seringa CHROMAFIL<sup>®</sup> com porosidade 0,20 µm e armazenados em vials de 2 mL para injeção no equipamento.

O analisador de massas de alta resolução LTQ Orbitrap Velos foi equipado com interface de ionização por electrospray (ESI). As condições do equipamento foram descritas conforme a Tabela 4.

**Tabela 4: Condições do LC-MS utilizadas para analisar as amostras.**

<b>EQUIPAMENTO</b>	<b>CONDIÇÕES</b>
<b>LC</b>	
Solvente	Acetonitrila
Coluna	C18
Temperatura	25°C
Volume de injeção	1 µL
Tempo de análise	15 min
<b>Espectrômetro de Massas</b>	
Temperatura do gás	300 °C
Intervalo de massa	200-2000
Energia de colisão	10 - 30%
ESI modo	negativo



#### 4.6 AVALIAÇÃO DA MODIFICAÇÃO QUÍMICA DO INSETICIDA FLUBENDIAMIDA *IN VITRO*, PELA LACASE DE *B. RHODINA* PRODUZIDA EM ALCOOL VERATRÍLICO, POR LC-MS

##### 4.6.1 Produção de lacase utilizando-se álcool veratrílico (AV) como agente indutor.

Os cultivos foram desenvolvidos no meio mínimo de Vogel, em 4 frascos de 2L, contendo 360 mL do referido meio de cultivo e glucose 1 % (m/v), como fonte única de carbono, em cada frasco. Uma solução de álcool veratrílico, estéril, foi adicionada ao meio de Vogel, para conferir uma concentração final de 30,4 mM, conforme descrito por Vasconcelos e colaboradores (2000), completando o volume de meio de cultivo para 400 mL. Sessenta e quatro (64) esferas de meio sólido de Vogel, previamente colonizado pelo *B. rhodina* MAMB-05, foram utilizados como inóculo em cada frasco. Os cultivos foram mantidos por 4,5 dias sob agitação a 180 rpm a 28°C. Em seguida os cultivos foram interrompidos por filtração em papel Whatmann N° 1, e os filtrados foram coletados em banho de gelo, acondicionados em sacos de papel celofane, dialisados contra água destilada em câmara fria, a 4 °C com várias trocas sucessivas de água, durante 48 horas. A solução de lacase foi congelada em diferentes recipientes de plástico, e então liofilizada. Uma solução de lacase a 1 % (m/v) foi preparada para avaliar se esta enzima poderia promover modificação química do inseticida flubendiamida *in vitro*.

##### 4.6.2 Análise da modificação química da flubendiamida por LC-MS

Uma solução da enzima lacase (1%) foi inoculada em frascos de Erlenmeyers de 25 mL, contendo:

- (a) 0.2 mL de enzima lacase;
- 2.0 mL de tampão pH 6.5;
- 1.0 mL de flubendiamida (concentração final 0,1 mg/mL);
- 6.8 mL de H<sub>2</sub>O, totalizando 10 mL de solução no ensaio enzimático.

- (b) 0.2 mL de enzima lacase;
- 2.0 mL de tampão pH 6.5;
- 1.0 mL de flubendiamida (concentração final 0,1 mg/mL);
- 6.7 mL de H<sub>2</sub>O destilada,
- 0.1 mL de ABTS 0,05M, totalizando 10 mL.

A utilização do ABTS neste experimento visou avaliar a modificação química pela Lacase diante da presença de um substrato dentro do sistema de incubação.

- (c) 2.0 mL de tampão pH 6.5;
- 1.0 mL de flubendiamida (concentração final 0,1 mg/mL);
- 7.0 mL de H<sub>2</sub>O, totalizando 10 mL.

Os frascos de Erlenmeyers foram agitados lentamente em shaker (30 rpm) por 24 horas, e então o líquido foi extraído com acetato de etila 1:1. Os extratos foram analisados por LC-MS LTQ Orbitrap Velos.

#### 4.7 PRODUÇÃO DE LACASE PELOS ISOLADOS SELECIONADOS E B. RHODINA EM INSETICIDAS COMERCIAIS E FLUBENDIAMIDA PADRÃO ANALÍTICO

##### 4.7.1 Cultivo em meio líquido e obtenção do Extrato livre de células (ELC)

Os experimentos para avaliar a atividade de lacase secretada no meio líquido de cultivo foram desenvolvidos em frascos de Erlenmeyers de 125 mL, contendo 50 mL de meio de Vogel (VOGEL, 1956) e 1% de glucose (m/v). O preparo dos inóculos dos isolados selecionados foram cultivados em placas de Petri contendo meio de cultivo sólido (BDA) durante 7 dias, sem inseticida. Seis discos de 7 mm de diâmetro foram cortadas do meio sólido recoberto com hifas dos fungos, e transferidas para os frascos de Erlenmeyer nas mesmas condições do experimento de biotransformação (item 4.4.1), utilizando os inseticidas flubendiamida (padrão analítico Bayer 98,5 %) e os comerciais Belt (48% flubendiamida) e Actara (25 % thiamethoxam).

As concentrações avaliadas foram aquelas que proporcionaram as melhores taxas de crescimento no teste de inibição de crescimento em meio sólido, ou seja, 1.22 g.L<sup>-1</sup> de Belt®, 3.00 g.L<sup>-1</sup> de Actara® e 100 mg.L<sup>-1</sup> de flubendiamida padrão analítico (98,5%). Os cultivos foram realizados em triplicata para os inseticidas comerciais. Entretanto, foi testado em quadruplicata utilizando o padrão analítico de flubendiamida, devido à ausência do veículo/compostos inertes que estão presentes nos inseticidas comerciais. Foram desenvolvidos dois tipos de controles: (a) ausência do pesticida e (b) ausência do fungo.

#### 4.7.2 Interrupção dos Cultivos dos Microrganismos e Determinação da Atividade de Lacase

Os cultivos foram interrompidos em 5, 10 e 20 dias de crescimento do microrganismo. Posteriormente, as amostras foram submetidas ao processo de filtração utilizando papel de filtro e funil de Büchner para obtenção dos extratos livres de células (ELC). Em seguida, o pH final do filtrado foi avaliado e as amostras foram congeladas.

O sistema de incubação é utilizado para avaliar a determinação da atividade enzimática (Tabela 5). A atividade de lacase foi analisada utilizando-se o substrato ABTS (2,2'-Azino-bis(3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonic Acid) 0,05 M, solução tampão citrato-fosfato (0,25 M) com pH 3,0, e o espectrofotômetro foi ajustado para realizar a leitura no comprimento de onda 420 nm (DEKKER E BARBOSA, 2001).

**Tabela 5 – Sistema de incubação avaliar a atividade de lacase dos fungos selecionados, cultivados na presença dos inseticidas Belt, Actara e padrão analítico flubendiamida (98,5 %).**

	Reação	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>
Substrato ABTS	50 µL	0 µL	50 µL
Tampão	150 µL	150 µL	150 µL
H <sub>2</sub> O (q.s.p)*	775 µL	825 µL	800 µL
Lacase (ELC)	25 µL	25 µL	0 µL

**ELC = extrato livre de células.  
Temperatura de banho: 50 °C.**

**Reação:** reação completa, ou seja, substrato ABTS, tampão, e extrato enzimático (ECF);

**C<sub>1</sub>** = Controle da enzima, na ausência do substrato ABTS;

**C<sub>2</sub>** = Controle do substrato, na ausência da enzima (ELC).

A unidade de lacase foi definida como o número de  $\mu$ moles de substrato oxidados por minuto por mL da solução de enzima e calculada a partir da Equação 1:

$$U/mL = \frac{A-(C_1+C_2)}{\varepsilon} \cdot \frac{1}{V} \cdot FD \cdot \frac{1}{t} \cdot 1000 \quad \dots \quad (\text{Equação 1})$$

Onde U/mL ou U.mL<sup>-1</sup> corresponde a unidade de lacase por mL de substrato, t é o tempo de incubação (em minutos), v é o volume de enzima empregado nos ensaios, FD é o fator de diluição da solução enzimática quando necessário, e  $\varepsilon$  é o coeficiente de extinção molar do substrato (ABTS é 36.000 mol<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SOLO E ISOLAMENTO DOS FUNGOS FILAMENTOSOS

As amostras de solos foram coletadas de lavouras de soja que apresentavam características físico-químicas semelhantes entre as três áreas avaliadas. De acordo com Lemos e Santos (1984), o solo é classificado como Latossolo Vermelho distroférico (Tabela 6), devido ao alto teor de argila, típico da região de Londrina.

As características químicas foram quantificadas de acordo com as propriedades: pH, teor de carbono, alumínio, fósforo, cálcio, potássio e magnésio (Tabela 7). Essas propriedades do solo apresentaram valores similares entre as três áreas. Os valores de pH variaram entre 5.00 e 5.50, e os teores de nutrientes do fósforo, carbono, cálcio, magnésio e potássio eram semelhantes entre os três solos analisados.

**Tabela 6: Propriedades físicas dos solos das três áreas avaliadas.**

Data: 29/05/2014	Argila (g.kg <sup>-1</sup> )	Silte(g.kg <sup>-1</sup> )	Areia (g.kg <sup>-1</sup> )
Área PlatinumNeo <sup>®</sup> (P.A thiamethoxam)	68	15	17
Área Premio <sup>®</sup> (P.A clorantraniliprole)	67	18	15
Área sem inseticida	69	15	17

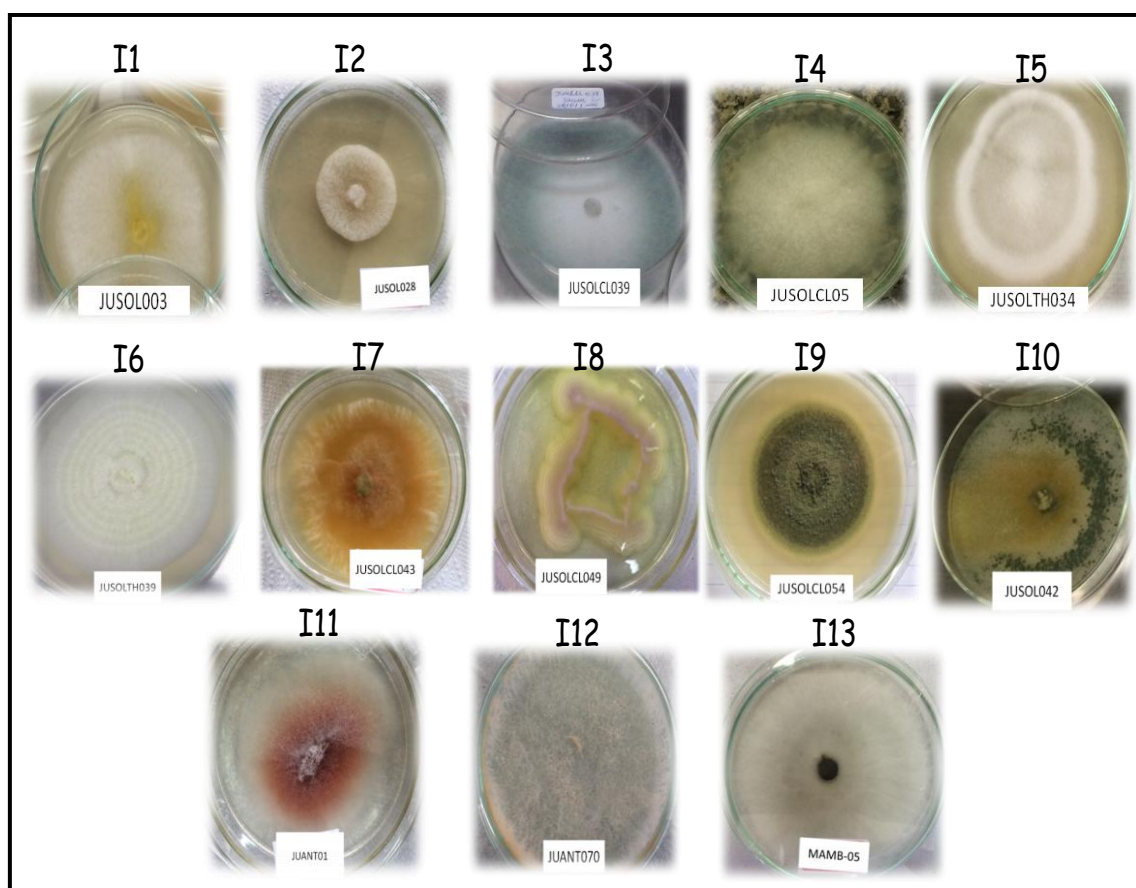
**Tabela 7: Propriedades químicas dos solos das três áreas avaliadas.**

Data: 29/05/2014	Área PlatinumNeo	Área Premio	Área Sem inseticida
pH	05.50	5.00	05.40
P (mg/dm <sup>3</sup> )	16.90	14.60	18.50
C (g/dm <sup>3</sup> )	18.07	17.64	20.18
Al (cmol/dm <sup>3</sup> solo)	00.00	00.00	00.00
Ca (cmol/dm <sup>3</sup> de solo)	07.10	05.62	06.02
Mg (cmol/dm <sup>3</sup> solo)	01.89	01.23	01.64
K (cmol/dm <sup>3</sup> de solo)	01.12	00.81	01.35

Das amostras de solo das lavouras de soja foram isolados 133 fungos, sendo 42 isolados da área com aplicação de inseticida PlatinumNeo<sup>®</sup>; 54

isolados da área com inseticida Premio® e 37 da área sem inseticida. Todos os isolados fúngicos foram codificados e mantidos em meio de cultivo apropriado de conservação.

Os isolados fúngicos foram selecionados para o teste de inibição de crescimento em meio sólido de acordo com sua velocidade de crescimento nas placas de Petri, e pela distinção de suas características macroscópicas. Desta forma, 12 fungos foram escolhidos, junto com o fungo de referência *B. rhodina* MAMB-05, representados pela Figura 7.



**Figura 7: Isolados fúngicos selecionados para o teste em meio sólido. (I1) JUSOL003; (I2) JUANT028; (I3) JUSOLCL039; (I4) JUSOLCL05; (I5) JUSOLTH034; (I6) JUSOLTH039; (I7) JUSOLCL043; (I8) JUSOLCL049; (I9) JUSOLCL054; (I10) JUSOL042; (I11) JUANT001 (isolado de inseto); (I12) JUANT070 (isolado de inseto); (I13) *B. rhodina* MAMB-05.**

A comunidade microbiana isolada de áreas com aplicação de inseticida pode ser potencial degradadora de pesticidas, devido ao crescimento e persistência neste solo. De acordo com Das e Mukherjee (2014), um solo com comunidade microbiana, associado às características físico-químicas do solo,

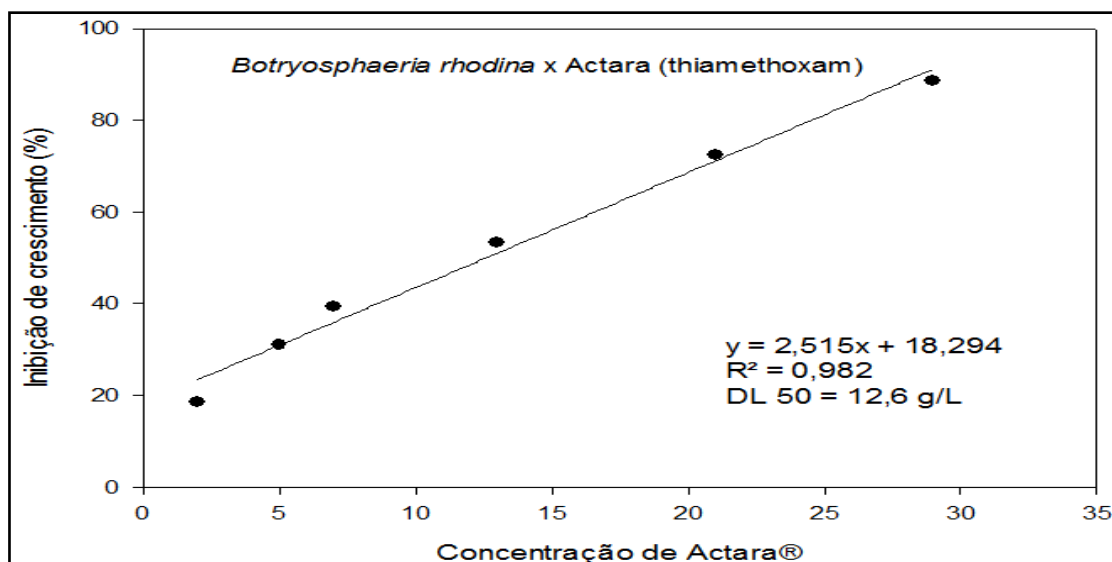
representa maior possibilidade de degradação de um composto xenobiótico, resultando em uma alta redução do tempo de destes pesticidas. No referido estudo os autores demonstraram que o tempo de meia vida do inseticida flubendiamida no solo estéril foi de 140 dias, enquanto o solo com os microrganismos reduziu para 94 dias.

O isolamento de organismos potenciais degradadores da flubendiamida evidenciam a importância das propriedades físico-químicas do solo coletado. Através dos estudos de Paramasivam e Banerjee (2011), o solo com propriedades físico-química semelhantes à este trabalho levou a melhores resultados de degradação do inseticida flubendiamida em comparação com solos mais arenosos e com pH acima de 7.

Além disso, os fungos isolados de solo argiloso, com pH entre 5 e 5,5 e com características químicas semelhantes foram objetos de estudos por Das e Mukherjee (2014). O trabalho enfatizou a importância dessas propriedades na degradação da flubendiamida, visto que os autores demonstraram que a comunidade microbiana existente nessas condições de solo resultou em maiores taxas de degradação da flubendiamida em comparação com outros tipos de solo.

## 5.2 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DOS INSETICIDAS ACTARA E BELT EM MEIO SÓLIDO; UTILIZANDO *BOTRYOSPHAERIA RHODINA* MAMB-05 COMO REFERÊNCIA

A seleção fúngica permitiu uma avaliação preliminar da toxicidade do inseticida. O teste de inibição de crescimento em meio sólido avaliou 13 fungos na presença de quatro concentrações distintas do inseticida comercial Actara: 3 g.L<sup>-1</sup>, 7 g.L<sup>-1</sup>, 21 g.L<sup>-1</sup> e 35 g.L<sup>-1</sup>. A escolha dessas concentrações foi baseada no crescimento micelial do fungo de referência, o *B. rhodina* MAMB-05, conforme mostra a Figura 8.



**Figura 8:** Taxa de inibição do *B. rhodina* MAMB-05 na presença de concentrações crescentes de Actara (0 a 30 g/L), observado durante sete dias de incubação em BOD.

De acordo com o teste de inibição em placa de Petri, na qual foi cultivado o *B. rhodina* em concentrações crescentes de Actara, observou-se que a dose que proporcionou uma redução de 50% do crescimento do fungo, em comparação com o controle, no qual o pesticida estava ausente, foi a de 12.6 g/L de Actara.

No teste de inibição foram utilizadas 4 concentrações de Actara em 12 isolados fúngicos e no fungo de referência MAMB-05. O cálculo da inibição foi relativo ao controle (ausente da dose de Actara). Os resultados do teste estão descritos na Tabela 8. A presença do inseticida Actara influenciou o crescimento de todos os fungos avaliados, em todas as concentrações estudadas.



**Tabela 8: Inibição do crescimento (%) dos fungos selecionados a partir de isolados do solo, em placas de Petri em meio BDA. As concentrações de Actara® avaliadas foram 3, 7, 21 e 35 g.L<sup>-1</sup>.**

Isolados Fúngicos	Concentração Actara® (g.L <sup>-1</sup> )			
	3	7	21	35
<b>JUANT070</b>	00.00 cD	04.10 cF	35.18 bF	48.41 aE
JUSOLTH039	01.34 dD	20.57 cD	61.70 bD	72.31 aD
JUSOLCL054	02.64 dD	42.33 cC	67.62 bC	75.55 aD
JUSOLCL043	02.91 dD	17.06 cE	61.24 bD	85.71 aD
<b>JUSOLCL039</b>	<b>03.97 dD</b>	<b>21.69 cD</b>	<b>43.25 bE</b>	<b>75.97 aD</b>
JUSOL003	03.57 dD	35.18 cC	80.42 bB	92.73 aA
JUSOL042	03.44 cD	59.92 bB	76.06 aB	81.35 aC
JUSOL028	07.54 dC	38.36 cC	69.58 bC	82.67 aC
JUANT001	09.13 dC	25.92 cD	67.32 bC	77.28 aC
JUSOLCL005	11.75 cC	68.91 bA	89.42 aA	96.56 aA
JUSOLTH034	18.94 cB	22.98 cD	80.64 bB	90.20 aB
JUSOLCL049	29.91 cA	33.56 cC	72.31 bC	90.10 aB
<b>MAMB-05</b>	<b>05.42 dD</b>	<b>14.95 cE</b>	<b>70.50 bC</b>	<b>79.23 aC</b>

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, pelo teste de Scott-Knott á 5% de probabilidade.

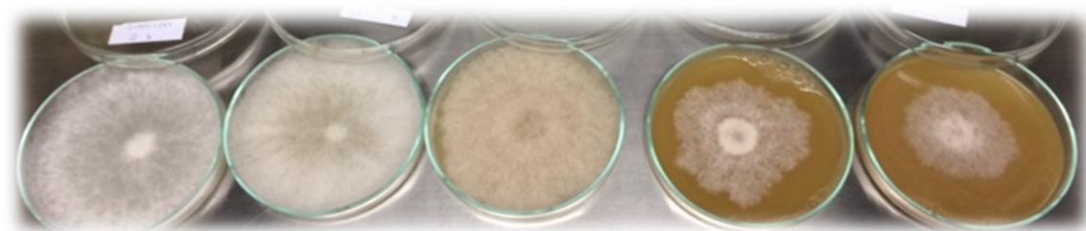
Na menor concentração (3 g.L<sup>-1</sup>) observou-se uma taxa de inibição inferior a 10% para a maioria dos microrganismos testados, exceto para os isolados JUSOLCL049 (29,91% inibição), JUSOLCL005 (11,75% inibição) e JUSOLTH034 (18,94% inibição). Por outro lado, os isolados JUANT070, JUSOLCL039, JUSOLTH039, JUSOLCL054, JUSOLCL043, JUSOL042, JUSOL003 e o fungo MAMB-05 foram os que apresentaram inibições inferiores a 5,5% em relação aos cultivos nos quais os pesticidas estavam ausentes, indicando uma alta resistência ao Actara. De acordo com o teste Scott-Knott, esses fungos se destacaram porque se diferenciaram estatisticamente dos demais isolados na menor concentração aplicada no cultivo, demonstrando-se resistentes ao pesticida.

A concentração de 7 g.L<sup>-1</sup> de Actara demonstrou uma taxa de inibição superior a dose inicial em todos os isolados. Grande parte dos fungos que se destacaram em 3 g.L<sup>-1</sup> não conseguiram o alto crescimento nesta concentração intermediária. Os fungos que continuaram se destacando no crescimento foram JUANT070 (4,10% inibição), JUSOLCL043 (17,06% inibição), JUSOLCL039 (21,69% inibição), e o fungo *B. rhodina* MAMB-05 (14,95% inibição). Além disso, pela análise estatística pode-se concluir que o elevado

crescimento do JUANT070 se diferenciou de todos os fungos, enquanto os isolados JUSOLCL005 e JUSOL042 expressaram alta inibição diante da presença do inseticida, com porcentagens de 68,91% e 59,92%, respectivamente.

Na concentração de 21 g.L<sup>-1</sup>, o pesticida promoveu uma inibição do crescimento de todos os fungos à taxas superiores de 35%, apresentando relevante toxicidade em concentrações superiores. Os isolados JUANT070 e JUSOLCL039 destacaram-se pelo crescimento micelial superior ao fungo de referência *B.rhodina*, atingindo inibições de 35,18% e 43,25%, respectivamente.

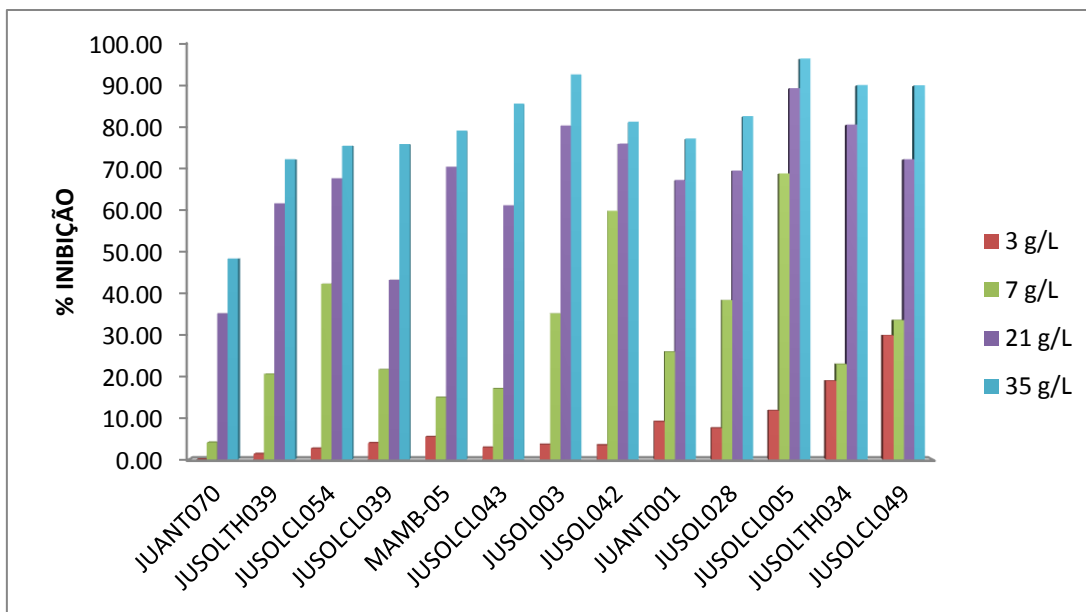
Na maior concentração aplicada neste teste, o isolado JUANT070 exerceu o melhor crescimento em comparação com todos os fungos testados. Nesta concentração de alta toxicidade, o fungo conseguiu se desenvolver, apresentando taxa de inibição de 48,41 %, o único fungo com inibição inferior a 50 % (Figura 9).



**Figura 9: Crescimento do isolado JUANT070 no teste de inibição. Da esquerda para direita, foram adicionadas as concentrações 0.00, 3.00, 7.00, 21.00 e 35.00 g.L<sup>-1</sup> de Actara®.**

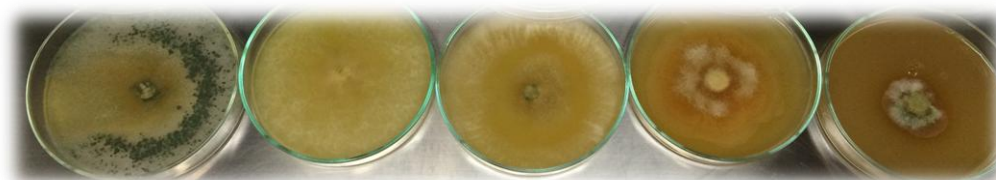
As quatro concentrações avaliadas permitiram diferenciar o nível de crescimento dos fungos nas placas de Petri. Através da análise estatística, observou-se que houve um descréscimo no crescimento de acordo com o aumento da concentração de Actara, para todos os fungos. As concentrações avaliadas correspondem a valores muito superiores às doses aplicadas no campo. As concentrações recomendadas para aplicação na lavoura foram testadas preliminarmente, porém não influenciaram no crescimento de nenhum dos isolados testados, visto que a dose recomendada no campo é baixa, e varia entre 0.12 – 0.20 g.L<sup>-1</sup> (SYNGENTA, 2015).

A Figura 10 ilustra o teste de inibição de crescimento dos fungos em concentrações crescentes de Actara, nas quatro concentrações avaliadas.



**Figura 10: Avaliação da porcentagem de inibição do crescimento (%) dos isolados fúngicos cultivados em concentrações crescentes de Actara (3, 7, 21 e 35 g/L).**

Por meio da identificação macro e microscópica, os isolados JUSOLCL039 (Figura 11) e JUANT070 (Figura 9) possivelmente pertencem aos gêneros *Trichoderma* e *Neurospora*, respectivamente. Esses fungos apresentam um histórico de participação da biodegradação de compostos xenobióticos, além de produzirem lacase em diversos estudos (SU et al., 2011). Juntamente a esses fungos, o *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 também consiste em um fungo produtor de lacase (DEKKER et al., 2002), e apresentou altas taxas de crescimento em relação aos outros fungos nas concentrações moderadas (3 e 7 g.L<sup>-1</sup>) de Actara. Diante disso, esses fungos foram selecionados para os ensaios de biotransformação em meio líquido.



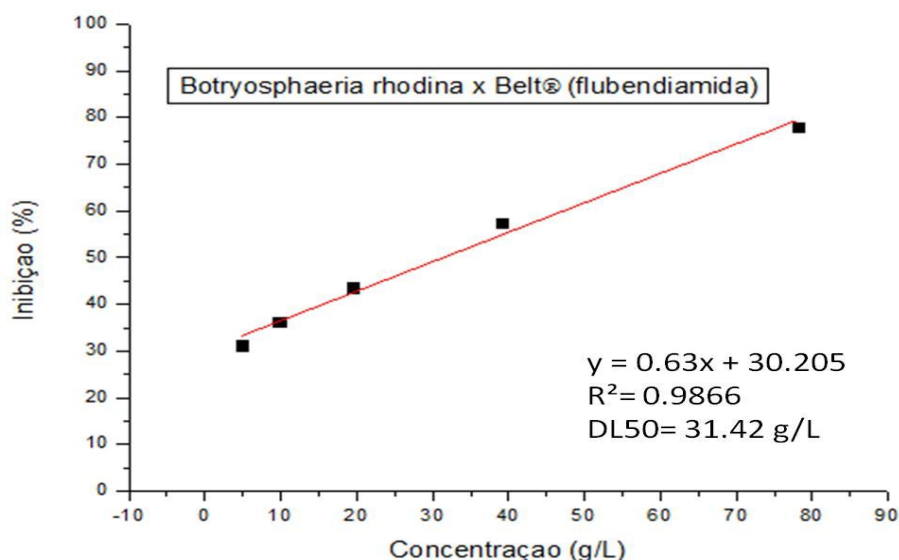
**Figura 11: Crescimento do isolado JUSOLCL039, possivelmente do gênero *Trichoderma*, no teste de inibição. Da esquerda para direita, foram adicionadas as concentrações 0.00, 3.00, 7.00, 21.00 e 35.00 g.L<sup>-1</sup> de Actara®.**

Os fungos que apresentaram baixa inibição quando testados em meio sólido são, provavelmente, potenciais biodegradadores do composto xenobiótico avaliado. Birolli et. at. (2014), utilizaram fungos para o teste de

inibição com o pesticida dieldrin e avaliaram os fungos *Aspergillus sydowii*, *Penicillium miczynskii* e *Trichoderma* sp., condicionados a 0,25 a 0,75 g.L<sup>-1</sup> de dieldrin. O fungo *Penicillium miczynskii* demonstrou o melhor crescimento no teste em meio sólido, e assim foi utilizado para cultivo em meio líquido, onde foi constatado o seu potencial biodegradador.

Desta forma, o teste de inibição em meio sólido constitui uma importante etapa para preceder o experimento de biotransformação em meio de cultivo líquido, pois permite selecionar os potenciais fungos degradadores de pesticidas. Semelhante a este teste, o trabalho de Vacondio et al. (2015) selecionou o fungo *Trichoderma harzianum* para o experimento de biodegradação de pentaclorofenol, a partir do teste de inibição de crescimento em meio sólido que continha 50 mg.L<sup>-1</sup> de pesticida.

O teste de inibição de crescimento em meio sólido com o inseticida comercial Belt constitui um relevante estudo de identificação dos potenciais fungos biotransformadores de seu princípio ativo flubendiamida. A determinação das concentrações a serem aplicadas neste teste foi baseada na inibição de crescimento do fungo *B. rhodina* diante de altas concentrações do pesticida (Figura 12).



**Figura 12: Taxa de inibição do *B. rhodina* MAMB-05 na presença de concentrações crescentes de Belt (0 a 80 g/L).**

Com este teste, pode-se observar que a concentração de 31.42 g/L deste inseticida permitiu uma inibição de 50% do crescimento do *B. rhodina*.

Desta forma, as concentrações aplicadas para os demais fungos foram 1.22, 4.88, 19.52 e 39.04 g.L<sup>-1</sup>.

Os resultados do experimento com os 13 fungos aplicados em meio com Belt estão apresentados na Tabela 9. Observou-se uma inibição do crescimento acima de 10% apenas para os fungos JUANT001 (14,11%), JUSOLTH039 (17,17%), JUSOLTH034 (18,94%) e JUSOLCL049 (29,16%), na concentração de 1.22 g.L<sup>-1</sup> de Belt. De acordo com o teste estatístico, o crescimento destes fungos se diferenciaram dos demais. Entretanto, todos os outros fungos da Tabela 9 demonstraram baixa ou nula inibição de crescimento na menor concentração aplicada no cultivo, revelando-se estatisticamente iguais, além da possibilidade de aplicação nos estudos de biodetoxificação da flubendiamida.

**Tabela 9: Inibição do crescimento (%) dos fungos selecionados a partir de isolados do solo, em placas de Petri em meio BDA. As concentrações de Belt<sup>®</sup> utilizadas foram de 1.22, 4.88, 19.52 e 39.04 g.L<sup>-1</sup>.**

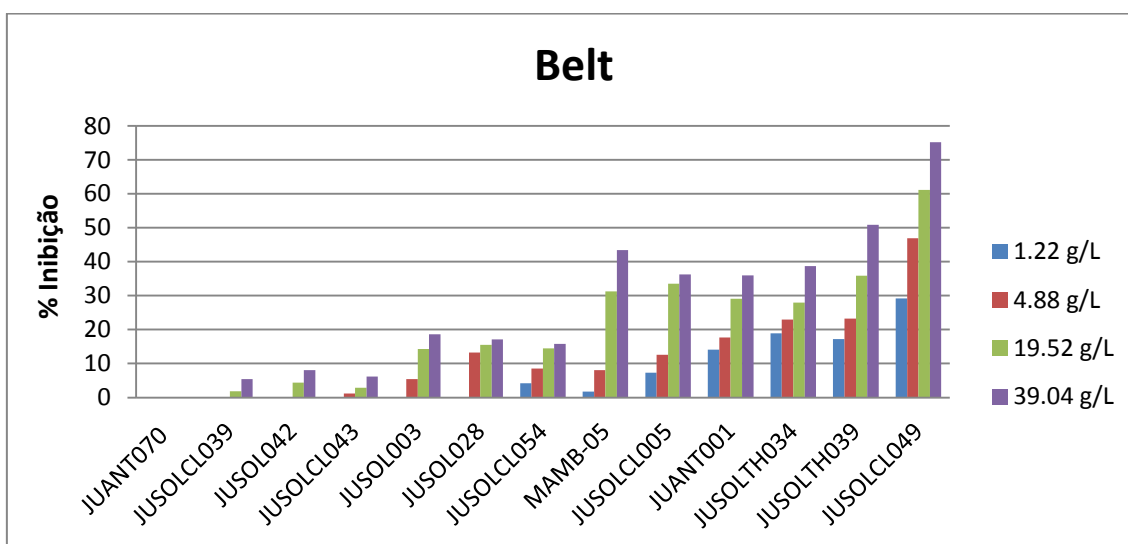
Isolados Fúngicos	Concentração Belt <sup>®</sup> (g.L <sup>-1</sup> )			
	1.22	4.88	19.52	39.04
JUSOL042	00.00 aC	00.00 aD	04.43 aD	08.06 aE
JUSOL028	00.00 bC	13.26 aC	15.48 aC	17.07 aD
<b>JUSOLCL039</b>	<b>00.00 aC</b>	<b>00.00 aD</b>	<b>01.85 aD</b>	<b>05.42 aE</b>
JUSOLCL043	00.00 aC	01.19 aD	02.91 aD	06.22 aE
<b>JUANT070</b>	<b>00.00 aC</b>	<b>00.00 aD</b>	<b>00.00 aD</b>	<b>00.00 aE</b>
JUSOL003	00.00 bC	05.44 bD	14.28 aC	18.65 aD
JUSOLCL054	04.16 bC	08.50 bC	14.43 aC	15.78 aD
JUSOLCL005	07.32 bC	12.56 bC	33.47 aB	36.24 aC
JUANT001	14.11 bB	17.68 bB	29.04 aB	35.98 aC
JUSOLTH039	17.17 cB	23.27 cB	35.87 bB	50.83 aB
JUSOLTH034	18.94 bB	22.98 bB	27.99 bB	38.72 aC
JUSOLCL049	29.16 dA	46.89 cA	61.13 bA	75.20 aA
<b>MAMB-05</b>	<b>01.72 cC</b>	<b>08.07 cC</b>	<b>31.22 bB</b>	<b>43.39 aB</b>

\* Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si, minúsculas na linha e maiúsculas na coluna, pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

A concentração moderada de 4.88 g.L<sup>-1</sup> permitiu uma alta taxa de crescimento para apenas alguns fungos, que obtiveram inibição inferior a 10%: JUSOL042 (0% inibição), JUSOLCL039 (0% inibição), JUSOLCL043 (1,19% inibição), JUANT070( 0% inibição), JUSOL003 (5,44% inibição), JUSOLCL054 (8,50% inibição) e MAMB-05 (8,07% inibição). Desta forma, diante de uma

concentração quatro vezes maior que a menor concentração, esses fungos ainda se destacaram com elevado desenvolvimento em meio sólido.

De acordo com os resultados do teste nas concentrações mais elevadas, o comportamento da maioria dos fungos foi estatisticamente semelhante nas concentrações de 19,52 e 39,04 g.L<sup>-1</sup> de Belt. Os destaques de crescimento permaneceram aos isolados JUSOL042, JUSOLCL039, JUSOLCL043 e JUANT070, que foram estatisticamente iguais e demonstraram inibição inferior a 10% em todas as quatro concentrações testadas (Figura 13). Além disso, inibições inferiores a 50% de crescimento na presença de altas concentrações refletem bom desenvolvimento dos fungos diante de relevante toxicidade. Desta forma, JUSOL028, JUSOL003, JUSOLCL054, MAMB-05, JUSOLCL054, JUANT001 e JUSOLTH034 também obtiveram bom desenvolvimento na presença do inseticida Belt.



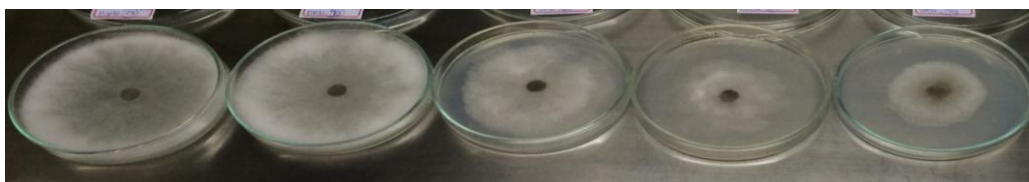
**Figura 13: Avaliação da porcentagem de inibição do crescimento (%) dos isolados fúngicos cultivados em concentrações crescentes de Belt (1.22, 4.88, 19.52, e 39,04 g/L).**

Da mesma maneira que o inseticida Actara, o Belt foi estudado em concentrações muito superiores às doses recomendadas em campo (0.05 g.L<sup>-1</sup> e 0.25 g.L<sup>-1</sup>) (BAYER, 2015). Estas concentrações de campo foram testadas preliminarmente, e não apresentaram inibição.

Diante dos testes de inibição com Actara e Belt, os isolados JUSOLCL039, JUANT070 E MAMB-05 demonstraram ser muito promissores para experimentos de biotransformação, pois cresceram satisfatoriamente no



meio com os pesticidas. As taxas de inibição de crescimento foram relativamente baixas nas duas menores concentrações, tanto para o inseticida Actara, quanto para o Belt. O isolado JUANT070 não teve interferência no seu crescimento em todas as concentrações testadas com Belt, e foi o fungo com menor inibição perante o Actara nas quatro concentrações avaliadas. O isolado JUSOLCL039 demonstrou, estatisticamente, ter um bom potencial biodegradador de ambos os pesticidas, principalmente para com o Belt, que conseguiu inibir apenas 5% de seu crescimento, e é o inseticida cujo princípio ativo é a flubendiamida, principal alvo do estudo de biotransformação neste trabalho. Além disso, o *B. rhodina* MAMB-05 também apresentou inibições inferiores a 10% nas concentrações de até 4,88 g.L<sup>-1</sup> de Belt (Figura 14) e inibição abaixo de 15% com concentração moderada de 7 g.L<sup>-1</sup> de Actara.



**Figura 14: Crescimento do *B. rhodina* MAMB-05 no teste de inibição. Da esquerda para direita, foram adicionadas as concentrações 0.00, 1.22, 4.88, 19.52, 39.04 g.L<sup>-1</sup> de Belt®.**

Os fungos filamentosos estão presentes em outros estudos em meio sólido, destacados no trabalho de Colla et al. (2008). Isolados de solo contaminado com atrazina, os fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Trichoderma* apresentaram as maiores taxas de crescimento na presença do pesticida. Segundo os autores, o desenvolvimento de tais fungos em meio contaminado com o herbicida indica a possibilidade de utilização destes fungos como potenciais biorremediadores de solos contaminados.

Além disso, os fungos ligninolíticos também são potenciais candidatos para o tratamento de solos contaminados, já que degradam vários xenobióticos. Os fungos do mofo branco, estudados por Rubilar et al. (2007), foram utilizados em teste de degradação de solo com lodo contaminado com pentaclorofenol (PCP). *Anthracophyllum discolor* degradou 96% nas concentrações de 100 mg/kg de Pentaclorophenol, e 94% na concentração de 250 mg/kg. Desta maneira, a escolha do fungo *Botryosphaeria rhodina*, um

fungo ligninolítico produtor constitutivo de lacases, ressalta o potencial biodegradador de xenobióticos.

O fungo de gênero *Neurospora*, codificado com JUANT070, se sobressaiu no teste de inibição em meio sólido e foi também avaliado em estudos de biodegradação. De acordo com Jesus et al. (2010), o cultivo deste fungo na presença do corante Eritrosina sugeriu a possibilidade da ação enzimática da lacase no processo de biodegradação deste xenobiótico.

Diante dos resultados obtidos do teste de inibição de crescimento micelial, bem como pelos relatos obtidos nas revisões bibliográficas, os fungos *B. rhodina*, *Trichoderma* sp. e *Neurospora* sp. apresentam potencial para o prosseguimento destes estudos, visto que apresentaram ótimo crescimento na presença dos pesticidas avaliados e estão registrados em estudos de biorremediação (Vacondio et al, 2015). Além disso, o *B. rhodina* demonstra um histórico de atividade enzimática de lacase (BARBOSA, DEKKER E HARDY, 1996). Acredita-se que esta enzima possa atuar na estrutura química destes inseticidas, auxiliando a degradação dos mesmos.

Por isso, acredita-se que estes fungos são promissores para o estudo de biotransformação, cultivando-os em meio líquido, a fim de averiguar os possíveis produtos de transformação e se há indução da produção de lacase na presença de flubendiamida e dos inseticidas comerciais Actara<sup>®</sup> e Belt<sup>®</sup>.



### 5.3 VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL INDUTOR DE ACTARA, BELT E FLUBENDIAMIDA NA PRODUÇÃO DE LACASE PELOS ISOLADOS JUANT070, JUSOLCL039 E PELO *BOTRYOSPHAERIA RHODINA* MAMB-05 EM MEIO LÍQUIDO

#### 5.3.1 Ação indutora de Actara e Belt

Os resultados da atividade enzimática estão apresentados na Tabela 10. Diante dos resultados, observou-se que os inseticidas não interferiram no método de determinação da atividade lacase, visto que não houve oxidação do ABTS, conforme pode ser observado nos resultados dos controles.

**Tabela 10: Atividade enzimática de lacase com os inseticidas Actara® e Belt®. O controle é constituído apenas do meio de cultivo líquido com inseticida, sem a presença dos microrganismos.**

	Ativ. enzimática lacase (U.mL <sup>-1</sup> )					
	Actara®			Belt®		
	5 dias	10 dias	20 dias	5 dias	10 dias	20 dias
<b>JUANT070</b>						
Cultivo + inseticida	0.01	0.05	0.01	0.03	0.02	0.02
Cultivo – inseticida	0.07	0.02	0.02	0.05	0.02	0.05
Controle	0	0	0	0	0	0
<b>JUSOLCL039</b>						
Cultivo + inseticida	0.01	0.01	0.02	0.02	0.04	0.02
Cultivo – inseticida	0.01	0.03	0.01	0.02	0.11	0.01
Controle	0	0	0	0	0	0
<b>MAMB-05</b>						
Cultivo + inseticida	0.1	0.03	0.03	0.09	0.12	0.03
Cultivo – inseticida	0.04	0.11	0.03	0.05	0.16	0.03
Controle	0	0	0	0	0	0

Todos os fungos avaliados são produtores constitutivos de lacase. Os pesticidas Actara® e Belt® não induziram a lacase em todos os microrganismos estudados, visto que os níveis de produção continuaram baixos (entre 0.01 e 0.12 U.mL<sup>-1</sup>) quando comparados com as atividades determinadas nos cultivos onde os respectivos inseticidas estavam ausentes (entre 0.01 e 0.16 U.mL<sup>-1</sup>).

O fungo *B. rhodina* MAMB-05 apresentou maior produção de lacase em comparação com os outros isolados testados. A atividade de lacase pelo

*B.rhodina* MAMB-05 denota um possível papel para a sua participação na biodegradação de compostos aromáticos (DEKKER et al., 2002). Rezende et al. (2005) concluíram que o *B. rhodina* MAMB-05 produziu lacase em um meio basal contendo o herbicida Scepter<sup>®</sup>-imazaquin. Com a análise de HPLC, observou-se que o metabolismo do fungo diminuiu o nível residual de imazaquin até em 80%.

A presença de ambos inseticidas no meio de cultivo elevou o pH no decorrer do tempo. O metabolismo do *B. rhodina* foi diferente na presença do Actara<sup>®</sup> (Tabela 11), visto que valor de pH final foi 6.75 no cultivo de 5 dias, diferindo do pH final dos cultivos nos outros intervalos de tempo, que variaram entre pH 7.51 e 7.93. Dekker et. al.(2007) destacam que a faixa de pH 4.0 – 6.5 é ótima para o *B.rhodina* e outros fungos, relatando acréscimo na atividade de lacase.

**Tabela 11: Valores médios dos valores de pH final dos cultivos com os inseticidas Actara<sup>®</sup> e Belt<sup>®</sup>.**

	pH					
	Actara <sup>®</sup>			Belt <sup>®</sup>		
JUANT070	5 dias	10 dias	20 dias	5 dias	10 dias	20 dias
Cultivo + inseticida	8.39	8.28	7.97	8,42	8.41	8.69
Cultivo – inseticida	8.5	9.44	8.8	8,42	8,35	8.66
Controle	7.24	7.14	7.23	7,18	7,17	7.14
JUSOLCL039	5 dias	10 dias	20 dias	5 dias	10 dias	20 dias
Cultivo + inseticida	8.21	8.37	8.39	7.76	8.26	8.33
Cultivo – inseticida	7.91	8.1	8.15	7.02	8.26	8.23
Controle	7.65	8.2	7.61	7.31	7.33	7.35
MAMB-05	5 dias	10 dias	20 dias	5 dias	10 dias	20 dias
Cultivo + inseticida	6.75	7.51	7.93	7.35	7.85	8.59
Cultivo – inseticida	6.57	7.43	7.84	7.29	8.03	8.33
Controle	7.36	7.45	7.69	7.59	7.82	7.68

**Obs: pH dos controles correspondem aos valores de pH inicial dos cultivos**

A presença do isolado JUANT070 variou o pH final do meio entre 7.97 e 9.44, contrariando o pH inicial do controle com inseticida, na ausência do fungo (pH entre 7.14 e 7.24). Os cultivos do isolado JUSOLCL039 apresentou pH final entre 7.0 e 8.4, com pH máximo de 8.39. Em comparação com os fungos ligninolíticos, os fungos filamentosos são mais tolerantes às condições ácidas, podendo variar o pH entre 6.0 e 8.0, sendo os mais favoráveis à ação

degradadora de hidrocarbonetos. Nesta faixa de pH, observou-se um maior crescimento dos microrganismos bem como um aumento da velocidade de degradação. As variações dos valores de pH podem ter acontecido durante a incubação e podem estar relacionados aos transportes e solubilização dos nutrientes, a reações enzimáticas, produtos de excreção ou fenômenos de superfícies (CERNIGLIA; SUTHERLAND, 2001).

A lacase do ascomiceto *Neurospora crassa*, mesmo gênero do isolado JUANT070, foi descrita, por Tamaru e Inoue (1989), como uma enzima induzível. A produção desta enzima é reprimida em culturas vegetativas, mas pode ser induzida por tratamento com baixas concentrações de ciclo-heximida. Linden et al. (1991) relataram que esta enzima é uma oxidase que catalisa a oxidação biológica de substratos orgânicos, tais como mono-, di- e polifenóis e diaminas, com a concomitante redução de oxigênio molecular à água.

Desta maneira, a atividade enzimática de lacase está ativa nos fungos testados, porém a presença dos inseticidas comerciais não induziu, ou seja, não aumentou os níveis constitutivos de produção desta enzima, em comparação com os controles, quando o inseticida estava ausente.

### 5.3.2 Ação indutora de flubendiamida (Padrão analítico 98,5%)

A atividade enzimática, determinada com o substrato ABTS, foi avaliada na cultivo com flubendiamida, na concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup>. O cultivo foi interrompido com 10 dias, e a atividade enzimática dos fungos com a presença do inseticida foi comparada com a ausência do mesmo.

O isolado JUSOLCL039 atingiu atividade enzimática de lacase entre 1.21 e 1.58 U.mL<sup>-1</sup> (Tabela 12) através do cultivo em meio líquido com 100 mg.L<sup>-1</sup> de flubendiamida, alcançando uma média de atividade de 1.39 U.mL<sup>-1</sup>. No entanto, o cultivo do isolado JUSOLCL039 na ausência do inseticida demonstrou um valor de atividade enzimática superior (entre 1.57 e 1.62), resultando em uma média de 1.59 U.mL<sup>-1</sup>. Desta maneira, pode-se considerar que a presença da concentração da flubendiamida não induziu a atividade de lacase deste fungo. Além disso, o resultado do “controle” demonstrou que o inseticida não influenciou na oxidação do substrato durante o ensaio.

**Tabela 12: Atividades de lacase do isolado fúngico JUSOLCL039, JUANT070 e o fungo MAMB-05 na presença e ausência da flubendiamida, determinadas com o substrato ABTS. O controle refere-se a amostra apenas com inseticida, ausente de cultivo com microrganismos. As letras A-B-C-D indicam as repetições.**

Atividade enzimática lacase (U.mL <sup>-1</sup> )					
10 dias					
<b>JUSOLCL039</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>Média</b>
<b>Cultivo + inseticida</b>	1.58	1.44	1.21	1.33	1.39
<b>Cultivo – inseticida</b>	1.59	1.57	1.62	1.57	1.59
<b>Controle</b>	0	0	0	0	0
<b>JUANT070</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>Média</b>
<b>Cultivo + inseticida</b>	2.4	2.45	2.26	2.12	2.31
<b>Cultivo – inseticida</b>	2.69	2.06	2.09	2.23	2.27
<b>Controle</b>	0	0	0	0	0
<b>MAMB-05</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>Média</b>
<b>Cultivo + inseticida</b>	5.26	8.82	7.16	7.09	7.084
<b>Cultivo – inseticida</b>	5.62	7.98	6.22	6.86	6.671
<b>Controle</b>	0	0	0	0	0

Os estudos de Lucon et al.(2009) verificaram a capacidade de crescimento do *Trichoderma* em meios contendo pesticidas. Esses microrganismos foram capazes de degradar diversos hidrocarbonetos e pesticidas, e demonstram-se resistentes às toxinas e produtos naturais.

A indução da produção de lacase pelo fungo *Trichoderma harzianum* foi pesquisada por Baldrian (2006), em meio de cultura, durante interações interespecíficas com fungos da decomposição branca. Neste estudo, a associação deste fungo com outros no mesmo meio proporcionou um acréscimo de 13 vezes a produção de lacases, demonstrando uma ótima indução da atividade desta enzima.

Desta maneira, o isolado JUSOLCL039 é produtor constitutivo da enzima lacase, porém a presença do inseticida no meio de cultivo não proveu um acréscimo na produção desta enzima.

A quantificação da atividade enzimática do isolado JUANT070 indicou que este isolado fúngico, possivelmente do gênero *Neurospora*, produz lacase, cujas atividades variaram entre 2.12 a 2.45 U.mL<sup>-1</sup> nos cultivos com inseticida (média 2.31 U.mL<sup>-1</sup>), e atividade entre 2.06 e 2.69 U.mL<sup>-1</sup> no cultivos sem a presença de flubendiamida (média 2.27 U.mL<sup>-1</sup>).

A diferença entre as atividades enzimáticas obtidas entre essas duas formas de cultivo não demonstra o potencial indutor de lacase na presença pela flubendiamida, visto que os cultivos sem a presença do pesticida apresentaram valores de atividade muito próximos ao cultivo nos quais o inseticida foi adicionado.

Os resultados do cultivo com o *B. rhodina* mostrou uma atividade lacase superior aos outros isolados. A atividade enzimática produzida pelo fungo cultivado com a flubendiamida variou entre 5,26 e 8,82 U.mL<sup>-1</sup>, obtendo uma média de 7,084 U.mL<sup>-1</sup>. Por outro lado, o cultivo sem a presença do inseticida no meio resultou em resultados próximos aos cultivos com flubendiamida, apresentando valores que variaram de 5,62 a 7,98 U.mL<sup>-1</sup>, e uma média de 6,671. Desta forma, a comparação entre os dois tratamentos indicam que o cultivo com inseticida aumentou a atividade de lacase em 6,20%. Além disso, os resultados apresentados no controle revelaram que não houve interferência da flubendiamida na oxidação do substrato, pois seu valor de atividade enzimática demonstrou-se nula.

Os valores da atividade de lacase do cultivo com inseticida indicaram um acréscimo inferior a 10% da atividade enzimática. Este valor pode estar relacionado com a presença do pesticida, ou por alterações mínimas nas condições físico-químicas durante o cultivo, tais como pH, nutrientes, reações enzimáticas, entre outras condições que podem ter variado. Em comparação aos estudos realizados por Vasconcelos et. al. (2000), nota-se que o composto álcool veratrílico, introduzido no cultivo pelos autores, interferiu de modo relevante na produção de lacase. Os resultados mostraram que o *B. rhodina* produziu 0,13 U.mL<sup>-1</sup> no cultivo ausente do álcool, com o substrato ABTS. E com a presença do álcool veratrílico, o nível de produção subiu para 5,40 U.mL<sup>-1</sup>, demonstrando que esse composto é um grande indutor da atividade enzimática de lacase.

O potencial biodegradador de compostos xenobióticos pelo *Botryosphaeria rhodina* foi relacionado com a atividade enzimática de lacase nos estudos de Rezende et al.,(2005). Este fungo demonstrou atividade enzimática em concentrações de até 25% do pesticida Scepter.

Neste estudo, a quantificação da enzima lacase foi superior no fungo *B. rhodina*. O experimento com o padrão analítico flubendiamida foi capaz de

promover elevados níveis de produção desta enzima, mesmo não tendo atuado como indutor de lacase. Em comparação com os inseticidas comerciais, os extratos livres de células demonstraram baixos níveis de atividade enzimática. Este fato pode estar relacionado ao veículo dos inseticidas comerciais Actara e Belt, que compõem a maior parcela do composto, e conferem solubilidade, estabilidade e validade ao mesmo. Desta forma, estes compostos inertes que compõem os inseticidas comerciais possivelmente interferiram na atividade enzimática dos fungos selecionados.

#### 5.4 DETERMINAÇÃO DE FLUBENDIAMIDA E SEUS POSSÍVEIS METABÓLITOS EM EXTRATOS DOS CULTIVOS LÍQUIDOS COM OS FUNGOS JUANT070, JUSOLCL039 E *BOTRYOSPHERIA RHODINA* MAMB-05 POR HPLC – UV.

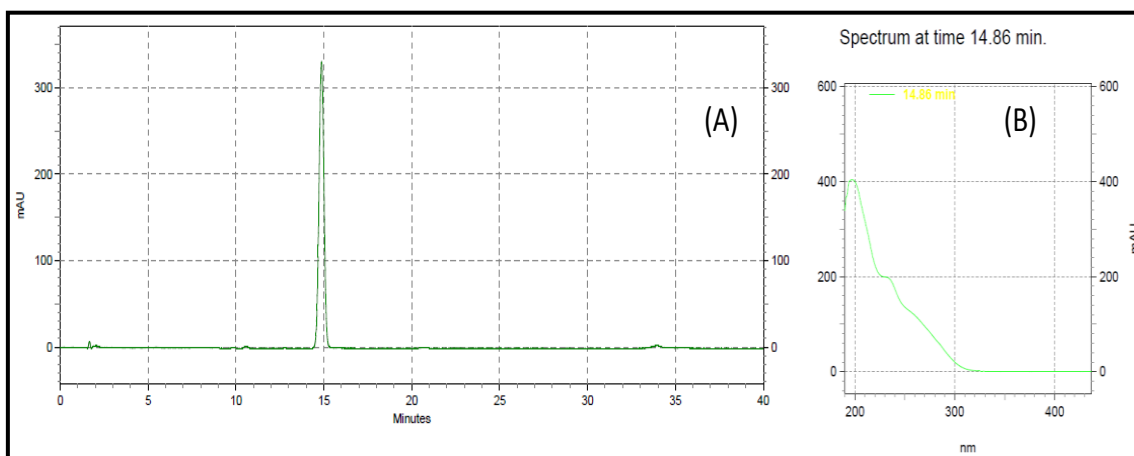
Os extratos do controle B foram analisados no laboratório da UEL (LAPA), utilizando HPLC com detector UV-PDA. Este experimento preliminar foi importante para a confirmação da presença do inseticida no método utilizado para extração dos possíveis metabólitos.

Desta maneira, os extratos do cultivo com a flubendiamida e os fungos JUANT070, JUSOLCL039 e MAMB-05 foram analisados por HPLC-UV em fase reversa, com fase móvel na proporção acetonitrila:água (60:40) no modo isocrático.

O extrato controle do inseticida apresentou um pico cromatográfico com tempo de retenção (RT) de 14.86 minutos, observado no comprimento de onda de 210 nm. (Figura 15 [A]). O perfil de absorção da flubendiamida no UV (Figura 15 [B]) demonstra que o comprimento de onda próximo a 200 nm indica o máximo de absorção por este detector.

O estudo de Das e Mukherjee (2012) avaliou a persistência da flubendiamida num solo arenoso da Índia. Após a extração do inseticida com solventes orgânicos, eles injetaram a amostra no HPLC, nas condições de fase móvel acetonitrila:água (70:30). O melhor pico da flubendiamida foi visualizado no comprimento de onda 210 nm, no tempo de retenção 10.1 minutos. Em comparação a este trabalho, os solventes utilizados permitiram extrair o

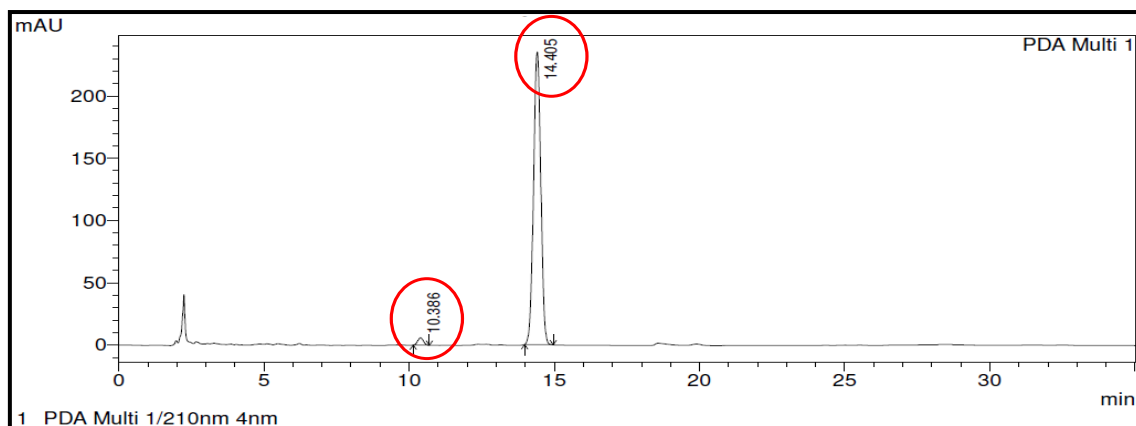
inseticida do meio líquido, e as condições aplicadas no HPLC mostraram um sinal bem definido no comprimento de onda 210 nm.



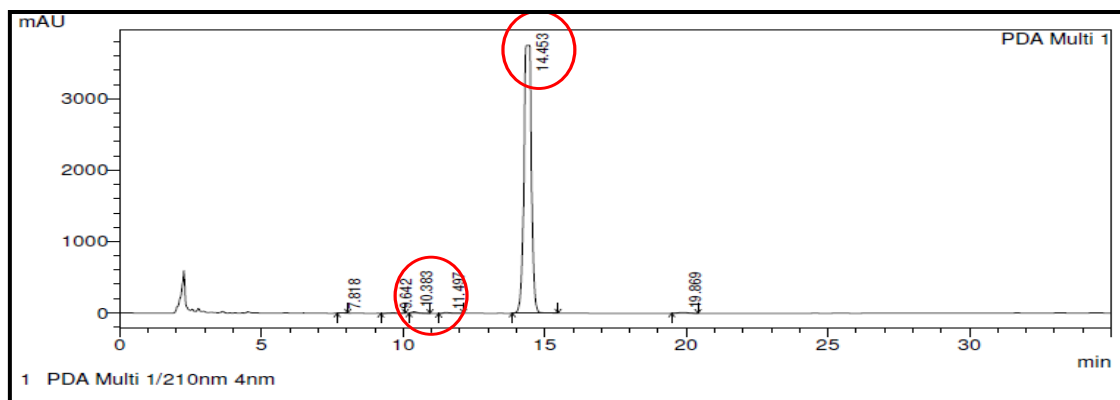
**Figura 15: Cromatograma do padrão analítico da flubendiamida (A) e perfil de absorção da flubendiamida no UV (B).**

#### 5.4.1 Identificação de metabólitos do extrato JUANT070

Após confirmar a presença da flubendiamida no controle do inseticida, foi realizada uma análise do extrato do meio líquido (Figura 16) e do micélio (Figura 17) do fungo JUANT070. Pelos cromatogramas de ambas figuras, pode-se observar dois picos, nos tempos de retenção de 10.39 e 14.41 minutos.

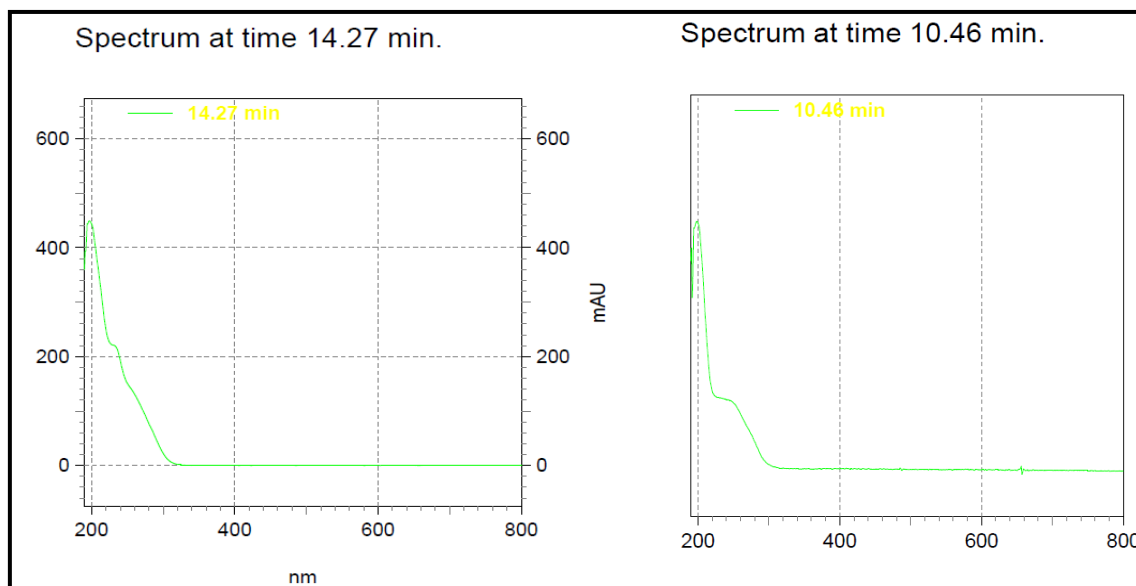


**Figura 16: Cromatograma em 210 nm do extrato da parte líquida do fungo JUANT070 cultivado com flubendiamida.**



**Figura 17: Cromatograma em 210 nm do extrato da parte do micélio do fungo JUANT070 cultivado com flubendiamida.**

A comparação com o cromatograma do extrato controle do inseticida (Figura 15) comprova que o pico de tempo 14.41 minutos é a flubendiamida. Além disso, a observação do perfil de absorção UV (Figura 18) do sinal com tempo de retenção 10.39 minutos foi semelhante ao perfil do tempo de 14.41 minutos.



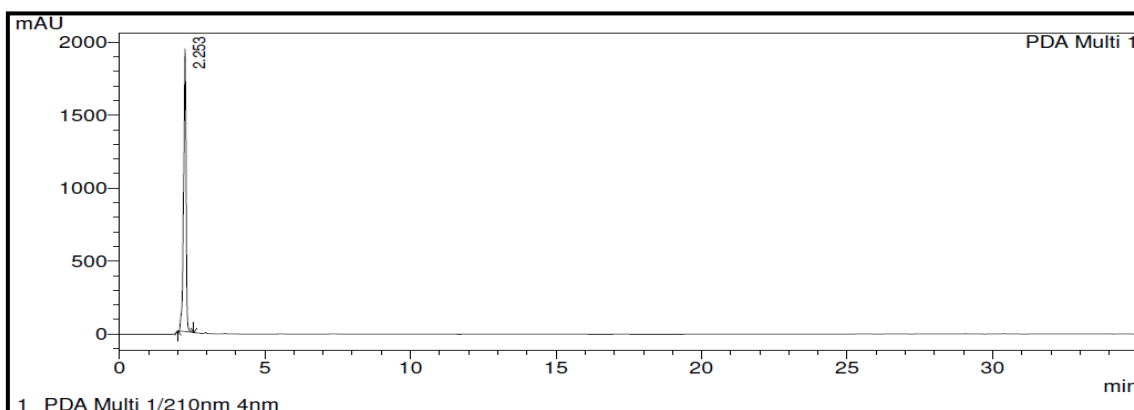
**Figura 18: Perfil de absorção no UV dos picos no tempo de retenção 14.27 e 10.46 minutos.**

A análise do extrato controle do fungo (meio + fungo) não mostrou nenhum sinal próximo aos tempos de retenção 10.39 e 14.41 minutos (Figura 19). Isto significa que o meio de cultivo e o fungo JUANT070 não foram responsáveis pelo sinal em 14.41 minutos.

Além disso, o sinal obtido nas Figuras 26 e 27 no tempo de retenção 10.39 minutos não aparecem nos cromatogramas do controle do inseticida e no



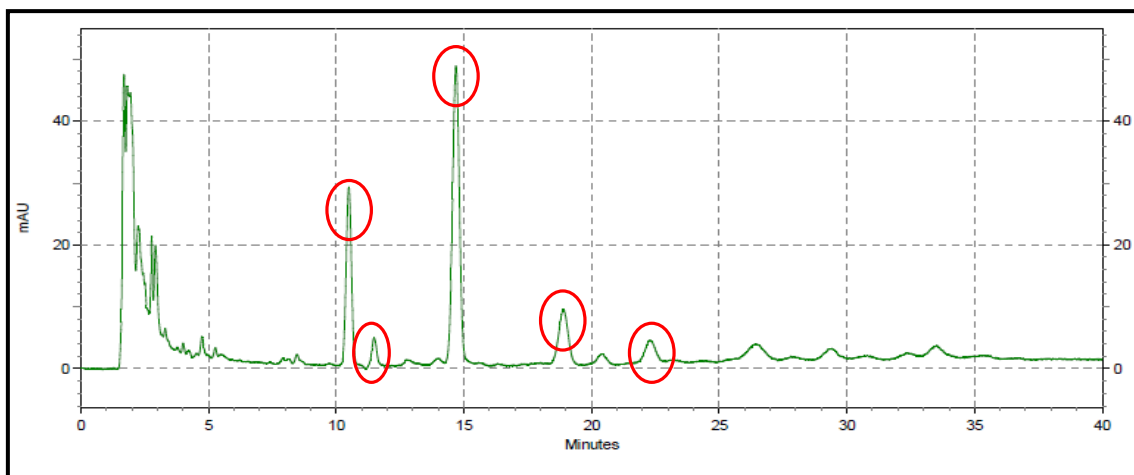
controle do fungo. Por isso, pode-se considerar um provável metabólito deste pesticida.



**Figura 19: Cromatograma em 210 nm do controle do fungo JUANT070.**

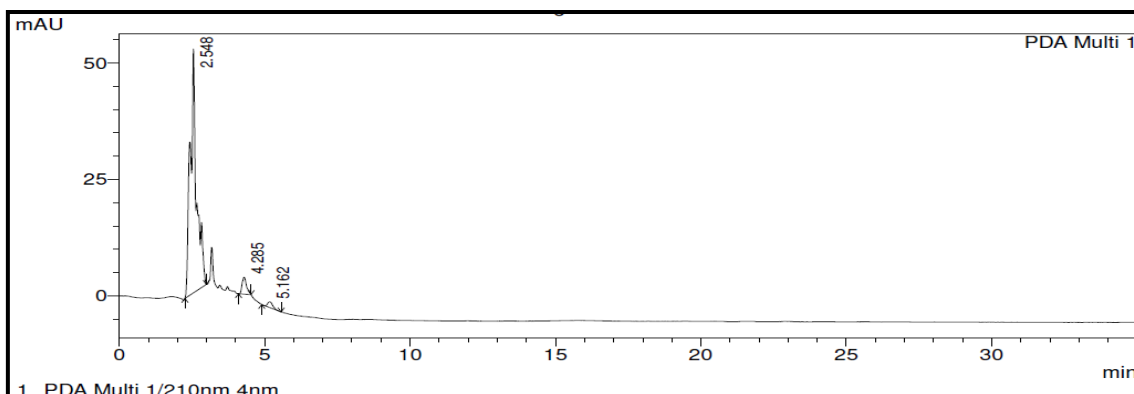
#### 5.4.2 Identificação de metabólitos do extrato JUSOLCL039

O extrato do fungo JUSOLCL039 referente ao cultivo em meio com flubendiamida revelou 5 picos significativos no cromatograma da Figura 20. Os tempos de retenção foram: 10.28, 11.50, 14.40, 18.89 e 22.29 minutos.



**Figura 20: Cromatograma em 210 nm do extrato da parte líquida do fungo JUSOLCL039, cultivado com flubendiamida.**

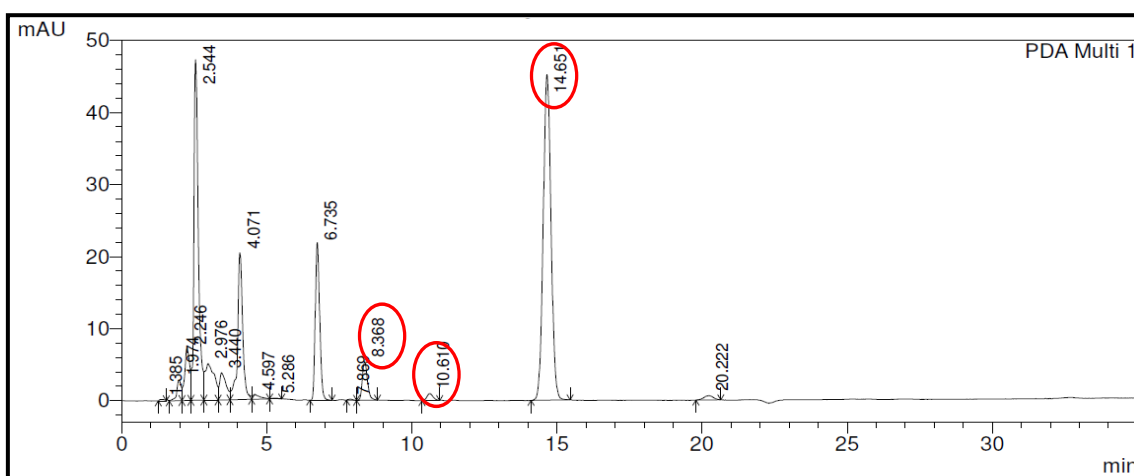
De acordo com o cromatograma do extrato controle do fungo (meio + fungo), não foi evidenciado sinal próximo aos tempos de retenção 10.28, 11.50, 14.40, 18.89 e 22.29 minutos (Figura 21). Ou seja, os cromatogramas do controle do inseticida e no controle do fungo indicam que os picos com RT 10.28, 11.50, 18.89 e 22.29 são prováveis metabólitos.



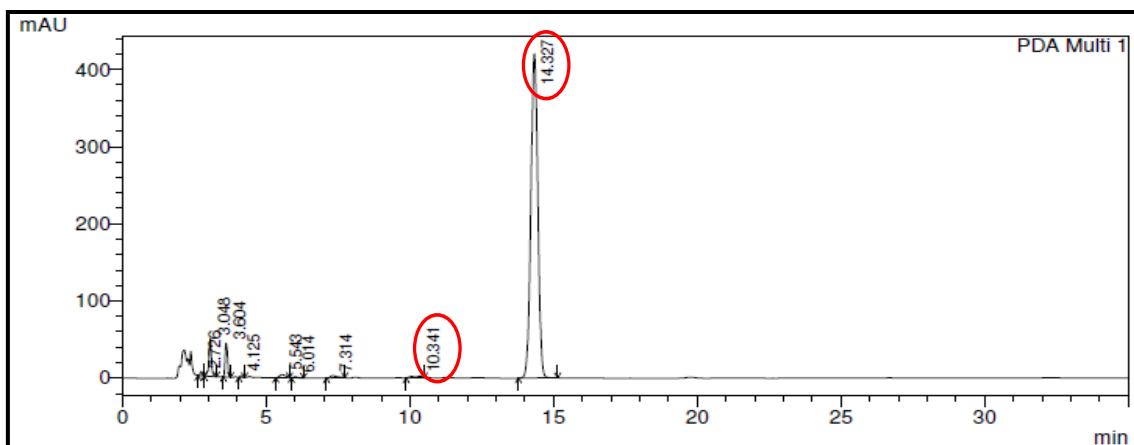
**Figura 21: Cromatograma em 210 nm do extrato controle do fungo JUSOLCL039.**

#### 5.4.3 Identificação de metabólitos do extrato MAMB-05

O extrato do fungo *B. rhodina* cultivado com flubendiamida apresentou sinais cromatográficos semelhantes na parte líquida (Figura 22) e no micélio (Figura 23). Os tempos de retenção 14.65 minutos do extrato do cultivo e o extrato do cultivo micélio são semelhantes ao do extrato do controle B. Os cromatogramas também revelaram um sinal no tempo de 10.61 minutos no extrato da parte líquida e 10.34 minutos no extrato do micélio.

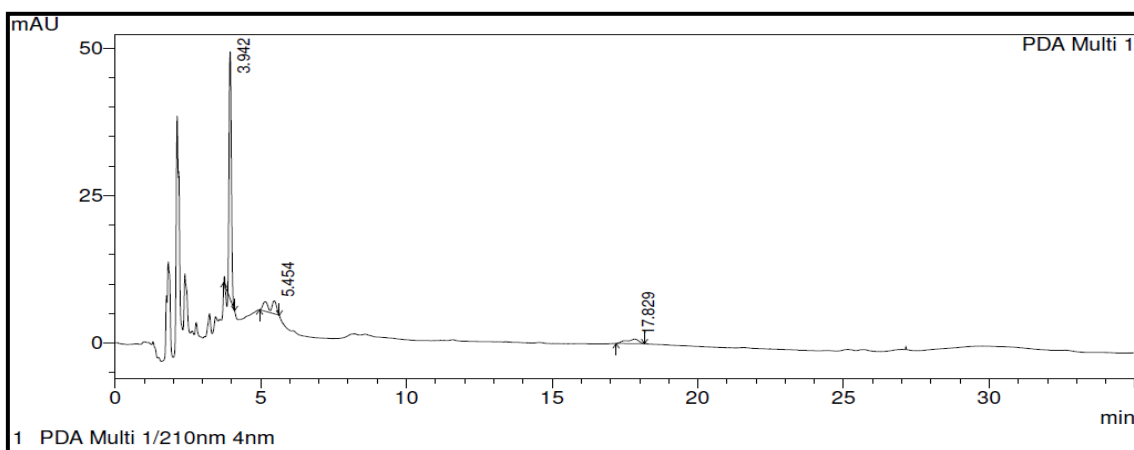


**Figura 22: Cromatograma em 210 nm do extrato da parte líquida do fungo MAMB-05, cultivado com flubendiamida.**



**Figura 23: Cromatograma em 210 nm do extrato da parte do micélio do fungo MAMB-05, cultivado com flubendiamida.**

De acordo com os estudos feitos por BATTU et. al. (2008), utilizando HPLC nas mesmas condições, obtiveram um pico correspondente ao metabólito desiodo flubendiamida no tempo de retenção 7.99 minutos. Além disso, o cromatograma do controle do fungo (Figura 24) não indicou sinais entre o tempo de retenção entre 7 e 15 minutos, reforçando os metabólitos encontrados no cultivo do fungo com flubendiamida, com RT 10.49 e 8.33 minutos.



**Figura 24: Cromatograma em 210 nm do extrato controle do fungo *B. rhodina*.**

Portanto, a visualização da presença do inseticida flubendiamida foi constatada em todos os extratos. Além disso, foram observados possíveis metabólitos nos extratos dos cultivos com os fungos JUANT070, JUSOLCL039 e *B.rhodina*, com tempo de retenção distintos do controle do inseticida e controle do fungo.

O método de extração da flubendiamida com acetato de etila foi eficiente e detectou os metabólitos das amostras. Portanto, os extratos dos cultivos dos fungos JUANT070, JUSOLCL039 e *B. rhodina* foram avaliados em LC-MS/MS, em alta sensibilidade e com detector de massas.

## 5.5 ANÁLISE DOS METABÓLITOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO UTILIZANDO CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

### 5.5.1 Determinação das condições de ionização utilizando o padrão analítico de flubendiamida

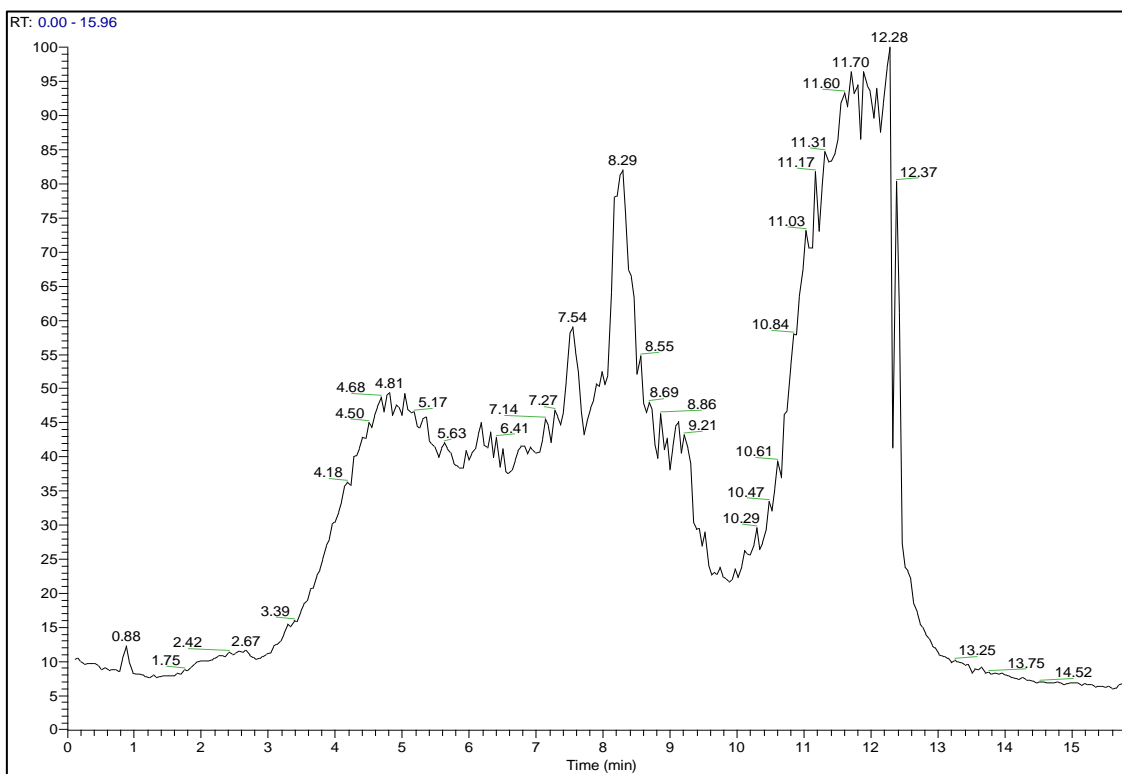
A detecção no HPLC do inseticida flubendiamida e alguns metabólitos presentes nos extratos possibilitou a realização do estudo de identificação e análises, a partir da espectrometria de massas. Desta maneira, este experimento foi efetuado no laboratório da USP – São Carlos, em parceria com o projeto do Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho – DQ/UFSCar. Foi utilizado o equipamento de cromatografia líquida, acoplada a um espectrômetro de massas LTQ Orbitrap Velos, com uma fonte de ionização de eletrospray (ESI).

A avaliação das amostras foi precedida por uma análise do composto padrão da flubendiamida, a fim de compreender o modo de ionização da amostra. Pela fonte ESI, pode-se operar tanto no modo positivo quanto no modo negativo. O sucesso do processo depende da afinidade protônica do analito. No modo negativo, a afinidade por prótons da fase móvel (eluente) deverá ser menor do que o analito, de maneira que o analito irá doar o próton para o eluente. Neste caso, corresponderá ao analito desprotonado, ou seja, com uma unidade de massa a menos que o íon molecular, o que permite a determinação da massa molecular do analito. No modo positivo, o analito precisa ter uma afinidade por prótons maior do que o eluente, de maneira que o analito irá abstrair o próton dele, e ficará com uma unidade de massa a mais (LANÇAS, 2009).

O TIC é um cromatograma criado pela soma das intensidades de todos os picos espectrais de massa pertencentes ao mesmo scan. Desta forma, o cromatograma de íons totais (TIC) do padrão flubendiamida foi realizado no

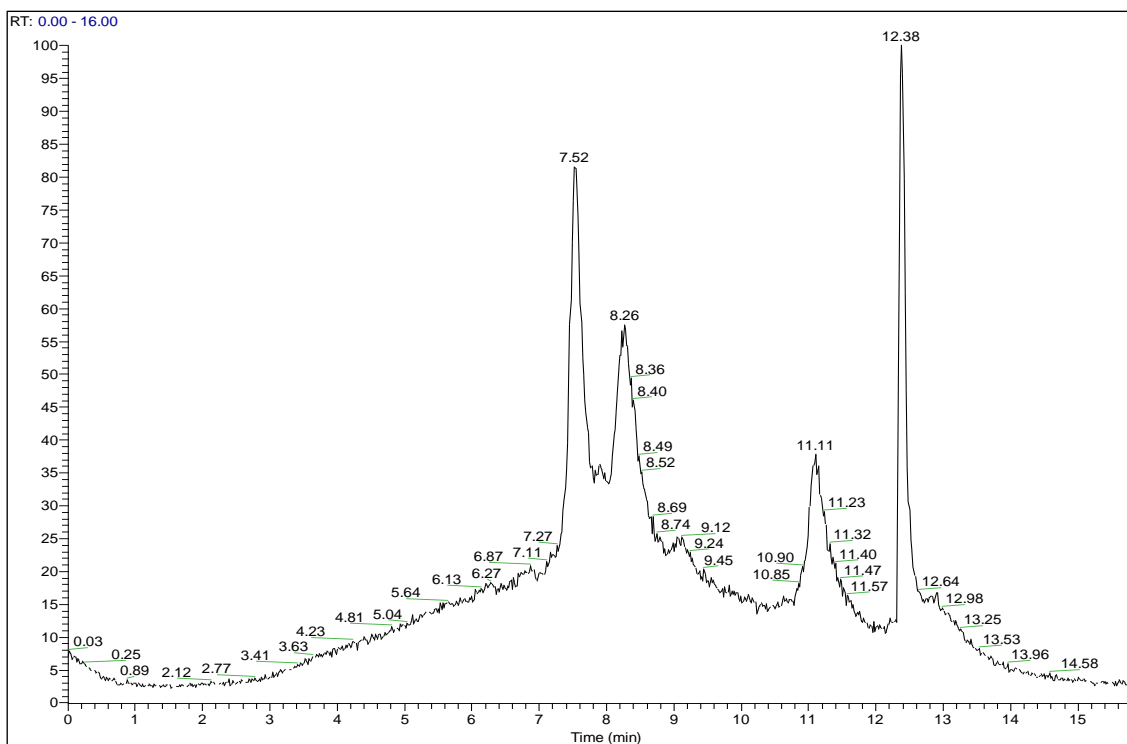
modo ESI positivo (ESI+) e ESI negativo (ESI-), para determinar a forma de ionização das amostras. em seguida avaliou-se o espectro de massas de ambos.

Foi desempenhado o TIC no modo ESI positivo entre 0 e 15 minutos de varredura (Figura 25). Neste cromatograma, foram detectadas todas as substâncias com massa entre 200-2000, visto que o composto padrão do inseticida apresenta massa exata de 682.01494 ( $C_{23}H_{22}F_7IN_2O_4S$ ).



**Figura 25: TIC no modo ESI-positivo do composto padrão de flubendiamida.**

Da mesma maneira, o teste utilizando o modo de ionização ESI negativo apresentou um cromatograma de íons totais referentes ao intervalo de 0 – 15 minutos, cuja varredura detectou todas as substâncias com massa entre 200 – 2000 (Figura 26).



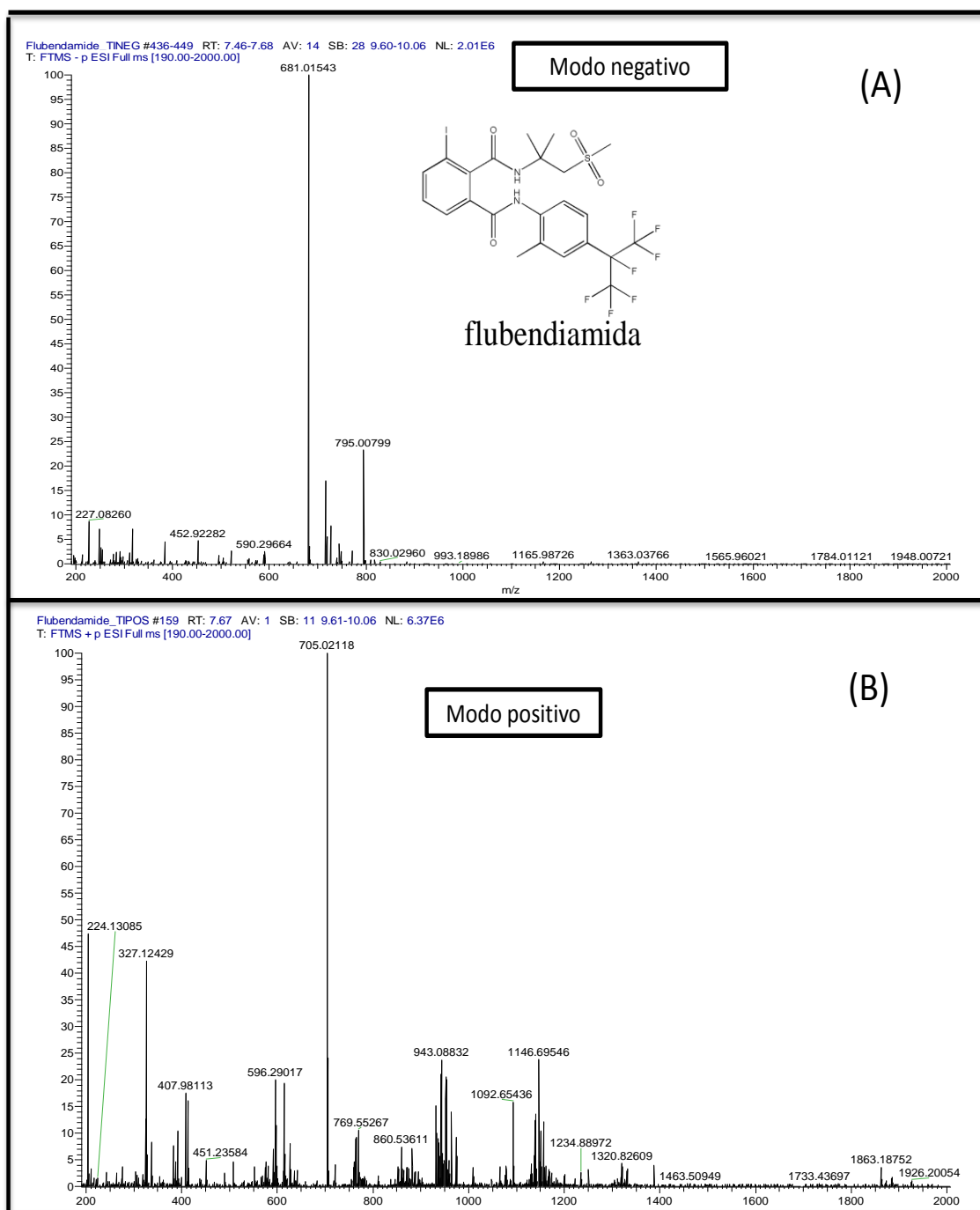
**Figura 26: Cromatograma de íons totais do padrão flubendiamida no modo ESI negativo.**

A partir do TIC nos modos de ionização positivo e negativo, foi necessário avaliar o espectro de massa de ambos, para assim verificar em qual método se encontra o composto padrão da flubendiamida. Processando o TIC obteve-se o espectro de massas da Figura 27.

A comparação dos espectros de massa obtidos na ionização por eletrospray foi realizada nos modos positivo e negativo. Desta forma, o espectro de massas no modo ESI negativo (Figura 27[[A]) obteve uma massa de 681.01543 na forma desprotonada ( $[M-H]^-$ ), o que equivale a massa de 682.01543 na forma neutra, com baixo erro em comparação à massa teórica/exata da flubendiamida (682.39007).

Entretanto, o modo de ionização positivo (Figura 27[B]) não detectou nenhum composto com  $[M+H]^+ = 683.01543$ , cuja massa revelaria a presença da flubendiamida. O tempo de retenção analisado no modo de ionização negativo foi 7.46 – 7.68 e no positivo foi 7.67 minutos.

Portanto, ambos os íons formados no modo negativo e positivo foram avaliados, mas devido a sua característica estrutural, o modo negativo gerou mais informações correspondentes a flubendiamida, e assim foi o modo de ionização escolhido neste trabalho.

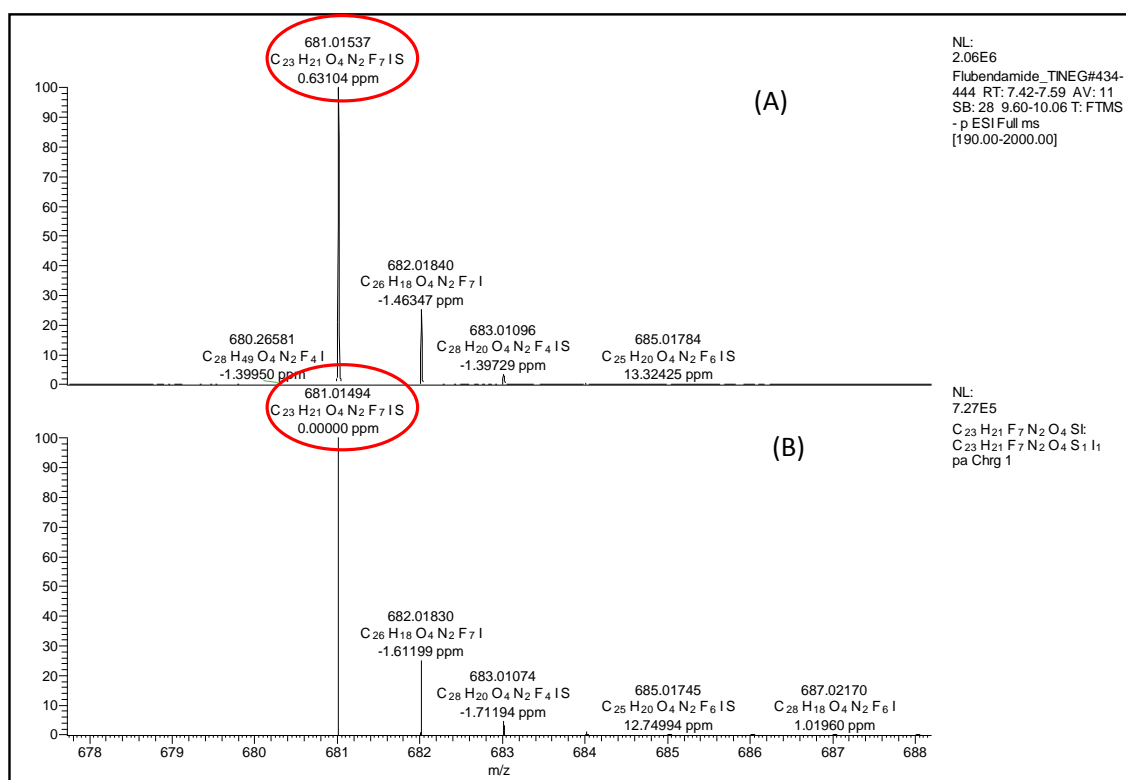


**Figura 27: Comparação dos espectros de massas obtidos pela ionização por eletrospray no modo negativo (A) RT:7.46 – 7.68; e positivo (B) RT: 7.67.**

O equipamento de massas opera em alta resolução e o espectro da Figura 28 mostra o padrão isotópico ( $^{12}\text{C}$  e  $^{13}\text{C}$ ) com os erros de cada fórmula proposta. A análise foi especificada em alta resolução para o intervalo de massas 678 – 688, no tempo de retenção encontrado para a flubendiamida

(RT: 7.42 -7.59 minutos). A Figura 28 [A] expressa o espectro de massas da amostra padrão neste intervalo, e compara com a massa simulada da flubendiamida, de forma molecular  $C_{23}H_{22}F_7IN_2O_4S$  (Figura 40 [B]).

Portanto, pode-se notar que a massa do composto padrão analisado ( $m/z = 681,01537$ ) possui um erro muito baixo da flubendiamida (0.63104 ppm) em relação a sua forma teórica, baseando-se em sua forma molecular ( $m/z = 681.01494$ ).



**Figura 28: Comparação do espectro de massas no intervalo de massa 678 – 688, no tempo de retenção entre 7.42 – 7.59 minutos. (A): Massas obtidas do composto padrão com ionização negativa; (B): Massa simulada da flubendiamida, a partir da sua formula molecular.**

### 5.5.2 Determinação do tempo de retenção da flubendiamida e desiodo-flubendiamida

A identificação dos metabólitos foi realizada através da comparação entre os espectros de massas obtidos por LC-MS do extrato: 1) do controle do inseticida (meio de cultivo + flubendiamida); 2) do controle do fungo (meio de cultivo + fungo); 3) dos fungos selecionados (cultivados com flubendiamida).

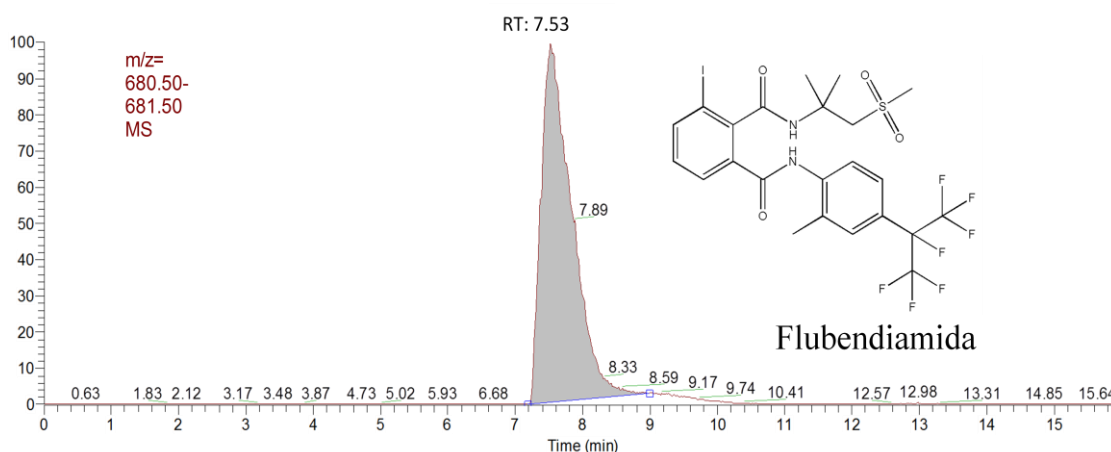


Primeiramente foi analisado quais metabólitos são provenientes da amostra do controle do inseticida. Nesta análise, foram identificados 2 picos no cromatograma de íons totais (TIC), que apresentaram tempo de retenção (RT) 7.08 e 7.53 minutos.

A partir destes valores, o espectro de massas no modo de ionização negativo demonstrou apenas duas massas:  $m/z$  681 e  $m/z$  555, as quais correspondem aos dois tempos de retenção observados no TIC do controle do inseticida.

Desta forma, a análise entre as massas e o tempo de retenção foi realizada através do cromatograma de íons selecionados (SIC). Este cromatograma relaciona o íon preterido ( $m/z$ ) com o seu tempo de retenção correspondente (min). Isto permite a detecção de sinais em uma proporção massa-carga muito específica.

O íon  $m/z$  681 corresponde ao tempo de retenção de 7.53 minutos (Figura 29), e foi identificado como a flubendiamida.

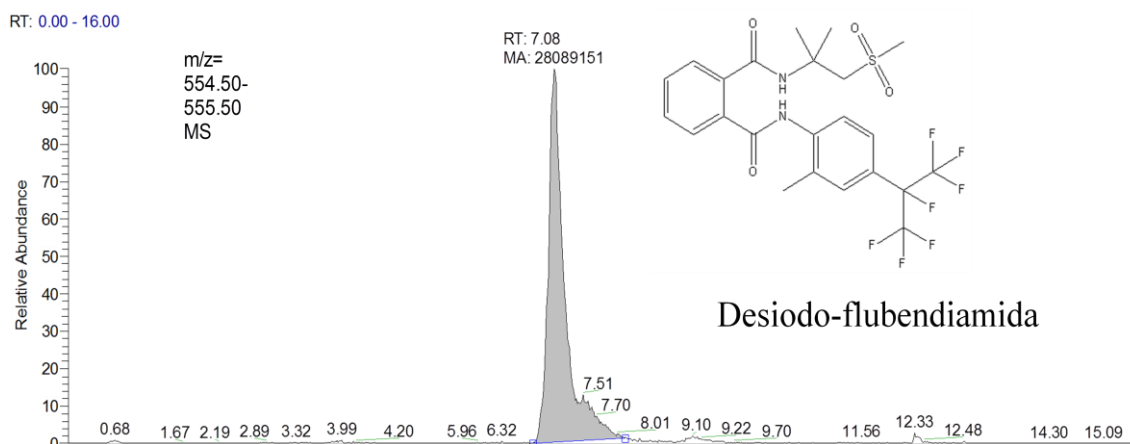


**Figura 29: Cromatograma de íon selecionado, indicando que a massa de  $m/z$  681 corresponde ao tempo de retenção 7.53 minutos e é a flubendiamida.**

A identificação da flubendiamida por LC-MS colabora com os resultados de Chen et. al. (2014), que foi visualizada no estudo de degradação deste inseticida em repolho e solo, utilizando o cromatograma de íons selecionados como ferramenta.

O metabólito desiodo-flubendiamida foi detectado em estudos de degradação em repolho, tomate, feijão, pimentão e solo (PARAMASIVAM E BANERJEE, 2011; BATTU et al., 2012; BATTU et al., 2008). Por isso, sua presença no extrato foi verificada pelo cromatograma de íons selecionados.

Com massa  $m/z$  555 ( $C_{23}H_{23}N_2O_4F_7$ ), sua detecção foi confirmada pelo SIC, conforme a Figura 30. O desiodo flubendiamida apresentou tempo de retenção de 7.08 minutos. Ele já foi reportado como um metabólito primário da de fototransformação da nos estudos de Hartung et. al. (2013), detectado em solo japonês.



**Figura 30: Cromatograma de íon selecionado, indicando que a massa de  $m/z$  555 corresponde ao tempo de retenção 7.08 minutos e é o metabólito desiodo-flubendiamida.**

Concluindo, como o metabólito desiodo-flubendiamida foi detectado no controle do inseticida, não foi considerado como produto de biotransformação.

### 5.5.3 Determinação dos metabólitos de biotransformação do isolado JUANT070 extraído do meio líquido

Os extratos do cultivo em meio líquido do isolado JUANT070 foram analisados por LC-MS. Os espectros de massa dos extratos obtidos do cultivo dos isolados fúngicos com a flubendiamida foram comparados com o: 1) extrato controle B (controle do inseticida: meio de cultivo + flubendiamida); e 2) extrato controle A (controle do fungo: meio de cultivo + fungo).

A verificação dos metabólitos oriundos da biotransformação ou produzidos pelo fungo na presença do inseticida foi realizada através de uma varredura dos íons, nas triplicatas das amostras. Foram comparados primeiramente com os íons do controle do inseticida, e os íons iguais foram desconsiderados. Após esta etapa, os íons mais abundantes foram comparados com o controle do fungo. A Figura 31 apresenta os

cromatogramas de cada íon selecionado do extrato do fungo JUANT070 com flubendiamida. Os cromatogramas A, B, C, E, F e G apresentaram diferentes tempos de retenção. Isto significa que provavelmente possuem a mesma fórmula molecular do metabólito, porém com estruturas diferentes.

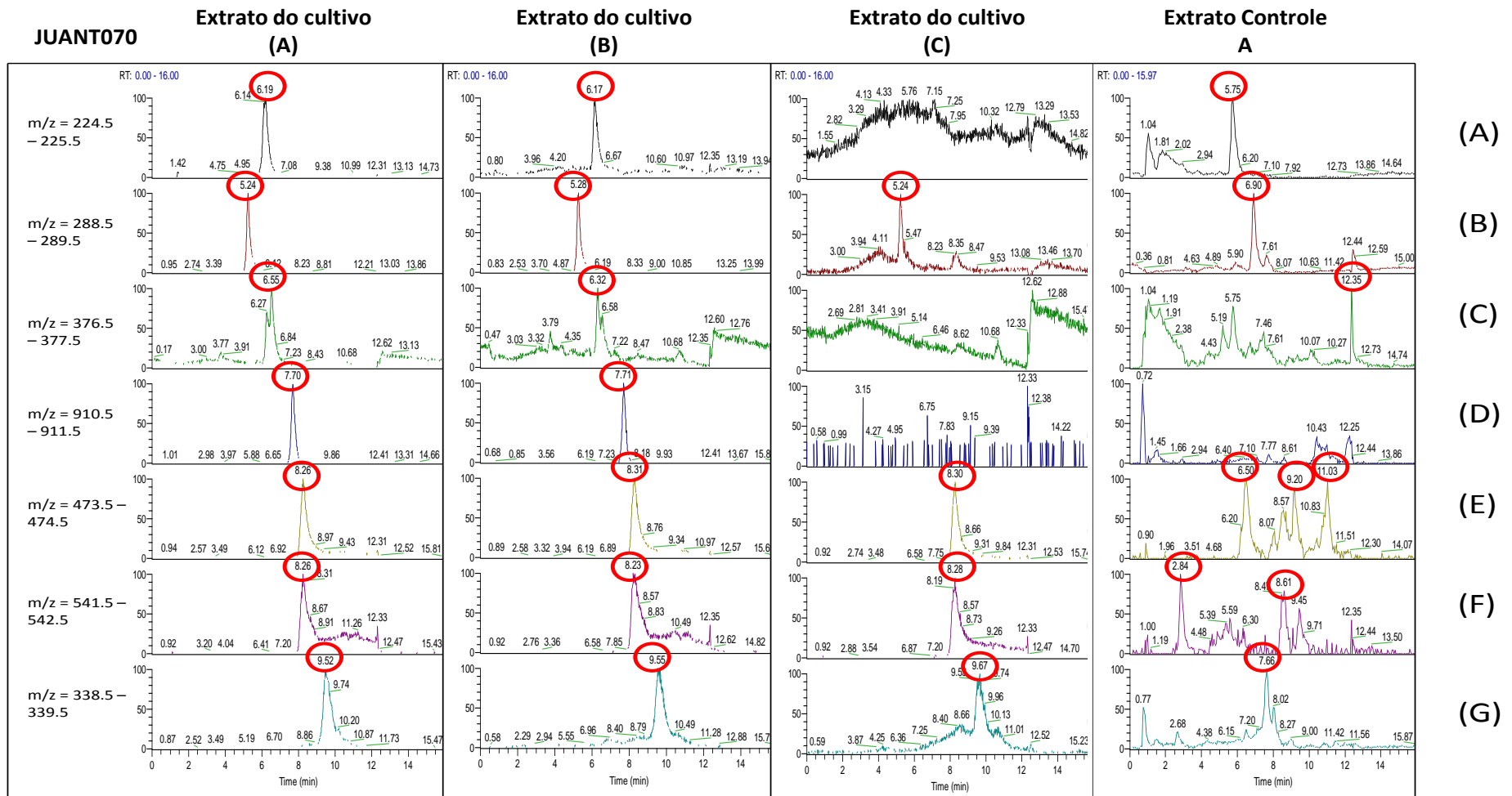


Figura 31: Cromatograma de íons selecionados dos extratos obtidos da parte líquida do cultivo do fungo JUANT070 em meio com flubendiamida, em triplicata I, II e III, comparados com o SIC do extrato controle do fungo, a partir dos m/z: A) 225. B) 289. C) 377. D) 911. E) 474. F) 542. G) 339.

Os íons resultantes depois da comparação com o controle do fungo foram listados na Tabela 13:

**Tabela 13: Metabólitos oriundos da biotransformação ou produzidos pelo isolado JUANT070 induzidos pelo inseticida.**

Metabólito	m/z	Tempo de retenção (min)
1	225	6.17 – 6.19
2	289	5.24 - 5.28
3	339	9.52 - 9.55
4	377	6.27 - 6.32
5	474	8.26 - 8.31
6	542	8.23 - 8.28
7	911	7.70 - 7.71

Com isso, pode-se considerar que os íons de massas da Tabela 13 são produtos de biotransformação ou biossintetizados pelo fungo JUANT070 na presença do inseticida. Isso pode ser comprovado pela Figura 43, que expressa o cromatograma de íons selecionados destes metabólitos nas triplicatas do cultivo, mostrando a comparação e diferenciação do tempo de retenção dos metabólitos contidos nas amostras e no extrato controle A.

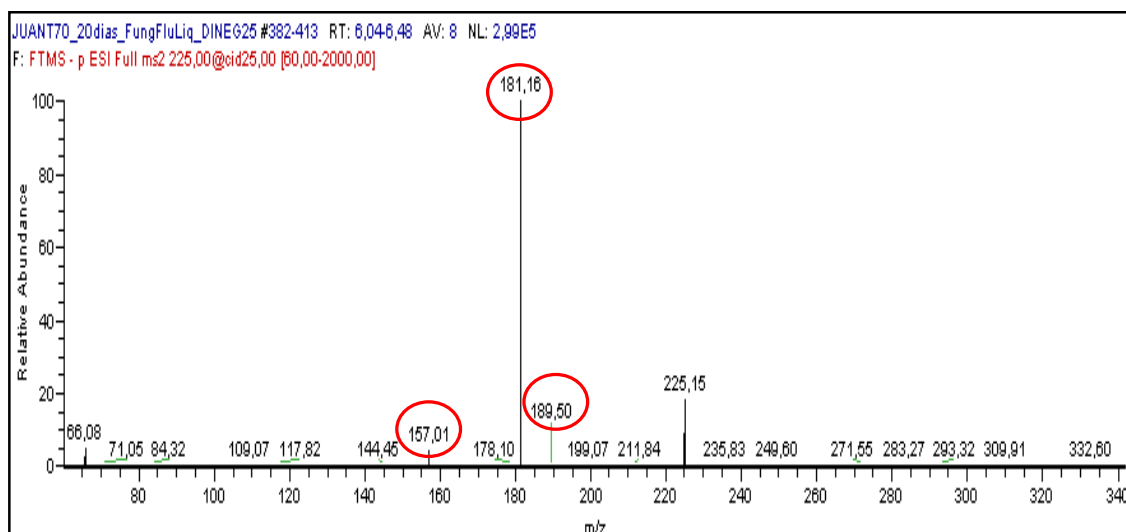
#### *5.5.3.1 Espectrometria de massas do meio líquido JUANT070 usando a técnica Tandem, MS/MS ou MS<sup>2</sup>*

Os metabólitos encontrados no cultivo do fungo JUANT070 em meio líquido foram analisados por espectrometria de massas em sequência, conhecido como MS/MS ou espectrometria de massas Tandem. Esta espectrometria foi baseada em três estágios: 1) seleção de um íon precursor

(chamado assim pois dele serão formados outros íons); 2) ruptura deste íon para gerar íons-fragmentos; 3) detecção de fragmentos (DASS, 2007).

Para a obtenção dos fragmentos, foi efetuada a dissociação induzida por colisão (CID), com a câmara de colisão preenchida com o gás inerte argônio. Para a formação do fragmento, a quantidade de energia utilizada variou para cada íon, pois cada metabólito responde de forma distinta diante da quantidade de energia utilizada para a fragmentação.

Todos os metabólitos da Tabela 13 foram submetidos a técnica Tandem, nas energias de colisão 10, 20, 25 e 30%, porém somente o íon 225 foi fragmentado. A Figura 32 apresenta o espectro de massas Tandem deste íon, executado no modo de ionização negativa e com energia de colisão aplicada em 25%.



**Figura 32: Espectro de massas do tipo TANDEM do íon de massa m/z 225.**

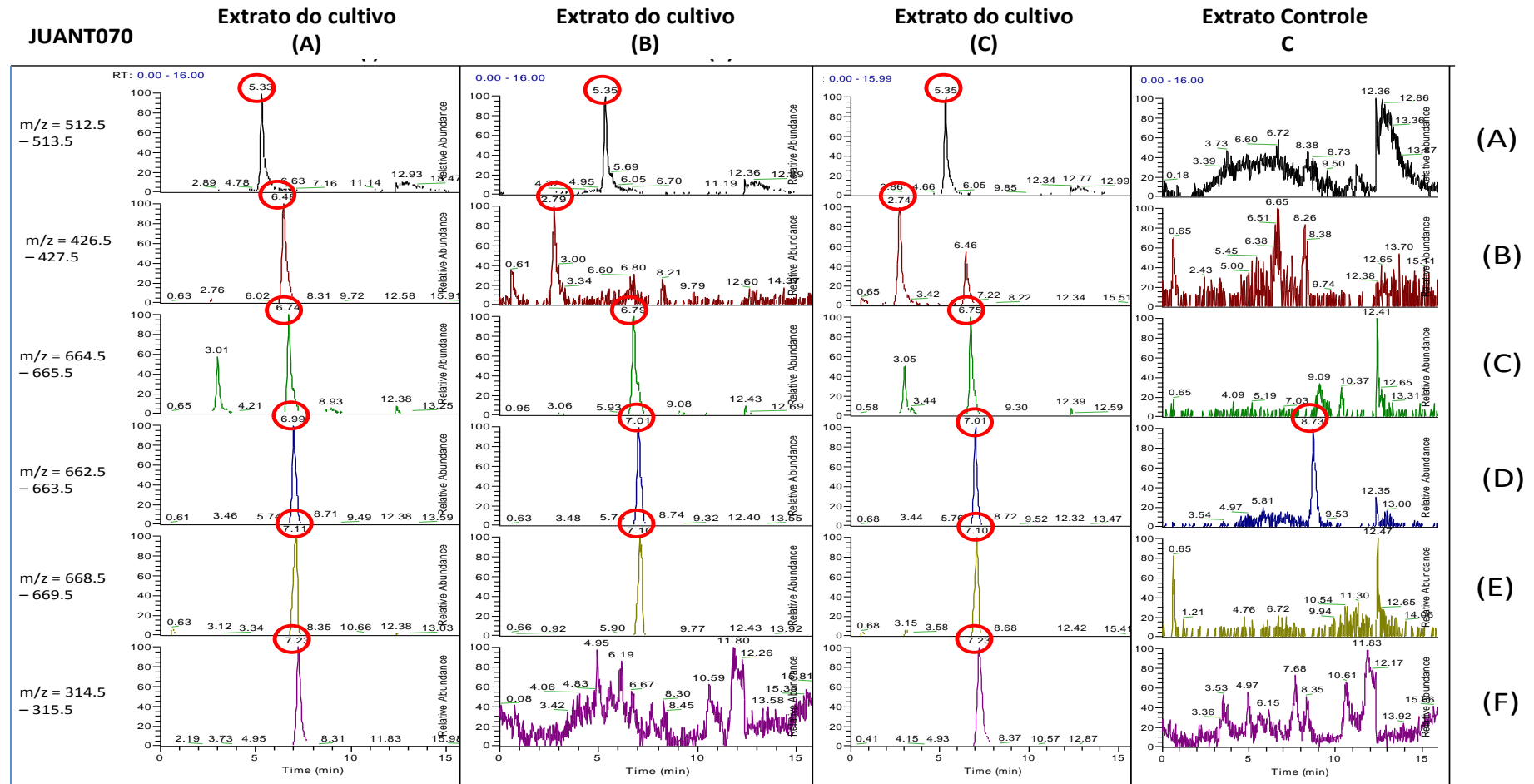
Diante do espectro de massas da Figura 32, foram formados os fragmentos m/z 157.01, 181.16 e 189.50. O íon molecular m/z 225,15 também foi detectado, relativo ao pico com maior valor de m/z.

A determinação estrutural desse produto de biotransformação ou metabólito induzido pelo fungo está em fase de análise. Portanto, o cultivo utilizando o fungo JUANT070 foi capaz de formar diversos metabólitos referentes à biotransformação do inseticida ou produzidos pelo fungo em estímulo às condições impostas no cultivo. A estrutura do metabólito com íon de massa m/z = 225 ainda não foi proposto.

#### 5.5.4 Determinação dos metabólitos de biotransformação do cultivo com o isolado JUANT070 extraído do micélio

Os cromatogramas dos extratos do micélio obtidos do cultivo do JUANT070 com a flubendiamida foram comparados com o controle do fungo e o controle do inseticida.

Primeiramente foi realizado uma varredura e selecionou-se algumas massas que não continham no controle. Estes foram submetidos ao cromatograma de íons selecionados. A Figura 33 apresenta os cromatogramas de íons selecionados dos metabólitos obtidos.



**Figura 33: Cromatograma de íons selecionados dos extratos obtidos da parte micelial do cultivo do fungo JUANT070 em meio com flubendiamida, em triplicata A, B e C, comparados com o SIC do extrato controle do fungo, a partir dos m/z: A) 513. B) 427. C) 665. D) 663. E) 669. F) 315.**



De acordo com os resultados, há íons que apresentaram a mesma massa nos extratos com cultivo do fungo com flubendiamida e no controle C. Porém, a massa pode ser igual, mas a estrutura é diferente. O metabólito 10, com íon selecionado no cromatograma com massa m/z 513, apresentou tempo de retenção 5.33, 5.35 e 5.35 minutos na triplicata I, II e III. Assim como este íon, outros contendo massa m/z 315, 427, 663, 665 e 669 se diferenciaram estruturalmente do extrato controle C. Portanto, são referentes a produtos de biotransformação ou induzidos pelo fungo com flubendiamida.

Os íons resultantes depois da comparação com o controle foram listados na Tabela 14.

**Tabela 14: Metabólitos do micélio oriundos da biotransformação do inseticida ou produzidos pelo isolado JUANT070.**

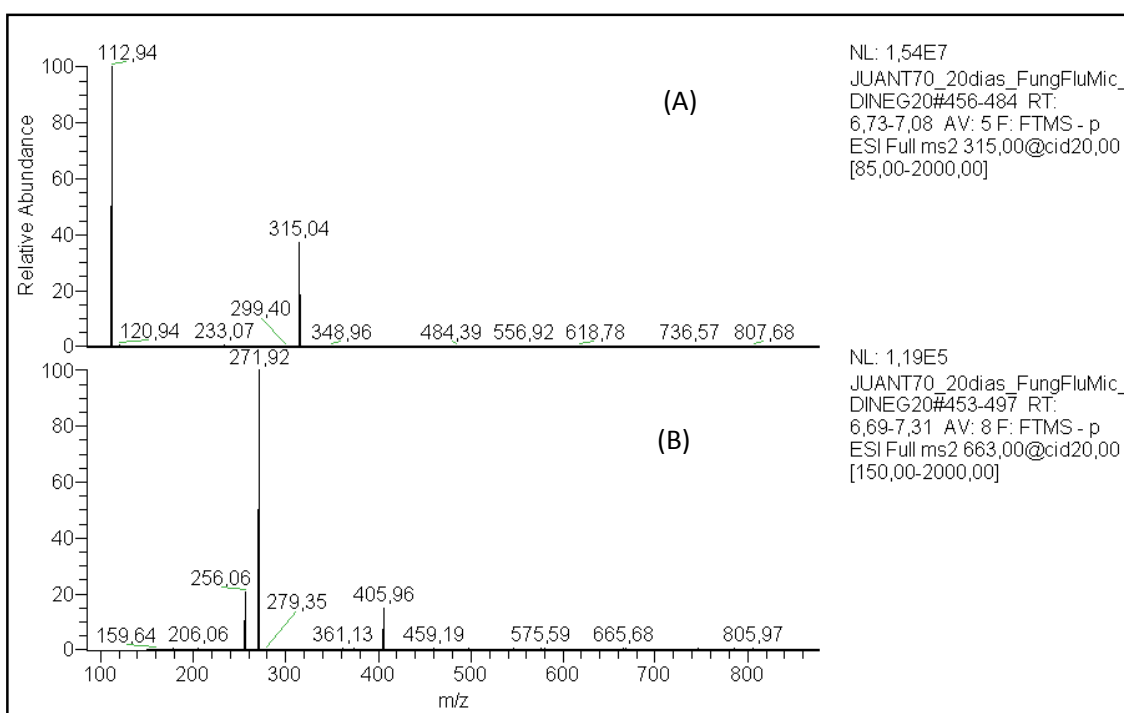
<b>Metabólito</b>	<b>m/z</b>	<b>Tempo de retenção (min)</b>
<b>8</b>	315	7.23
<b>9</b>	427	6.46 – 6.48
<b>10</b>	513	5.33 – 5.35
<b>11</b>	663	6.99 – 7.01
<b>12</b>	665	6.74 – 6.79
<b>13</b>	669	7.10 – 7.11

#### 5.5.4.1 Espectrometria de massas do micélio do fungo JUANT070 usando a técnica Tandem, MS/MS ou MS<sup>2</sup>

Após a detecção de 6 metabólitos nos extratos do micélio do isolado JUANT070, foi realizada uma análise por espectrometria de massas Tandem.

Todos os íons foram fragmentados e somente os íons  $m/z = 315$  e  $663$  apresentaram resultados de fragmentação. Estes foram executados no modo de ionização negativa e com energia de colisão aplicada em 20%.

A Figura 34 apresenta o espectro de massas Tandem.



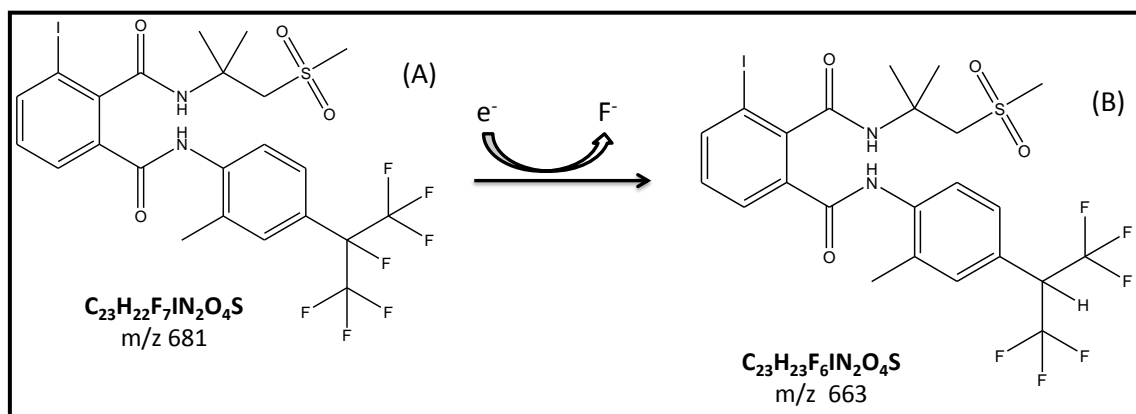
**Figura 34: Espectro de massas do tipo TANDEM do íon de massa (A):  $m/z$  315; (B):  $m/z$  663.**

O espectro de massa apresentado na Figura 34 (A) revela o íon molecular  $m/z$  315,04, e o fragmento correspondente ao pico base, de  $m/z$  112,94. A estrutura deste metabólito está em fase de análise, e até o momento concluiu-se que provavelmente este metabólito não é oriundo de biotransformação inseticida flubendiamida.

Entretanto, o espectro de massa Tandem da Figura 34 (B) mostrou a relação do íon  $m/z$  663 com a biotransformação da flubendiamida. Com uma

energia de colisão em 20%, foram observados fragmentos  $m/z$  405,96, 271,92 e 256,06.

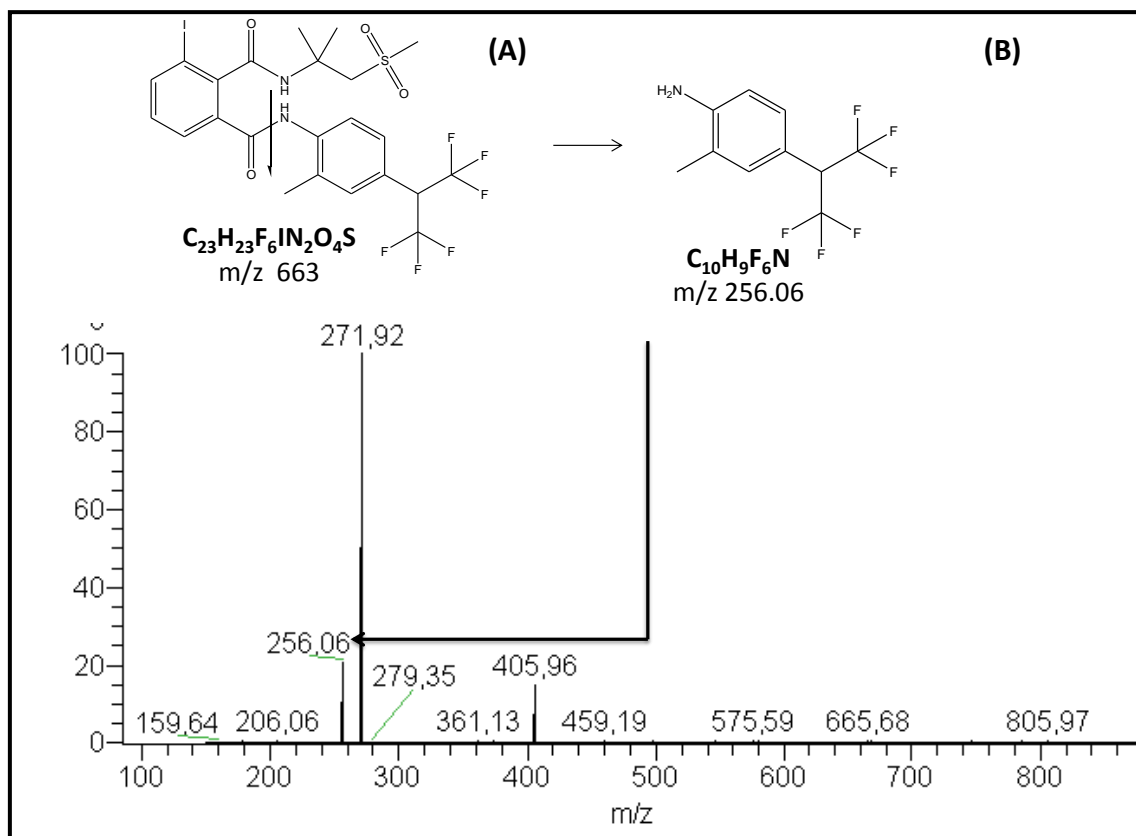
A proposta da rota de biotransformação da flubendiamida  $m/z = 681$  (Figura 35 [A]) ocorreu através da desalogenação reductiva, resultando em desfluoro-flubendiamida, de fórmula molecular  $C_{23}H_{23}F_6IN_2O_4S$ ,  $m/z = 663$  (Figura 35 [B]).



**Figura 35: Provável rota de biotransformação da flubendiamida pelo fungo JUANT070.**

A partir desses fragmentos, a provável estrutura do fragmento  $m/z$  256,06 foi proposta de acordo com as Figura 36. Na fragmentação de massas, a reação de hidrólise na amida promove a formação do fragmento  $m/z$  256,06, conforme a Figura 36, de fórmula molecular  $C_{10}H_9F_6N$ .

Portanto, a estrutura proposta, com  $m/z$  256.064 [Figura 36(B)], corresponde ao fragmento indicado no espectro de massas Tandem do íon  $m/z$  663 [Figura 36(A)]. Assim, com a perda de flúor, podemos concluir que o fungo JUANT070 foi capaz de produzir um metabólito de biotransformação do inseticida flubendiamida.



**Figura 36: Comprovação da estrutura do fragmento formado do íon m/z 663, pelo espectro de massas Tandem com elucidação do fragmento m/z 256.06.**

Portanto, a parte líquida e do micélio do fungo JUANT070 foram capazes de formarem diversos metabólitos referentes à biotransformação do inseticida ou produzidos pelo fungo em estímulo às condições impostas no cultivo. O metabólito com íon de massa m/z 663 analisado por técnica Tandem teve sua provável estrutura de biotransformação proposta.

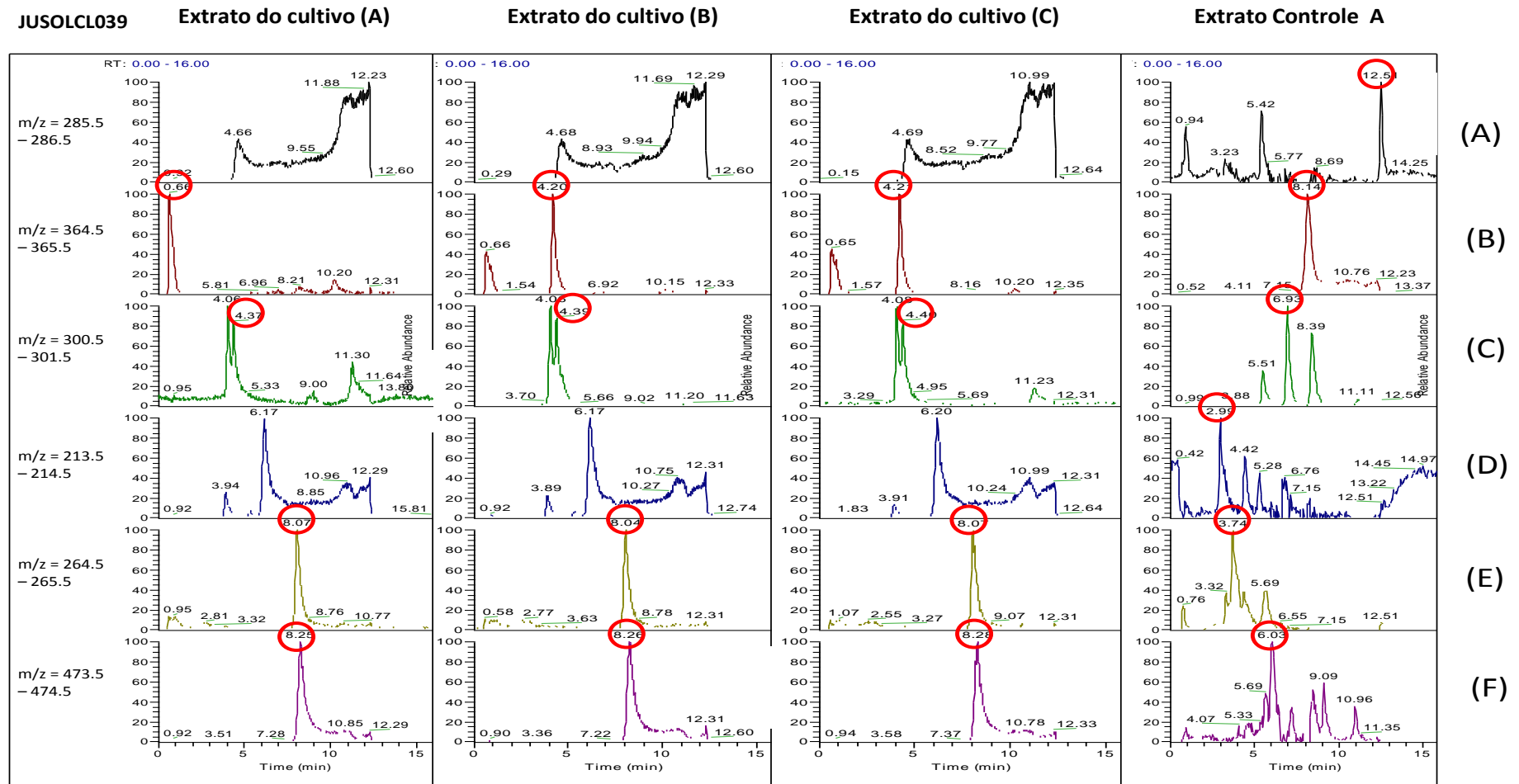
O fungo JUANT070, do gênero *Neurospora*, não foi alvo de nenhum trabalho de biotransformação da flubendiamida. Por isso, a detecção de metabólitos pode ser considerada inédita. Segundo Luke e Burton (2001), a habilidade de biotransformação do *Neurospora crassa* foi investigada para compostos fenólicos. Eles concluíram que este fungo produziu enzimas oxidases intra e extracelulares, capazes de converter esses compostos de forma eficientes.

#### 5.5.5 Determinação dos metabólitos de biotransformação do cultivo com o isolado JUSOLCL039 extraído do meio líquido

O equipamento de LC-MS também analisou com alta sensibilidade os metabólitos referentes ao extrato do cultivo em meio líquido do isolado JUSOLCL039. A comparação dos metabólitos obtidos do cultivo dos isolados fúngicos com a flubendiamida também foi realizada com os controles do inseticida e controle do fungo.

Com o intuito de avaliar se os metabólitos foram oriundos da biotransformação da flubendiamida ou foram produzidos pelo fungo na presença do inseticida, foi analisado o cromatograma de íons totais dos extratos. Então, os íons mais abundantes foram comparados com o controle do fungo e do inseticida.

A Figura 37 apresenta os cromatogramas de íons selecionados. Estes mostram tempos de retenção distintos entre as amostras em triplicata o controle. Observando os cromatogramas A até F, essa diferença nos tempos de retenção denota provavelmente um metabólito com estruturas diferentes do controle, embora apresentem picos com a mesma massa.



**Figura 37: Cromatograma dos extratos obtidos da parte líquida do cultivo do fungo JUSOLCL039 em meio com flubendiamida, em triplicata A, B e C, comparados com o SIC do extrato controle do fungo, a partir dos m/z: A) 286. B) 365. C) 301. D) 214. E) 265. F) 265. G) 474.**

Após analisar os metabólitos presentes e compará-los com o extrato controle, os íons resultantes foram listados na Tabela 15. O íon com massa  $m/z$  214 demonstrou um tempo de retenção entre 6.17 e 6.20 minutos perante o cromatograma da triplicata. Além disso, outros íons de massa  $m/z$  265, 301, 365, e 474 se diferenciaram do tempo de retenção do extrato controle A.

**Tabela 15: Metabólitos da parte líquida do cultivo oriundos da biotransformação do inseticida ou produzidos pelo isolado JUSOLCL039.**

Metabólito	$m/z$	Tempo de retenção (min)
14	214	6.17 - 6. 20
15	265	8.04 - 8.07
16	285	4.66 – 4.69 12.23 – 12.29
17	301	4.06 - 4.08 4.37 - 4.40
18	365	0.65 - 0.66 4.20 - 4.21
19	474	8.25 - 8.28

Em comparação com os metabólitos encontrados no fungo JUANT070, nenhum dos metabólitos possui a mesma massa que os metabólitos encontrados no cultivo do fungo JUSOLCL039.

Em estudos de biotransformação envolvendo os fungos do gênero *Trichoderma*, não há trabalhos que envolvam o inseticida flubendiamida. Entretanto, Ye et. al. (2009) avaliou as reações envolvidas na biotransformação de narigin (flavonóide) pelo fungo *Trichoderma harzianum*. A produção de dois

metabólitos deste estudo ocorreu devido ao processo de hidroxilação em diversas posições da cadeia do composto.

#### *5.5.5.1 Espectrometria de massas da parte líquida do fungo JUSOLCL039 usando a técnica Tandem, MS/MS ou MS<sup>2</sup>*

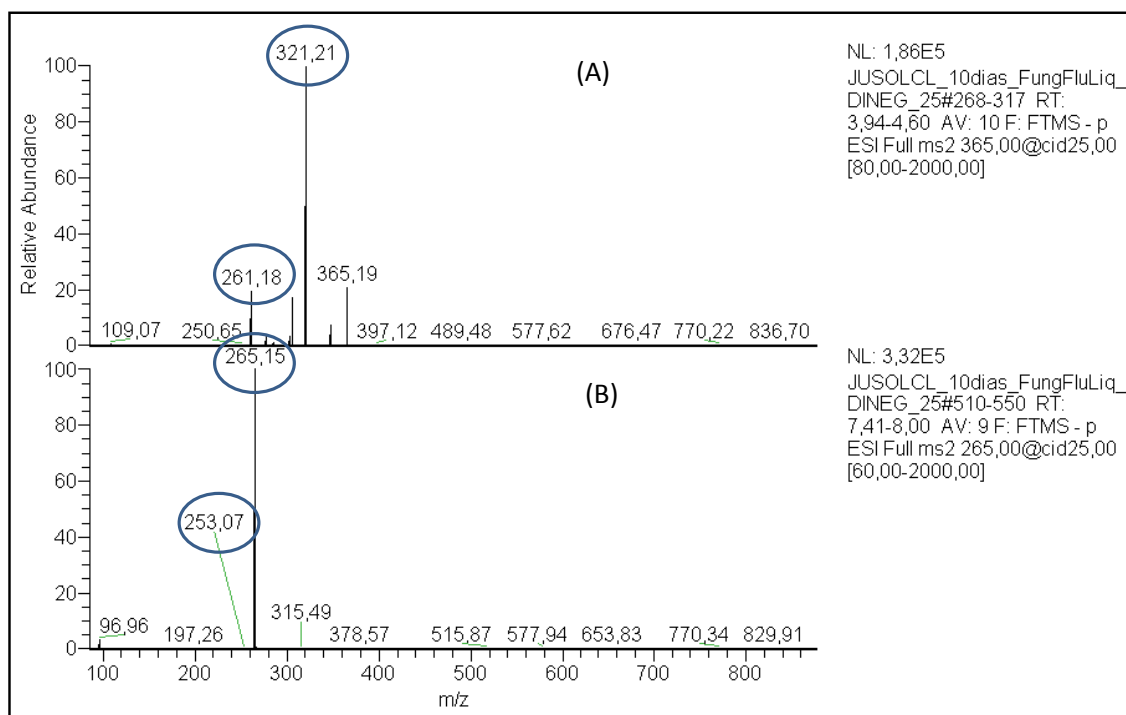
Perante os diversos metabólitos encontrados, foi realizada uma análise por espectrometria de massas Tandem.

Para este processo, todos os íons encontrados foram analisados, e somente os íons com  $m/z$  365 e  $m/z$  265 foram fragmentados por MS/MS com resultados satisfatórios. Em ambos, a dissociação induzida por colisão (CID) foi utilizada para a fragmentação dos íons, com energia de colisão em 25%.

O espectro de massa Tandem do íon  $m/z$  365 foi apresentado na Figura 38 (A). O espectro formado revela o íon molecular  $m/z$  365.19, e os fragmentos correspondentes a  $m/z$  321.21 e  $m/z$  261.18. A estrutura deste metabólito não foi elucidada.

Os fragmentos formados pela análise em Tandem para o íon  $m/z$  265 (Figura 38 [B]) demonstrou o íon molecular  $m/z$  265.15 e o fragmento  $m/z$  96.96 com pequena intensidade. Assim como o metabólito da Figura 38 (A), a estrutura deste metabólito não foi elucidada.





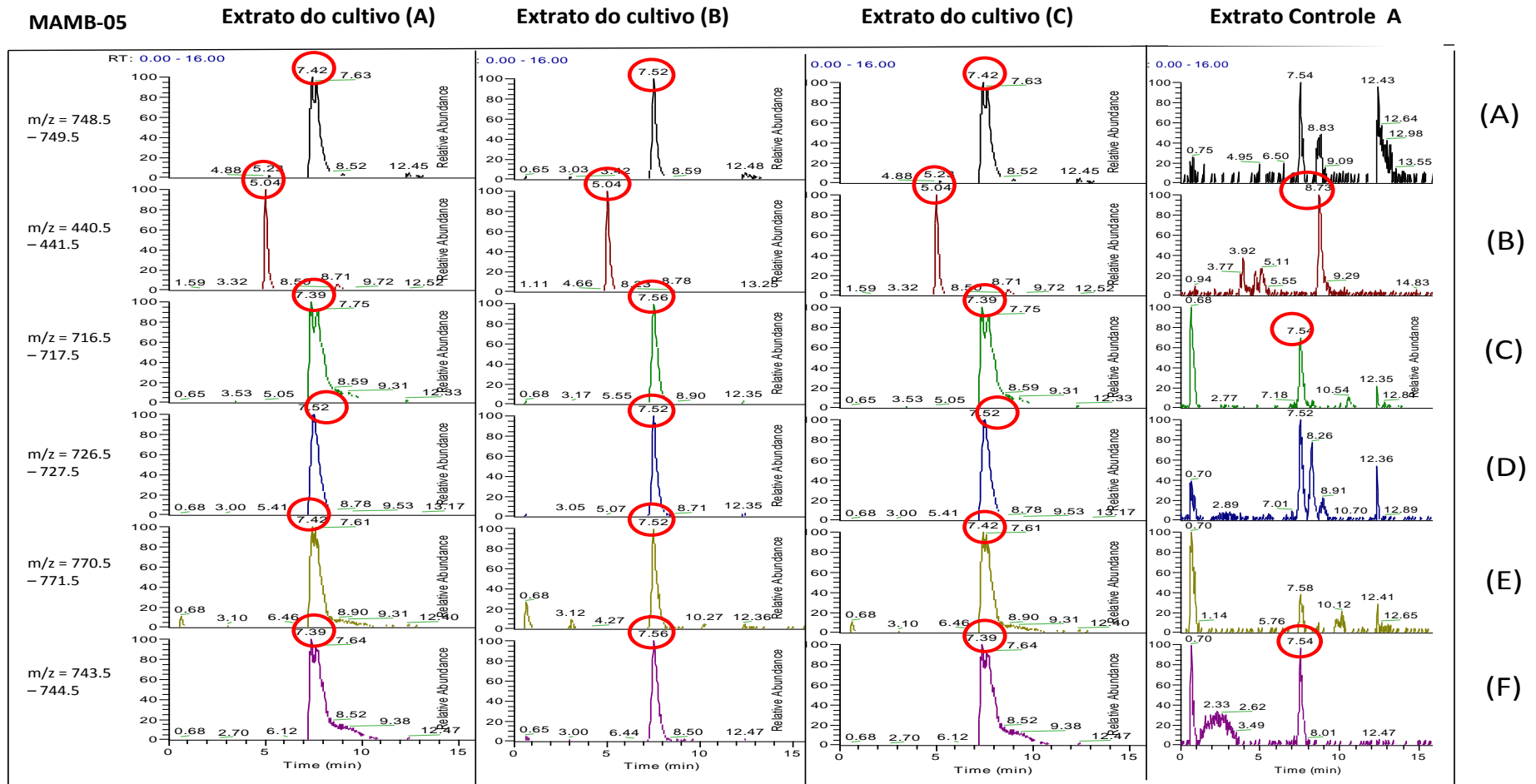
**Figura 38: Espectro de massas do tipo TANDEM do íon de massa (A): m/z 365; (B): m/z 265.**

#### 5.5.6 Determinação dos metabólitos de biotransformação do cultivo com fungo *B. rhodina* extraído meio líquido

A parte líquida do cultivo do *B. rhodina* foi extraída com acetato de etila, e então analisada por LC-MS. Foi efetuada uma varredura dos íons nas triplicatas das amostras e os íons mais abundantes foram comparados com os íons do controle do inseticida e do fungo. Portanto, foram analisados os íons selecionados de m/z: 441,717, 727, 744, 749 e 771.

A Figura 39 indica os metabólitos identificados tanto no extrato cultivado com fungo e flubendiamida quanto no extrato controle do fungo. Pode-se observar que a maioria dos metabólitos apresentados nos cromatogramas de íons selecionados do cultivo apresentaram tempo de retenção próximos aos dos metabólitos obtidos no extrato do controle A.

Somente os íons m/z 440 (Figura 39 [B]) e m/z 771 (Figura 51[E]) podem ser considerados metabólitos oriundos de biotransformação ou sintetizados pelo fungo.



**Figura 39: Cromatograma de íons selecionados dos extratos obtidos da parte líquida do cultivo do fungo MAMB-05 em meio com flubendiamida, em triplicata A, B e C, comparados com o SIC do extrato controle do fungo, a partir dos m/z: A) 749. B) 441. C) 717. D) 727. E) 771. F) 744.**

De acordo com os metabólitos obtidos, o tempo de retenção do íon  $m/z$  441 foi de 5.04 minutos para o extrato com o cultivo do *B. rhodina* e flubendiamida. No entanto, o tempo de retenção deste íon apresentou alta intensidade em 8.73 minutos. Esta distinção denota que este metabólito de  $m/z$  441 provavelmente está relacionado à biotransformação, ou foi biossintetizado pelo *B. rhodina* na presença do inseticida.

Apesar da transferência de prótons ser a forma mais comum em ionização química, a formação de adutos tem sido também utilizada para ajudar na elucidação da estrutura química (LANÇAS, 2009). A formação de adutos como sódio e cloro dão origem aos íons  $[M+Na]^+$  e  $[M+Cl]^-$ . Desta forma, a detecção do íon  $[M+Cl]^-$  717 indica a presença do aduto de cloro. A Tabela 16 mostra todos os metabólitos encontrados no meio líquido dos cultivos do fungo *B. rhodina*.

**Tabela 16: Metabólitos da parte líquida do cultivo oriundos da biotransformação do inseticida ou produzidos pelo fungo *B. rhodina*.**

Metabólito	$m/z$	Tempo de retenção (min)
20	441	5.04
21	717	7.39 - 7.75
22	727	7.52
23	744	7.39 - 7.64
24	749	7.42 - 7.52
25	771	7.42 - 7.52

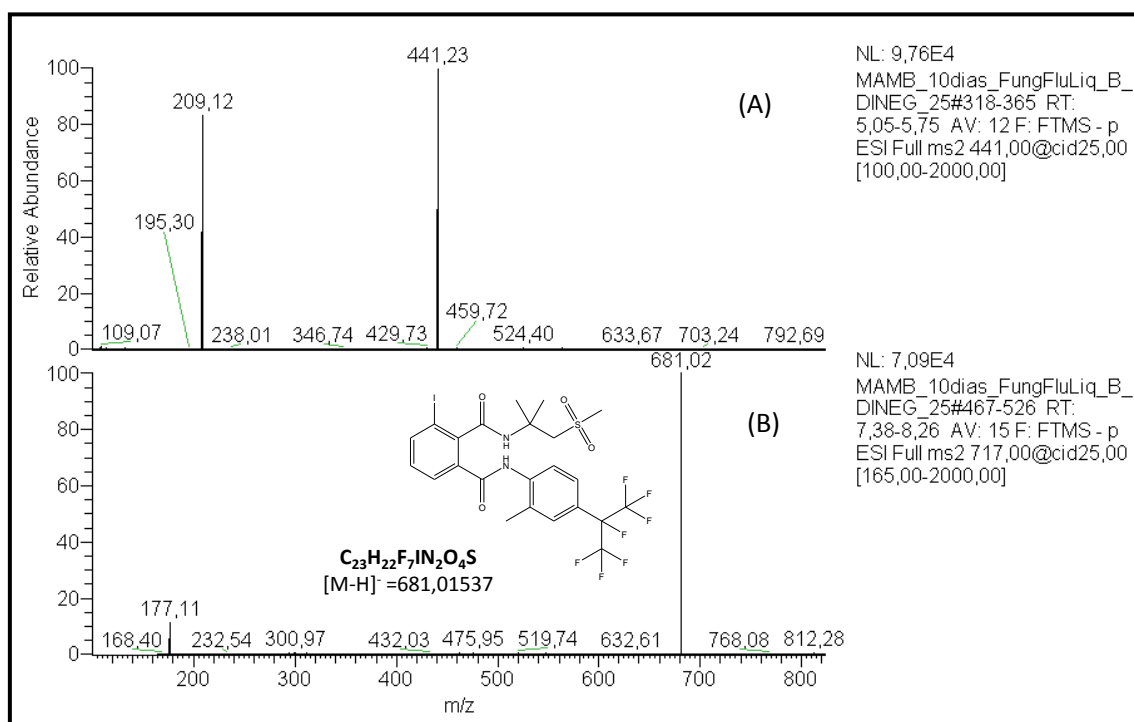
#### 5.5.6.1 Espectrometria de massas da parte líquida do fungo MAMB-05 usando a técnica Tandem, MS/MS ou MS<sup>2</sup>

A análise por espectrometria de massas do tipo Tandem teve sucesso somente para os metabólitos com íons  $m/z$  441 e  $[M+Cl]^-$  717. Em ambos, a

dissociação induzida por colisão (CID) foi utilizada para a fragmentação dos íons, com energia de colisão em 25%.

O espectro de massa Tandem do íon  $m/z$  441 foi apresentado na Figura 40 (A). Os resultados revelam o íon molecular  $m/z$  441.23, e os fragmentos de menor intensidade  $m/z$  209.12 e 195.30. A estrutura deste metabólito não foi elucidada, provavelmente devido a este metabólito não ser oriundo de biotransformação do inseticida flubendiamida, e possivelmente representar um metabólito produzido pelo fungo *B. rhodina*.

A análise usando a técnica Tandem para o aduto de cloro  $[M+Cl]^+$  717 (Figura 40 [B]) demonstrou a presença do fragmento  $m/z$  681.02, demonstrando-se como o pico base do espectro. Além disso, há um fragmento  $m/z$  177.11, de baixa intensidade. A detecção do fragmento  $m/z$  681.02 confirma a presença do inseticida flubendiamida, que possui  $m/z$  681.015, e denota que o íon  $m/z$  717 representa a presença do aduto de cloro.



**Figura 40: Espectro de massas do tipo Tandem do íon de massa (A):  $m/z$  441; (B):  $[M+Cl]^+$  717.**

### 5.5.7 Determinação dos metabólitos de biotransformação do cultivo com fungo *B. rhodina* extraído do micélio

Os extratos do micélio do fungo *B. rhodina* foram analisados por LC-MS/MS. As Figuras 41 (a) e (b) indicam os cromatogramas de íons selecionados, baseado na comparação entre os extratos do micélio do fungo MAMB-05 cultivado com flubendiamida nas triplicatas e com os extratos controles C e do controle B.

Os metabólitos formados foram analisados de acordo com o tempo de retenção correspondente de cada íon. Diferentes tempos de retenção com o extrato controle demonstram que este metabólito provavelmente possui a mesma fórmula/massa molecular, porém com estruturas diferentes. Esta diferenciação nos tempos de retenção para um mesmo íon permite compreender se os sinais de massas dos metabólitos são oriundos da biotransformação ou produzidos pelo fungo na presença do inseticida.

O extrato do micélio do fungo MAMB-05 revelou a maior quantidade de metabólitos perante os demais fungos testados.

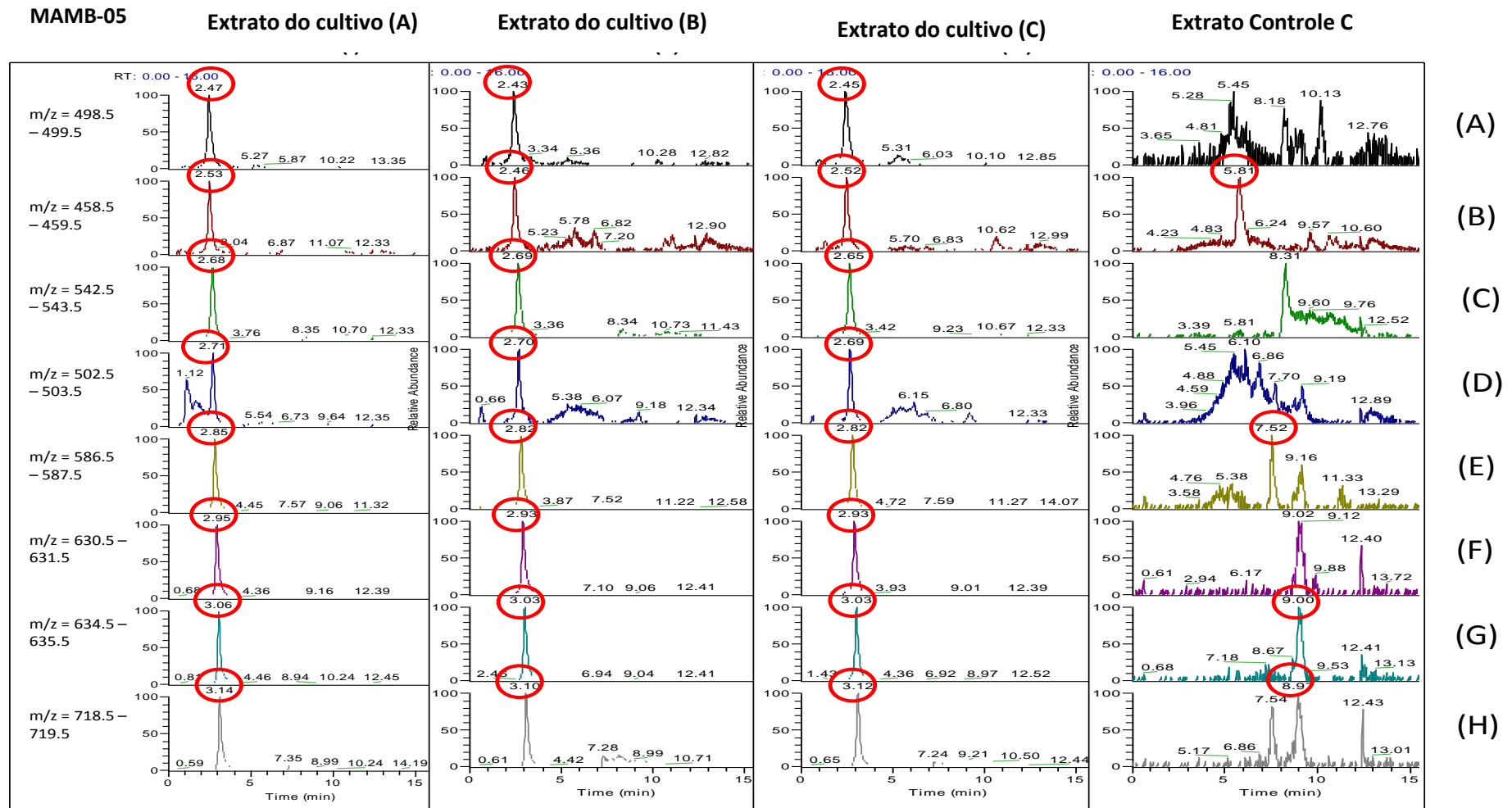


Figura 41 (a): Cromatograma (parte 1) dos extratos obtidos da parte micelial do cultivo do fungo MAMB-05 em meio com flubendiamida, em triplicata A, B e C, comparados com o SIC do extrato controle do fungo, a partir dos m/z: A) 499. B) 459. C) 543. D) 503. E) 587. F) 631. G) 635. H) 719.

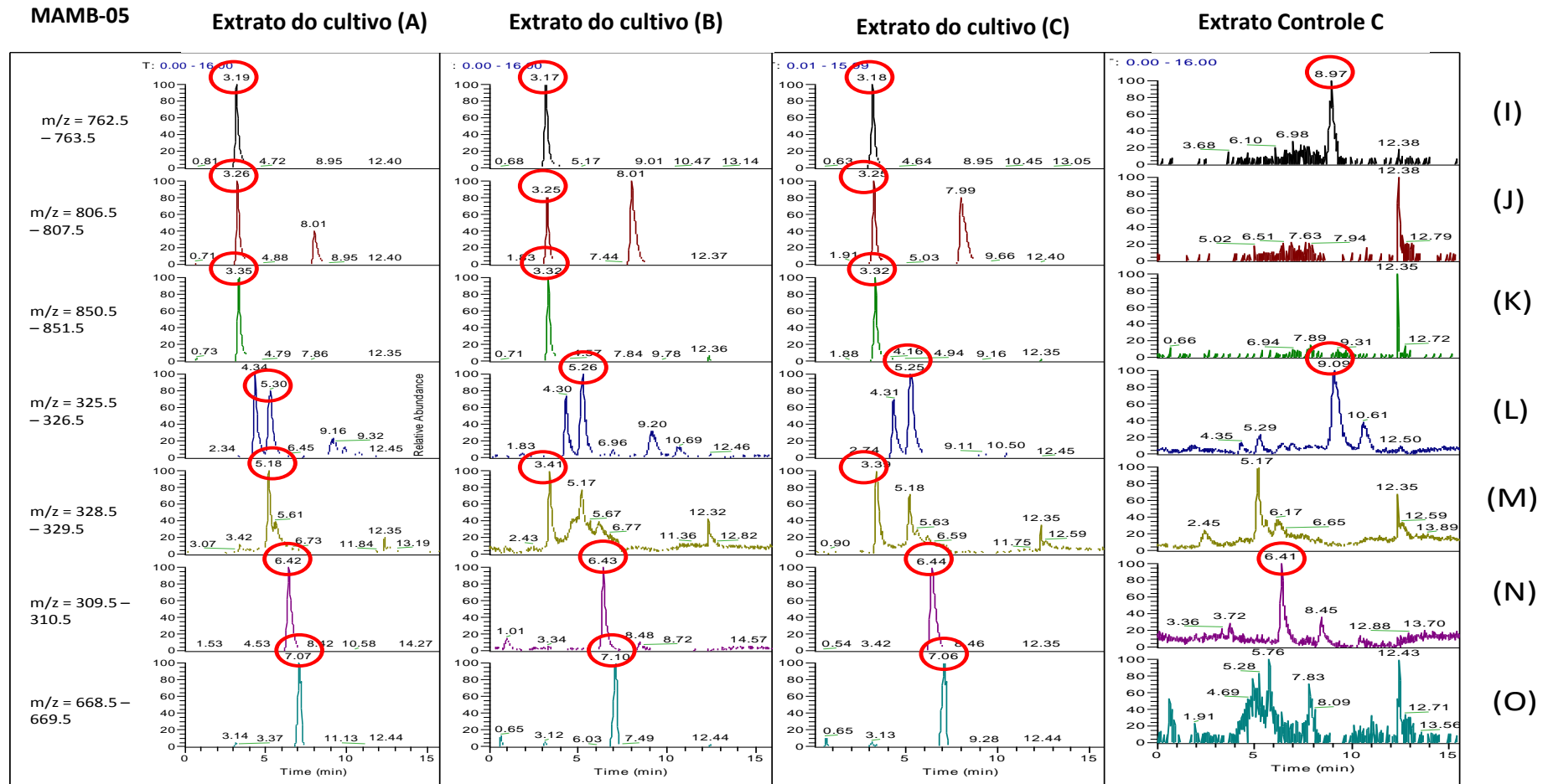


Figura 41 (b): Cromatograma (parte 2) dos extratos obtidos da parte micelial do cultivo do fungo MAMB-05 em meio com flubendiamida, em triplicata A, B e C, comparados com o SIC do extrato controle do fungo, a partir dos m/z: I) 763. J) 807. K) 851. L) 326. M) 329. N) 310. O) 669.

Os cromatogramas de íons selecionados do cultivo do fungo MAMB-05 com a flubendiamida forneceram diversos metabólitos, presenciados na triplicata A, B e C das Figuras 53 (a) e (b). Em comparação com o extrato controle C, observa-se que apenas o íon  $m/z$  310 foi detectado em toda a triplicata dos cultivos e no controle C com o mesmo tempo de retenção. Portanto, por existir no extrato controle C, não se pode aferir com certeza que este metabólito esteja relacionado à biotransformação do inseticida ou induzidos pela sua presença.

Os demais metabólitos analisados não se apresentaram no extrato controle. Os metabólitos encontrados e o tempo de retenção de cada um foram destacados na Tabela 17. Comparando com os outros fungos, observou-se que o metabólito de íon  $m/z$  669 foi similar no *B. rhodina* e no isolado JUANT070, ambos apresentando tempo de retenção entre 7.05 – 7.11 minutos. Desta maneira, pode-se considerar que este metabólito provavelmente está relacionado à biotransformação do inseticida flubendiamida, embora sua estrutura não tenha sido elucidada.



**Tabela 17: Metabólitos do micélio do cultivo, oriundos da biotransformação do inseticida ou produzidos pelo fungo MAMB-05.**

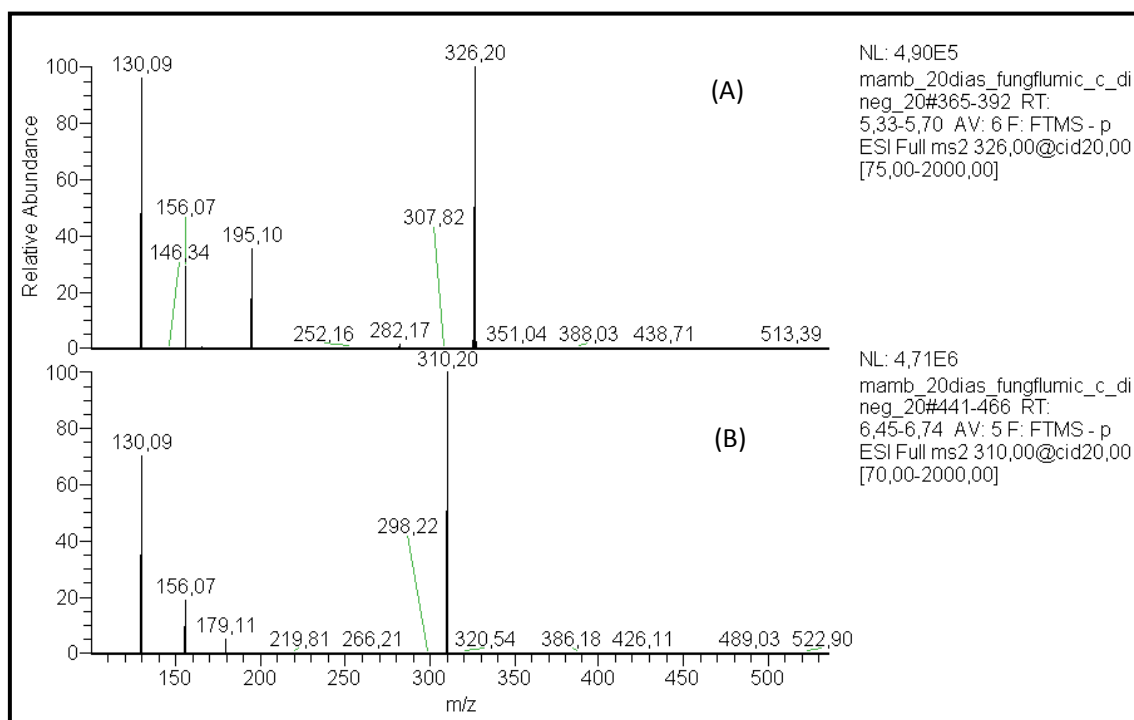
Metabólito	m/z	Tempo de retenção (min)
26	310	6.42 - 6.44
27	326	4.30 - 4.34 5.25 - 5.30
28	329	3.39 - 3.41
29	499	2.43 - 2.47
30	459	2.46 - 2.53
31	503	2.69 - 2.71
32	543	2.65 - 2.69
33	587	2.82 - 2.85
34	631	2.93 - 2.95
35	635	3.03 - 3.06
36	669	7.06 - 7.10
37	719	3.10 - 3.14
38	763	3.17 - 3.19
39	807	3.25 - 3.26 7.99 - 8.01
40	851	3.32 - 3.35

#### 5.5.7.1 Espectrometria de massas do micélio do fungo MAMB-05 usando a técnica Tandem, MS/MS ou MS<sup>2</sup>

A análise por espectrometria de massas do tipo Tandem foi executada com sucesso para os metabólitos com íons m/z 326 e m/z 310. A dissociação induzida por colisão (CID) utilizada para a fragmentação dos íons, com energia de colisão em 20% em ambos.

A Figura 42 (A) indica o espectro de massa Tandem do íon m/z 326. Os principais fragmentos formados foram de m/z 195.10, 156.07 e 130.09. Além deste metabólito, o íon da Figura 54 (B) representa o espectro de massa Tandem para m/z 310. Observa-se uma fragmentação semelhante ao íon m/z

326, com fragmentos  $m/z$  130.09 e 156.07 presentes em ambos metabólitos. A estrutura destes metabólitos ainda não foi elucidada.

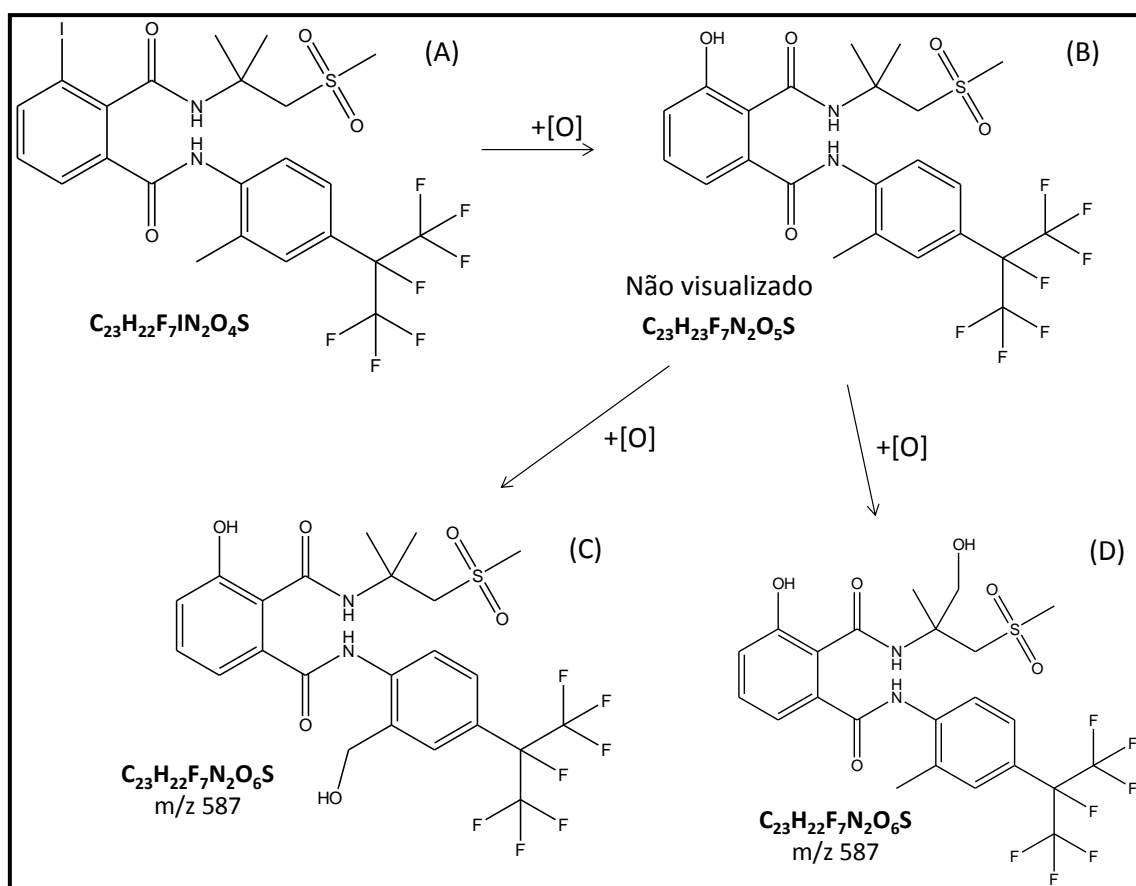


**Figura 42: Espectro de massas do tipo Tandem do íon de massa (A):  $m/z$  326; (B):  $m/z$  310.**

Uma rota metabólica de biotransformação da flubendiamida foi proposta, a partir do metabólito 33 com íon de  $m/z$  587 (Figura 43), mesmo sem a análise por Tandem.

Nesta rota, a reação de desalogenação oxidativa da flubendiamida (Figura 43A) ocasiona na perda do iodo e hidroxilação (Figura 55[B]), formando um metabólito intermediário (não visualizado). Posteriormente, uma reação de hidroxilação foi sugerida, em duas posições diferentes, conforme a Figura 43 (C) e (D) demonstram, formando o íon  $m/z$  587.

Esta proposta de rota metabólica com o *B. rhodina* não foi encontrada em literatura, porém é característica da enzima lacase oxidar diversos compostos orgânicos, principalmente fenólicos (MOGHARABI E FARAMARZI, 2014).



**Figura 43: Proposta de rota metabólica do íon de m/z 587.**

### 5.5.8 Determinação dos metabólitos de biotransformação pela enzima lacase

O experimento de biotransformação também foi realizado com o extrato bruto da enzima lacase liofilizada do fungo *B. rhodina*. Neste experimento foi utilizado o extrato da enzima em pH 6, com e sem ABTS. Este composto auxilia a ação cinética da enzima lacase.

A Figura 44 mostra os cromatogramas de íons selecionados, baseado na comparação entre os extratos de lacase (pH 6) com flubendiamida, lacase + ABTS + flubendiamida, e o controle da lacase (lacase sem flubendiamida). Os metabólitos formados foram analisados de acordo com o tempo de retenção correspondente de cada íon.

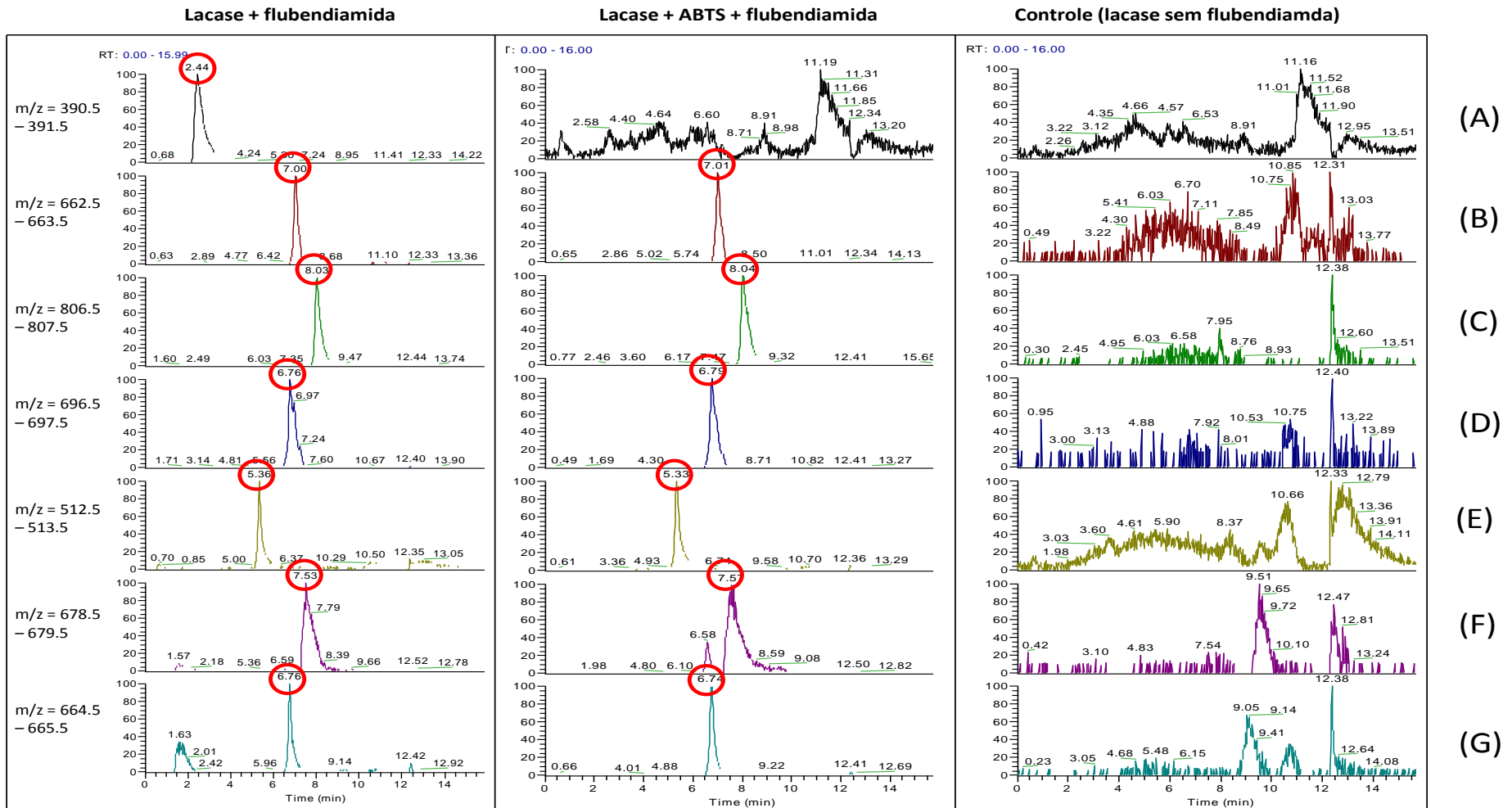


Figura 44: Cromatograma dos extratos obtidos da enzima lacase em meio com flubendiamida, comparados com o SIC do extrato controle da lacase, a partir dos m/z: A) 391. B) 663. C) 807. D) 697. E) 513. F) 679. G) 665.

Na análise do cromatograma de íons selecionados (Figura 56), observaram-se sete metabólitos cujos tempos de retenção não foram similares ao extrato controle A. Esta diferenciação nos tempos de retenção para um mesmo íon permite compreender se os sinais de massas dos metabólitos são oriundos da biotransformação ou produzidos pelo fungo na presença do inseticida.

Entretanto, neste experimento envolvendo o extrato da enzima lacase, não houve a presença de nenhum fungo. Desta forma, os metabólitos formados são produtos de biotransformação do inseticida, através da ação enzimática.

Os resultados dos metabólitos encontrados foram apontados na Tabela 18. Dentre eles, os íons m/z 663 e 665 coincidem com os metabólitos formados com os extratos do micélio do fungo JUANT070 e possivelmente metabólitos de biotransformação do fungo.

**Tabela 18: Metabólitos da incubação com a lacase, oriundos da biotransformação do inseticida.**

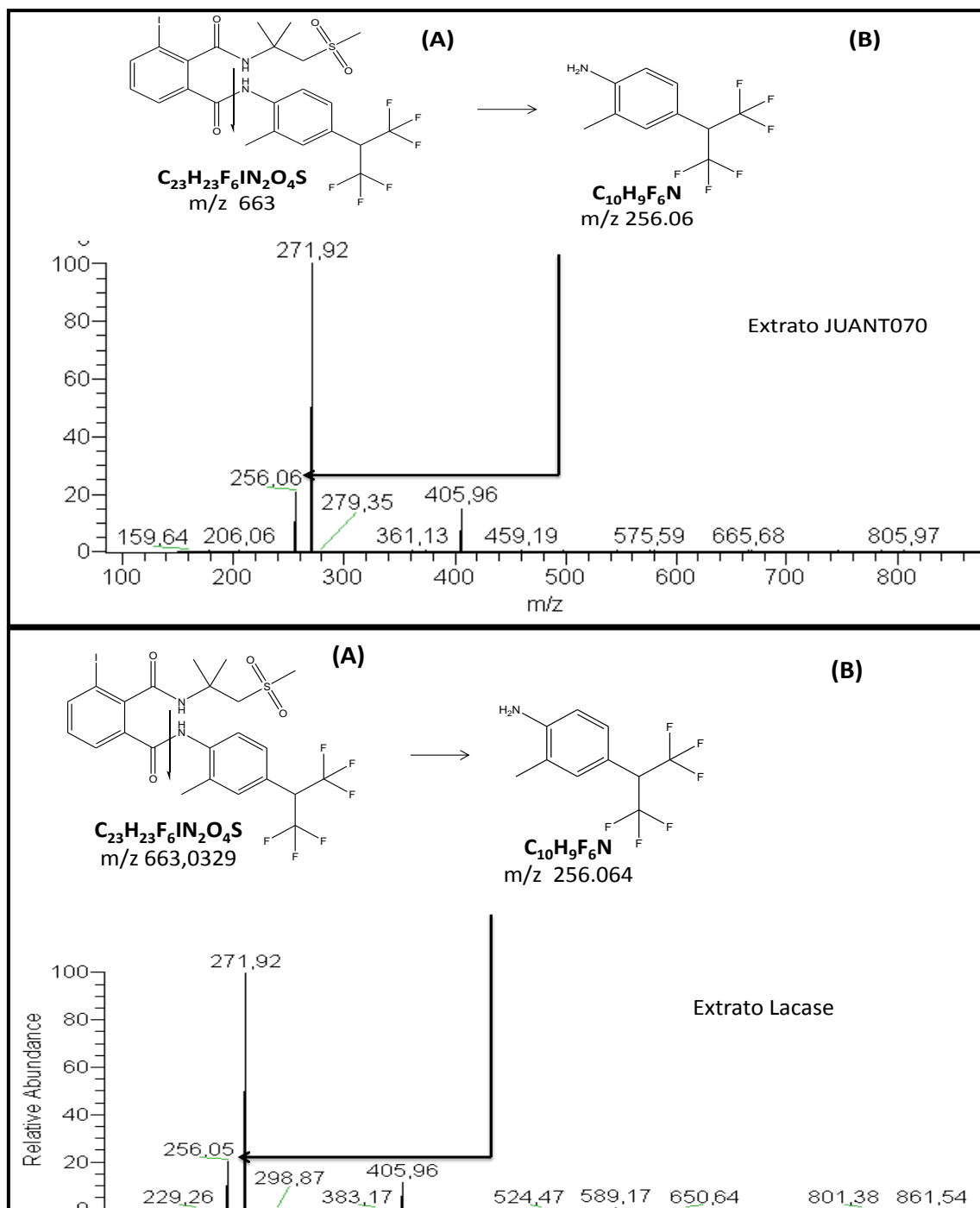
Metabólito	m/z	Tempo de retenção (min)
41	391	2.44
42	663	7.00 - 7.01
43	807	8.03 - 8.04
44	697	6.76 - 6.79
45	513	5.33 - 5.36
46	679	7.53 - 7.57
47	665	6.74 - 6.76

#### 5.5.8.1 Espectrometria de massas do extrato de lacase usando a técnica Tandem, MS/MS ou MS

A análise por espectrometria de massas do tipo Tandem foi executada com sucesso para a maioria dos metabólitos:  $m/z$  513, 663, 665, 697 e 807. A dissociação induzida por colisão (CID) utilizada para a fragmentação dos íons teve energia de colisão entre 20 - 25%.

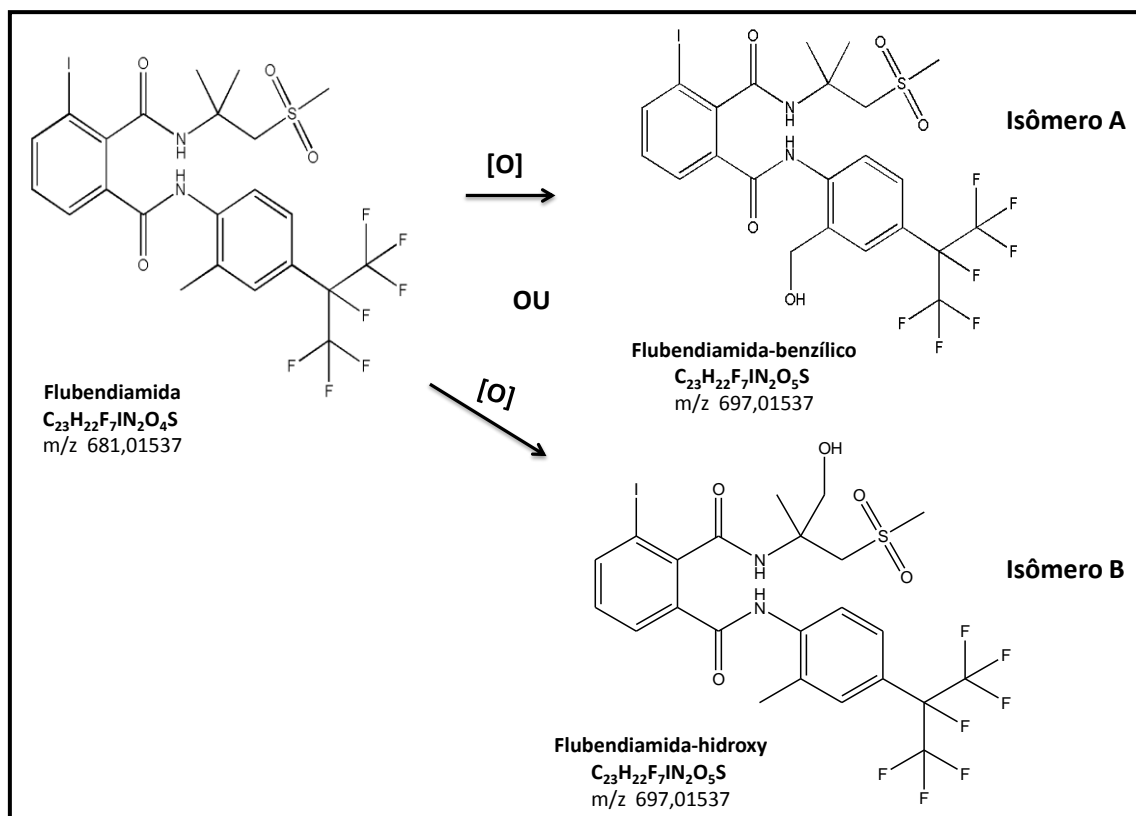
As Figuras 45 (A) e (B) indicam o espectro de massa Tandem do íon  $m/z$  663. O metabólito da Figura 45 (A) pertence ao extrato com cultivo do fungo JUANT070, no qual a rota metabólica e a confirmação pelo espectro de massa Tandem foi elucidado anteriormente nas Figuras 36, 37 e 38. Contudo, o metabólito presente no extrato com a enzima lacase (Figura 45 [B]) identificou os mesmos fragmentos presentes no fungo JUANT070.

Assim, os metabólitos presentes em ambos extratos são iguais, e formados a partir da biotransformação do inseticida flubendiamida, por desalogenação com a saída do flúor. Essa reação não foi reportada nos estudos de lacase, que relatam reações com potencial para catalisar a oxidação de diversos poluentes ambientais, fenólicos ou não.



**Figura 45: Espectro de massas Tandem, comparando os fragmentos do íon  $m/z$  663: (A) do extrato do cultivo do fungo JUANT070; (B) da enzima lacase.**

O íon de  $m/z$  697 também foi avaliado pelo equipamento de espectrometria de massas Tandem. Esse metabólito já foi registrado em estudos metabólicos encontrados na degradação da flubendiamida. Segundo a FAO (2011), este metabólito, apresentado na Figura 46, pode ser oriundo da flubendiamida, a partir da reação de hidroxilação, com 2 prováveis locais de hidroxilação (isômeros), com  $m/z$  697.

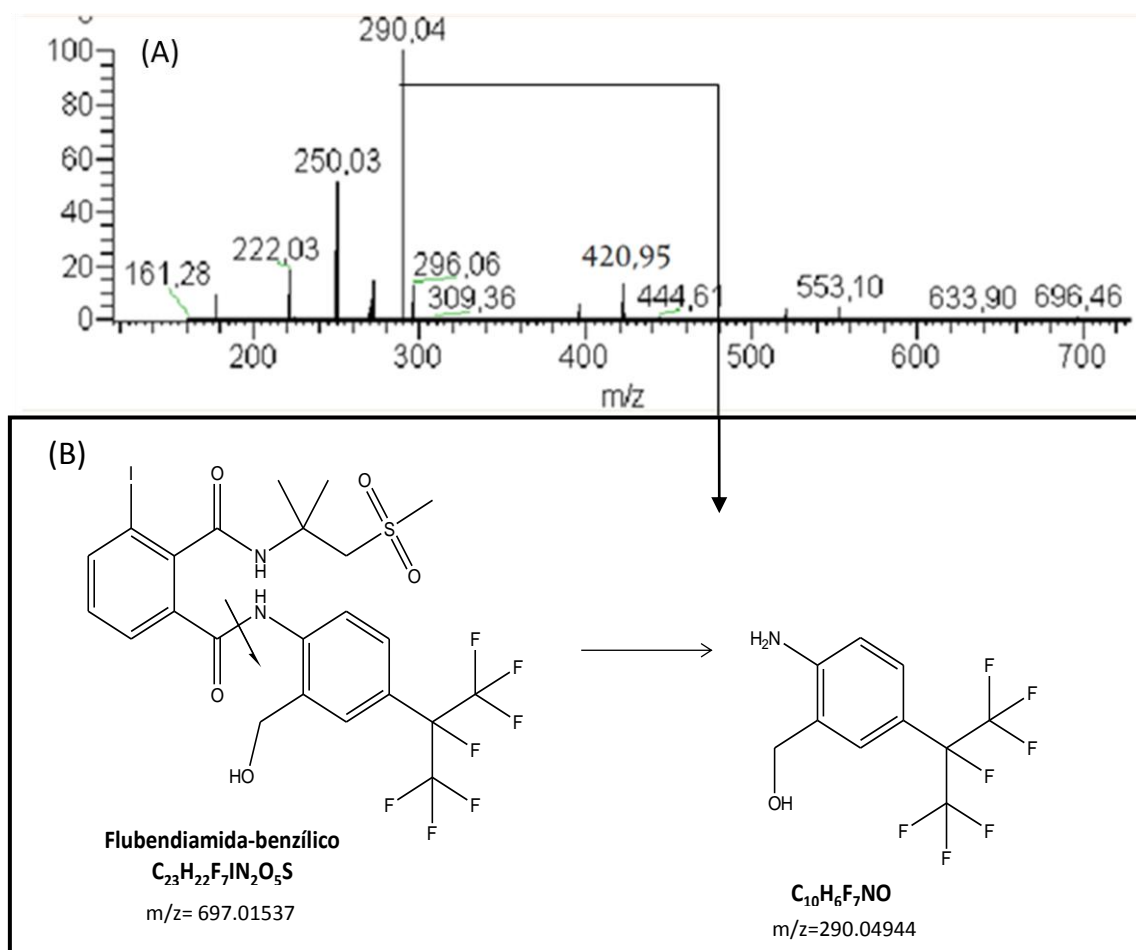


**Figura 46: Provável rota de biotransformação da flubendiamida, na presença da enzima lacase, formando os metabólitos flubendiamida-benzílico (isômero A) ou flubendiamida-hidroxy (isômero B).**

A confirmação que este metabólito é proveniente do inseticida foi estabelecida conforme a análise de espectrometria de massas em Tandem do íon  $m/z$  697. A partir deste íon, a Figura 47 apresenta os principais fragmentos obtidos aplicando uma energia de colisão de 20%:  $m/z$  290.04, 421.95, 250.03 e 222.03.

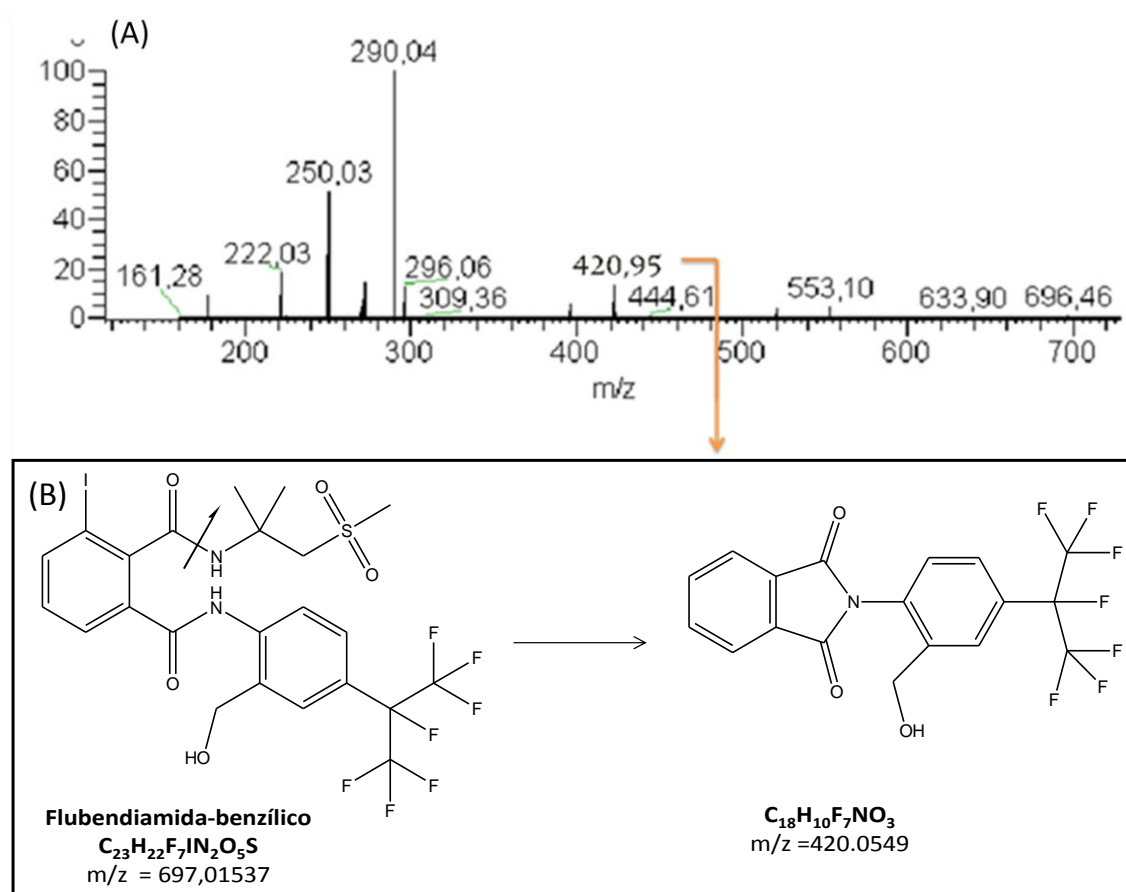
Considerando o íon  $m/z$  697 registrado como flubendiamida-benzílico (Isômero A) (Figura 46), o fragmento  $m/z$  290.04 pode ser obtido pela reação de hidrólise da amida na espectrometria Tandem, conforme indicado na Figura 47.





**Figura 47: (A) Espectro de massas Tandem contendo os fragmentos do metabólito  $m/z = 697$ . (B) Proposta de fragmentação do íon  $m/z = 697$  por MS/MS.**

O íon  $m/z$  697 registrado como flubendiamida-benzílico (Figura 47) fragmentou em  $m/z$  420.95, conforme indicado na Figura 48. Essa fragmentação do íon provavelmente ocorreu devido à reação de hidrólise da amida, juntamente com a perda do iodo. Após um rearranjo na cadeia, o fragmento  $m/z$  420.0549 foi proposto (Figura 48), comprovando assim, pela espectrometria de massas usando a técnica Tandem, que o íon  $m/z$  697 é o isômero A da flubendiamida benzílico, um metabólito de biotransformação.



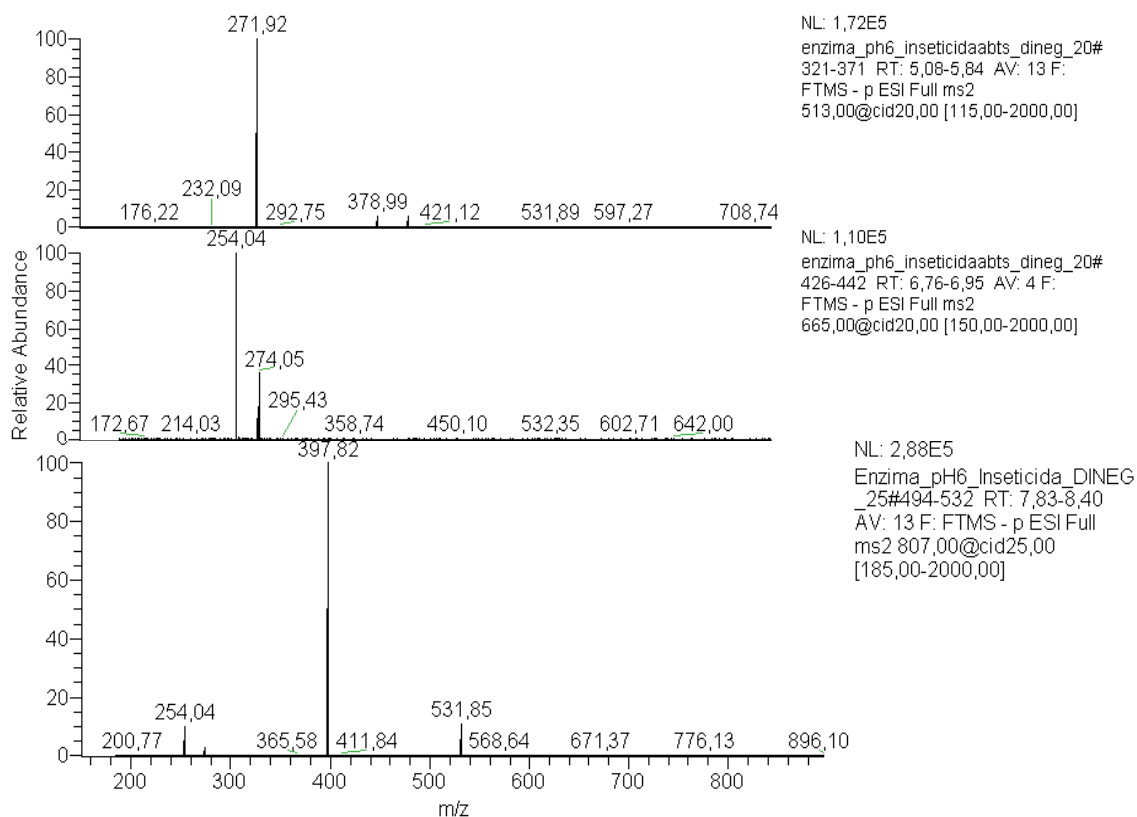
**Figura 48: (A) Espectro de massas Tandem contendo os fragmentos do metabólito  $m/z = 697$ . (B) Proposta de fragmentação do íon  $m/z = 697$  por MS/MS.**

Desta maneira, o composto flubendiamida-benzílico pode ser considerado um metabólito, produto de biotransformação da flubendiamida com o extrato da enzima lacase.

Além desses metabólitos elucidados, o espectro de massas Tandem avaliou os fragmentos para os metabólitos  $m/z$  513, 665 e 807 (Figura 49). Estes metabólitos não foram elucidados neste estudo, porém sabe-se que eles estão relacionados à biotransformação da flubendiamida, visto que os extratos continham apenas a enzima lacase e a flubendiamida.

Desta forma, a importância desta enzima é relatada por diversos autores, que mostraram considerável atenção por causa de sua utilidade como oxidante de compostos fenólicos e não-fenólicos, bem como a sua aptidão para a síntese orgânica, tratamento de poluentes ambientais, e outras aplicações biotecnológicas. Há diversos trabalhos que estudam as propriedades estruturais, a ocorrência, os mecanismos de reação, mediadores redox de lacases e sua aplicação em procedimentos de síntese orgânica, tais como

dimerização, polimerização, oxidação, e aminação. (LEE et. al. 2002; AKTAS e TANYOLAC, 2003).



**Figura 49: Espectro de massas do tipo Tandem do íon de massa: m/z 513; m/z 665 e m/z 807.**

O estudo de biotransformação obteve resultados inéditos, que demonstraram possíveis metabólitos referentes à biotransformação da flubendiamida, pela ação enzimática dos fungos, ou pelo extrato enzimático bruto contendo lacase.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Conforme proposto nesta pesquisa, foram isolados 133 fungos da lavoura de soja: 42 isolados foram da área com aplicação de inseticida PlatinumNeo<sup>®</sup>; 54 isolados da área com inseticida Premio<sup>®</sup> e 37 isolados da área sem inseticida.

Dentre os isolados, foram selecionados 12 isolados do solo e o *B. rhodina* para o teste de inibição de crescimento em meio sólido com os inseticidas Actara<sup>®</sup> e Belt<sup>®</sup>, em placas de Petri.

Os fungos que obtiveram os melhores resultados no teste de inibição de crescimento em placa de Petri foram: 1) JUSOLCL039 com 3,97% de inibição em seu crescimento na concentração de 3 g/L de Actara<sup>®</sup> e 0,00% de inibição nas concentrações de 1.22 e 4.88 g/L de Belt<sup>®</sup>; 2) JUANT070 que não apresentou nenhuma inibição de crescimento em todas as concentrações de Belt, assim como na concentração de 3 g/L de Actara<sup>®</sup>; 3) e o fungo *B. rhodina*, cedido pela Prof. Dra. Aneli M. Barbosa, que obteve uma inibição de 1.72% em contato com o 1.22 g/L de Belt<sup>®</sup> e 5.42% de inibição quando exposto à concentração de 3 g/L de Actara<sup>®</sup>.

A análise da atividade da enzima lacase mostrou que os fungos JUANT070, JUSOLCL039 e *B. rhodina* foram produtores constitutivos de lacase, na presença dos inseticidas Actara, Belt e no padrão analítico de flubendiamida.

Estes inseticidas não atuaram como indutores de lacase aos três fungos testados, visto que não houve acréscimo na unidade de enzima em comparação com as amostras controle. Entretanto, a atividade enzimática utilizando o padrão analítico da flubendiamida apresentou atividade lacase superior aos ensaios com inseticidas comerciais Actara e Belt. O veículo dos inseticidas comerciais pode ter influenciado na atividade da enzima, e compõe a maior parcela dos inseticidas comerciais.

A análise em HPLC-UV detectou a presença do inseticida flubendiamida e alguns metabólitos nos extratos dos fungos JUANT070, JUSOLCL039 e *B. rhodina*. Estes metabólitos não foram evidenciados no extrato controle do fungo.

Os três fungos analisados JUANT070, JUSOLCL039, MAMB-05, e a enzima lacase produziram metabólitos de biotransformação ou induzidos pela presença da flubendiamida. Foram detectados 47 metabólitos no total, sendo que a incubação da enzima lacase formou 7 metabólitos de biotransformação.

O metabólito de íon  $m/z$  587 foi detectado no extrato do fungo MAMB-05. Sua rota metabólica foi proposta, através da perda do iodo e da reação de hidroxilação.

O metabólito de íon  $m/z$  663 foi encontrado no extrato do fungo JUANT070 e da enzima lacase. A rota de biotransformação foi proposta através da desalogenação do flúor, e confirmada pela espectrometria de massas Tandem.

O extrato da enzima lacase foi capaz de formar o metabólito de íon  $m/z$  697. Formado por uma hidroxilação, esse metabólito foi identificado com auxílio da espectrometria de massas.

Portanto, os resultados do experimento de biotransformação da flubendiamida detectaram diversos metabólitos, que foram formados pela ação de determinadas enzimas presentes nos fungos selecionados, ou pelo extrato enzimático bruto contendo lacase.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADELIN, E.; SERVY, C.; CORTIAL, S.; LEVAIGUE, H.; GALLARD, F. F.; MARTIN, M. T.; RETAILLEAU, P.; BUSSABAN, B.; LUMYONG, S.; OUZZANI, J. Biotransformation of natural compounds. Oxido-reduction of Sch-642305 by *Aspergillus ochraceus* ATCC 1009. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** v.21, n.8, 2011.

AKTAS, N.; TANYOLAC, A. Reaction condition for laccase catalysed polymerization of catecol. **Bioresource Technology.** V. 87, p. 209–214, 2003.

ANVISA – AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Critérios para a classificação Toxicológica.** Disponível em: <<<http://s.anvisa.gov.br/wps/s/r/vz>>>. Acesso em Junho, 2015.

ARORA, D. S., SHARMA, R. K. Ligninolytic Fungal Laccases and Their Biotechnological Applications. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2009.

AUSTRALIAN PESTICIDES AND VETERINARY MEDICINES AUTHORITY – APVMA. **Evaluation of the new active Flubendiamide in the products BELT 480 SC Inseticide & BELT 240 WG Inseticide.** Camberra, Australia, Fev. 2009.

BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, p. 215 – 242, 2006.

BARBOSA, A.M.; DEKKER, R.F.H.; HARDY, G.E. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye POIY R-478, **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, p. 93-96, 1996.

BATTU, R. S.; SINGH, B.; KOONER, R.; SINGH, B. Simple and efficient method for the estimation of residues of flubendiamide and its metabolite desiodo flubendiamide. **J. Agric. Food Chem.** v.56, p.2299-2302, 2008.

BAYER CROP SCIENCE. Belt® Inseticida – instruções de uso. Disponível em: <http://www.bayercropscience.com.br/Site/nossosprodutos/protecaodecultivosebiotecnologia/DetalheDoProduto.fss?Produto=208>. Acesso em agosto de 2015.

BEHKI, R. M. et al. Degradation of atrazine, propazine, and simazine by *Rhodococcus* strain B-30. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.42, n.5, p.1237-1241, 1993.

BIROLI, W.G.; YAMAMOTO, K. Y.; OLIVEIRA, J. R.; NITSCHKE, M.; SELEGUIM, M. H. R.; PORTO, A. L. M. Biotransformation of dieldrin by the marine fungus *Penicillium miczynskii* CBMAI 930. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology.** 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2014.06.002>

BOSTANIAN, N.J., THISTLEWOOD, H.M.A., HARDMAN, J.M., LAURIN, M.-C., RACETTE, G.,. Effect of seven new orchard pesticides on *Galendromus occidentalis* in laboratory studies. **Pest Manage. Sci.** v.65, p.635–637, 2009a.

BOLLER; E. F. et al. IOBC. International Organization for Biological and Integrated Control of Noxious Animals and Plants. Integrated Production: principles and technical guidelines. 3. ed. **IOBC/WPRS BULLETIN**, 2004. 50 p.

- BRIJWANI, K., RIGDON, A., VADLANI, P. V.. Article review. Fungal Laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing. **Enzyme Research**. 10p. 2010. doi:10.4061/2010/149748
- BUDZIKIEWICZ, H.; GRIGSBY, R.D. Mass spectrometry and isotopes: A century of research and discussion. *Mass Spectrometry Reviews*, v.25, n.1, p.146-157. 2006.
- CABANA, H., JIWAN, J. H., ROZENBERG, R., ELISASHVILI, V., PENNINGCKX, M., AGATHOS, S. N., JONES, J. Peter. Elimination of endocrine disrupting chemicals nonylphenol and bisphenol A and personal care product ingredient triclosan using enzyme preparation from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona*. **Chemosphere**, v. 67, p. 770–778, 2007.
- CASALI, André Luis et al . Nível de capacitação e informação dos operadores de máquinas para a aplicação de agrotóxicos. **Cienc. Rural**, Santa Maria , v. 45, n. 3, p. 425-431, Mar. 2015 .
- CASTRO, N. R. A. Sorção, degradação e lixiviação do inseticida thiamethoxam em Latossolo e Argissolo. 2005. 161 p. **Tese de Doutorado em Entomologia Agrícola** - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2005.
- CERNIGLIA CE, SUTHERLAND JB. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ligninolytic and non-ligninolytic fungi. **In Fungi in Bioremediation**. **GM Gadd** (ed.). Cambridge, UK: Cambridge University Press, pp. 136–187. 2001
- CHEN, X.et al. Degradation dynamics and residue analysis of flubendiamide in cabbage and soil by liquid chromatography tandem mass spectrometry with dispersive solid phase extraction, **Agricultural Sciences**, 5, , 850-857. 2014
- COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; LIMA, M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J.A.V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. *Ciênc. Agrotec.*, Lavras, v. 32, n. 3, p. 809-813, maio/jun., 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.
- DAS, S. K.; MUKHERJEE, I. Effect of Moisture and Organic Manure on Persistence of Flubendiamide in Soil. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.** v.88, p. 515-520, 2012.
- DAS, S. K.; MUKHERJEE, I. Influence of microbial community on degradation of flubendiamide in two Indian soils. **Environ Monit Assess.** v.186, n.5, p. 3213-3219, 2014.
- DASS, C., **Fundamentals of contemporary mass spectrometry**. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, 2007.
- DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; SARGENT, K. The effect of lignin-related compounds on growth and production of laccases by the ligninolytic ascomycete, *Botryosphaeria sp.* **Enzyme and Microbial Technology**, v.30, p.374-380, 2002.

DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; The effects of aeration and veratryl alcohol on the Production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v.28, p.81-88, 2001.

DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M.; GIESE, E. C.; GODOY, S. D. S.; COVIZZI, L. G. Influence of nutrients on enhancing laccase production by *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05. **International Microbiology**. v.10, p. 177-185. 2007.

EFSA - European Food Safety Authority. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance flubendiamide. **EFSA Journal**; v.11, n.9, 2013.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY –EPA. **Pesticide Fact Sheet**. 65p. August . 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO) - **Pesticide residues in food 2010**- Evaluations Part I – Residues. Paper 206. Rome, 2011.

GANDOMKAR, S.; HABIBI, Z. Biotransformation of 6 $\alpha$ -santonin and 1,2-dihydro- $\alpha$ -santonin by *Acremonium chrysogenum* PTCC 5271 and *Rhizomucor pusillus* PTCC 5134. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.110, p. 59–63, 2014.

GAVRILESCU, M., 2005. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. **Eng. Life Sci**. v.5, p.497–526.

GOMPERTZ, O. F. et al. Características Gerais das Micoses. IN: Trabulsi, L.R. *Microbiologia*. 4. ed. Atheneu: São Paulo, 2004. Cap. 65. p. 451-459.

GOPAL, M., MISHRA, E.. Analytical method for the estimation of new insecticide flubendiamide and its safety evaluation for usage in rice crop. **Bull. Environ. Contam. Toxicol**. v.81, p.360–364. 2008.

HARTUNG S, IWASAKI M, OGAWA N, KREUZIG R. Laboratory tests on sorption and transformation of the insecticide flubendiamide in the Japanese tea field soil. **Sci Total Environ** , v. 443: p.904–909, 2013.

HECK, A. J. R.; Van den Heuvel, R. H. H. **Mass Spectrom. Rev**. 2004, 23, 368-389.

HOFFMAN, E; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. Chichester: John Wiley & Sons Chichester, UK. Third Edition. 2007.

JESUS, G.J.; CORSO, C. A.; CAMPOS, A.; FRANCHETTI, S. M.M. **Biodegradation of Erythrosin B Dye by Paramorphic Neurospora crassa 74A**. V.53, n. 2: pp. 473-480, 2010.

KANEKAR, P.P, BHADBHADE,B. ,DESPHPANDE,N.M., SARNAIK,S., Biodegradation of organophosphorus pesticides. **Indian.Natl.Sci.Acad**. v.1, p.57–70, 2004.

KATO K, KIYONAKA S, SAWAGUCHI Y, TOHNISHI M, MASAKI T, YASOKAWA N. Molecular characterization of flubendiamide sensitivity in the lepidopterous ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channel. **Biochemistry** v.48, p.10342–10352, 2009.



- KLICH, M. A. Identification of Common Aspergillus species. Amsterdam: Centraalbureau voor Schimmelauteurs, 2002b. 116p.
- KOONER, R., SAHOO, S.K., SINGH, B., BATTU, R.S. Dissipation kinetics of flubendiamide and thiacloprid on tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) and soil. **Qual. Assur. Safe. Crops Foods** v.2, n.1, p.36–40. 2010
- KOUZAYHA, A.; RABAA, A. R.; ISKANDARANI, M. A.; BEH, D.; BUDZINSKI, H.; JABER, F. Multiresidue method for determination of 67 pesticides in water samples using solid-phase extraction with centrifugation and gas chromatography-mass spectrometry. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 3, p. 257-265, 2012.
- KULSHRESTHA G, KUMARI A. Fungal degradation of chlorpyrifos by Acremonium sp. strain (GFRC-1) isolated from a laboratory-enriched red agricultural soil. **Biol Fert Soils** 47: 219–225. 2011.
- LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v.1, n.2 , 2009.
- LEE, S. K.; GEORGE, S. D.; ANTHOLINE, W. E.; HEDMAN, B.; HODGSON, K. O.; SOLOMON, E. I. Nature of the intermediate formed in the reduction of O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O at the trinuclear cluster active site in native laccase. **Journal of the American Chemical Society**. V. 124, p. 6180–6193. 2002.
- LEMOS, R.C. & SANTOS, R.D. dos. Manual de descrição e coleta de solo no campo. 2ed. Campinas: SBCS/SNLCS, 1984. 45p.
- LINDEN, H., MISAWA, N., CHAMOVITZ, D., PECKER, I., HIRSCHBERG, J., AND SANDMANN, G. Functional complementation in Escherichia coli of different phytoene desaturase genes and analysis of accumulated carotenes. **Z. Naturforsch.** 46C, 1045-1051. 1991
- LITCHFIELD, C. Trinta Anos e Contagem: Biorremediação em seu Prime. **BioScience**, v.55, n.3,p. 273-279, 2005.
- LUKE A.K. AND BURTON S.G. Novel application for Neurospora crassa: progress from batch culture to a membrane bioreactor for the bioremediation of phenols. **Enzyme Microb. Technol.**, 99: 348-356 (2001).
- LUCON, C. M. M.; KOIKE, C. M.; ISHIKAWA, A. I.; PATRÍCIO, F. R. A.; HAKAKAVA, R. Bioprospecção de isolados de *Trichoderma* spp. para o controle de *Rhizoctonia solani* na produção de mudas de pepino. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 44, n. 3, p. 225-232, mar. 2009.
- MARCH, R. E. An introduction to quadrupole ion trap mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.**, v. 32, p. 351-369, 2005.
- MASAKI T, YASOKAWA N, TOHNISHI M, NISHIMATSU T, TSUBATA K, INOUE K, MOTOBA K, HIROOKA T. Flubendiamide, a novel Ca<sup>2+</sup> channel modulator, reveals evidence for functional cooperation between Ca<sup>2+</sup> pumps and Ca<sup>2+</sup> release. **Mol Pharmacol.** May;v. 69(5):p. 1733-1739, 2006.
- MOGHARABIA, M.; FARAMARZIA, M. A. Laccase and Laccase-Mediated Systems in the Synthesis of Organic Compounds Mehdi,\* **Adv. Synth. Catal.** 2014, 356, 897 – 927.

- MONTE, E. Understanding Trichoderma: between biotechnology and microbial ecology. **Int. Microbiol.**, Vol. 4, p. 1-4, 2001.
- MOROZOVA, O. V., SHUMAKOVICH, G. P., GORBACHEVA, M. A., SHLEEV, S. V., YAROPOLOV, A. I. "Blue" Laccases. **Biochemistry**, v. 72, p. 1136 – 1150, 2007.
- MIKOLASCH, A., SCHAUER, F. Fungal laccases as tools for the synthesis of new hybrid molecules and biomaterials. **Appl. Microbiol Biotechnol**, v. 82, p. 605 – 624, 2009.
- NETO, A.F. R.; NUNES, D. S. S.; **Cromatografia: Princípios e Técnicas Afins**, Editora Interciência: Rio de Janeiro, 2003.
- NEWBY, D.T., GENTRY, T.J., PEPPER, I.L., Comparison of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Degradation and Plasmid Transfer in Soil Resulting from Bioaugmentation with Two Different pJP4 Donors. **Appl. Environ. Microbiol.** v.66, p. 3399-3407, 2000.
- NISHIMATSU, T., HIROOKA, T., KODAMA, H., TOHNISHI, M., SEO, A., Flubendiamide – a new insecticide for controlling lepidopterous pests. **In: Proceedings of the BCPC International Congress, Crop Science and Technology**, v. 2, Glasgow, United Kingdom, p.57–64. 2005.
- PANDEY, G.; DORRIAN, S.J.; RUSSELL, R.J.; OAKESHOTT, J.G. Biotransformation of the neonicotinoid insecticides imidacloprid and thiamethoxam by *Pseudomonas* sp. 1 G. **Biochem Biophys Res Commun**, v.380, p.710–714, 2009.
- PARAMASIVAM, M.; BANERJEE, H. Simultaneous Determination of Flubendiamide its Metabolite Desiodo Flubendiamide Residues in Cabbage, Tomato and Pigeon Pea by HPLC. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, V. 87, n. 4, p. 452-456, 2011.
- PELCZAR, M. J., CHANG, E. C. S., KRIEG, N. R. *Microbiologia: conceitos e aplicações*, Volume II, 2ª ed. São Paulo: Makron Books, 1996.
- PERLATTI, B.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B; FORIM, M. R. Biodegradation of 1,2,3,4-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in liquid broth by brown-rot fungi. **Bioresource Technology**, v. 148, p. 624–627. 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.09.036>
- PEREIRA, A. R. B.; FREITAS, D. A. F. Uso de microrganismos para a biorremediação de ambientes impactados. **Rev. Elet. em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**. v.6, n.6, p. 975-1006, 2012.
- PEZZELLA, C., AUTORE, F., GIARDINA, P., PISCITELLI, A., SANNIA, G., FARACO, V. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members. **Current Genetics**, v. 55, p. 45 –57, 2009.
- REZENDE, M. I.; BARBOSA, A. M.; VASCONCELOS, A. F. D.; HADDAD, R.; DEKKER, R. F. H. Growth and production of laccases by the ligninolytic fungi, *Pleurotus ostreatus* and *Botryosphaeria rhodina*, cultured on basal medium containing the herbicide, Scepter® (Imazaquin) **J. Basic Microbiol.** v.45, n.6, p.460-469, 2005. doi: 10.1002/jobm.200410552

- RODRIGUES, E. G.; LIRIO, R. S.; LACAZ, C. S. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 34: 159-65. 1992.
- RUBILAR, O.; FEIJOO, G.; DIEZ, C.; LU-CHAU, T. A.; MOREIRA, M. T.; LEMA, J. M. Biodegradation of Pentachlorophenol in Soil slurry cultures by *Bjerkandera adusta* and *Anthracoxyllum discolor*. *Ind. Eng. Chem. Res.* v.46, p.6744-6751, 2007.
- SANKARAN, S.; KHANAL, S. K.; JASTI, N.; JIN, B.; POMETTO, A. L.; VAN LEEUWEN, J. Use of filamentous fungi for wastewater treatment and production of high value fungal byproducts: a review, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 40, p. 400–449, 2010.
- SCORZA JÚNIOR, R. P.; RIGITANO, R. L. O. Comportamento Ambiental do Inseticida Thiamethoxam em um Latossolo Vermelho distroférico de Dourados, MS. *Embrapa Agropecuária Oeste*. 1ed. 24p. 2009.
- SCHALLEY, C. A. *Int. J. Mass Spectrom.*, v.194, n.11, 2000.
- SEO, J.; KEYN, Y.; LI, Q. X. Bacterial degradation of Aromatic Compounds. *Internacional Journal of Environmental Research and Public Health*. v.6, p. 278 – 309, 2009.
- SILVA, A. C. F.; ROSA, C. R. E.; MELO, I. S. Sensibilidade de isolados de *Trichoderma* SP. a benomil e iprodione. *Ciência Rural*, Santa Maria, v.29. n.3. p. 395-399. 1999
- SOARES, A. F.; LEÃO, M. D.; NETO, M. R. V.; OLIVEIRA, S. M. A. Risk estimate of water contamination by pesticides used in coffee crops. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, v.16, n.4, p.425–432, 2012.
- SINGH, G.; BATISH, M.; SHARMA, P.; CAPALASH, N..Xenobiotics enhance laccase activity in alkali-tolerant -proteobacterium *jb*. *Brazilian Journal of Microbiology* v.40, p.26-30, ISSN 1517-8382, 2009.
- SU, SHIMING., ZENG, X., BAI L., LI L., DUAN, R. Arsenic biotransformation by arsenic-resistant fungi *Trichoderma asperellum* SM-12F1, *Penicillium janthinellum* SM-12F4, and *Fusarium oxysporum* CZ-8F1. *Science of the Total Environment*, v.409, p.5057–5062, 2011.
- SYNGENTA. **Actara 250 WG –Guia de produtos**. Março, 2015. Disponível em << <http://www.servicos.syngenta.com.br/PRODUTOS/ProductDetails.aspx?idProduct=207> >>
- TAMARU, H.; INOUE, H. Isolation and characterization of a laccase-derepressed mutant of *Neurospora crassa*. *J Bacteriol.* v.171 n.11, p.6288-6293, 1989.
- TONISHI, M., NAKAO, H., FURUYA, T., SEO, A., KODAMA, H., TSUBATA, K., ET AL. Flubendiamide, a novel insecticide highly active against lepidopterous insects pests. *Journal of Pesticide Science*, v.30, p.354– 360, 2005.
- TONINI, R. M. C. W.; REZENDE, C. E.; GRATIVOL, A. D. Degradação e biorremediação de compostos do petróleo por bactérias: revisão. *Oecologia Australis*. v.14, n.4, p.1025-1035, 2010.

TSUBATA K, TOHNISHI M, KODAMA H, SEO A. Chemistry of flubendiamide—discovery, synthesis and X-ray structure. **Pflanzenschutz-Nachr Bayer**, v.60, p.105–116, 2007.

USEPA (2008). Pesticide Fact Sheet, Flubendiamide. United States Environment Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides & Toxic Substances. Disponível em: <<[http:// www.epa.gov/opprd001/factsheets/flubendiamide.pdf](http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/flubendiamide.pdf)>>.

VACONDIO, B.; BIROLI, W. G.; FERREIRA, I. M. ; SELEGHIM, M. H. R. ; GONCALVES, S.; VASCONCELLOS, S. P. ; PORTO, A.L. Biodegradation of pentachlorophenol by marine-derived fungus *Trichoderma harzianum* CBMAI 1677 isolated from ascidian *Didemnum ligulum*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.4, p.266–275, 2015.

Van BRAMER, S.E . **An introduction to mass spectrometry**. Chester: Widener University, 1998. 38p.

VASCONCELOS, A. F. D.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SCARMINIO, I. S.; REZENDE, M.I. Optimization of laccase production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. **Process Biochemistry** v.35, p.1131 – 1138, 2000.

Vogel, H. J. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). **Microbial Genet. Bull.** v.13: p.42-43, 1956.

WALKER, A., JURADO-EXPOSITO, M., BENDING, G. D., & SMITH, V. J. R. Spatial variability in the degradation rate of isoproturon in soil. **Environmental Pollution**, v.111, p.407–415, 2001.

WARD, O.; SINGH, A.; VAN HAMME, J. Accelerated biodegradation of Petroleum Hydrocarbon waste. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v.30. p.260-270., 2003.

YE, H.; XU, H.; YU, C.; DAI, Y.; LIU, G.; XU, W; YUAN, S. Hydroxylation of naringin by *Trichoderma harzianum* to dramatically improve its antioxidative activity. **Enzyme and Microbial Technology**. V. 45, p. 282-287, 2009.

YU,Z.,ZENG,G.M.,CHEN,Y.N.,ZHANG,J.C.,YU,Y.,HUI,L.,ZHI-FENG,L.,LIN,T., Effects of inoculation with *Phanerochaete chrysosporium* on remediation of Pentachlorophenol contaminated soil waste by composting. **Process.Biochem.** V.46, p.1285–1291, 2011.

ZANG, L., DEMAIN, A.L.. Natural products: drug discovery and therapeutic medicine. **Huma press**. Totowa. p.95-106, 2005.

ZABAR, R.; KOMEL, T.; FABJAN, J.; KRALJ, M. B.; TREBSE, P. Photocatalytic degradation with immobilised TiO<sub>2</sub> of three selected neonicotinoid insecticides: Imidacloprid, thiamethoxam and clothianidin. **Chemosphere**, v.89, p.293-301, 2012.

ZHOU, G.; WANG, Y.; ZHAI, S.; GE, F.; LIU, Z.; DAI, Y.; YUAN, S.; HOU, J. Biodegradation of neonicotinoid insecticide thiamethoxam by the nitrogen-fixing and plant-growth-promoting rhizobacterium *Ensifer adhaerens* strain TMX-23. **Appl Microbiol Biotechnol.**, v.97, p.4065-4074, 2013.