



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Biodegradação de pesticidas em solos e biomisturas.

Sandra Cristina Cardoso Rodrigues

Orientação: Prof.^ª Dr.^ª Ana Paula Honrado Pinto

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2014



UNIVERSIDADE DE ÉVORA

ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Biodegradação de pesticidas em solos e biomisturas.

Sandra Cristina Cardoso Rodrigues

Orientação: Prof.^ª Dr.^ª Ana Paula Honrado Pinto

Mestrado em Bioquímica

Dissertação

Évora, 2014

Agradecimentos

Gostaria de expressar a minha profunda gratidão a todos aqueles que de uma forma direta ou mais subtil, contribuíram para o meu enriquecimento pessoal e profissional no decorrer de toda a dissertação.

Primeiramente, agradeço à minha orientadora Prof.^a Dr.^a Ana Paula Pinto por me ter aceitado como sua orientanda, por todo o seu apoio prestado, pela sua motivação, conhecimentos científicos e dedicação prestados para a realização deste trabalho. Sem a sua orientação tudo seria mais difícil.

À Prof.^a Dr.^a Dora Teixeira, também pelo seu apoio, disponibilidade, ajuda, simpatia e colaboração neste trabalho.

À Prof.^a Dr.^a Ana Teresa Caldeira pela sua paciência, disponibilidade e atenção prestadas em várias fases do trabalho.

Ao Laboratório Hércules pela disponibilidade na utilização dos equipamentos.

Quero dirigir por sua vez, os meus agradecimentos às Técnicas de Laboratório Deolinda, Lena e Esperança por toda a paciência e ajuda prestada durante todo o trabalho prático.

Agradeço a todo o pessoal do Laboratório de Enologia na Mitra, principalmente à Prof.^a Raquel Garcia pela simpatia com que sempre me recebeu e por estar sempre disposta a ajudar.

Agradeço principalmente à minha família, em especial aos meus pais e à minha irmã, por sempre me terem apoiado incondicionalmente e motivado a continuar. Sem o vosso amor e carinho nada disto teria sido possível. Obrigado por acreditarem sempre em mim e nas minhas capacidades.

Aos meus colegas e amigos, que sempre me apoiaram e estiveram lá nos momentos em que eu mais precisei deles. Agradeço a vossa amizade ao longo de todos estes anos, o incentivo, apoio e carinho. Obrigado Andreia por sempre me ajudares em tudo, me aturares e acreditares em mim desde o início.

De uma forma geral, gostaria de agradecer também a todos os docentes das unidades curriculares que frequentei ao longo destes seis anos, por toda a sabedoria, conhecimento e formação que me transmitiram.

A todos o meu muito obrigado!

Abreviaturas e Convenções

2-OH-TERB: 2-hidroxi-terbutilazina

APCI- Ionização Química à Pressão Atmosférica (do inglês "*Atmospheric-Pressure Chemical Ionization*")

ASE- Accelerated Solvent Extraction

DAD- Detetor Diode Array (do inglês "*Diode Array Detector*")

DET: Desetil-terbutilazina

DL50- Dose Letal

DNA- Acido Desoxirribonucleico (do Inglês "*Deoxyribonucleic Acid*")

ESI- Electrospray Ionization

GC- Cromatografia Gasosa (do inglês "*Gas Chromatography*")

HPLC- Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência (do inglês "*High Performance Liquid Chromatography*")

i.e.- Isto é

Kow- Coeficiente de partição octanol-água

LC-MS- Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (do inglês "*Liquid Chromatography- Mass Spectroscopy*")

m/z- Razão massa carga

MEA- Malte Extrato Agar

MS- Espectrómetro de Massa (do inglês "*Mass spectrometry*")

p.e.- Por exemplo

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês "*Polymerase Chain Reaction*")

pKa- Constante de acidez

RB- Rosa Bengal

rpm- Rotações por minuto

SEM- Microscopia Eletrônica de Varrimento (do inglês "*Scanning Electron Microscopy*")

SIM- Monitorização do Ião Seleccionado (do inglês "*Single Ion Monitoring*")

SRM- Monitorização da Reação Seleccionada (do inglês "*Selected Reaction Monitoring*")

TIC- Corrente Iónica Total (do inglês "*Total Ion Current*")

tr- Tempo de retenção

UV- Ultra Violeta

Biodegradação de pesticidas em solos e biomisturas.

Resumo

O uso mundial de pesticidas tem aumentado drasticamente nas últimas duas décadas pelo que estes fitofármacos bem como os seus respetivos metabolitos têm sido frequentemente detetados em vários compartimentos ambientais (p.e. solos, águas).

Com o objetivo de seleccionar microrganismos potencialmente capazes de biodegradar os pesticidas terbutilazina, difenoconazol, diflufenicão e pendimetalina, presentes em diferentes biomisturas, foram realizados ensaios *batch* com duração de seis meses, utilizando como matriz um solo franco-argiloso e dois substratos.

A comparação entre todas as biomisturas, mostrou que os pesticidas foram removidos com a seguinte ordem de eficiência: pendimetalina>terbutilazina>diflufenicão>difenoconazol.

Taxas de remoção de 100%, foram obtidas para o herbicida pendimetalina, na presença de três diferentes consórcios microbianos.

A análise por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa dos extractos obtidos, permitiu confirmar a presença de metabolitos para dois dos xenobióticos estudados, confirmando assim a metabolização microbiana dos herbicidas terbutilazina e pendimetalina por hidroxilação e hidrólise, respetivamente.

Palavras-chave: pesticidas, biodegradação, microrganismos, metabolitos.

Biodegradation of pesticides in soils and biomixtures.

Abstract

The global usage of pesticides has increased dramatically over the last two decades therefore these phytochemicals and their respective metabolites have been frequently detected in various environmental compartments (eg soil, water).

With the aim of selecting potentially microorganisms capable of biodegrading the pesticides terbuthylazine, difenoconazole, diflufenican and pendimethalin, present in different biomixtures, batch tests were performed with duration of six months, using a clay loam soil and two substrates as matrix.

The comparison between all biomixtures showed that pesticides were removed in the following order of efficiency: pendimethalin> terbuthylazine> diflufenican> difenoconazole.

Removal rates of 100% were obtained for the herbicide pendimethalin, in the presence of three different microbial consortia.

The analysis by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry of the extracts obtained, confirmed the presence of metabolites for two studied xenobiotics, thus confirming the microbial metabolism of herbicides terbuthylazine and pendimethalin by hydroxylation and hydrolysis, respectively.

Keywords: pesticides, biodegradation, microorganisms, metabolites.

Índice

Agradecimentos.....	i
Abreviaturas.....	ii
Resumo	iv
Abstract.....	v
Índice	vi
Índice de Figuras	viii
Índice de Tabelas.....	xiii
1. Problemática	1
2. Objetivos	2
3. Estratégia	3
4. Introdução	4
4.1. Pesticidas no ambiente	1
4.1.1 Pesticidas em águas	5
4.1.2 Pesticidas em solos.....	7
4.2. Métodos de tratamento para matrizes contaminadas	8
4.2.1 Biorremediação	8
4.2.2 <i>Biobeds</i>	9
4.2.3 <i>Bioaugmentation</i>	11
4.3. Fungos como auxiliares de biodegradação	12
4.4. Principais mecanismos de metabolização de xenobióticos	13
4.5. Microrganismos em estudo	17
4.5.1 <i>Fusarium</i> spp.	17
4.5.2 <i>Trichoderma viride</i>	18
4.5.3 <i>Aspergillus</i> spp.	19
4.5.4 <i>Lecanicillium saksenae</i>	20
4.5.5 Bac 1 e Bac 2	21
4.6. Pesticidas em estudo e principais vias de metabolização	21
4.6.1 Terbutilazina.....	21
4.6.2 Difenoconazol.	24
4.6.3 Diflufenicão.	25
4.6.4 Pendimetalina.	27
4.7. Métodos analíticos utilizados.....	29
4.7.1 Extração Acelerada por Solventes (ASE).	29
4.7.2 Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência (HPLC).	30
4.7.3 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS). 31	
5. Material e Métodos.....	33

5.1. Fitofármacos utilizados.....	33
5.2. Isolamento e identificação das espécies de fungos mais adaptadas aos pesticidas.....	34
5.3. Preparação de culturas líquidas dos fungos selecionados	36
5.4. Preparação de culturas líquidas das bactérias selecionadas.....	36
5.5. Ensaio de biodegradação	36
5.6. Extração Acelerada por Solventes (ASE)	40
5.7. Desadsorção dos pesticidas.....	41
5.8. Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência com detetor UV (HPLC-UV).....	41
5.9 Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS)	42
5.10. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)	43
5.11. Análise estatística	43
6. Resultados e Discussão	44
6.1. Isolamento e identificação das espécies de fungos mais adaptadas aos pesticidas.....	44
6.2. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)	45
6.3. Ensaio de biodegradação.....	46
6.3.1 Terbutilazina.....	47
6.3.2 Difenconazol.	54
6.3.3 Diflufenicão.	60
6.3.4 Pendimetalina.	67
6.3.5 Considerações finais	72
6.4. Biodegradação dos pesticidas.....	73
6. Conclusão	82
7. Referências Bibliográficas	84

Índice de Figuras

Figura 1: Destino dos resíduos de pesticidas no solo (adaptado de Andreu & Picó, 2004)	7
Figura 2: Sistema típico de um <i>Biobed</i> (adaptado de Vischetti <i>et al.</i> , 2007)	10
Figura 3: Reações de Fase I e Fase II do metabolismo de xenobióticos por fungos (adaptado de Costa <i>et al.</i> , 2004).....	15
Figura 4: Princípios fundamentais na degradação aeróbia de hidrocarbonetos por bactérias: processos associados ao crescimento (adaptado de Rem & Reed, 2008)..	16
Figura 5: Isolado fúngico do fungo <i>Fusarium oxysporum</i> (adaptado de Fang & Barbetti, 2014).....	17
Figura 6: Isolado fúngico do fungo <i>Trichoderma viride</i> (adaptado de Mishra <i>et al.</i> , 2011)	19
Figura 7: Isolado fúngico do fungo <i>Aspergillus fumigatus</i> (adaptado de Metta <i>et al.</i> , 2010)	20
Figura 8: Isolado fúngico do fungo <i>Lecanicillium saksenae</i> (Universidade de Évora, 2014)	21
Figura 9: Estrutura molecular do herbicida terbutilazina (adaptado de Mercadante <i>et al.</i> , 2012).....	22
Figura 10: Principais vias de metabolização da terbutilazina no solo. TERB= Terbutilazina; DIA= Deisopropilatrazina; DET= Desetilterbutilazina; 2-OH-TERB= 2-hidroxi-terbutilazina; 2-Cl-4-OH-TERB= 2-cloro-4-hidroxi-terbutilazina; 2-OH-DET= 2-hidroxi-desetilterbutilazina; 2,4-DI-HIDROXI-TERB= 2,4-dihidroxi-terbutilazina (adaptado de Bottoni <i>et al.</i> , 2013).....	23
Figura 11: Estrutura molecular do difenoconazol (adaptado de Du <i>et al.</i> , 2014b)	24
Figura 12: Via de metabolização proposta para o metabolismo aeróbio do difenoconazol no solo. Nome IUPAC dos metabolitos CGA 205375= 1-[2-cloro-4-(4-cloro-fenoxi)-fenil]-2-(1,2,4-triazol)-1-il-etanol CGA 205374= 1-(2-cloro-4-(4-cloro-fenoxi)-fenil)-2-(1,2,4-triazol)-1-il-etanona (adaptado de FAO, 2014)	25
Figura 13: Estrutura molecular do herbicida diflufenicão (adaptado de EFSA, 2013b).	26
Figura 14: Estrutura molecular do metabolito AE 0542291 (nome IUPAC= 2-[3-(trifluorometil)fenoxi]piridina-3-carboxamida) (adaptado de EFSA, 2013b)..	26
Figura 15: Estrutura molecular do herbicida pendimetalina (adaptado de Sarma <i>et al.</i> , 2006)	27
Figura 16: Via de degradação proposta para o pesticida pendimetalina por microrganismos do solo. M1= <i>N</i> -(1-etilpropil)-3'4-dicarboxi 2'6-dinitro benzenamina, M2= <i>N</i> -(1-etil-1-propil)-3,4dicarboxi-2'6-dinitrobenzenamina- <i>N</i> -óxido, M3= <i>N</i> -(1-	

etilpropil)-3,4dimetoxi-2,6-dinitrobenzenamina e M4= benzimidazol-7-carboxialdeído (adaptado de Ramakrishna <i>et al.</i> 2008)	28
Figura 17: Biomisturas a partir das quais foram efetuados os isolamentos das espécies de fungos mais adaptadas aos pesticidas. 1= Fungos A e B; 2= Fungos C e <i>L. saksenae</i> e 3= <i>T. viride</i>	35
Figura 18: Esquema da montagem do ensaio de biodegradação e descrição das diferentes modalidades onde foram adicionados fungos. Os copos marcados com A, B e C correspondem às réplicas	38
Figura 19: Esquema da montagem do ensaio de biodegradação e descrição das diferentes modalidades onde foram adicionadas bactérias. Os copos marcados com A, B e C correspondem às réplicas	39
Figura 20: Isolados fúngicos obtidos a partir de amostras constituídas por: i) solo franco-argiloso (Fungo A e Fungo B); ii) biomistura contendo solo franco-argiloso e cortiça (Fungo C).....	44
Figura 21: Imagens obtidas através de SEM para a amostra do copo 4A (solo+cortiça+ <i>Fusarium</i> sp.).....	45
Figura 22: Cromatograma obtido por HPLC-UV para a amostra do copo 1B, no final do ensaio i.e. 180 dias de contaminação	46
Figura 23: Concentração do pesticida terbutilazina (mg Kg ⁻¹ de solo) nas amostras recolhidas ao fim de: A) 0 dias; B) 15 dias; C) 30 dias; D) 100 dias e E) 140 dias após contaminação. Bio 1= <i>L. saksenae</i> + Cortiça; Bio 2= <i>Fusarium</i> sp. + Cortiça; Bio 3= <i>L. saksenae</i> + <i>Fusarium</i> sp. + Cortiça; Bio 4= <i>L. saksenae</i> + <i>T. viride</i> + <i>Fusarium</i> sp. + Cortiça; Bio 5= <i>L. saksenae</i> + <i>T. viride</i> + <i>Fusarium</i> sp. + Vermiculite; Bio 6= <i>L. saksenae</i> + <i>T. viride</i> + <i>F. oxysporum</i> + <i>Aspergillus</i> sp. + Cortiça. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados ± desvio padrão	47
Figura 24: Concentração do pesticida terbutilazina (mg Kg ⁻¹ de solo) nas amostras recolhidas ao fim de 180 dias após contaminação. Bio 1= <i>L. saksenae</i> + Cortiça; Bio 2= <i>Fusarium</i> sp. + Cortiça; Bio 3= <i>L. saksenae</i> + <i>Fusarium</i> sp. + Cortiça; Bio 4= <i>L. saksenae</i> + <i>T. viride</i> + <i>Fusarium</i> sp. + Cortiça; Bio 5= <i>L. saksenae</i> + <i>T. viride</i> + <i>Fusarium</i> sp. + Vermiculite; Bio 6= <i>L. saksenae</i> + <i>T. viride</i> + <i>F. oxysporum</i> + <i>Aspergillus</i> sp. + Cortiça. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados ± desvio padrão. Letras distintas significa que existem diferenças significativas para p<0,05	48
Figura 25: Concentração do pesticida terbutilazina (mg Kg ⁻¹ de solo) nas amostras recolhidas ao fim de: A) 0 dias e B) 40 dias após contaminação. Bio 7= Bac 1 + Cortiça; Bio 8= Bac 1 + Vermiculite; Bio 9= Bac 2 + Cortiça; Bio 10= Bac 2 + Vermiculite. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados ± desvio padrão. 49	49

Figura 26: Concentração do pesticida terbutilazina (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de 120 dias após contaminação. Bio 7= Bac 1 + Cortiça; Bio 8= Bac 1 + Vermiculite; Bio 9= Bac 2 + Cortiça; Bio 10= Bac 2 + Vermiculite. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Letras distintas significa que existem diferenças significativas para $p < 0,05$ 50

Figura 27: Concentração do pesticida difenoconazol (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de: A) 0 dias; B) 15 dias; C) 30 dias; D) 100 dias e E) 140 dias após contaminação. Bio 1= *L. saksenae* + Cortiça; Bio 2= *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 3= *L. saksenae* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 4= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 5= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Vermiculite; Bio 6= *L. saksenae* + *T. viride* + *F. oxysporum* + *Aspergillus* sp. + Cortiça. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão 54

Figura 28: Concentração do pesticida difenoconazol (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de 180 dias após contaminação. Bio 1= *L. saksenae* + Cortiça; Bio 2= *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 3= *L. saksenae* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 4= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 5= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Vermiculite; Bio 6= *L. saksenae* + *T. viride* + *F. oxysporum* + *Aspergillus* sp. + Cortiça. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Letras distintas significa que existem diferenças significativas para $p < 0,05$ 55

Figura 29: Concentração do pesticida difenoconazol (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de: A) 0 dias e B) 40 dias após contaminação. Bio 7= Bac 1 + Cortiça; Bio 8= Bac 1 + Vermiculite; Bio 9= Bac 2 + Cortiça; Bio 10= Bac 2 + Vermiculite. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão.. 57

Figura 30: Concentração do pesticida difenoconazol (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de 120 dias após contaminação. Bio 7= Bac 1 + Cortiça; Bio 8= Bac 1 + Vermiculite; Bio 9= Bac 2 + Cortiça; Bio 10= Bac 2 + Vermiculite. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Letras distintas significa que existem diferenças significativas para $p < 0,05$ 58

Figura 31: Concentração do pesticida diflufenicão (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de: A) 0 dias; B) 15 dias; C) 30 dias; D) 100 dias e E) 140 dias após contaminação. Bio 1= *L. saksenae* + Cortiça; Bio 2= *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 3= *L. saksenae* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 4= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 5= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Vermiculite; Bio 6= *L. saksenae* + *T. viride* + *F. oxysporum* + *Aspergillus* sp. + Cortiça. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão 61

Figura 32: Concentração do pesticida diflufenicão (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de 180 dias após contaminação. Bio 1= *L. saksenae* + Cortiça; Bio 2= *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 3= *L. saksenae* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 4= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 5= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Vermiculite; Bio 6= *L. saksenae* + *T. viride* + *F. oxysporum* + *Aspergillus* sp. + Cortiça. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Letras distintas significa que existem diferenças significativas para $p < 0,05$ 62

Figura 33: Concentração do pesticida diflufenicão (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas A) 0 dias e B) 40 dias após contaminação dos ensaios de biodegradação com bactérias. Bio 7= Bac 1 + Cortiça; Bio 8= Bac 1 + Vermiculite; Bio 9= Bac 2 + Cortiça; Bio 10= Bac 2 + Vermiculite. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão.. 64

Figura 34: Concentração do pesticida diflufenicão (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de 120 dias após contaminação. Bio 7= Bac 1 + Cortiça; Bio 8= Bac 1 + Vermiculite; Bio 9= Bac 2 + Cortiça; Bio 10= Bac 2 + Vermiculite. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Letras distintas significa que existem diferenças significativas para $p < 0,05$ 64

Figura 35: Concentração do pesticida pendimetalina (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de: A) 0 dias; B) 15 dias; C) 30 dias; D) 100 dias e E) 140 dias após contaminação. Bio 1= *L. saksenae* + Cortiça; Bio 2= *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 3= *L. saksenae* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 4= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 5= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Vermiculite; Bio 6= *L. saksenae* + *T. viride* + *F. oxysporum* + *Aspergillus* sp. + Cortiça. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão 67

Figura 36: Concentração do pesticida pendimetalina (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de 180 dias após contaminação. Bio 1= *L. saksenae* + Cortiça; Bio 2= *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 3= *L. saksenae* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 4= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 5= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Vermiculite; Bio 6= *L. saksenae* + *T. viride* + *F. oxysporum* + *Aspergillus* sp. + Cortiça. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Letras distintas significa que existem diferenças significativas para $p < 0,05$ 68

Figura 37: Concentração do pesticida pendimetalina (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas A) 0 dias e B) 40 dias após contaminação dos ensaios de biodegradação com bactérias. Bio 7= Bac 1 + Cortiça; Bio 8= Bac 1 + Vermiculite; Bio 9= Bac 2 +

Cortiça; Bio 10= Bac 2 + Vermiculite. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão	70
Figura 38: Concentração do pesticida pendimetalina (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de 120 dias após contaminação. Bio 7= Bac 1 + Cortiça; Bio 8= Bac 1 + Vermiculite; Bio 9= Bac 2 + Cortiça; Bio 10= Bac 2 + Vermiculite. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Letras distintas significa que existem diferenças significativas para $p < 0,05$	70
Figura 39: Cromatograma de corrente iónica total (TIC) obtido para as amostras de solo da Bio 4, recolhidas 100 dias após a contaminação. Compostos com tr 22,18 e 28,67 min identificados como sendo 2-hidroxi-terbutilazina (2-OH-TERB) e <i>N</i> -(1-etil-1-propil)-3,4dicarboxi-2'6-dinitrobenzenamina- <i>N</i> -óxido (M2), respetivamente.....	73
Figura 40: Espectro full MS obtido para o ião com tr 22,18 min 2-hidroxi-terbutilazina (2-OH-TERB), na amostra da Bio 4 após 100 dias.....	74
Figura 41: Vias de metabolização do herbicida terbutilazina pela bactéria <i>Pseudomonas</i> sp. R1 = $\text{C}(\text{CH}_3)_3$; OH- TERB: Hidroxi-terbutilazina; DET: Desetil-terbutilazina; OH-DET: Hidroxi-desetil-terbutilazina; BIS-DES: Di-butil-desetil-terbutilazina (adaptado de Grenni, 2011).....	75
Figura 42: Espectro full MS obtido para o ião <i>N</i> -(1-etil-1-propil)-3,4dicarboxi-2'6-dinitrobenzenamina- <i>N</i> -óxido (M2), com tr 28,67 min, na amostra da Bio 4 após 100 dias.....	76
Figura 43: Cromatograma de corrente iónica total (TIC) obtido para extratos resultantes dos ensaios de desadsorção da cortiça (ver seção 5.7.), para a Bio 4, 100 dias após a contaminação. Compostos com tr 22,18 e 28,67 min identificados como sendo 2-hidroxi-terbutilazina (2-OH-TERB) e <i>N</i> -(1-etil-1-propil)-3,4dicarboxi-2'6-dinitrobenzenamina- <i>N</i> -óxido (M2), respetivamente.....	77
Figura 44: Cromatograma de corrente iónica total (TIC) obtido para as amostras de solo da Bio 4, recolhidas após 180 dias. Composto com tr 22,18 min identificado como sendo o 2-hidroxi-terbutilazina (2-OH-TERB).....	78
Figura 45: Cromatograma de corrente iónica total (TIC) obtido para extratos resultantes dos ensaios de desadsorção da cortiça (ver seção 5.7.), para a Bio 4, 180 dias após a contaminação. Compostos com tr 22,18 e 28,67 min identificados como sendo 2-hidroxi-terbutilazina (2-OH-TERB) e <i>N</i> -(1-etil-1-propil)-3,4dicarboxi-2'6-dinitrobenzenamina- <i>N</i> -óxido (M2), respetivamente.....	79

Índice de Tabelas

Tabela 1: Principais características físico-químicas da terbutilazina, difenoconazol, diflufenicão e pendimetalina.....	33
Tabela 2: Composição das biomisturas (Bio) em estudo.....	39
Tabela 3: Condições utilizadas no método Extração Acelerada por Solventes (ASE) da Dionex	40
Tabela 4: Gradiente utilizado na separação dos compostos por HPLC-UV	42
Tabela 5: Identificação das espécies dos isolados fúngicos	44
Tabela 6: Percentagens de remoção do pesticida terbutilazina, 180 dias após a contaminação, nas diferentes biomisturas	51
Tabela 7: Percentagens de remoção do pesticida difenoconazol, 180 dias após a contaminação, nas diferentes biomisturas	59
Tabela 8: Percentagens de remoção do pesticida diflufenicão, 180 dias após a contaminação, nas diferentes biomisturas	66
Tabela 9: Percentagens de remoção do pesticida pendimetalina, 180 dias após a contaminação, nas diferentes biomisturas	71
Tabela 10: Presença ✓ () ou ausência (-) dos produtos de degradação 2-hidroxiterbutilazina (2-OH-TERB) e <i>N</i> -(1-etil-1-propil)-3,4dicarboxi-2'6-dinitrobenzenamina- <i>N</i> -óxido (M2), nos extratos de amostras de solo e extratos de desadsorção da cortiça, após 100 e 180 dias na presença de fungos.....	80

1. Problemática

Os fitofármacos comumente designados pesticidas ou agroquímicos, são substâncias amplamente utilizadas na agricultura com o objetivo de aumentar a produtividade agrícola, melhorar a qualidade das culturas e reduzir os custos de trabalho e de energia (Rinaldo dos Reis *et al.*, 2014). O resultado ideal da sua utilização ocorre quando um pesticida realiza os propósitos para os quais foi aplicado e, de seguida, se decompõe em compostos inofensivos como o dióxido de carbono e água. No entanto, o seu uso indiscriminado nas práticas agrícolas convencionais aumentou drasticamente ao longo dos anos e os seus efeitos negativos potenciais sobre o meio ambiente e a saúde humana são cada vez mais motivo de preocupação (Tejada *et al.*, 2011).

Devido ao aumento das preocupações ambientais, há cada vez mais uma necessidade de desenvolver métodos seguros e economicamente viáveis, para a remediação de águas e solos contaminados com estes xenobióticos. Assim sendo, a biorremediação tem ganho aceitação como uma alternativa para despoluir solos e águas contaminados por fitofármacos, utilizando microrganismos (p. e. fungos) para degradar os poluentes (Chun *et al.*, 2004; Mohan *et al.*, 2007). Os fungos geralmente biotransformam os pesticidas e outros xenobióticos, introduzindo pequenas alterações na estrutura da molécula, tornando-os menos tóxicos ou não tóxicos. Assim, o pesticida biotransformado pode ser libertado no solo, onde será suscetível a uma degradação adicional executada nomeadamente pelas bactérias (Pinto *et al.*, 2012).

Alguns trabalhos sobre biorremediação, demonstraram a possibilidade de selecionar microrganismos para a biodegradação de diferentes xenobióticos, tornando este tratamento biológico um instrumento eficaz e ecológico para controlar e prevenir a contaminação orgânica nos vários compartimentos ambientais (Atlas & Philp, 2006).

Neste trabalho foi avaliada a capacidade dos fungos *Lecanicillium saksenae*, *Trichoderma viride*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus sp.* e *Fusarium sp.*, bem como de duas bactérias Bac 1 e Bac 2 na biodegradação dos pesticidas terbutilazina, difenoconazol, diflufenicão e pendimetalina, presentes num solo franco-argiloso e duas biomistura (solo + cortiça e solo + vermiculite). Os isolados fúngicos *Fusarium sp.*, *F. oxysporum* e *Aspergillus sp.* foram obtidos a partir de amostras de diferentes biomisturas, previamente contaminadas com os pesticidas em estudo.

2. Objetivos

De acordo com a problemática descrita, este estudo teve como objetivo selecionar microrganismos com capacidade de biodegradação dos pesticidas terbutilazina, difenoconazol, diflufenicão e pendimetalina, presentes em diferentes biomisturas. Para isso, procedeu-se ao isolamento e identificação dos fungos *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Fusarium oxysporum* a partir de amostras previamente contaminadas. Para além destas espécies foram também avaliados os fungos *L. sakeanae* e *T. viride*, por terem demonstrado em trabalhos anteriores uma elevada capacidade de biodegradação dos xenobióticos em estudo. Duas bactérias também foram selecionadas para este estudo devido ao grande potencial para biodegradar os pesticidas estudados. A capacidade de biodegradação/remoção destes pesticidas, pelos fungos e bactérias selecionados, foi avaliada através da realização de ensaios *batch* com a duração de 180 e 120 dias, respetivamente, utilizando como matriz um solo franco-argiloso e dois substratos (cortiça e vermiculite).

3. Estratégia

Local de realização:

Laboratório de Química dos Produtos Naturais do Departamento de Química da Universidade de Évora; *Centro Hércules* da Universidade de Évora e *Laboratório de Enologia* do Departamento de Fitotecnia (Herdade da Mitra), da Universidade de Évora.

Duração prevista do trabalho:

Dois semestres letivos.

Fungos em estudo:

Lecanicillium sakesenae, *Trichoderma viride*, *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp. e *Fusarium oxysporum*.

Bactérias em estudo:

Bac 1 e Bac 2.

Pesticidas em estudo:

Terbutilazina, Difenconazol, Diflufenicão e Pendimetalina.

Técnicas utilizadas:

- Extração Acelerada por Solventes (ASE);
- Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS);
- Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência com deteção UV (HPLC-UV);
- Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM).

4. Introdução

4.1. Pesticidas no ambiente

Os pesticidas representam uma ampla categoria de produtos químicos orgânicos e inorgânicos, cuja aplicação nos ecossistemas agrícolas tem como objetivo causar efeitos adversos sobre os animais nocivos, insetos, plantas, ervas daninhas, bactérias e fungos, a fim de limitar a sua difusão, inibir o seu crescimento e a sua sobrevivência. Estes fitofármacos são utilizados principalmente na agricultura, mas também têm aplicação na indústria, higiene pública, jardinagem e em atividades domésticas. Em todo o mundo são aplicados cerca de três bilhões de quilos de pesticidas e apesar das suas vantagens inegáveis em termos de altos rendimentos na agricultura intensiva, no aumento da produção de alimentos, na evolução das técnicas agrícolas e na melhoria da qualidade dos produtos, estes podem produzir efeitos tóxicos potencialmente perigosos para o meio ambiente. Assim, o uso disseminado destes fitofármacos para fins agrícolas e não-agrícolas resultou na presença dos seus resíduos em diferentes compartimentos ambientais, que em muitos dos casos se deve ao facto destes químicos não serem totalmente seletivos e, por conseguinte, poderem ter um efeito sobre os organismos não-alvo no ambiente. Estudos publicados recentemente, demonstram que diferentes pesticidas e respetivos metabolitos, frequentemente detetados em solos, águas superficiais e subterrâneas e em alguns casos águas para consumo humano (Pedlowski *et al.*, 2012; Plakas & Karabelas, 2012; Bottoni *et al.*, 2013; Flaherty *et al.*, 2013).

Uma vez que os pesticidas são altamente tóxicos para os organismos vivos, estes representam uma grande preocupação para a saúde humana na medida em que podem contribuir significativamente para o aparecimento de várias patologias (Plakas & Karabelas, 2012; Hernández *et al.*, 2013). Ao abordar especificamente os problemas causados pelos pesticidas na saúde humana, Pedlowski *et al.* (2012) indica que a contaminação pode ocorrer por meios diretos e indiretos, e os trabalhadores rurais são provavelmente o grupo em maior risco através da exposição ocupacional. Uma explicação comum para os altos níveis de exposição a pesticidas nos países em desenvolvimento poderá ser o baixo nível de escolaridade entre os agricultores, prejudicando as suas capacidades de seguir os avisos de perigo desenvolvidos pela indústria química e agências reguladoras (Pedlowski *et al.*, 2012).

Sob o ponto de vista da higiene e segurança no trabalho, o Ministério da Agricultura, do Desenvolvimento Rural e das Pescas tem desenvolvido esforços de forma a poderem ser minimizados os impactos toxicológicos que se encontram relacionados com o manuseamento dos fitofármacos, através da disponibilização de

informações acerca dos locais de compra de equipamentos de proteção individual e o uso correto dos mesmos. No entanto, os cuidados a ter no manuseamento dos pesticidas não devem concentrar-se apenas nos agricultores, mas sim abranger todos os que direta ou indiretamente contactam com os mesmos (Teixeira, 2010).

A base de dados de pesticidas da União Europeia contém uma lista de 1304 ingredientes ativos que são comercializados em toda a gama de produtos fitossanitários comerciais (EUPD, 2014). Portugal, devido às suas condições climáticas e geográficas favoráveis, possui uma grande variedade de atividades agrícolas que exigem um elevado consumo de fitofármacos (Ratola *et al.*, 2014). Assim, é de interesse fundamental o desenvolvimento de procedimentos eficazes para prevenir e controlar a contaminação dos vários compartimentos ambientais causada por pesticidas.

4.1.1. Pesticidas em águas

O uso intensivo de pesticidas pela agricultura tornou-se numa fonte de contaminação de águas superficiais e subterrâneas, na medida em que as águas superficiais são contaminadas pelo escoamento superficial, e as águas subterrâneas pela lixiviação dos solos (Brum, 2012). O escoamento superficial corresponde ao arrastamento dos fitofármacos causado pela água da rega ou chuva na superfície do solo, podendo chegar à superfície dos rios, lagos e terrenos com baixo declive. Já a lixiviação é caracterizada pelo movimento descendente dos fitofármacos ao longo do perfil do solo, causado pela percolação da água. Esse processo ocorre quando a água da chuva/regagem se infiltra no solo, levando consigo os contaminantes, podendo atingir as águas subterrâneas e os lençóis freáticos. Apesar do solo atuar como um filtro físico e químico, este não confere uma total proteção quanto ao risco de contaminação (Teixeira, 2010; Brum, 2012).

A probabilidade de um poluente atingir a água subterrânea depende de vários fatores, tais como a espessura e permeabilidade do aquífero, o teor de matéria orgânica do solo, o tipo e intensidade da precipitação, a inclinação do terreno, bem como a intensidade do uso dos pesticidas. Além disso, certas práticas agrícolas como o uso de drenos e irrigação subterrâneas, podem contribuir significativamente para a lixiviação dos pesticidas e, posteriormente, para a contaminação das águas subterrâneas. A disponibilidade do poluente no solo é outro fator importante no que diz respeito à contaminação de águas subterrâneas. Um poluente que se deposite no solo poderá passar por uma série de reações ou interações químicas e físicas com os

constituintes do solo antes de atingir a água subterrânea, que poderão neutralizar, modificar ou retardar a ação do poluente (Fait *et al.*, 2010; Teixeira, 2010).

Em águas de superfície, os pesticidas podem ser foto-degradados ou metabolizados contrariamente ao que acontece em águas subterrâneas, onde estes podem permanecer estáveis por longos períodos de tempo (Gonçalves, 2013).

A concentração e a forma química dos pesticidas no ambiente, nomeadamente em águas utilizadas para consumo humano, podem acarretar dificuldades às Estações de Tratamento de Águas (ETAs), havendo uma crescente necessidade de tecnologias mais complexas do que aquelas que são normalmente usadas nos tratamentos convencionais (Teixeira, 2010).

Segundo Teixeira (2010), a qualidade de uma água corresponde a um conjunto de características, físicas, químicas e biológicas de um certo corpo de água, avaliadas segundo critérios de qualidade que irão depender da finalidade da sua utilização.

As grandes dificuldades de um programa de monitorização da qualidade da água são conhecer o funcionamento dos ecossistemas, elaborar uma base de dados sobre a qualidade da água e identificar os fatores que afetam essa qualidade a nível regional e nacional (Teixeira, 2010).

A presença dos pesticidas nos cursos de água é agora um tema de considerável interesse ambiental, devido ao número crescente de compostos detetados, exigindo a implementação de diretivas rigorosas (Herrero-Hernández *et al.*, 2013) pela Comissão Europeia (CE) de modo a minimizar o impacto sobre o meio ambiente. Assim sendo, a União Europeia estabeleceu diferentes diretivas, como a Diretiva-Quadro da Água 2000/60/CE, cujo principal objetivo é proteger a qualidade da água (Comissão Europeia, 2000). No ano de 2008, foi introduzida a Diretiva N° 2008/105/CE, estabelecendo uma lista de trinta e três substâncias prioritárias a ser controladas na água, em que um terço da lista corresponde a pesticidas (Comissão Europeia, 2008). Em 2013, esta lista sofreu uma atualização, passando a ser quarenta e cinco as substâncias prioritárias a ser controladas na água (União Europeia, 2013).

Assim sendo, no que diz respeito à qualidade da água potável, é definido um limite de 0.1 µg/L para um único ingrediente ativo de pesticidas, e 0.5 µg/L para a soma de todos ingredientes ativos individuais detetados e quantificados por meio de monitorização (Decreto-Lei N° 306/2007).

4.1.2. Pesticidas em solos

O destino dos pesticidas no solo é controlado pela dinâmica química, biológica e física desta matriz, daí que processos como a degradação química e microbiológica (que afetam a sua persistência) bem como a sorção, absorção pelas plantas, volatilização, erosão pelo vento, escoamento e lixiviação (que afetam a sua mobilidade) possam afetar o destino destes no solo (Figura 1) (Adaptado de Andreu & Picó, 2004). A persistência do pesticida no solo é a taxa de tempo que um pesticida leva para se decompor naturalmente em condições ideais. Esta é muitas vezes expressa como tempo de meia-vida e pode ser dividida em três categorias que incluem: não persistente (tempo de meia-vida inferior a trinta dias), moderadamente persistente (tempo de meia-vida entre trinta a cem dias) e persistente (tempo de meia-vida superior a cem dias) (Tharp, 2012).

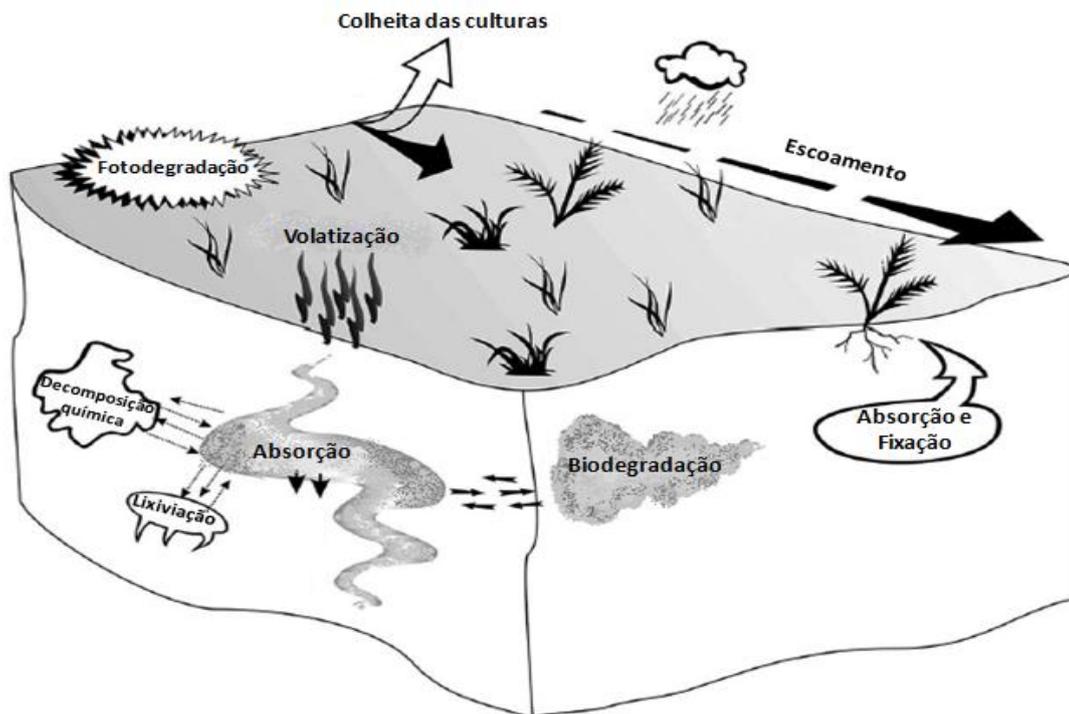


Figura 1- Destino dos resíduos de pesticidas no solo (adaptado de Andreu & Picó, 2004).

Como referido no parágrafo anterior, os pesticidas podem ser degradados por processos químicos e microbiológicos. A degradação química ocorre através de reações como a fotólise, hidrólise, oxidação e redução, já a degradação microbiológica ocorre quando os microrganismos do solo consomem ou degradam os pesticidas.

Estes microrganismos encontram-se maioritariamente distribuídos na camada superficial do solo, onde a matéria orgânica atua como fonte de alimento (Andreu & Picó, 2004).

Se os pesticidas são degradados durante um breve período de dias pelos microrganismos do solo ou se estes são acumulados de forma constante de ano para ano, depende muito do clima, do tipo de solo e das práticas agrícolas utilizadas bem como da comunidade microbiana presente (Andreu & Picó, 2004).

As propriedades físico-químicas e a disponibilidade do pesticida utilizado, bem como as propriedades do solo (textura, teor de argila, matéria orgânica e permeabilidade) desempenham papéis fundamentais no processo de lixiviação destes compostos ao longo do perfil do solo (Plakas & Karabelas, 2012; Marín-Benito *et al.*, 2013).

Em algumas investigações, reconheceu-se a perda de 1-2% dos pesticidas aplicados através da contaminação difusa, pelo arrastamento das pulverizações, o escoamento superficial, volatilização e lixiviação dos pesticidas. No entanto, a principal via de contaminação deriva da contaminação pontual através das más práticas agrícolas, no que diz respeito aos derramamentos acidentais, à lavagem e ao enchimento de tanques de pulverização contendo pesticidas (Vischetti *et al.* 2004; Brown & Beinum, 2009; Grenni *et al.*, 2012; Karanasios *et al.*, 2013).

4.2. Métodos de tratamento para matrizes contaminadas

Existem vários métodos para o tratamento de matrizes contaminadas com pesticidas, estes envolvem tanto abordagens físico-químicas como biológicas. Embora os tratamentos físico-químicos sejam eficazes, estes são caros, requerem um maior consumo de energia e reagentes químicos, e podem ser prejudiciais para o meio ambiente, razões pelas quais o uso de microrganismos capazes de degradar compostos tóxicos se tornou numa tecnologia atrativa (Mrozik & Piotrowska-Seget, 2010).

4.2.1. Biorremediação

Segundo Shinde (2013), a biorremediação é definida como “o processo pelo qual os resíduos orgânicos são biologicamente degradados sob condições controladas a um estado inócuo, ou para níveis abaixo dos limites de concentração estabelecidos pelas autoridades reguladoras”.

Os pesticidas, sendo na sua maioria compostos orgânicos, podem ser degradados por processos abióticos ou bióticos. A degradação abiótica deve-se às reações químicas ou fotoquímicas. Os processos químicos podem ocorrer por hidrólise (eventualmente catalisada por ácidos, bases ou íons metálicos) ou reações redox. A fotólise, por outro lado, pode ser direta quando o pesticida absorve a luz e passa por uma transformação, ou indireta quando outras espécies químicas se tornam eletronicamente excitadas (devido à absorção de fótons) e reagem com o contaminante. Os processos bióticos baseiam-se na degradação microbiana, uma vez que os microrganismos têm a capacidade de interagir tanto bioquimicamente com as substâncias levando a alterações estruturais ou à degradação completa das moléculas alvo. Entre as comunidades microbianas, as bactérias e os fungos são os principais transformadores e degradadores de pesticidas. Os fungos geralmente biotransformam os pesticidas e outros xenobióticos através da introdução de alterações estruturais mínimas na molécula, tornando-a menos tóxica ou não tóxica e lançam o pesticida biotransformado no solo onde se encontrará sujeito a uma posterior biodegradação por parte das bactérias (Pinto *et al.*, 2012).

Os processos biológicos apresentam diversas vantagens em relação aos químicos, dado que podem ser realizados *in situ*, têm uma ampla aplicabilidade, são processos de baixo custo, podendo reduzir a concentração e/ou anular a toxicidade de contaminantes. Estes processos têm também de uma forma geral uma maior aceitação por parte da comunidade, uma vez que são processos mais amigos do ambiente, económicos e versáteis (Madueño *et al.*, 2011; Gonçalves, 2013).

Assim sendo, a biorremediação pode ter inúmeras aplicações na descontaminação de diferentes matrizes ambientais (Boopathy, 2000).

4.2.2. Biobeds

Como referido anteriormente (ver secção 4.1.2.), a poluição que ocorre durante o manuseamento dos pesticidas foi apontada como aquela que contribui mais significativamente para a contaminação dos recursos hídricos naturais. Assim sendo, de modo a minimizar esta fonte de poluição pontual, têm sido propostas diversas estratégias de atenuação, incluindo a implementação de sistemas de biopurificação conhecidos como *biobeds*, os quais estão a ser amplamente utilizados e desenvolvidos com o objetivo de tratar efluentes agrícolas resultantes do manuseamento de pesticidas (Omirou *et al.*, 2012; Karanasios *et al.*, 2013).

Os *biobeds* são sistemas de biopurificação simples, desenvolvido primeiramente na Suécia de modo a reduzir a poluição pontual causada pelos

resíduos obtidos através de atividades agrícolas. Estes sistemas consistem essencialmente numa mistura de materiais orgânicos e solo, chamada biomistura, da qual a eficácia deste sistema irá depender em grande parte. A biomistura é geralmente constituída por solo, materiais lignocelulósicos (como a palha) e substratos orgânicos (como a turfa) humidificados em proporções volumétricas variáveis (p. e. 2:1:1, respetivamente) (Tortella *et al.*, 2012; Tortella *et al.*, 2013). Têm sido utilizados vários materiais lignocelulósicos, mas a palha é o mais popular. O seu papel na biomistura passa por estimular o crescimento de fungos capazes de degradar lignina, que podem contribuir para a degradação de diferentes pesticidas. Como substrato orgânico, o mais utilizado é a turfa, que aumenta a capacidade de sorção deste sistema de biopurificação e mantém a humidade. Por sua vez, o solo contribui com a capacidade de sorção e com uma população microbiana que degrada os pesticidas (Omirou *et al.*, 2012). Apesar desta ser a composição da biomistura mais utilizada, esta poderá depender da disponibilidade local dos materiais individuais, pelo que noutros trabalhos têm sido utilizados diferentes substratos orgânicos, como ramos de videira (Vischetti *et al.*, 2007), cascas de citrinos, folhas de oliveira, talos de uva, algodão, entre outros (Vischetti *et al.*, 2004; Karanasios *et al.*, 2010; Karanasios *et al.*, 2013).

A biomistura pode em alguns sistemas (Figura 2) ser coberta com uma camada de relva que serve para manter a temperatura dentro de certos limites, favorecendo a atividade microbiana. Uma grade sobre a superfície permite a passagem de tratores para a lavagem do equipamento utilizado nos tratamentos fitossanitários. As águas residuais poluídas que são despejadas no *biobed*, irão ser lixiviadas através da biomistura, e descontaminadas devido ao processo de sorção e da ação das comunidades microbianas (que crescem e se selecionam) capazes de degradar e/ou metabolizar os resíduos dos pesticidas (Coppola *et al.*, 2011).

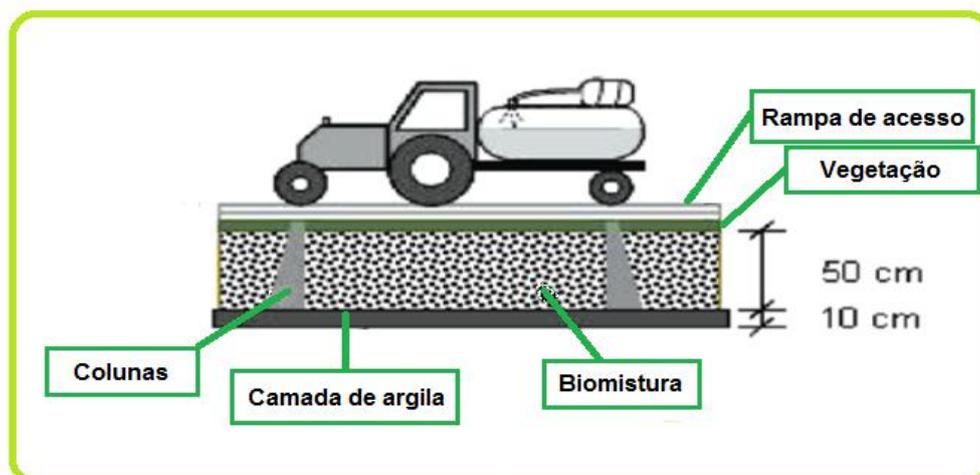


Figura 2- Sistema típico de um *Biobed* (adaptado de Vischetti *et al.*, 2007).

Assim sendo, a principal função do *biobed* é reduzir as concentrações de pesticidas ambientais devido à forte sorção do pesticida aos componentes orgânicos e à rápida degradação pela população microbiológica ativa (Vischetti *et al.*, 2004).

A eficiência deste sistema é elevada e já demonstrou que pode diminuir a descarga no ambiente de alguns resíduos em mais de 90% (Fogg *et al.*, 2003; Diez *et al.*, 2013). Apesar da obtenção de elevadas taxas de degradação, as vias metabólicas que ocorrem nos *biobeds* não são ainda totalmente conhecidas e continuam a ser feitos estudos para melhor perceber e aumentar a eficiência deste tipo de sistemas. Tendo em consideração que o objetivo principal do *biobed* é a depuração de águas residuais e águas contendo pesticidas, e que o metabolismo geralmente leva à formação de moléculas mais polares que são mais tendentes a sofrer o processo de lixiviação no solo em relação aos compostos-mãe, a completa mineralização ou, alternativamente, a acumulação de metabolitos não-tóxicos e/ou não relevantes para o ambiente é um pré-requisito para a sua alta eficácia. Assim sendo, são necessários dados complementares sobre o metabolismo dos pesticidas nas diferentes biomisturas para estabelecer o potencial total de depuração destes sistemas de biopurificação (Coppola *et al.*, 2011; Karanasios *et al.*, 2013).

4.2.3. Bioaugmentation

Bioaugmentation é considerada uma abordagem promissora para a descontaminação *in situ* do solo e tem sido empregue na remediação de solos contaminados por diversos poluentes orgânicos. Este processo de biodegradação envolve a adição de uma cultura ou um consórcio de microrganismos indígenas ou exógenos à matriz contaminada, os quais irão promover a degradação das moléculas alvo. Este processo é aplicado quando as taxas de degradação intrínsecas são lentas, devido à ausência ou baixa população microbiana indígena ou, por outro lado, quando as populações microbianas não apresentam capacidades metabólicas para a biodegradação dos poluentes (Chirnside *et al.*, 2007; Mroziak & Piotrowska-Seget, 2010; Madueño *et al.*, 2011; Chi *et al.*, 2013; Gonçalves, 2013).

Muitos estudos têm demonstrado que fatores ambientais bióticos e abióticos influenciam a eficácia deste processo, pelo que poderá ser mais eficiente utilizar microrganismos autóctones. *Bioaugmentation* autóctone é definida como a tecnologia que utiliza microrganismos indígenas do local a ser descontaminado. Os microrganismos são isolados a partir da matriz contaminada, através de um processo de seleção e enriquecimento. A técnica da cultura de enriquecimento desenvolve uma

cultura que tem um número aumentado de um consórcio de microrganismos capazes de degradar os compostos-alvo (Chirnside *et al.*, 2007; Madueño *et al.*, 2011).

O processo de *bioaugmentation* pode ser influenciado por variados aspetos, como por exemplo a forma como os organismos são adicionados ao local, bem como as condições ambientais, características do solo, entre outros. A aplicação bem-sucedida desta técnica requer a sobrevivência e manutenção da atividade biológica dos organismos após a sua libertação no local a descontaminar, pelo que o seu sucesso depende da utilização eficiente e fiável de microrganismos com a capacidade de degradar os poluentes-alvo e de sobreviverem na presença de outros microrganismos (Mancera-López *et al.*, 2008; Chi *et al.*, 2013; Gonçalves, 2013).

4.3. Fungos como auxiliares de biodegradação

O processo de biorremediação utilizando fungos, apresenta inúmeras vantagens devido à sua facilidade de incorporação e adaptação na matriz do solo. Além disso, os fungos têm a capacidade de crescer em ambientes com baixa humidade, pH ácido e baixas concentrações de nutrientes (Mancera-López *et al.*, 2008).

Para quebrar as estruturas aromáticas complexas dos xenobóticos, têm sido preferencialmente utilizadas as culturas mistas de fungos e bactérias devido aos bons resultados obtidos (Mancera-López *et al.*, 2008; Mrozik & Piotrowska-Seget, 2010). A degradação dos poluentes é mais frequentemente atingida utilizando estes consórcios ativos de microrganismos em vez de ser utilizada apenas uma única espécie. Geralmente, a biodegradação utilizando apenas um isolado fúngico ou bacteriano não representa o comportamento real dos microrganismos na biorremediação dos solos contaminados, pois na natureza a biorremediação irá depender da cooperação das atividades metabólicas das diferentes populações microbianas que se encontram no local. Uma das vantagens importantes na utilização de um consórcio microbiano é que este possui inúmeras capacidades metabólicas que aumentam a eficiência do processo de biorremediação (Chen *et al.*, 2006; Janbandhu & Fulekar, 2011).

Em muitos casos, as culturas mistas de fungos ou bactérias demonstraram mais eficácia do que as estirpes individuais pelo facto de que os intermediários de uma via catabólica de uma estirpe podem ser ainda mais degradados por outras estirpes fúngicas que possuam a via catabólica adequada (Mrozik & Piotrowska-Seget, 2010).

Jacques *et al.* (2008) avaliou a capacidade de um consórcio microbiano composto por *Mycobacterium fortuitum*, *Bacillus cereus*, *Microbacterium* sp., *Gordonia polyisoprenivorans*, *Microbacteriaceae* bacterium e *Fusarium oxysporum* para

degradar antraceno, fenantreno e pireno no solo. Os resultados obtidos mostraram uma maior capacidade de degradação por parte da cultura mista de microrganismos em comparação com as suas culturas individuais.

Na biorremediação, os microrganismos indígenas que são selecionados a partir dos solos contaminados são mais eficazes no metabolismo dos seus contaminantes do que os organismos obtidos a partir de outros locais não contaminados (Wang *et al.*, 2013). Os resultados obtidos por Wand *et al.* (2013) e Li *et al.* (2009) na biodegradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, através de processos de *bioaugmentation* demonstraram uma maior capacidade de biodegradação por parte de microrganismos previamente adaptados aos poluentes em comparação com microrganismos inadaptados.

4.4. Principais mecanismos de metabolização de xenobióticos

Os pesticidas em solos continuam a ser os contaminantes ambientais mais estudados, mas também há cada vez mais interesse nos seus produtos de degradação (Andreu & Picó, 2004).

Os regulamentos na Europa incluem cada vez mais os metabolitos dos pesticidas, tanto na monitorização como na avaliação dos riscos (European Commission, 2003), uma vez que estes podem estar presentes em níveis mais elevados no solo do que o próprio pesticida e ambos podem apresentar diferentes comportamentos ambientais em termos de mobilidade no solo e resistência (Andreu & Picó, 2004; Farlin *et al.*, 2013).

A maior parte dos pesticidas é transformada essencialmente por processos biológicos, através de enzimas presentes em plantas, microrganismos e animais. As transformações sofridas no pesticida geralmente resultam na degradação da sua estrutura molecular original em formas mais simples, no entanto, a molécula resultante poderá persistir se as condições ambientais não forem as mais favoráveis para a subsequente degradação, uma vez que as interações entre os xenobióticos, o solo e os microrganismos são complexas e variáveis. Geralmente, os metabolitos resultantes apresentam uma menor toxicidade para a biota do que os compostos originais, mas em alguns casos pode não se verificar esta diminuição de toxicidade, pelo que os produtos de degradação poderão ser mais nocivos, representando um maior risco para o meio ambiente. As diferenças no comportamento ambiental dos metabolitos, em comparação com os compostos-mãe, podem incluir um aumento da sua mobilidade no solo. Assim sendo, uma análise conjunta das concentrações determinadas no solo e

nas águas subterrâneas pode fornecer dados para a construção de modelos que permitam determinar o destino dos pesticidas no ambiente (Andreu & Picó, 2004).

Dependendo do destino dos pesticidas no ar, água, solo, ou sedimentos, estes xenobióticos podem vir a tornar-se disponíveis aos microrganismos presentes nestes diferentes compartimentos ambientais. Os fungos, bem como as bactérias (aeróbias e anaeróbias), podem adaptar-se à presença destes compostos e sobreviver através da sua degradação, utilizando essas moléculas como fonte de energia e nutrientes (Abourashed *et al.*, 1999).

Vários trabalhos têm vindo a tentar explicar o porquê dos microrganismos possuírem esta capacidade de degradação de xenobióticos. Uma das explicações refere que a existência de inúmeros compostos orgânicos naturais no solo, e muitos dos xenobióticos são análogos, levando a que os enzimas envolvidos neste metabolismo possam ter baixa especificidade de substrato, podendo assim atacar também os xenobióticos análogos (Silva *et al.*, 2004).

Os microrganismos normalmente contêm muita informação genética localizada no DNA cromossomal, extracromossomal ou nos plasmídeos. O DNA cromossómico codifica as sequências responsáveis pela manutenção e pelo crescimento normal da célula, por outro lado, o DNA extracromossomal e os plasmídeos normalmente codificam as sequências para a resistência a metais, antibióticos e os processos de degradação e conjugação de xenobióticos (Silva *et al.*, 2004).

Os microrganismos do solo apresentam uma função importante na atenuação dos efeitos ambientais dos pesticidas, uma vez que se podem adaptar à presença destes e sobreviver por meio da sua degradação, utilizando estas moléculas como fonte nutricional e de energia. Este processo, de onde deriva algum benefício nutricional através da transformação dos pesticidas, em que a molécula é utilizada como fonte de carbono e energia (ou outro nutriente) é chamado de metabolismo primário. Deste metabolismo, geralmente resulta a completa mineralização do composto, onde ocorre a sua conversão para dióxido de carbono, água e iões inorgânicos (Boopathy, 2000). No entanto, vários microrganismos são capazes de transformar parcialmente estes compostos químicos em produtos que não produzem energia para o seu crescimento, transformando este substrato na presença obrigatória de outro que irá fazer esse suporte do crescimento. Neste caso, este processo denomina-se de co-metabolismo, de onde resultam produtos que não apresentam função metabólica (não sofrem ação de outras enzimas de microrganismos co-metabolizantes), podendo levar à sua acumulação (Rem & Reed, 2004).

Entre as várias reações que um xenobiótico pode sofrer, a mineralização é a mais desejável, uma vez que há a produção de carbono e energia para o crescimento

microbiano, prevenindo a acumulação de intermediários potencialmente perigosos para o ambiente (Silva *et al.*, 2004).

Os fungos e as bactérias são microrganismos notáveis que produzem uma ampla gama de produtos naturais, muitas vezes denominados metabolitos secundários. Em muitos casos, a vantagem que estes compostos conferem ao organismo é desconhecida, mas é lógico supor que todos desempenham algum papel vital para o bem-estar do microrganismo. Existe, no entanto, um grande interesse nestes compostos, na medida em que muitos destes têm importância médica, industrial e/ou agrícola. No entanto, alguns destes produtos podem ser prejudiciais (p. e. as micotoxinas), enquanto outros podem ser benéficos para a humanidade (p. e. os antibióticos) (Calvo *et al.*, 2002).

No caso dos fungos, como organismos eucariotas que são, estes possuem sistemas enzimáticos de metabolização similares aos presentes nos mamíferos, pelo que se espera que o metabolismo de xenobióticos nos dois sistemas seja semelhante, se não idêntico (Abourashed *et al.*, 1999).

Tanto nos fungos como nos mamíferos, o processo do metabolismo dos xenobióticos inclui duas fases sequenciais conhecidas como Fase I e Fase II (Figura 3) (Costa *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004).

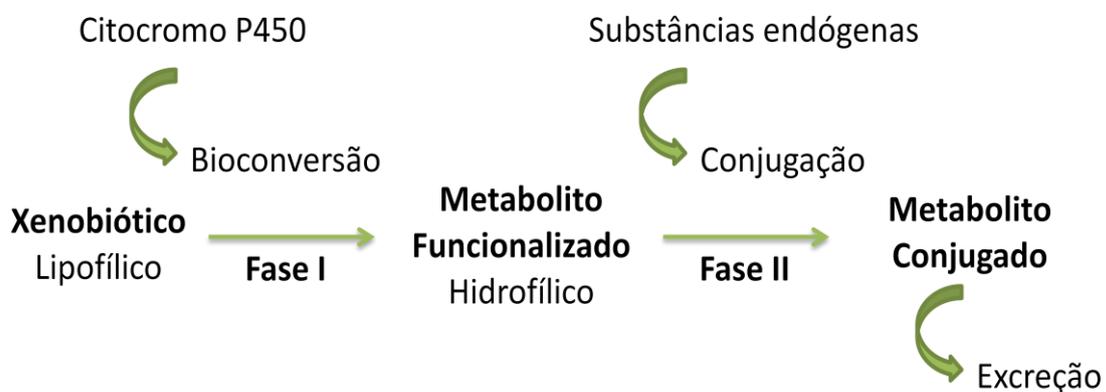


Figura 3- Reações de Fase I e Fase II do metabolismo de xenobióticos por fungos (adaptado de Costa *et al.*, 2004).

As principais reações da Fase I consistem em reações de oxidação (desalquilação, desaminação, hidroxilação e formação de sulfóxidos), redução (adição de hidrogénio e nitro-redução) e hidrólise, denominadas reações de funcionalização devido à introdução de grupos funcionais na molécula que está a ser biotransformada (p.e. -COOH, -OH, -NH₂). Estas reações são catalisadas pelo citocromo P450 monoxigenases, flavinas e monoaminoxidases. Normalmente, destas reações

resultam moléculas mais hidrofílicas (metabólitos funcionalizados), que podem ser bioativadas ou apresentarem-se menos ou mais reativas que o composto original. Ocasionalmente, poderão ocorrer as reações da Fase II, que consistem em reações de conjugação entre o grupo polar do xenobiótico bioconvertido com substâncias endógenas (metabólitos conjugados). Geralmente, estas reações irão aumentar a solubilidade em água do metabólito conjugado, que irá favorecer a sua eliminação das células. Muitos dos xenobióticos sofrem reações de ambas as fases de forma sequencial (Fase I seguida da Fase II), enquanto outros podem sofrer reações apenas de uma fase (Costa *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004).

O sistema enzimático mais importante que participa nas reações de Fase I é o sistema Citocromo P450, localizado nas membranas do retículo endoplasmático ou na fração microsomal. Nas reações de Fase II encontram-se envolvidas enzimas solubilizadas no citosol (Rocha, 2004).

No caso das bactérias, a transformação dos xenobióticos pode ocorrer em condições aeróbias ou anaérobias, sendo a primeira onde ocorre a degradação mais rápida e completa dos poluentes. As características essenciais dos microrganismos aeróbios na degradação de poluentes orgânicos são apresentadas na figura 4 (Rem & Reed, 2008; Sinha *et al.*, 2009).

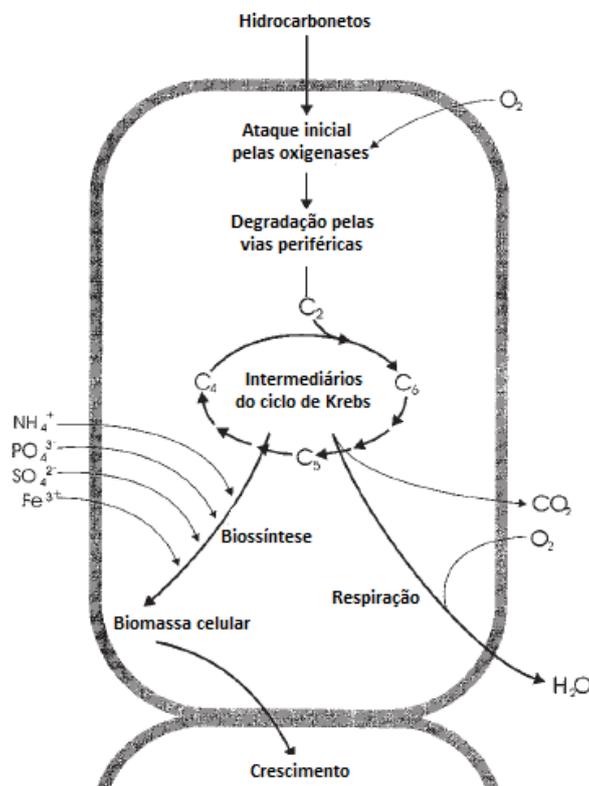


Figura 4- Princípios fundamentais na degradação aeróbia de hidrocarbonetos por bactérias: processos associados ao crescimento (adaptado de Rem & Reed, 2008).

O ataque inicial intracelular de poluentes orgânicos é um processo oxidativo, em que a ativação e incorporação de oxigênio na molécula de xenobiótico é a reação enzimática chave da biodegradação, catalisada por oxigenases e peroxidases. As vias de degradação periféricas, por sua vez irão converter passo a passo os poluentes orgânicos em intermediários do metabolismo intermediário central como o ciclo de Krebs. Por fim ocorre a biossíntese da biomassa celular a partir dos precursores metabólitos centrais, por exemplo, acetil-CoA, succinato, piruvato. Os açúcares necessários para várias biossínteses e para o crescimento devem ser sintetizados por gluconeogênese (Rem & Reed, 2008, Sinha *et al.*, 2009).

4.5. Microrganismos em estudo

4.5.1. *Fusarium spp.*

Fusarium oxysporum (Figura 5) é uma espécie de fungos necrotróficos/saprófitas filamentosos que habitam em vários tipos de solo e plantas por todo o mundo. Este fungo tem a capacidade de crescer e persistir por longos períodos de tempo nas plantas afetadas ou sobreviver na matéria orgânica do solo, no caso de haver ausência de um hospedeiro adequado. Os isolados patogênicos deste fungo podem causar problemas graves e perdas de rendimento numa grande variedade de plantas, incluindo espécies de culturas com importância econômica (Fang & Barbetti, 2014).



Figura 5– Isolado fúngico do fungo *Fusarium oxysporum* (adaptado de Fang & Barbetti, 2014).

O processo de infecção pelo fungo patogênico de *F. oxysporum* ocorre por várias etapas: reconhecimento, fixação e colonização da raiz, penetração e colonização do córtex da raiz, e proliferação de hifas no interior do vaso do xilema.

Atingindo os vasos do xilema, o fungo irá espalhar-se dentro da planta através da proliferação das hifas (Dong *et al.*, 2012). A utilização de culturas resistentes, rotação das culturas com plantas não contaminadas e a descontaminação do solo com um fungicida químico são os métodos usualmente utilizados para controlar os isolados fúngicos patogénicos do género *Fusarium* (Martins, 2005).

Os fungos não-patogénicos desta espécie podem ocorrer naturalmente nas plantas como endófitos, melhorando a fisiologia da planta, através do reforço do seu crescimento radicular, aumento da tolerância à seca e indução de resistência sistémica. Existem vários isolados fúngicos não-patogénicos deste fungo que inibem a sua forma patogénica. Esse efeito antagónico deve-se à capacidade saprófita deste fungo e á rápida colonização das raízes das plantas hospedeiras, ocupando os sítios de infeção (Conci, 2009; Waweru *et al.*, 2014).

Para além dos fungos *Fusarium* spp. apresentarem capacidades de degradação de óleos, como o petróleo (Balba *et al.*, 1998), estes também têm a capacidade de degradar fenóis (Cai *et al.*, 2007), corantes (Li *et al.*, 2011), lignina e hidratos de carbono complexos associados ao solo (Zhang *et al.*, 2013).

4.5.2. *Trichoderma viride*

Trichoderma viride (Figura 6) é uma espécie de fungos saprófitas naturalmente distribuídos no solo e em materiais celulósicos, que são conhecidos pela sua produção de enzimas celulasas, quitinolíticas e hemicelulasas (Neethu *et al.*, 2012; Wagner *et al.*, 2013). Dependendo das espécies do género *Trichoderma*, estas podem promover o crescimento das plantas, e ser eficazes como agentes de controlo biológico na agricultura, na medida em que têm uma ação antagonista para com microrganismos fitopatogénicos (p. e. *Fusarium* sp. e *Rhizoctonia* sp.) (Verma *et al.*, 2007a). Estes agentes de controlo biológico são reconhecidos como um método eficaz, amigo do ambiente e barato, anulando os efeitos prejudiciais dos produtos químicos. Estes fungos parecem inibir o crescimento dos microrganismos patogénicos através de vários mecanismos, tais como a competição por nutrientes, antibiose e produção de enzimas que degradam a parede celular fúngica (Zhihui *et al.*, 2008; Mishra *et al.*, 2011; Khandelwal *et al.*, 2012; Nawrocka & Malolepsza, 2013; Mishra *et al.*, 2014).



Figura 6- Isolado fúngico do fungo *Trichoderma viride* (adaptado de Mishra *et al.*, 2011).

Para além de todas estas características, algumas espécies também são muito úteis para a indústria e têm um grande potencial de biorremediação (Mishra *et al.*, 2011; Mishra *et al.*, 2014).

Existem inúmeras evidências de que vários fungos do género *Trichoderma* contribuem para a degradação de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos. Assim, a aplicação deste género de fungos na biorremediação de solos contaminados com pesticidas, tem sido encarada como uma abordagem sustentável. A revisão da literatura atual sugere que as hidrolases, lacases, peroxidases, e outros enzimas líticos produzidos em abundância pelo *Trichoderma* spp. são fatores que provavelmente auxiliam na degradação dos compostos contaminantes (Verma *et al.*, 2007b).

4.5.3. *Aspergillus* spp.

As espécies de fungos do género *Aspergillus* são fungos filamentosos com uma distribuição mundial, normalmente encontrados no solo, ar, em plantas e em matéria orgânica em decomposição. Nas casas, estes fungos podem ser frequentemente encontrados nos alimentos e no pó. Os fungos do género *Aspergillus* são patogénicos oportunistas, sobretudo em pacientes imunocomprometidos (Aktas & Yigit, 2009; Nourmoradi *et al.*, 2012). São oficialmente reconhecidas duzentas espécies de *Aspergillus*, mas apenas um número relativamente pequeno de estirpes podem causar doenças em humanos (Kumar & Kannabiran, 2010). Espécies como *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* (Figura 7) e *Aspergillus niger* surgiram como importantes patogénicos oportunistas em humanos, podendo causar várias doenças devido à produção de micotoxinas (Nourmoradi *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2013).



Figura 7- Isolado fúngico do fungo *Aspergillus fumigatus* (adaptado de Metta *et al.*, 2010).

Aspergillus também é um dos gêneros de fungos com capacidades para degradar óleos (Balba *et al.*, 1998), bem como inseticidas organofosforados como o ometoato (Chun *et al.*, 2004). Mukherjee *et al.* (2010) realizaram um estudo com o fungo *Aspergillus niger* para testar a sua tolerância ao arsênio (metalóide tóxico amplamente distribuído). Os seus resultados demonstraram a elevada tolerância deste fungo para este contaminante, tornando a utilização deste microrganismo como um modelo adequado para a descontaminação de arsênio em áreas de alto risco.

Tavares dos Passos *et al.* (2009) também avaliaram a capacidade de biodegradação do fenol pelo fungo *Aspergillus* sp.. Os seus resultados demonstraram a alta tolerância do fungo ao fenol, podendo biodegradá-lo efetivamente.

Bhalerao e Puranik, (2007), também verificaram a capacidade de biorremediação do endossulfão (inseticida organoclorado de largo espectro utilizado em todo o mundo) pelo fungo *A. niger*. Os resultados obtidos revelaram a capacidade deste fungo para degradar o endossulfão, podendo vir a ser utilizado na biorremediação de solos e águas contaminadas por este inseticida.

4.5.4. *Lecanicillium saksenae*

As espécies de fungos do género *Lecanicillium* são principalmente entomopatogénicos. Os fungos entomopatogénicos atuam através da invasão da superfície dos insetos pelo contato e conseqüentemente pela sua penetração. O hospedeiro acabará por morrer devido à falta de nutrientes solúveis na hemolinfa e à libertação de toxinas pelos fungos (Park & Kim, 2010).

Pinto *et al.* (2012) investigaram a capacidade de degradação dos pesticidas terbutilazina, difenoconazol e pendimetalina pelo fungo *Lecanicillium saksenae* (Figura 8) em culturas líquidas. Nos resultados obtidos, verificou-se a eficiente remoção dos xenobióticos a partir do meio de cultura líquido, permitindo obter taxas de remoção de 99,5% para o herbicida pendimetalina.



Figura 8- Isolado fúngico do fungo *Lecanicillium saksenae* (Universidade de Évora, 2014).

4.5.5. Bac 1 e Bac 2

As bactérias utilizadas neste trabalho foram selecionadas com base em ensaios prévios realizados, nos quais demonstraram grande potencial para a biodegradação dos pesticidas estudados. Por motivos de inovação nos resultados obtidos e não publicados, não poderá ser alvo deste trabalho a descrição pormenorizada dos microrganismos utilizados e a designação utilizada a partir daqui será: Bac 1 e Bac 2.

4.6. Pesticidas em estudo e principais vias de metabolização

4.6.1. Terbutilazina

Os herbicidas da família s-triazinas estão entre os herbicidas mais utilizados na agricultura. Esta classe foi desenvolvida em 1950 para o controlo de plantas infestantes, através da inibição da fotossíntese, de diversas culturas, como o milho e cana-de-açúcar. Estes herbicidas são suspeitos de poder causar problemas graves na saúde humana como doenças cancerígenas, malformações congénitas e alteração das funções hormonais, pelo que o seu uso é proibido em alguns países (Gonçalves,

2013; Lozowicka *et al.*, 2014). Fazem parte desta família os herbicidas, atrazina, terbutilazina, simazina, propazina, entre outros (Gonçalves, 2013).

Terbutilazina (N^2 -terbutile-6-cloro- N^4 -etile-1,3,5-triazina-2,4-diamina) (Figura 9), do grupo das triazinas, é um herbicida não-seletivo de largo espectro que atua como inibidor da fotossíntese. Este herbicida é utilizado no controlo da maioria das plantas infestantes em terrenos agrícolas e não-agrícolas, tendo sido desenvolvido pela empresa CIBA-GEIGY e introduzido no mercado com o nome de Gardporin em 1980 na Malásia (Gonçalves, 2013).

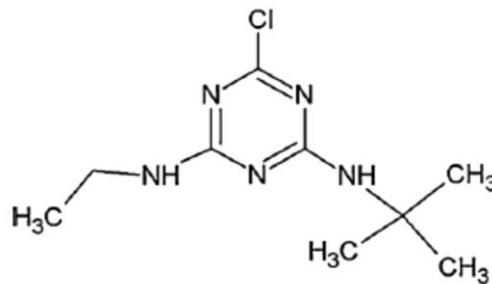


Figura 9- Estrutura molecular do herbicida terbutilazina (adaptado de Mercadante *et al.*, 2012).

Em alguns países, a atrazina tem sido gradualmente substituída pela terbutilazina, pois esta última apresenta uma menor capacidade de contaminação dos recursos aquáticos, uma vez que o seu coeficiente de adsorção ao solo é superior ao da atrazina (231 LKg^{-1} e 100 LKg^{-1} , respetivamente). A terbutilazina é assim mais facilmente adsorvida às partículas do solo, apresentando por isso uma menor lixiviação e conseqüentemente um menor impacto na poluição das águas subterrâneas (Düring & Hummel, 1999; Caracciolo *et al.*, 2001). No entanto, a terbutilazina tem sido frequentemente detetada em concentrações mais elevadas que as legalmente permitidas nos recursos aquáticos, assim como os seus metabolitos, pois o facto do coeficiente de adsorção não permitir tão facilmente a sua lixiviação no solo não é suficiente para impedir uma potencial ação nefasta da terbutilazina nos ecossistemas aquáticos e terrestres (Grenni *et al.*, 2012; Laini *et al.*, 2012; Gonçalves, 2013).

Quanto à sua metabolização, a principal via metabólica no solo (Figura 10) inclui a desalquilação mediada biologicamente que conduz à produção de desetil-terbutilazina (DET), considerado o metabolito principal da terbutilazina no solo, e a descloração abiótica ou biótica para a formação de 2-hidroxi-terbutilazina (2-OH-TERB). Os produtos desalquilados (p. e. DET) são geralmente mais persistentes e

solúveis na água, representando assim um maior risco de contaminação das águas subterrâneas (Fait *et al.*, 2010; Grenni *et al.*, 2012; Karanasios *et al.*, 2013).

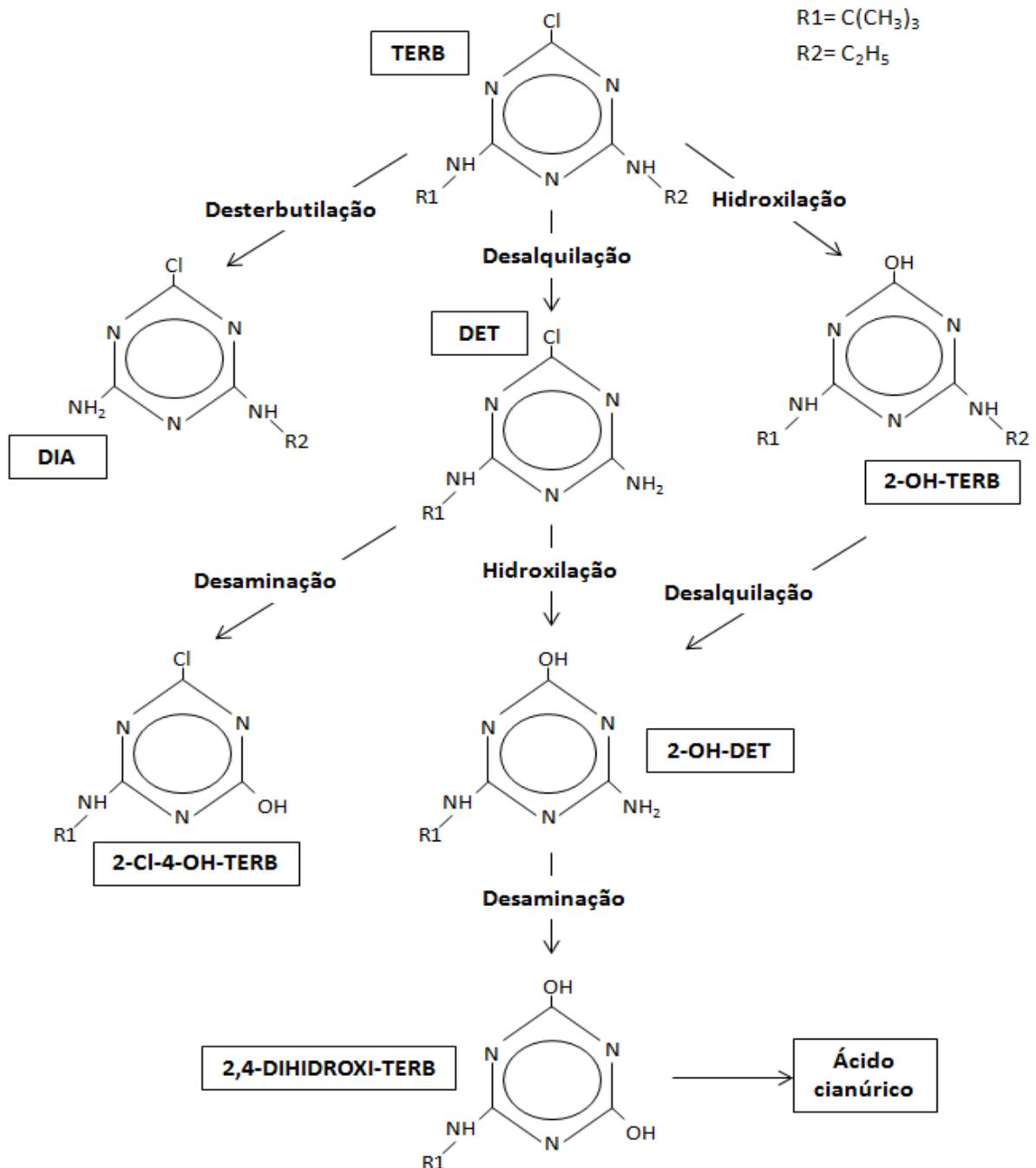


Figura 10- Principais vias de metabolização da terbutilazina no solo. TERB= Terbutilazina; DIA= Deisopropilatrazina; DET= Desetilterbutilazina; 2-OH-TERB= 2-hidroxi-terbutilazina; 2-Cl-4-OH-TERB= 2-cloro-4-hidroxi-terbutilazina; 2-OH-DET= 2-hidroxi-desetilterbutilazina; 2,4-DI-HIDROXI-TERB= 2,4-dihidroxi-terbutilazina (adaptado de Bottoni *et al.*, 2013).

O tempo de meia-vida deste herbicida (tempo que demora a reduzir a sua concentração a metade) encontra-se entre os cinco e cento e dezasseis dias, dependendo das características do solo e da temperatura (Cabrera *et al.*, 2009). A degradação da terbutilazina no solo depende de processos abióticos, mas principalmente de processos bióticos, que são responsáveis pela sua degradação completa. Tem sido demonstrado que a biodegradação e mineralização de s-triazinas são levadas a cabo por estirpes bacterianas e fúngicas isoladas partir de locais contaminados (Grenni *et al.*, 2012; Pinto *et al.*, 2012).

4.6.2. Difenoconazol

Os fungicidas triazóis são uma das principais classes de pesticidas amplamente utilizados numa grande variedade de culturas de frutos, legumes e cereais. As suas características de elevada estabilidade química e fotoquímica, baixa biodegradabilidade e fácil transporte no ambiente, torna esta classe de pesticidas muito persistente no solo e na água (Mu *et al.*, 2013).

Difenoconazol (1-[2-[4-(4-clorofenoxi)-2-clorofenil]-4-metil-1,3-dioxolan-2-ylmetil]-1H-1,2,4-triazol) (Figura 11), é um dos pesticidas desenvolvidos pela Syngenta Corporation na Suíça, que pertence ao grupo dos triazóis. Trata-se de um fungicida de largo espectro que possui uma boa capacidade de interferir com o crescimento micelial e inibir a germinação de esporos de fungos patogénicos, levando a modificações morfológicas e funcionais das membranas celulares que irão impedir o crescimento dos fungos (Wang *et al.*, 2012; EFSA, 2013a; Mu *et al.*, 2013; Du *et al.*, 2014b).

Uma vez que este fungicida é amplamente utilizado no controlo de doenças fúngicas em frutos, vegetais, cereais e outras culturas, existe uma grande probabilidade de haver contato deste pesticida com o meio ambiente, levando à contaminação das águas subterrâneas e de superfície (Dong *et al.*, 2013; Mu *et al.*, 2013).

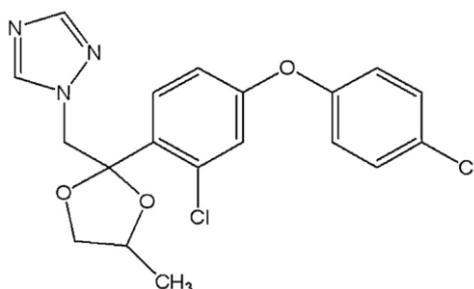


Figura 11- Estrutura molecular do difenoconazol (adaptado de Du *et al.*, 2014b).

Comparando este fungicida com outros pertencentes ao mesmo grupo, o difenoconazol possui uma elevada toxicidade para uma ampla gama de organismos aquáticos (Dong *et al.*, 2013).

A degradação do pesticida difenoconazol é lenta, e a degradação biótica através da atividade microbiana é a principal via de degradação (Figura 12). Assim como os seus resíduos, é considerado relativamente persistente no solo, devido à sua elevada afinidade para se ligar com a matéria orgânica (Thom *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 2013; FAO, 2014). As taxas de metabolismo ou de degradação deste pesticida podem ser influenciadas pela natureza e humidade do solo, bem como pela temperatura. O seu tempo de meia-vida é de aproximadamente cento e oitenta e um dias (FAO, 2014).

Os metabolitos CGA 205375 (produto de hidroxilação) e 1,2,4-triazol (produto de desalquilação) foram identificados como os principais metabolitos no solo (FAO, 2014).

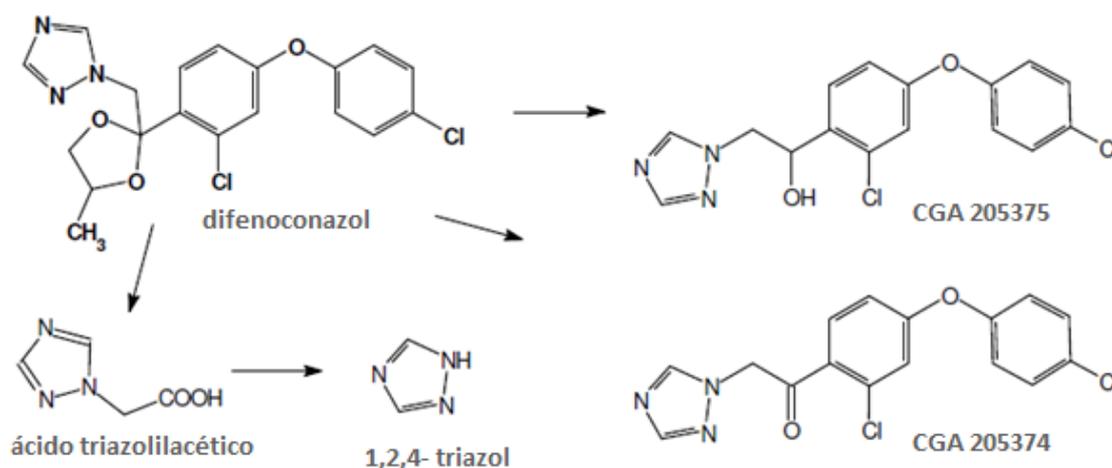


Figura 12- Via de metabolização proposta para o metabolismo aeróbio do difenoconazol no solo. Nome IUPAC dos metabolitos CGA 205375= 1-[2-cloro-4-(4-cloro-fenoxi)-fenil]-2-(1,2,4-triazol)-1-il-etanol CGA 205374= 1-(2-cloro-4-(4-cloro-fenoxi)-fenil)-2-(1,2,4-triazol)-1-il-etanona (adaptado de FAO, 2014).

4.6.3. Diflufenicão

Diflufenicão (N-(2,4-difluorfenil)-2-[3-(trifluorometil)fenoxi]-3-piridincarboxamida) (Figura 13) é um herbicida de pré- e pós-emergência com ação sistêmica, que pertence ao grupo das carboxamidas e é utilizado no controlo das ervas daninhas. Este herbicida atua como um inibidor específico da fitoeno desidrogenase

(enzima chave na biossíntese de carotenoides), prevenindo assim a fotossíntese que levará à morte da planta (EFSA, 2013b).

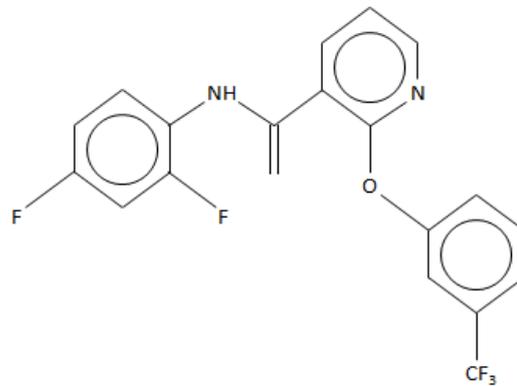


Figura 13- Estrutura molecular do herbicida diflufenicão (adaptado de EFSA, 2013b).

Estudos realizados em laboratório e em campo indicaram que este herbicida não é facilmente lixiviado no solo devido à sua baixa solubilidade em água e a sua persistência irá depender de características físicas e químicas do solo bem como de fatores bióticos. No entanto, Accinelli *et al.* (2003) reportou a presença deste em águas subterrâneas. O seu tempo de meia vida varia entre os cento e cinco e os duzentos e dez dias (Tejada, 2009).

De acordo com os estudos de degradação realizados em solo, o metabolito mais relevante deste herbicida é o AE 0542291 (Figura 14) (EFSA, 2013b).

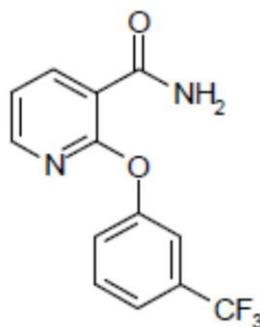


Figura 14- Estrutura molecular do metabolito AE 0542291 (nome IUPAC= 2-[3-(trifluorometil)fenoxi]piridina-3-carboxamida) (adaptado de EFSA, 2013b).

4.6.4. Pendimetalina

Os herbicidas da família dinitroanilinas são amplamente utilizados no controle das ervas daninhas nas culturas de cereais, pomares, e legumes como ervilhas, couves, entre outros. Fazem parte desta família os herbicidas trifluralin, benfluralina e pendimetalina (Shehzad *et al.*, 2012).

Pendimetalina (N-(1-etilpropil)-3,4-dimetil-2,6-dinitrobenzenamina) (Figura 15) é um herbicida de pré-emergência que atua inibindo a divisão celular, alongamento das células e por fim o crescimento das plantas (Ündeğer *et al.*, 2010; EFSA, 2011; Rodríguez-Liébana *et al.*, 2014). Para além do seu uso na agricultura, este herbicida também é utilizado em relvados residenciais e plantas ornamentais. O seu uso comum em várias formulações, aumenta as probabilidades da sua deteção, como contaminante no solo, ar, águas subterrâneas e de superfície (Ündeğer *et al.*, 2010).

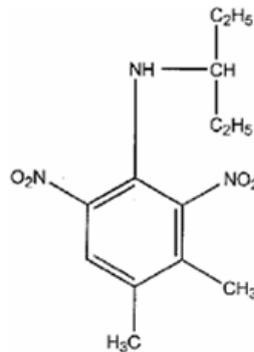


Figura 15- Estrutura molecular do herbicida pendimetalina (adaptado de Sarma *et al.*, 2006).

Após a aplicação deste herbicida no solo, este pode ser dissipado através da evaporação, lixiviação e escoamento superficial. Os herbicidas que são solúveis em água, como é o caso das dinitroanilinas, geralmente apresentam baixa capacidade de adsorção, o que os torna mais móveis no ambiente, pelo que tanto em águas subterrâneas como em águas de superfície, a presença de pendimetalina já foi detetada (Ündeğer *et al.*, 2010; Shehzad *et al.*, 2012; Rodríguez-Liébana *et al.*, 2014).

O herbicida pendimetalina é considerado moderadamente persistente e apresenta um tempo de meia-vida de aproximadamente noventa dias (Mohan *et al.*, 2007). Existem ainda poucos estudos acerca da degradação deste herbicida pelos microrganismos do solo. No entanto, Ramakrishna *et al.* (2008) identificaram os metabolitos N-(1-etilpropil)-3'4-dicarboxi 2'6-dinitro benzenamina (M1), N-(1-etil-1-propil)-3,4dicarboxi-2'6-dinitrobenzenamina-N-óxido (M2), N-(1-etilpropil)-3,4dimetoxi-2,6-dinitrobenzenamina (M3) e benzimidazol-7-carboxialdeído (M4) como metabolitos

do pesticida pendimetalina pela ação dos microrganismos nativos de uma amostra de solo recolhida no jardim do Instituto Indiano de Tecnologia Química (Figura 16).

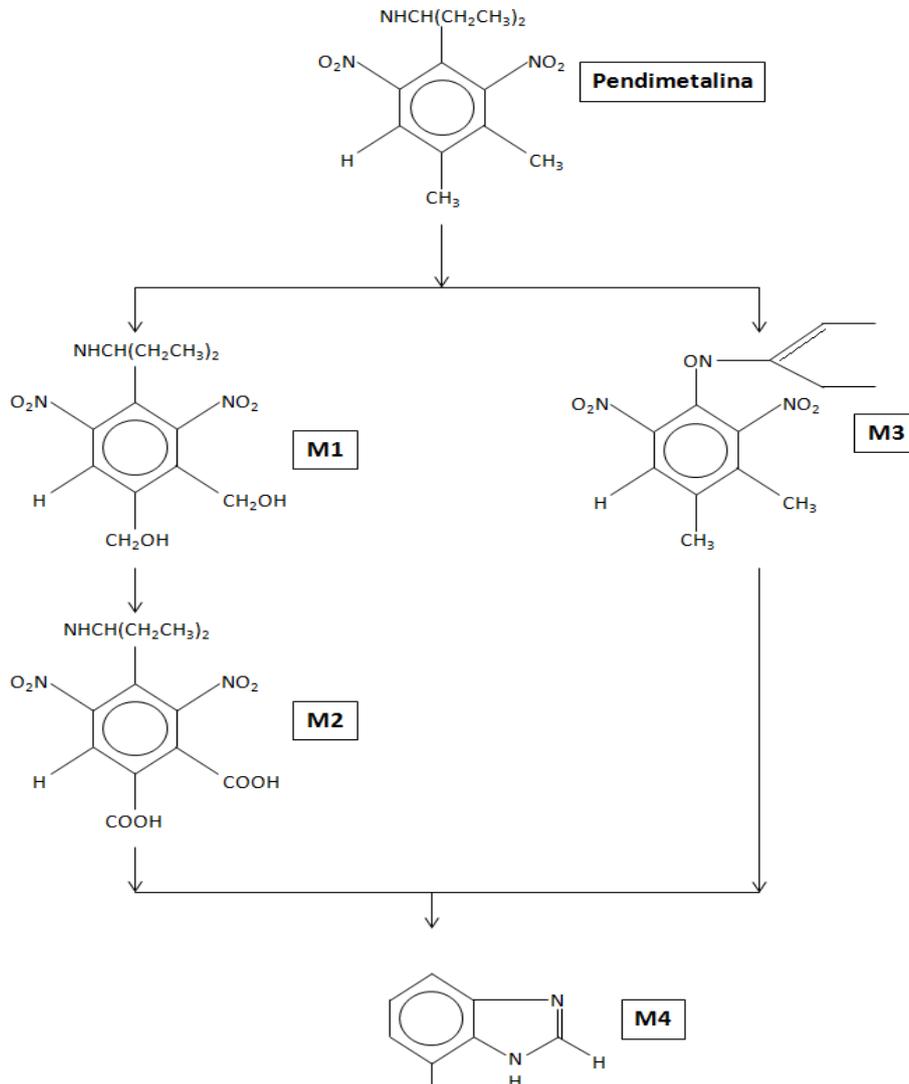


Figura 16- Via de degradação proposta para o pesticida pendimetalina por microrganismos do solo. M1= *N*-(1-etilpropil)-3,4-dicarboxi-2,6-dinitrobenzenamina, M2= *N*-(1-etil-1-propil)-3,4-dicarboxi-2,6-dinitrobenzenamina-*N*-óxido, M3= *N*-(1-etilpropil)-3,4-dimetoxi-2,6-dinitrobenzenamina e M4= benzimidazol-7-carboxialdeído (adaptado de Ramakrishna *et al.* 2008).

A formação dos metabolitos *N*-(1-etilpropil)-3,4-dicarboxi-2,6-dinitrobenzenamina e *N*-(1-etil-1-propil)-3,4-dicarboxi-2,6-dinitrobenzenamina-*N*-óxido deve-se à hidrólise dos grupos metílicos ligados ao anel de benzeno. Por outro lado, a oxidação dos grupos amina levou à formação do metabolito *N*-(1-etilpropil)-3,4-dimetoxi-2,6-dinitrobenzenamina e a hidroxilação dos grupos propilo deu origem ao produto de degradação benzimidazol-7-carboxialdeído (Ramakrishna *et al.*, 2008).

4.7. Métodos analíticos utilizados

Nesta seção irão ser descritos, de uma forma breve, os principais métodos analíticos utilizados na realização deste trabalho.

4.7.1. Extração Acelerada por Solventes (ASE)

Uma das técnicas utilizadas foi o ASE (do inglês “*Accelerated Solvent Extraction*”). Até agora, o termo mais utilizado para esta técnica é Extração Acelerada por Solventes, as alternativas são Extração Líquida Pressurizada e Extração com Fluido Pressurizado. Esta técnica de extração e de preparação de amostras é totalmente automatizada e confiável, apresentando várias vantagens sobre as técnicas de extração tradicionais. Os benefícios do alto rendimento, automatização, baixo consumo de solventes e rápida preparação das amostras tornam esta técnica vantajosa, podendo ser especialmente útil para realizar análises de rotina na indústria alimentar e farmacêutica (Sun *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2014a; Jentzer *et al.*, 2014).

Com esta técnica, uma amostra sólida ou semi-sólida é comprimida numa célula de extração e os analitos são extraídos a partir da matriz utilizando um solvente (ou uma mistura de solventes) a uma temperatura e pressão específicas (Andreu & Picó, 2004).

As temperaturas e pressões elevadas utilizadas (40-200°C e 1000-2500 psi, respetivamente) permitem ser alcançada a extração quantitativa das amostras num curto espaço de tempo com uma pequena quantidade de solvente. O aumento da temperatura aumenta a solubilidade e as taxas de difusão, enquanto a viscosidade e a tensão superficial dos solventes irão diminuir. A utilização de pressões elevadas permite que a célula de extração possa ser preenchida mais rapidamente com o solvente, e que este possa ser forçado a entrar dentro dos poros da amostra, aumentando a eficiência da extração. Outra vantagem da utilização de pressões elevadas é que o solvente irá manter-se sempre no estado líquido mesmo quando são utilizadas temperaturas iguais ou superiores ao seu ponto de ebulição (Wang *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2012; Jentzer *et al.*, 2014).

A água, a temperaturas moderadamente elevadas, demonstrou ser um solvente eficaz na extração seletiva de alguns herbicidas (como por exemplo as triazinas). Uma restrição da extração utilizando água quente é que esta não consegue recuperar os compostos hidrofóbicos, facilmente hidrolisáveis ou termolábeis (Andreu & Picó, 2004).

Esta técnica de extração que tem sido aplicada com êxito na extração de resíduos de pesticidas, a partir de várias matrizes (Schäfer *et al.*, 2008). Beizhen *et al.* (2008) utilizaram o ASE para extrair trinta e três resíduos de pesticidas (incluindo pesticidas organofosforados e organoclorados) de amostras de chá. Os resultados obtidos indicaram que este método de extração foi capaz de extrair os resíduos de forma rápida e eficaz, mostrando que o método tem uma boa eficiência de extração. Conte *et al.* (1997) também conseguiram extrair eficazmente o pesticida diflufenicão a partir de uma amostra de solo contaminada, salientando as melhores condições de extração.

4.7.2. Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência (HPLC)

Os métodos cromatográficos são os mais usados pelos laboratórios de análise química para determinar pesticidas nas mais variadas matrizes, incluindo amostras de água (Aschi *et al.*, 2007; Teixeira, 2010). A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC do inglês “*High Performance Liquid Chromatography*”) é uma das opções para este tipo de análise, geralmente utilizada para compostos não voláteis e termicamente instáveis (Silva *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2014).

Trata-se de um método analítico que permite separar uma amostra nos seus componentes individuais e quantificá-los, sendo útil na análise de amostras complexas (Leitão, 2010). A separação é um fator importante que depende do grau de interação entre os componentes do soluto e a fase estacionária. As vantagens da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência incluem não só uma grande melhoria na separação dos compostos, mas também um aumento da velocidade com que a separação é feita. Devido à possibilidade de poderem ser utilizados diferentes modos de separação e de detecção, esta técnica tem uma maior versatilidade do que outros sistemas cromatográficos (Teixeira, 2006).

Um sistema de HPLC inclui uma bomba, o injetor, a coluna, o detetor e um computador. Existem vários tipos de detetores, nomeadamente: UV-Vis, *diode-array*, índice de refração, fluorescência, eletroquímicos e espectrómetro de massa. No entanto, os mais utilizados para determinar os pesticidas por cromatografia líquida são o UV-Vis, *diode-array* e espectrómetro de massa (Silva *et al.*, 2009).

4.7.3. Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS)

Para haver uma elucidação estrutural mais completa é necessário, na maioria dos casos, recorrer a outras técnicas como a espectrometria de massa (MS do inglês “*Mass Spectrometry*”).

MS é uma técnica que permite identificar e quantificar compostos presentes numa amostra complexa. Atualmente, a cromatografia líquida de alta eficiência ou a Cromatografia Gasosa (GC) acoplada à espectrometria de massa parecem ser as técnicas de primeira escolha para a análise de resíduos de pesticidas várias matrizes (Watanabe *et al.*, 2014). Combinar a capacidade de separação da cromatografia líquida (que permite a introdução de compostos “puros” no espectrómetro de massa) com a capacidade de identificação da espectrometria de massa é um método muito vantajoso, principalmente devido aos compostos com tempos de retenção iguais ou semelhantes que normalmente têm espectros de massa muito diferentes, podendo assim ser diferenciados. A combinação destas duas técnicas irá permitir uma identificação mais definitiva e a determinação quantitativa de compostos, que não se encontram completamente resolvidos cromatograficamente. A vantagem principal desta técnica é a quantidade mínima de composto necessário para a análise (Teixeira, 2006).

A identificação de compostos é realizada com base na deteção do ião molecular e correspondentes fragmentos. Numa fase inicial do processo é necessário ionizar os compostos presentes na amostra (Teixeira, 2006). Esta operação é realizada numa fonte de ionização, que pode ser de diferentes tipos. Atualmente muitos dos equipamentos de HPLC-MS utilizam fontes que operam à pressão atmosférica, como a fonte de ESI (Ionização por Electrospray do inglês “*Electrospray Ionization*”) e APCI (Ionização Química à Pressão Atmosférica do inglês “*Atmospheric Pressure Chemical Ionization*”) (Xu & Armstrong, 2013).

Apesar de não existir uma divisão evidente, a ionização por ESI é mais utilizada para compostos iónicos ou polares, e a ionização por APCI para compostos não iónicos e menos polares. Em ambos os tipos de ionização os espetros de massa podem ser obtidos em modo positivo e negativo (Teixera, 2006).

Existem vários analisadores de massa, como os analisadores de sector magnético, do tipo quadrupólo e a armadilha de iões (do inglês “*ion trap*”). O analisador irá separar os iões de acordo com a sua razão massa/carga (m/z). Dado que a grande maioria desses iões são monocarregados, a razão m/z é geralmente igual à massa do ião (Teixera, 2006; Leitão, 2010;).

No que diz respeito ao processamento dos resultados, este pode ser realizado em vários modos, sendo o cromatograma de corrente iónica total (TIC do inglês "*Total Ion Current*"), a monitorização do ião seleccionado (SIM do inglês "*Single Ion Monitoring*") e a monitorização da reacção seleccionada (SRM do inglês "*Selected Reaction Monitoring*") os mais comuns (Teixeira, 2006).

O cromatograma TIC representa graficamente a corrente iónica total em função do tempo e, portanto, são detetados compostos de todos os valores de m/z dentro de uma determinada gama (Teixeira, 2006).

5. Material e Métodos

5.1. Fitofármacos utilizados

As características físico-químicas dos quatro pesticidas em estudo (terbutilazina, difenoconazol, diflufenicão e pendimetalina), encontram-se apresentadas na seguinte tabela (Tabela 1):

Tabela 1 – Principais características físico-químicas da terbutilazina, difenoconazol, diflufenicão e pendimetalina.

Nome Comercial	Aspect®	Score250EC®	Zarpa®	Stomp33E®
Fabricante	Bayer	Syngenta	Bayer	BASF
Substância Ativa	Terbutilazina	Difenoconazol	Diflufenicão	Pendimetalina
[Substância ativa] g L ⁻¹	333	250	40	330
Aplicação	Herbicida	Fungicida	Herbicida	Herbicida
Nº de registo CAS	5915-41-3	119446-68-3	83164-33-4	40487-42-1
Fórmula molecular	C ₉ H ₁₆ ClN ₅	C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃	C ₁₉ H ₁₁ F ₅ N ₂ O ₂	C ₁₃ H ₁₉ N ₃ O ₄
Grupo químico	Triazina	Triazol	Carboxamidas	Dinitroanilina
Peso molecular (g mol ⁻¹)	229.71	406.26	394.3	281.31
pH	4-7	4-8	5-9	6-7
Densidade (g cm ⁻³ a 20°C)	1.18	1.40	1,54	1.17
Solubilidade em água (mg/L a pH =7 e 20°C)	8.5	15 (25°C)	0.05	0.3
K _{ow} (log p) ^a	3.21	4.20	4.90	5.18
pKa ^b	2.0	1,07	9.95	2,8
Constante de Henry 25°C (Pa m ³ mol ⁻¹) ^c	3.24 X 10 ⁻⁰³	9.0 X 10 ⁻⁰⁷	0,033	2.73 X 10 ⁻⁰³
Pressão de vapor 25° (mPa)	0.12	3.33 X 10 ⁻⁰⁵	4.25 x 10 ⁻³	1.94
DL ₅₀ oral (mamíferos) mg kg ⁻¹ ^d	1590->2000	1453	>2000	1250
Potencial de bioacumulação	Baixo	Moderado	Alto	Alto

^a O coeficiente de partição octanol- água (Kow) mede o caráter hidrofóbico ou hidrofílico de uma molécula.

^b A constante de acidez (pKa) diz-nos as propriedades ácidas ou básicas de uma substância

^c A constante de Henry é definida pela partição ar líquido ou vapor-líquido, sendo importante para determinar a volatilização de pesticidas quando dissolvidos em água.

^d A dose letal (DL50) é uma indicação da dose letal de uma dada substância, correspondente à dose capaz de matar 50% dos indivíduos de uma população.

Para a realização dos estudos de biodegradação, procedeu-se à preparação de soluções aquosas dos pesticidas, em condições estéreis, através da diluição das suspensões comerciais dos pesticidas com água ultrapura (Simplicity® UV, Millipore Corp., France).

5.2. Isolamento e identificação das espécies de fungos mais adaptadas aos pesticidas

O isolamento dos fungos foi realizado a partir de amostras de um solo franco-argiloso e uma biomistura. Esta biomistura resultou da adição de um substrato orgânico, neste caso cortiça, a um solo franco-argiloso recolhido na Herdade da Mitra (Universidade de Évora). Quer o solo quer a biomistura encontravam-se previamente contaminada com os quatro pesticidas em estudo nas seguintes concentrações: 60 mg terbutilazina Kg solo⁻¹; 5 mg difenoconazol Kg solo⁻¹; 7,5 mg diflufenicão Kg solo⁻¹; 60 mg pendimetalina Kg solo⁻¹ (Tabela 1, secção 5.1.). A contaminação foi feita seis meses antes de se proceder ao isolamento dos fungos.

Para o isolamento dos fungos foram recolhidos 10 g de amostra (solo e/ou biomistura) aos quais foram adicionados 90mL de soro fisiológico. Estas soluções foram colocadas duas horas em agitação, de modo a que os microrganismos se encontrassem em suspensão e a sua concentração populacional mais homogénea na solução. De seguida, foram preparadas cinco diluições de cada amostra em eppendorfs (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ e 10⁻⁵), das quais foram retirados 200 µL de cada e espalhados com o auxílio de pipetas de Pasteur em placas de Petri com os meios de cultura Malte de Extrato Agar (MEA) e Agar Rosa de Bengal (RB), em que o segundo faz uma pré-seleção dos microrganismos uma vez que contém um antibiótico que não permite o crescimento de bactérias (cloranfenicol).

O meio MEA foi preparado com 20 g de extrato de malte, 20 g de glucose, 1 g de peptona e 20g de agar, tudo dissolvido com 1 L de água destilada em banho-maria.

O Meio RB contendo cloranfenicol, foi preparado com 5 g de peptona, 10 g de glucose, 1 g de fosfato de potássio, 0.5 g de sulfato de magnésio, 0.05 g de rosa de bengal, 0.1 g de cloranfenicol e 15 g de agar, tudo dissolvido com 1 L de água destilada em banho-maria. Após a sua preparação, os meios de cultura foram autoclavados para serem esterilizados.

Após a preparação das placas e da inoculação das diluições nas mesmas, estas foram colocadas a incubar na estufa a 28°C durante 3 dias. A partir destas placas, foram selecionadas as colónias que se apresentavam em maior número e claramente mais isoladas. Estas colónias foram inoculadas em novas placas de Petri contendo meio MEA e incubadas durante 4 dias na estufa a 28°C.

Após a observação das placas e com o objetivo de selecionar fungos de diferentes amostras (Figura 17), selecionaram-se dois fungos provenientes da amostra contendo apenas solo franco-argiloso (Fungo A e Fungo B) e um fungo proveniente da amostra contendo a biomistura do solo e cortiça (Fungo C) (ver secção 6.1.). Os fungos *L. saksenae* e *T. viride* também foram selecionados para ser objeto de estudo

neste trabalho por já terem sido utilizados em trabalhos anteriores (Pinto *et al.*, 2012; Rodrigues, 2012), mostrando ser bastante eficazes na degradação destes pesticidas. O procedimento de isolamento destes dois fungos também correspondeu ao procedimento realizado para os fungos A, B e C, sendo que o fungo *T. viride* foi isolado a partir de uma biomistura contendo solo franco-argiloso e casca de pinheiro como substrato orgânico, e o fungo *L. saksenae* de uma biomistura contendo solo franco-argiloso e cortiça como substrato orgânico (Figura 17).

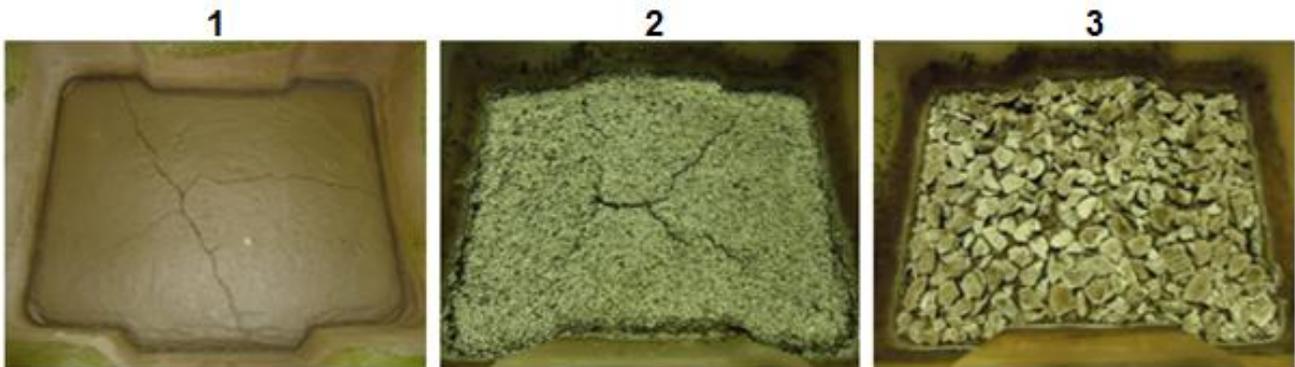


Figura 17– Biomisturas a partir das quais foram efetuados os isolamentos das espécies de fungos mais adaptadas aos pesticidas. 1= Fungos A e B; 2= Fungos C e *L. saksenae* e 3= *T. viride*.

Para a extração do DNA dos fungos e respetiva identificação utilizou-se o kit “NucleoSpin” da marca Macherey-Nagel, seguindo o protocolo do fornecedor. A amplificação do DNA efetuou-se por PCR utilizando primers da região ITS. A purificação dos produtos de PCR foi feita com o kit “NucleoSpin Extract II” da marca Macherey-Nagel.

As reações de sequenciação foram efetuadas usando os primers de PCR com o Kit BDT v1.1 (Applied Biosystems). A eletroforese capilar decorreu no sequenciador ABI PRISM 3730 xl (Applied Biosystems) e a análise de resultados foi feita com o Software Sequencing analysis 3.7.

Esta sequenciação foi efetuada recorrendo à prestação de serviços na firma Biopremier.

Os fungos *T. viride* e *L. saksenae* também foram selecionados para este estudo tal como já tinha sido descrito, devido ao facto de em trabalhos anteriores terem demonstrado uma boa capacidade de biodegradação dos pesticidas

selecionados (Pinto *et al.*, 2012; Rodrigues, 2012). A sequência parcial de DNA do fungo *L. saksenae* foi publicado no GenBank, NCBI, com o número de acesso JQ282679 (Caldeira *et al.*, 2013).

Para além dos fungos também foram realizados ensaios usando duas espécies bacterianas denominadas por Bac 1 e Bac 2. Estas duas bactérias foram selecionadas para este trabalho devido ao facto de serem bactérias com boas capacidades de degradação dos quatro compostos em estudo.

5.3. Preparação de culturas líquidas dos fungos selecionados

Para os ensaios de biodegradação (ver secção 5.5.) contendo os fungos, foram preparadas culturas líquidas dos mesmos (Fungo A, Fungo B, Fungo C, bem como do *L. saksenae* e *T. viride*). De modo a facilitar a adaptação dos fungos ao solo contaminado a primeira cultura líquida adicionada aos copos foi de 100 mL, para isso, em erlenmeyers de 250 mL foram colocados 100 mL de Malte de Extrato Líquido aos quais foram adicionados os respetivos fungos. As restantes culturas adicionadas aos ensaios foram de 40 mL, também preparadas como descrito anteriormente. Antes de serem adicionadas ao solo, todas as culturas foram mantidas num agitador orbital (Heidolph UNIMAX 2010) a 120 rpm durante 8 dias e à temperatura ambiente.

5.4. Preparação de culturas líquidas das bactérias selecionadas

Para os ensaios de biodegradação com as bactérias foram preparadas culturas líquidas das mesmas, para as quais os procedimentos foram muito semelhantes aos descritos previamente para os fungos (ver secção 5.3.).

5.5. Ensaios de biodegradação

Foram utilizadas seis diferentes modalidades para os ensaios de biodegradação contendo fungos (Figura 18). Foram ainda utilizadas como controlo uma modalidade contendo apenas solo e outra contendo apenas solo e cortiça, de modo a ser avaliada a possível degradação dos compostos na ausência dos fungos selecionados. Assim sendo, os dois sistemas em estudo consistiram: i) em modalidades com 600 g de solo e 12 g de cortiça; ii) em modalidades com 600 g de

solo e 24 g de vermiculite. O solo franco-argiloso, adicionado a cada copo, foi recolhido na Herdade da Mitra, crivado por 5mm (as características físico-químicas da cortiça e do solo encontram-se descritas em Pinto *et al.*, 2012) e esterilizado na autoclave. Em todas as modalidades foram usadas três réplicas.

Para se proceder à contaminação dos solos prepararam-se soluções-mãe dos pesticidas em estudo (ver seção 5.1.) utilizando para isso as respectivas suspensões comerciais da Bayer (Aspect® e Zarpa®) Syngenta (Score250EC®) e BASF (Stomp33E®). Foram preparadas soluções com concentrações de 16.7, 12.5, 16.5, e 2.0 gL⁻¹ de terbutilazina, difenoconazol, pendimetalina e diflufenicão, respectivamente. A contaminação final do solo consistiu em 70 mg terbutilazina kg⁻¹; 20 mg difenoconazol kg⁻¹; 20 mg diflufenicão kg⁻¹ e 70 mg pendimetalina kg⁻¹, utilizando para isso diferentes volumes das respectivas soluções-mãe. O solo foi revolvido regularmente e humedecido com água Milli-Q de modo a facilitar a homogeneização e dispersão dos pesticidas, bem como manter uma humidade favorável ao crescimento e desenvolvimento das populações microbianas.

Quinze dias após a contaminação do solo, foram adicionadas as culturas líquidas (ver seção 5.3.) contendo os fungos: Fungo A, Fungo B, Fungo C, bem como os fungos *L. saksenae* e *T. viride*. A adição dos substratos orgânicos (cortiça e vermiculite) aos copos, foi feita 48h antes da adição das respectivas culturas líquidas.

Na figura 18 são apresentadas de forma esquemática e descritiva as diferentes modalidades utilizadas neste estudo, onde foram adicionados fungos.

Biodegradação de pesticidas em solos e biomisturas.

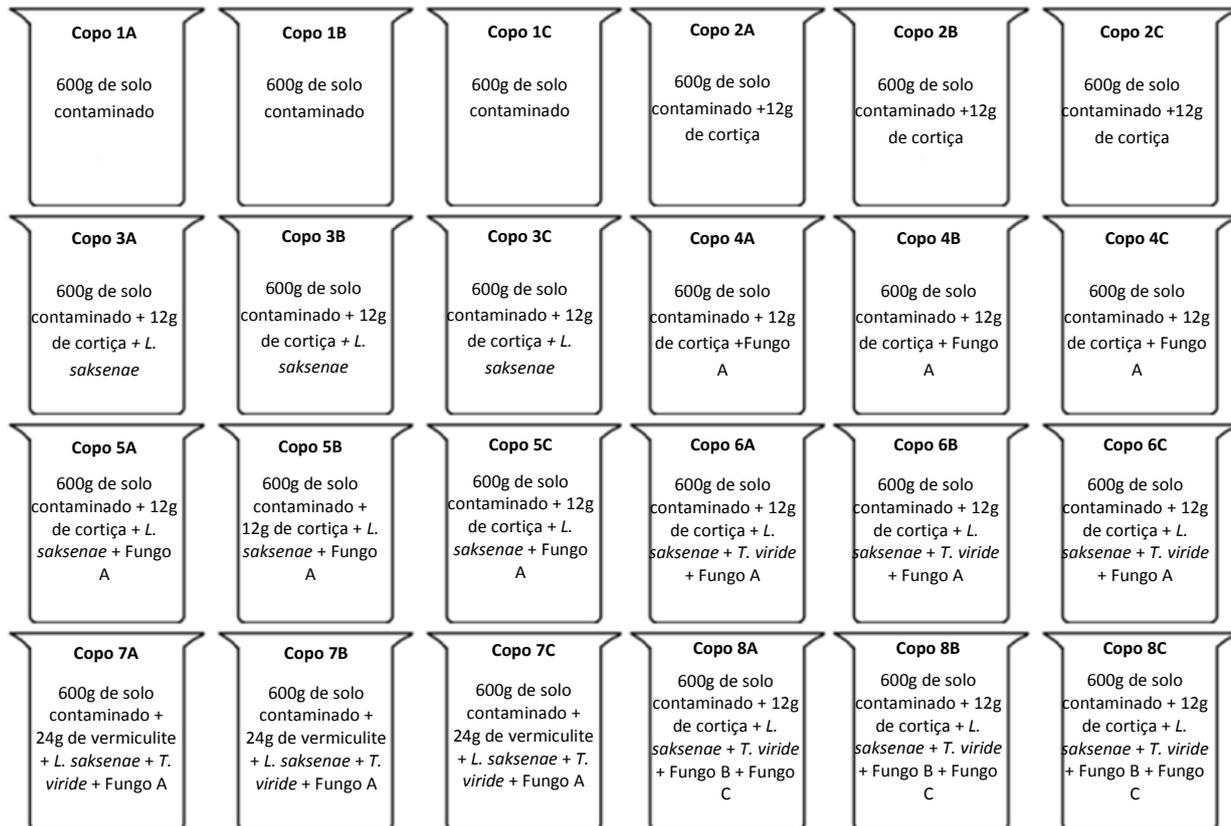


Figura 18- Esquema da montagem do ensaio de biodegradação e descrição das diferentes modalidades onde foram adicionados fungos. Os copos marcados com A, B e C correspondem às réplicas.

No total, foram efetuadas 4 adições de culturas líquidas contendo os respectivos fungos, ao fim de 15, 30, 60 e 120 dias, após a contaminação do solo.

A recolha das amostras também foi realizada após 15, 30, 100, 140 e 180 dias da contaminação do solo e sempre antes da adição das respetivas culturas líquidas. As amostras de solo e/ou biomistura recolhidas foram colocadas a secar à temperatura ambiente. Depois de secas, as amostras foram crivadas num crivo de 2 mm e guardadas para uma posterior extração pelo método Accelerated Solvent Extraction (ASE) da Dionex. As amostras dos copos que continham cortiça também foram tratadas como descrito anteriormente, mas a cortiça retida nos crivos foi recolhida e guardada no frio para uma posterior análise da sua capacidade de adsorção dos pesticidas.

Para além destes ensaios de biodegradação, foram realizados mais quatro modalidades contendo bactérias (Figura 19). Duas destas consistiram numa biomistura de 600 g de solo e 12 g de cortiça, e as outras duas consistiram numa outra biomistura de 600 g de solo e 24 g de vermiculite. Novamente, o solo franco-argiloso adicionado a cada copo foi recolhido na Herdade da Mitra e crivado por 5 mm. Para a

contaminação dos solos, procedeu-se como descrito anteriormente. Quinze dias após a contaminação do solo, foram adicionadas as culturas líquidas (ver seção 5.4.) contendo as bactérias Bac 1 e Bac 2. A adição dos substratos orgânicos (cortiça e vermiculite) aos copos, foi feita 48 h antes da adição das respectivas culturas líquidas.

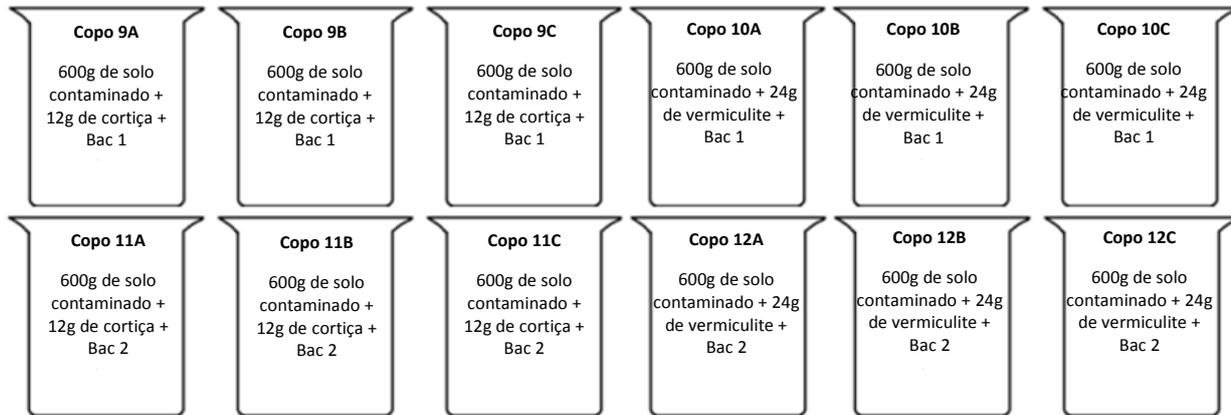


Figura 19- Esquema da montagem do ensaio de biodegradação e descrição das diferentes modalidades onde foram adicionadas bactérias. Os copos marcados com A, B e C correspondem às réplicas.

No total, foram efetuadas 2 adições de culturas líquidas contendo as respectivas bactérias, ao fim de 15 e 80 dias, após a contaminação do solo.

A recolha das amostras também foi realizada após 40 e 120 dias da contaminação do solo. As amostras de biomistura recolhidas foram colocadas a secar à temperatura ambiente, e depois de secas, foram crivadas num crivo de 2 mm e guardadas para uma posterior extração pelo método ASE. Para as amostras contendo cortiça, recolheu-se e guardou-se no frio a cortiça retida no crivo, para uma posterior análise da sua capacidade de adsorção dos pesticidas.

Resumidamente, as biomisturas em estudo encontram-se na tabela 2:

Tabela 2- Composição das biomisturas (Bio) em estudo.

Composição	
Bio 1	<i>L. saksenae</i> + Cortiça
Bio 2	<i>Fusarium</i> sp. + Cortiça
Bio 3	<i>L. saksenae</i> + Fungo A + Cortiça

Bio 4	<i>L. saksenae</i> + <i>T. viride</i> + Fungo A + Cortiça
Bio 5	<i>L. saksenae</i> + <i>T. viride</i> + Fungo A + Vermiculite
Bio 6	<i>L. saksenae</i> + <i>T. viride</i> + Fungo B + Fungo C + Cortiça
Bio 7	Bac 1 + Cortiça
Bio 8	Bac 1 + Vermiculite
Bio 9	Bac 2 + Cortiça
Bio 10	Bac 2 + Vermiculite

5.6. Extração Acelerada por Solventes (ASE)

Para uma posterior quantificação dos pesticidas, as amostras recolhidas foram sujeitas a um método de extração sob pressão da Dionex - Accelerated Solvent Extraction System (ASE 100). Para isso, pesaram-se 9.0 g das amostras previamente crivadas numa balança analítica (Pioneer™ Ohaus) e juntaram-se 1.5 g de terra de diatomáceas (Dionex Corporation), em seguida, esta mistura foi homogeneizada num almofariz e colocada na célula do ASE 100.

As condições de extração foram otimizadas de acordo com trabalhos anteriores (dados não publicados) e constam da Tabela 3:

Tabela 3 – Condições utilizadas no método Extração Acelerada por Solventes (ASE) da Dionex.

Temperatura (°C)	Volume de lavagem (%)	Tempo de purga (seg)	Número de ciclos	Tempo por ciclo (min)	Tamanho da célula (mL)
100	60	60	2	10	10

Como solvente de extração foi utilizado MeOH:H₂O (80:20, v:v), sendo o grau de pureza do metanol >99,9%, no que diz respeito os filtros usados foram de celulose (diâmetro de 30 mm, Dionex Corporation). O volume de amostra recolhida variou entre os 19 e os 20 mL.

Após realizada a extração, as amostras foram em seguida analisadas por HPLC-UV e LC-MS.

5.7. Desadsorção dos pesticidas

A cortiça retida nos crivos, durante o processo de preparação das amostras para ASE, foi sujeita a um processo de desadsorção de modo a serem extraídos os pesticidas e analisar a capacidade de adsorção deste substrato orgânico.

Procedeu-se então à pesagem da cortiça, a qual foi colocada em agitação (120 rpm) juntamente com 20.0 mL de MeOH:H₂O (80:20, v:v) durante 48h. Após as 48h, foram recolhidos 2.0 mL da suspensão obtida para um eppendorf, que foi levado ao vortex para uma melhor homogeneização da amostra. Com uma seringa, passaram-se cerca de 2.0 mL de MeOH:H₂O (80:20, v:v) por um filtro de Nylon de 0,45µm (Wattman, Maidstone, Inglaterra), com o qual foi filtrada a amostra para um vial.

No final todas as amostras foram analisadas por HPLC-UV e LC-MS, como descrito mais à frente (ver secção 5.8. e 5.9.).

5.8. Cromatografia Líquida de Elevada Eficiência com detetor UV (HPLC-UV)

As amostras extraídas no ASE foram preparadas para a análise por HPLC-UV através de dois métodos diferentes. Para as amostras dos copos que continham fungos ou bactérias utilizou-se o seguinte método: o volume de amostra recolhido no equipamento de ASE foi transferido para um balão de fundo redondo de 50.0 mL e em seguida lavou-se o frasco de ASE com 2.0 mL de MeOH:H₂O (80:20, v:v). Esta solução foi evaporada no rotavapor (Büchi R-200 com banho termostaticado Büchi Heating Bath B-490 e uma bomba de vácuo Büchi Vac V-500) a 35°C, até um volume final de aproximadamente 2.0 mL de amostra. Com a micropipeta retiraram-se os 2.0 mL de amostra para um balão volumétrico de 5.0 mL, lavou-se o balão de fundo redondo com 2.0 mL de MeOH:H₂O (80:20, v:v), adicionou-se ao balão volumétrico e perpez-se então o restante volume com MeOH:H₂O (80:20, v:v). Com o auxílio de uma seringa, passaram-se cerca de 2.0 mL de solução MeOH:H₂O (80:20, v:v) por um filtro de Nylon de 0,45 µm (Wattman, Maidstone, Inglaterra) e em seguida filtraram-se 2.0 mL de amostra para um vial.

Para as amostras dos copos controlo utilizou-se uma metodologia diferente, uma vez que seria esperada uma concentração de pesticidas superior nestas modalidades. O facto de não terem sido adicionadas a estes copos culturas líquidas de fungos ou bactérias conduziu a reduzidas taxas de biodegradação, sendo a concentração de todos os pesticidas no final do ensaio muito próxima da inicial. Assim sendo, para os copos controlo utilizou-se a seguinte metodologia: as amostras

recolhidas no equipamento de ASE foram transferidas para balões volumétricos de 25.0 mL. Em seguida, o frasco de ASE foi lavado com cerca de 2.0 mL de MeOH:H₂O (80:20, v:v), os quais foram adicionados ao balão volumétrico e perfizeram-se os 25.0 mL com MeOH:H₂O (80:20, v:v). Com o auxílio de uma seringa, passaram-se cerca de 2.0mL de solução MeOH:H₂O (80:20, v:v) por um filtro de Nylon de 0,45 µm (Wattman, Maidstone, Inglaterra) e em seguida filtraram-se 2.0 mL de amostra para um vial.

No final todas as amostras foram analisadas por HPLC-UV num equipamento Elite - LaChrom, equipado com uma bomba Hitachi L-2130, detetor UV – Hitachi L-2400 e amostrador automático Hitachi L-2200 ligado a um loop de amostra de 20 µL. A coluna analítica de fase reversa utilizada foi uma Zorbax Eclipse XDB-C18 (250mm x 4,6 mm, tamanho das partículas: 5 µm). A deteção foi feita a 225 nm correspondendo ao máximo de absorvância dos compostos.

A separação decorreu com uma fase móvel composta pelo solvente A: água acidificada (0.1% de H₃PO₄) e pelo solvente B: acetonitrilo (com grau de pureza >99,9%, a um fluxo de 1.0 mL min⁻¹. O gradiente utilizado encontra-se descrito na tabela 4.

Tabela 4- Gradiente utilizado na separação dos compostos por HPLC-UV.

Tempo (min)	Água acidificada com ácido fosfórico (0.1 %, v/v)	Acetonitrilo (%)
0	40	60
10	15	85
15	15	85
16	40	60
22	40	60

A quantificação dos pesticidas em solução aquosa foi feita pelo método da reta de calibração. Para construir as respetivas retas de calibração prepararam-se uma série de soluções padrão a partir das suspensões comerciais. Realizaram-se 3 réplicas para cada solução padrão, as quais foram injetadas 5 vezes.

5.9. Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (LC-MS)

De modo a verificar a possível metabolização dos pesticidas na presença dos fungos, avaliaram-se os extratos provenientes do ASE por LC-MS, bem como as amostras de desadsorção dos pesticidas da cortiça.

Estas análises foram realizadas num espectrómetro de massa LCQ Advantage ThermoFinnigan equipado com uma fonte de ionização *electrospray* e um analisador de massa *ion trap*.

As condições da análise MS foram: temperatura do capilar de 350°C, fonte de tensão de 5,0 kV, fonte de corrente de 100,0 µA e tensão capilar de 8,0 V no modo ião positivo.

O espectrómetro de massa encontrava-se acoplado a um sistema de HPLC com amostrador automático (Surveyor ThermoFinnigan) e detetor *diode array* (DAD). A coluna analítica utilizada foi uma Zorbax Eclipse XDB de fase reversa (C₁₈, tamanho de partículas 3.0 µm, e com dimensões de 150 mm x 2,1 mm).

A separação cromatográfica foi realizada com um fluxo de 0.2mLmin⁻¹ da fase móvel, por injeção de 20.0µL de cada amostra e o programa de eluição foi igual ao utilizado para a análise por HPLC-UV.

O detetor DAD foi programado com um comprimento de onda de 200-500nm e o perfil cromatográfico foi gravado aos 225nm.

5.10. Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

A verificação da presença de microrganismos nas amostras de solo, inoculado com os diferentes fungos, foi realizada por microscopia eletrónica de varrimento (SEM do inglês "Scanning *Electron Microscope*"). O copo avaliado foi o copo 4A (Figura 18, seção 5.5), contendo solo contaminado, cortiça e o *Fusarium* sp.. As amostras foram colocadas sobre uma fita de carbono, e metalizadas com plasma de ouro (Balzers Union SCD030), durante 30s. Após este processo preparatório, as amostras foram observadas no microscópio eletrónico de varrimento (Hitachi 3700N), em alto vácuo, a 20kV. Esta análise foi realizada no laboratório do *Centro Hércules*.

5.11. Análise estatística

As comparações estatísticas entre os tratamentos foram realizadas por análise de variância one-way (ANOVA) seguida do teste post-hoc de Tukey. O teste de Levene foi utilizado para verificar a homogeneidade das variâncias (IBM SPSS Statistics 21).

6. Resultados e Discussão

6.1. Isolamento e identificação das espécies de fungos mais adaptadas aos pesticidas

O procedimento para isolamento das espécies de fungos mais adaptadas aos pesticidas estudados (ver secção 5.2.), permitiu obter três isolados fúngicos. A partir de amostras contendo apenas solo franco-argiloso foram isolados e selecionados o fungo A e o fungo B, enquanto a partir da biomistura contendo solo franco-argiloso e cortiça foi isolado o fungo C (Figura 20).

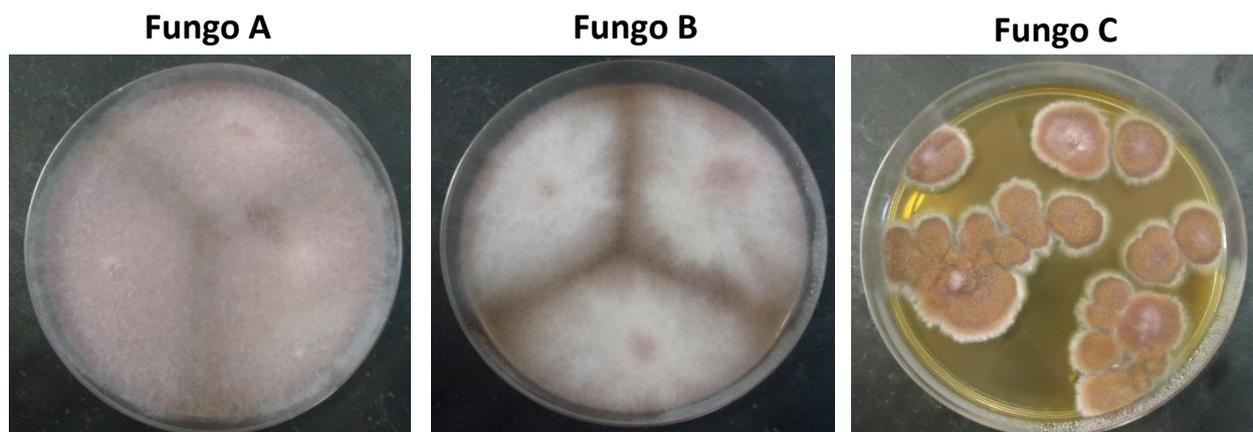


Figura 20- Isolados fúngicos obtidos a partir de amostras constituídas por: i) solo franco-argiloso (Fungo A e Fungo B); ii) biomistura contendo solo franco-argiloso e cortiça (Fungo C).

A respetiva identificação das diferentes espécies isoladas de fungos (ver secção 5.2.), permitiu então a obtenção dos seguintes resultados:

Tabela 5- Identificação das espécies dos isolados fúngicos.

Fungo A	<i>Fusarium</i> sp.
Fungo B	<i>Fusarium oxysporum</i>
Fungo C	<i>Aspergillus</i> sp.

6.2. Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM)

De modo a garantir uma densidade de microrganismos apropriada e necessária à degradação dos pesticidas, foram realizadas ao longo dos ensaios várias adições de culturas líquidas contendo os respetivos fungos ou bactérias (ver secção 5.5.). A confirmação da presença de uma elevada concentração microbiana, foi obtida através de análises de SEM em algumas modalidades.

A cortiça, para além de ser um material natural, possui uma elevada porosidade que lhe confere uma boa capacidade de sorção. Na figura 21, na zona assinalada, pode ser observada a presença do fungo *Fusarium* sp., presente numa amostra do copo 4^a (ver secção 5.5.), contendo "solo+cortiça+*Fusarium* sp.". É também possível confirmar a elevada porosidade deste substrato orgânico, a qual promove uma melhor estrutura e arejamento das biomisturas contendo este material, traduzindo-se em melhores condições para o desenvolvimento dos microrganismos.

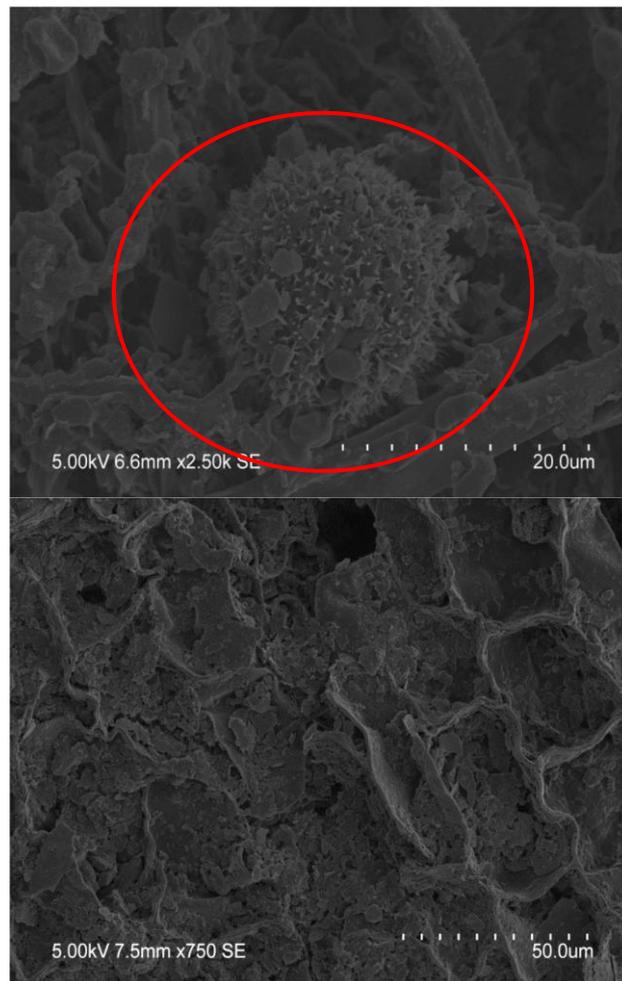


Figura 21- Imagens obtidas através de SEM para a amostra do copo 4A (solo+cortiça+*Fusarium* sp.).

6.3. Ensaio de biodegradação

Para a quantificação dos pesticidas presentes nas amostras recolhidas ao longo dos ensaios de biodegradação, foi necessária uma otimização alargada dos vários parâmetros que podem influenciar a separação dos picos na corrida cromatográfica. Para isso foram testadas exaustivamente diferentes situações, relativas à limpeza da matriz quer às condições cromatográficas. Os resultados destes estudos conduziram à figura, onde se apresenta um cromatograma-tipo, no qual estão apresentados os quatro tempos de retenção para os quatro pesticidas presentes nas amostras.

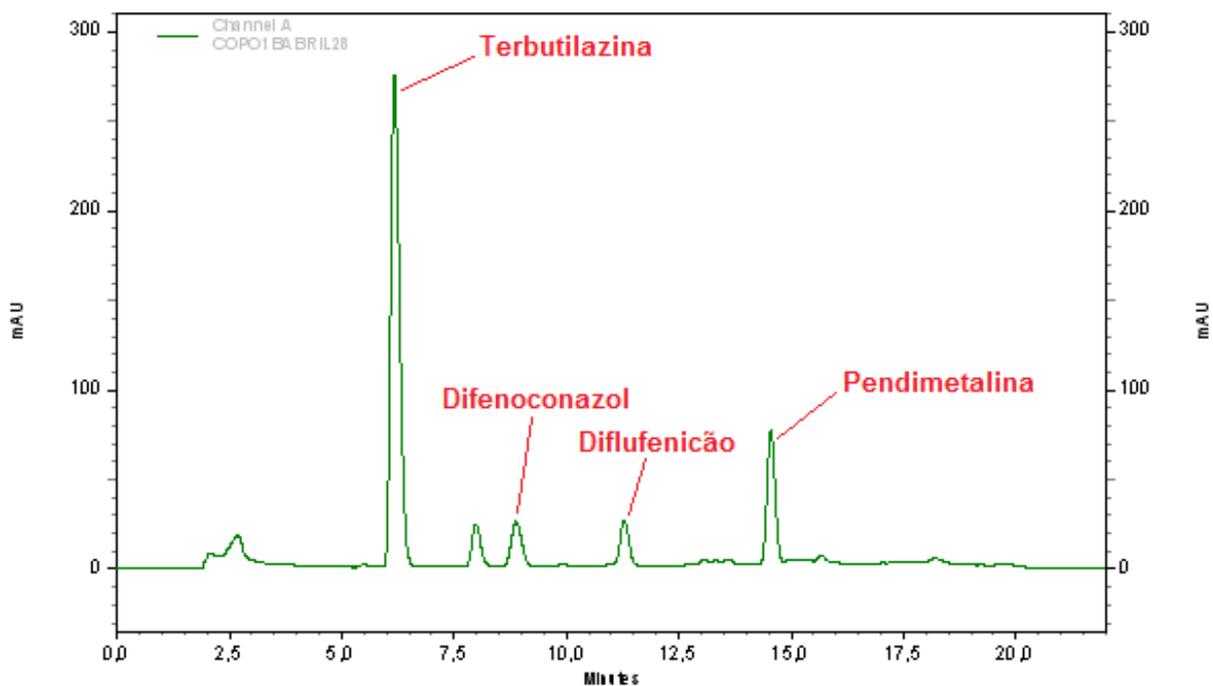


Figura 22- Cromatograma obtido por HPLC-UV para a amostra do copo 1B, no final do ensaio i.e. 180 dias de contaminação.

A identificação dos picos foi obtida através da comparação dos tempos de retenção obtidos para cada um dos padrões dos pesticidas analisados nas mesmas condições cromatográficas.

Através da obtenção do cromatograma da amostra do copo controlo (Figura 22), foi-nos possível identificar os quatro compostos em estudo terbutilazina, difenoconazol, diflufenicão e pendimetalina com os tempos de retenção 6,19; 8,87; 11,29 e 14,57 minutos, respetivamente.

6.3.1. Terbutilazina

Observando o gráfico B da figura 23 (15 dias após a contaminação), podemos concluir que os resultados obtidos demonstram que para a Bio 6 a concentração deste herbicida foi reduzida a cerca de metade, resultado que se acentua significativamente aos 30 dias.

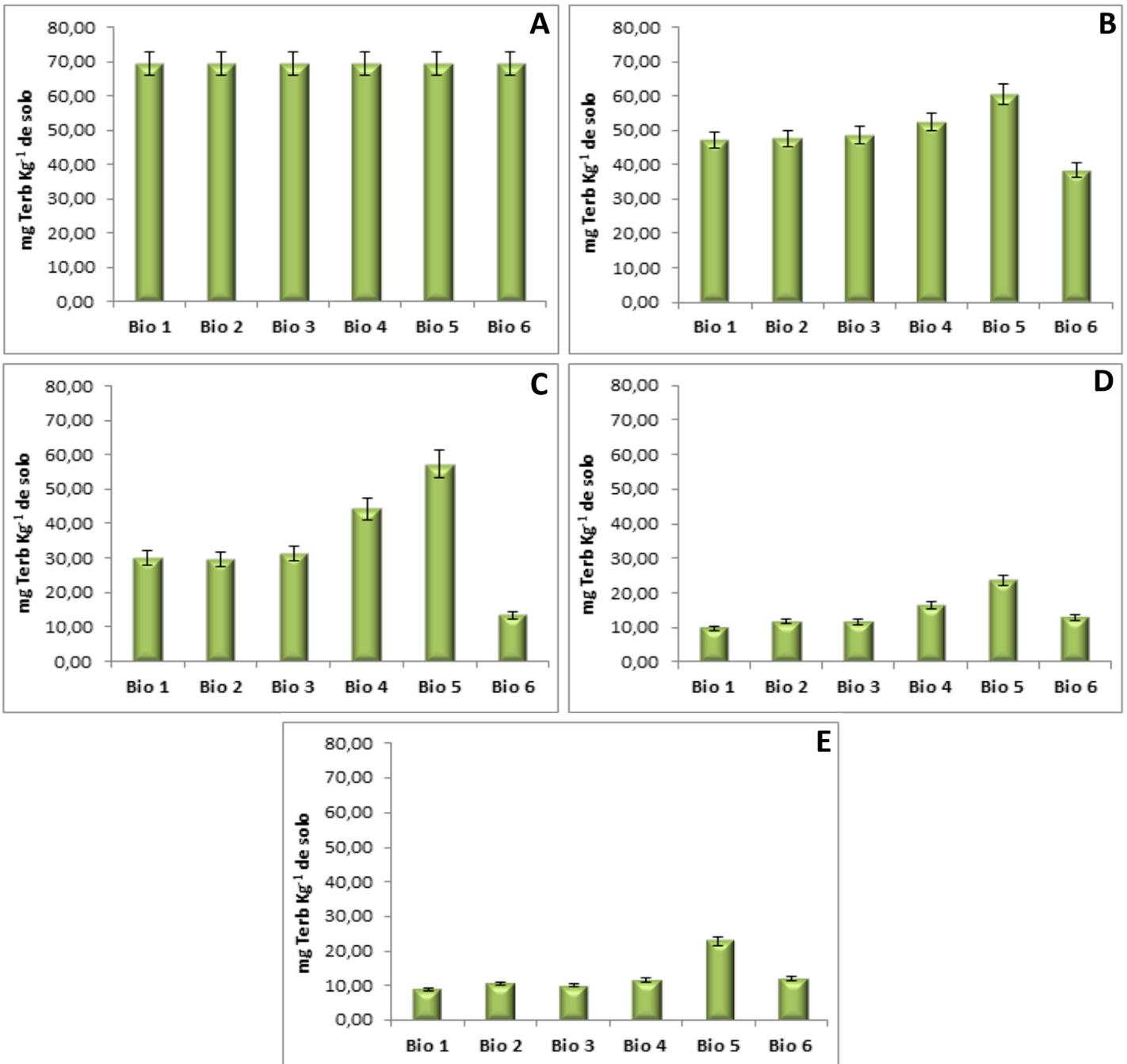


Figura 23- Concentração do pesticida terbutilazina (mg Kg⁻¹ de solo) nas amostras recolhidas ao fim de: A) 0 dias; B) 15 dias; C) 30 dias; D) 100 dias e E) 140 dias após contaminação. Bio 1= *L. saksenae* + Cortiça; Bio 2= *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 3= *L. saksenae* + *Fusarium* sp. +

Cortiça; Bio 4= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 5= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Vermiculite; Bio 6= *L. saksenae* + *T. viride* + *F. oxysporum* + *Aspergillus* sp. + Cortiça. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão.

Este resultado pode traduzir que o fator que contribui significativamente para uma cinética de biodegradação mais rápida, será a presença do fungo *Aspergillus* sp. na Bio 6, dado que é a presença deste fungo é a principal diferença para a Bio 4. A biomistura com a maior concentração foi a Bio 5, o que é facilmente justificado pela ausência de cortiça relativamente às restantes biomisturas. Comportamento muito similar ao longo dos ensaios foi apresentado pelas Bio 1, 2 e 3, o que sugere que o consórcio *L. saksenae* + *Fusarium* sp., não é mais eficiente que qualquer um dos fungos isoladamente.

Aos 100 dias após a contaminação dos ensaios, as concentrações do herbicida terbutilazina já se encontram muito baixas, comparando com a concentração inicial. Neste caso, é a Bio 1 com menos concentração e a Bio 5 com a maior concentração deste pesticida ($9,78 \pm 0,005 \text{ mg Kg}^{-1}$ e $23,58 \pm 0,012 \text{ mg Kg}^{-1}$ de solo, respetivamente).

Na figura 24 são apresentados os valores de concentração obtidos para o pesticida terbutilazina nas diferentes biomisturas, no final dos ensaios de biodegradação com fungos e a respetiva análise estatística.

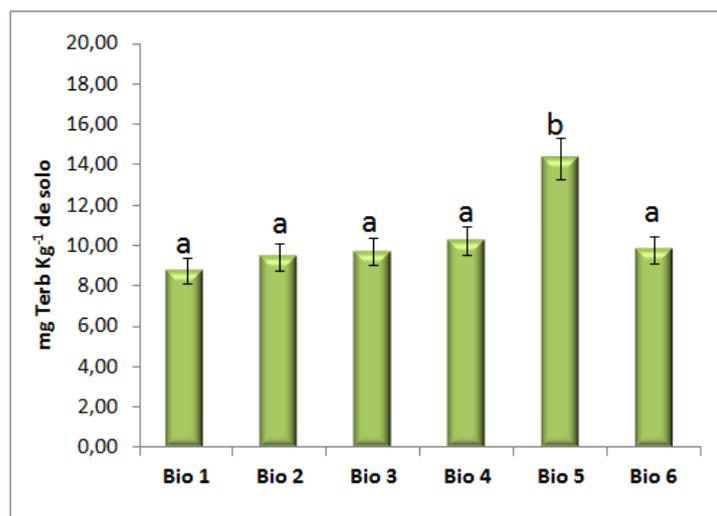


Figura 24- Concentração do pesticida terbutilazina (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de 180 dias após contaminação. Bio 1= *L. saksenae* + Cortiça; Bio 2= *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 3= *L. saksenae* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 4= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 5= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Vermiculite; Bio 6= *L. saksenae* + *T. viride* + *F. oxysporum* + *Aspergillus* sp. + Cortiça. Cada coluna representa o

valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Letras distintas significa que existem diferenças significativas para $p < 0,05$.

Através da análise estatística efetuada, foi possível verificar que não existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações de terbutilazina para as biomisturas contendo o substrato orgânico cortiça. No entanto, também foi possível constatar que a biomistura contendo vermiculite (Bio 5) não só apresenta uma concentração deste pesticida significativamente maior nas amostras recolhidas ($p < 0,05$) que a da Bio 4 (em que a sua composição é a mesma exceto o substrato orgânico), como a sua concentração é também significativamente superior ($p < 0,05$) em relação às restantes biomisturas.

Observando o gráfico B da figura 25, relativamente aos ensaios contendo bactérias, verificamos uma grande diferença de concentração entre as biomisturas contendo o substrato orgânico cortiça (Bio 7 e 9) e o substrato vermiculite (Bio 8 e 10). A Bio 7 contém $15,40 \pm 0,008 \text{ mg Kg}^{-1}$ e a Bio 9 contém $16,11 \pm 0,008 \text{ mg Kg}^{-1}$, já as biomisturas com vermiculite contém $34,50 \pm 0,017 \text{ mg Kg}^{-1}$ e $42,64 \pm 0,021 \text{ mg Kg}^{-1}$, correspondendo às biomisturas 8 e 10, respetivamente. No entanto, os resultados obtidos para as estas últimas biomisturas já demonstram que a concentração de pesticida é aproximadamente metade do valor inicial. É também de notar, a acentuada diminuição das concentrações nas biomisturas 7 e 9, apenas 40 dias após a contaminação.

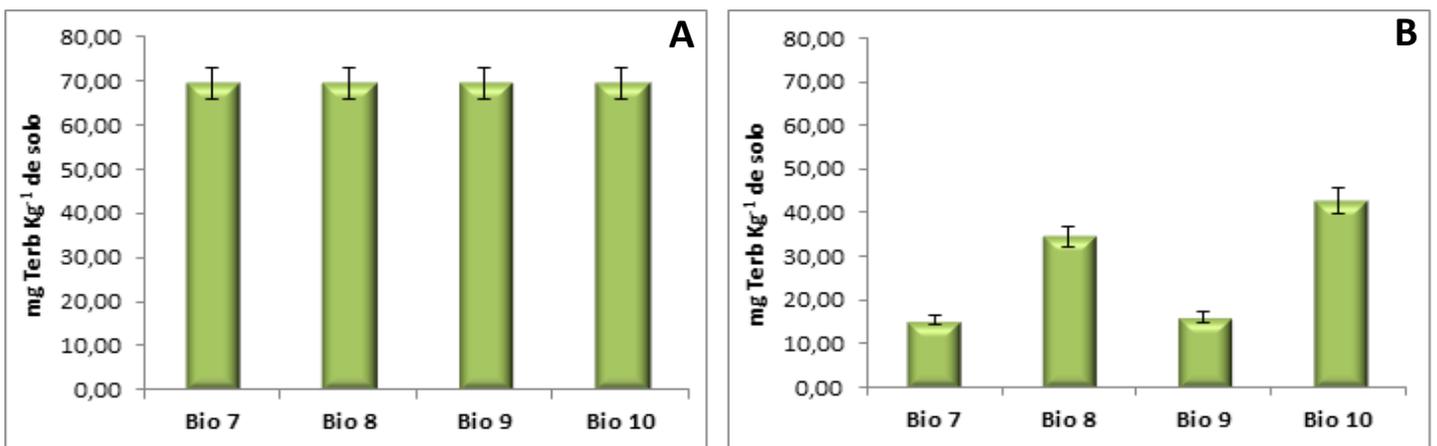


Figura 25- Concentração do pesticida terbutilazina (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de: A) 0 dias e B) 40 dias após contaminação. Bio 7= Bac 1 + Cortiça; Bio 8= Bac 1 + Vermiculite; Bio 9= Bac 2 + Cortiça; Bio 10= Bac 2 + Vermiculite. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão.

Na figura 26, encontram-se os valores de concentração do herbicida terbutilazina para as biomisturas dos ensaios de biodegradação com bactérias no final dos ensaios i.e. 120 dias após a contaminação. Estes resultados foram sujeitos a uma análise estatística de forma a verificar quais as biomisturas que apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) na redução da concentração do pesticida terbutilazina.

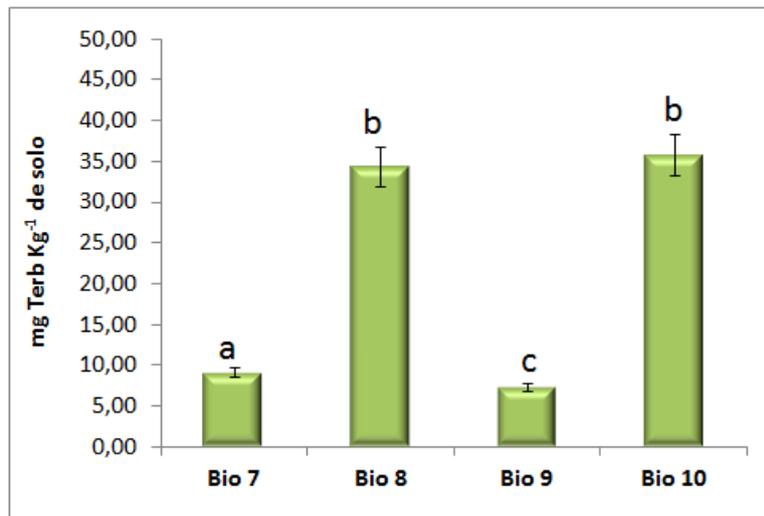


Figura 26- Concentração do pesticida terbutilazina (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de 120 dias após contaminação. Bio 7= Bac 1 + Cortiça; Bio 8= Bac 1 + Vermiculite; Bio 9= Bac 2 + Cortiça; Bio 10= Bac 2 + Vermiculite. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Letras distintas significa que existem diferenças significativas para $p < 0,05$.

No final do ensaio (Figura 26), verifica-se que a maior biodegradação ocorreu na Bio 9, apresentando no final do ensaio uma concentração em terbutilazina de $7,33 \pm 0,004 \text{ mg Kg}^{-1}$.

Comparando as biomisturas contendo a bactéria Bac 1, constatamos que a Bio 7 (contendo cortiça) apresentou valores de concentração significativamente inferiores ($p < 0,05$) relativamente à Bio 8 (contendo vermiculite), $9,18 \pm 0,046 \text{ mg Kg}^{-1}$ e $34,42 \pm 0,017 \text{ mg Kg}^{-1}$, respetivamente. Para a bactéria Bac 2, presente nas biomisturas 9 e 10 (cortiça e vermiculite, respetivamente) também se observaram diferenças significativas ($p < 0,05$) entre elas, nomeadamente, a Bio 9 apresentou valores de concentração significativamente inferiores ($p < 0,05$) à biomistura 10 ($7,33 \pm 0,004 \text{ mg Kg}^{-1}$ e $35,86 \pm 0,018 \text{ mg Kg}^{-1}$, respetivamente).

Na tabela 6, encontram-se as percentagens de remoção de terbutilazina no final do ensaio. Analisando e comparando todas as biomisturas, verificamos que a biomistura que apresentou maior taxa de biodegradação foi a Bio 9, com uma percentagem de remoção próxima dos 90%, removendo o terbutilazina quase na sua totalidade. Pelo contrário, a biomistura que menos removeu este pesticida foi a Bio 10, com uma percentagem de remoção de 48,3%. Verifica-se também, que nos ensaios de biodegradação contendo fungos, foram obtidas percentagens de remoção muito boas, rondando entre os 80 e 88%, aproximadamente. Deve no entanto ter-se em conta que o tempo de duração dos ensaios com fungos foi superior em 60 dias, relativamente aos ensaios com as bactérias.

Tabela 6- Percentagens de remoção do pesticida terbutilazina, 180 dias após a contaminação, nas diferentes biomisturas.

	Bio 1	Bio 2	Bio 3	Bio 4	Bio 5	Bio 6	Bio 7	Bio 8	Bio 9	Bio 10
% Remoção de Terbutilazina	87,4	86,4	86,0	85,3	79,4	85,9	86,8	50,4	89,4	48,3

Getenga *et al.* (2009), realizaram um estudo com duração de 98 dias onde verificaram a degradação de terbutilazina (com uma concentração inicial de pesticida de 22 mg L⁻¹) em culturas líquidas, por uma espécie bacteriana *Arthrobacter* sp. e também por um consórcio microbiano, isolados a partir de um solo com historial de contaminação com atrazina. A percentagem de degradação obtida utilizando o consórcio microbiano revelou-se maior do que a percentagem obtida utilizando apenas o isolado bacteriano (79% e 65% respetivamente). Comparando com os nossos resultados, observamos que as percentagens por nós obtidas foram superiores às obtidas no estudo referido anteriormente (acima dos 85% exceto para a Bio 5). É importante também realçar que os nossos resultados foram obtidos para ensaios em solo e não em cultura líquida.

Num estudo também levado a cabo por Grenni *et al.* (2009), foi utilizada a bactéria *Rhodococcus wratislaviensis* (isolada a partir de uma amostra de água subterrânea de um aquífero onde já foi detetado o pesticida terbutilazina e o seu metabolito DET), para realizar a degradação de terbutilazina em culturas líquidas, onde o tempo de meia-vida obtido para este pesticida foi de 62 dias. Comparando com os nossos resultados, verificamos que todas as biomisturas, com exceção das biomisturas 4, 5 e 10, conseguiram remover metade da concentração do pesticida num

menor intervalo temporal (aproximadamente 15 dias para a Bio 6; menos de 30 dias para as biomisturas 1,2 e 3; e aproximadamente 40 dias para a Bio 9).

Três anos mais tarde, Grenni *et al.*, (2012) avaliaram a capacidade de degradação de terbutilazina por uma cultura de enriquecimento obtida a partir de uma amostra de solo (com historial de contaminação com o mesmo herbicida). Realizando ensaios de degradação também em solo, foi obtido um tempo de meia-vida de 95-105 dias, valores muito superiores aos por nós obtidos, mesmo para as biomisturas utilizando apenas um isolado fúngico ou bacteriano (exceto para a Bio 10, onde o pesticida terbutilazina apresentou um tempo de meia-vida de 120 dias).

Grenni *et al.*, (2012) e Getenga *et al.* (2009) referem que a biodegradação dos herbicidas da classe das triazinas pode ser mais facilmente levada a cabo por consórcios ou por apenas um isolado de microrganismos, desde que o isolamento tenha sido feito a partir de locais previamente contaminados com esta família de herbicidas.

Pinto *et al.* (2012) também verificaram a degradação do pesticida terbutilazina, em culturas líquidas, por espécies de fungos isolados a partir de uma biomistura de solo e cortiça (previamente contaminada com o pesticida em questão). A maior percentagem de remoção foi obtida pelo fungo *Aspergillus oryzae* com uma remoção de aproximadamente 80% em dez dias de ensaio, com uma concentração inicial de pesticida de 25 mg L⁻¹. Num estudo levado a cabo por Bending *et al.* (2012) de 42 dias, também foi verificada a remoção de terbutilazina a partir de culturas líquidas (com uma concentração inicial de pesticida de 10 mg L⁻¹) por nove estirpes fúngicas. O fungo *Stereum hirsutum* foi o que mais removeu o terbutilazina das culturas líquidas com uma percentagem de remoção de aproximadamente 80%. Comparando os resultados destes dois estudos com os resultados por nós obtidos, verificamos que as percentagens de remoção se encontram próximas. No entanto, as concentrações de pesticida utilizadas nestes dois estudos são muito mais baixas do que as utilizadas no nosso, e os ensaios de degradação foram realizados em culturas líquidas, facilitando assim o processo da degradação, daí a relevância significativa dos nossos resultados.

Kodama *et al.* (2001), realizaram um estudo semelhante mas com o pesticida simazina, da mesma família do terbutilazina. O fungo *Penicillium steckii* foi obtido através do isolamento a partir de uma amostra de solo previamente contaminada com simazina. Os ensaios de degradação em solos foram inicialmente contaminados com 100 mg Kg⁻¹, e a taxa de remoção obtida foi de 45% em 35 dias de ensaio. Por outro lado, Ribas *et al.* (2009) utilizou o fungo *Lentinula edodes* para degradar o herbicida atrazina em culturas líquidas com 10 µg mL⁻¹ de pesticida. Em 30 dias de ensaio o fungo conseguiu remover 35% de atrazina, que comparando com os nossos

resultados, e se tratando de terbutilazina, aos 15 dias de ensaio a Bio 6 já se encontrava com menos 55% de pesticida, aproximadamente. Demonstrando a boa capacidade de remoção de terbutilazina nas primeiras duas semanas do ensaio deste nosso consórcio microbiano.

No estudo realizado previamente a este (Rodrigues, 2012; Rodrigues, 2014), foram utilizados quatro espécies fúngicas para degradar os quatro pesticidas em estudo, terbutilazina, difenoconazol, diflufenicão e pendimetalina. Os quatro fungos foram obtidos por procedimentos de enriquecimento seletivo, a partir de amostras de solo e/ou biomistura contaminadas com os pesticidas em estudo, e os ensaios de degradação foram realizados em solo contendo o substrato orgânico cortiça e apenas um isolado fúngico separadamente. Algumas semelhanças foram encontradas entre este estudo e o atual. Ao fim de 120 dias e partindo de uma contaminação inicial de 20 mg de terbutilazina Kg⁻¹ de solo, utilizando o fungo *F. oxysporum* e o fungo *L. edodes* na presença da cortiça, foi obtida uma percentagem de remoção muito próxima dos 91%, enquanto utilizando o fungo *Paecilomyces variotti* e o fungo *T. viride*, foi obtida uma percentagem cerca de 89% de remoção de terbutilazina. Estas percentagens não variam muito da obtida neste estudo utilizando a bactéria Bac 2 na presença da cortiça, em que foi obtida uma taxa de remoção de 89,4% também em 120 dias de ensaio.

Devemos realçar que uma das melhores percentagens de remoção de 87,4% ocorreu para a Bio 1, que apenas continha o isolado fúngico *L. saksenae*, demonstrando as capacidades deste fungo na degradação deste pesticida.

Apesar do tempo de ensaio ter sido cerca de dois meses mais curto, a Bio 9, contendo a Bac 2 na presença de cortiça, foi a biomistura que revelou a maior taxa de remoção deste pesticida (89,4%). Este resultado pode indicar que um aumento do período do ensaio para as bactérias pode ainda melhorar significativamente os resultados obtidos. Em suma, foram obtidas elevadas percentagens de remoção para a maioria das biomisturas estudadas, mesmo se tratando de um herbicida altamente persistente no solo.

6.3.2. Difenoconazol

No gráfico B (Figura 27), correspondente aos 15 dias de contaminação, os resultados obtidos demonstram que a Bio 6 é a biomistura com a menor concentração de fungicida ($15,53 \pm 0,008 \text{ mg Kg}^{-1}$), já a biomistura com a maior concentração é a Bio 2 ($19,27 \pm 0,010 \text{ mg Kg}^{-1}$), cujo valor não variou muito da concentração inicial.

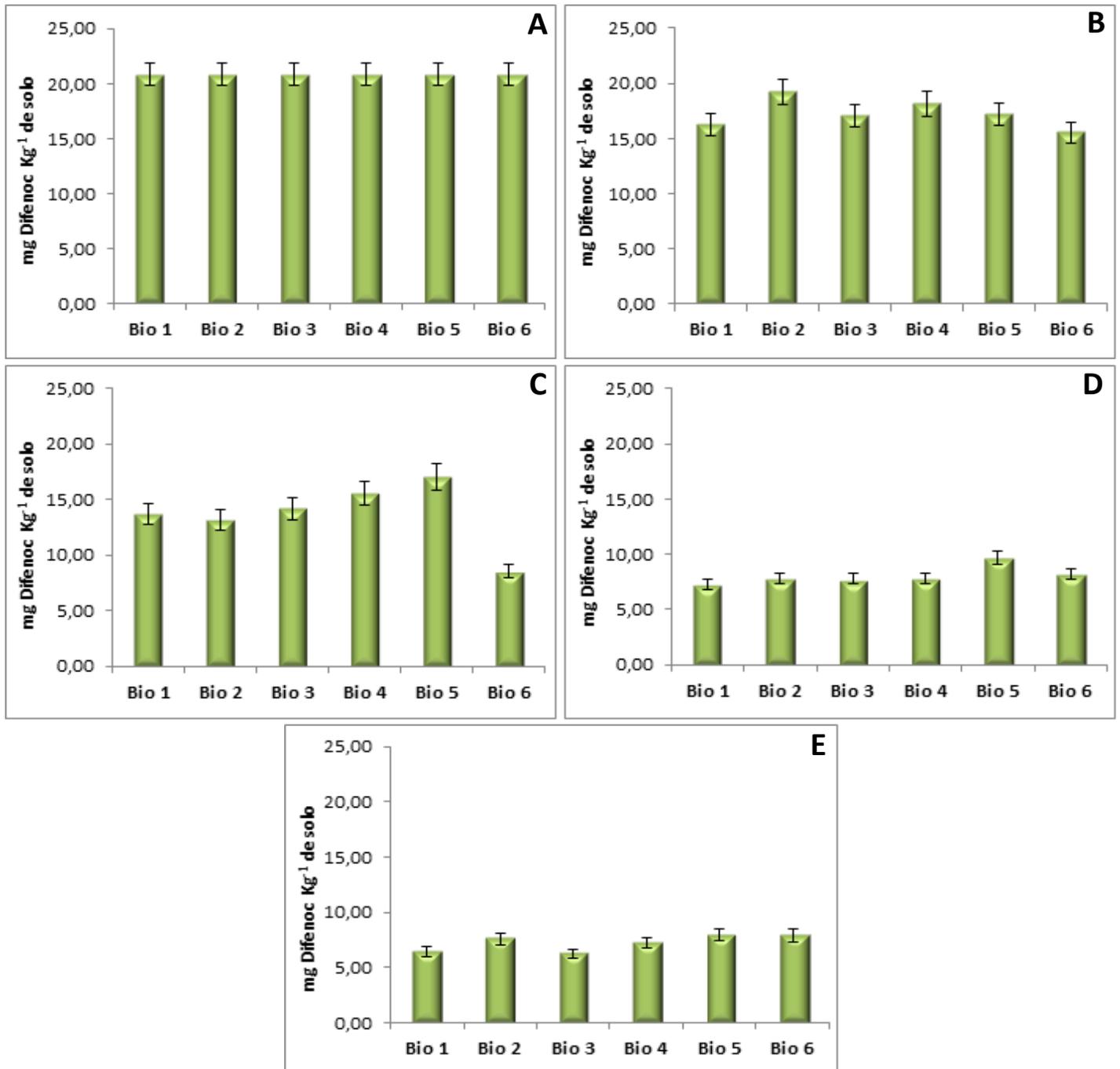


Figura 27- Concentração do pesticida difenoconazol (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de: A) 0 dias; B) 15 dias; C) 30 dias; D) 100 dias e E) 140 dias após contaminação. Bio 1= *L. saksenae* + Cortiça; Bio 2= *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 3= *L. saksenae* + *Fusarium* sp. +

Cortiça; Bio 4= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 5= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Vermiculite; Bio 6= *L. saksenae* + *T. viride* + *F. oxysporum* + *Aspergillus* sp. + Cortiça. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão.

As concentrações das biomisturas 1,3 e 5 encontram-se muito próximas dos 17 mg Kg⁻¹ de solo. Aos 30 dias após a contaminação, mais uma vez, é a Bio 6 que contem a menor concentração de pesticida, rondando os 8 mg Kg⁻¹. Comparando este último valor com a concentração inicial, a Bio 6 sofreu um decréscimo acentuado, tendo também em consideração o intervalo de tempo decorrido, tendo a capacidade já ter removido mais de metade da concentração.

No gráfico D, aos 100 dias após a contaminação dos ensaios, as concentrações do herbicida difenoconazol já foram bastante reduzidas, comparando com a concentração inicial, todas as biomisturas já conseguiram remover mais de metade da concentração inicial do fungicida. Na figura D, podemos concluir que os microrganismos precisam de um tempo de adaptação e desenvolvimento para que a cinética de biodegradação seja impulsionada, i. e. a grande remoção é realizada ao fim dos 100 dias e não para períodos inferiores. A diferença entre os 100 e os 140 dias já não é tão acentuada o que denota já uma certa estabilização no crescimento e desenvolvimento da comunidade microbiana instalada. À semelhança do observado no gráfico C, é a Bio 5 que possui a maior concentração deste pesticida (aproximadamente 10 mg Kg⁻¹).

Na figura 28 são apresentados os valores de concentração obtidos para o pesticida pendimetalina nas diferentes biomisturas, no final dos ensaios de biodegradação com fungos e a respetiva análise estatística.

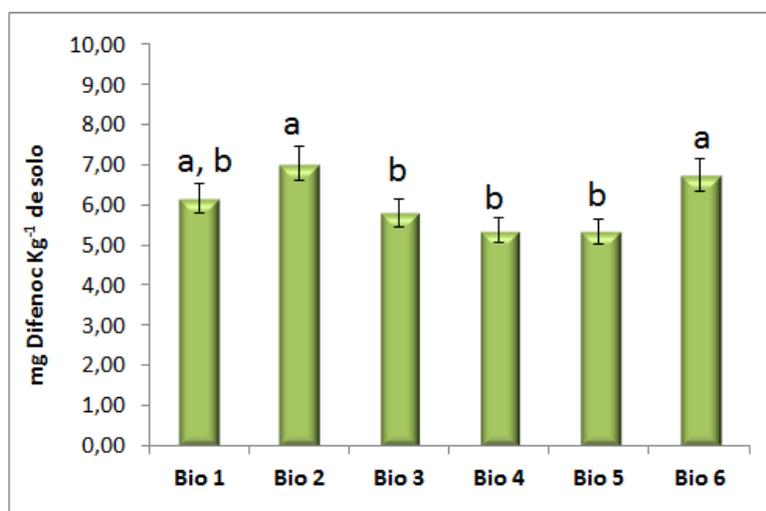


Figura 28- Concentração do pesticida difenoconazol (mg Kg⁻¹ de solo) nas amostras recolhidas ao fim de 180 dias após contaminação. Bio 1= *L. saksenae* + Cortiça; Bio 2= *Fusarium* sp. +

Cortiça; Bio 3= *L. saksenae* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 4= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 5= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Vermiculite; Bio 6= *L. saksenae* + *T. viride* + *F. oxysporum* + *Aspergillus* sp. + Cortiça. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Letras distintas significa que existem diferenças significativas para $p < 0,05$.

Observando os resultados obtidos na figura 28, verifica-se que é a Bio 5 a que apresentou a menor concentração residual de difenoconazol com um valor de $5 \pm \text{mg Kg}^{-1}$. Este resultado é de extrema importância dado que nesta biomistura o substrato usado foi a vermiculite, o que significa que se trata de uma biomistura que não produz qualquer tipo de resíduo final contaminado. Este resultado pode ser talvez justificado por um melhor desenvolvimento do consórcio fúngico utilizado nesta biomistura, na presença da vermiculite. Este substrato constituído por magnésio, alumínio e ferro, talvez sirva de fonte energética para este consórcio microbiano, auxiliando no seu crescimento e desenvolvimento. Para além de apresentar a vantagem de não ser produzido um resíduo final, a vermiculite de origem mineral, apresenta uma elevada porosidade promovendo o arejamento do solo, a sua porosidade e retenção da humidade.

Por outro lado, a Bio 2 foi a que menos degradou este pesticida, apesar da concentração residual obtida ser já muito baixa comparada com a concentração inicial. Comparando apenas as biomisturas contendo o substrato orgânico cortiça (Bio 1, 2, 3, 4 e 6), verificamos que existem diferenças significativas ($p < 0,05$). Nomeadamente, a Bio 2, apresentou valores significativamente superiores ($p < 0,05$) à Bio 3 e 4, demonstrando ser a biomistura que menos removeu este pesticida do solo. Já a Bio 4, apresentou valores significativamente inferiores ($p < 0,05$) à Bio 6, revelando-se uma biomistura mais eficaz que esta última na remoção do pesticida.

Fazendo a comparação entre as biomisturas contendo os substratos orgânicos cortiça e vermiculite, Bio 4 e 5, respetivamente, podemos constatar que não existem diferenças significativas ($p > 0,05$) entre elas, em que ambas as biomisturas apresentaram uma concentração final de difenoconazol de $5,37 \pm 0,003 \text{ mg Kg}^{-1}$ e $5,34 \pm 0,003 \text{ mg Kg}^{-1}$, respetivamente. No entanto, apesar dos dois valores de concentração serem bastante próximos, é a Bio 5 a que tem a menor concentração residual de difenoconazol no final do ensaio.

Relativamente aos ensaios contendo bactérias, e observando o gráfico B da figura 29, verificamos uma grande diferença entre as biomisturas contendo o substrato cortiça (Bio 7 e 9) e o substrato vermiculite (Bio 8 e 10). A concentração obtida nas primeiras ronda os 8 mg de difenoconazol Kg^{-1} de solo (menos de metade da

concentração inicial) e a concentração obtida nas últimas rouda os 13 mg Kg⁻¹. É importante também referir, a acentuada diminuição das concentrações nas biomisturas 7 e 9, apenas 40 dias após a contaminação.

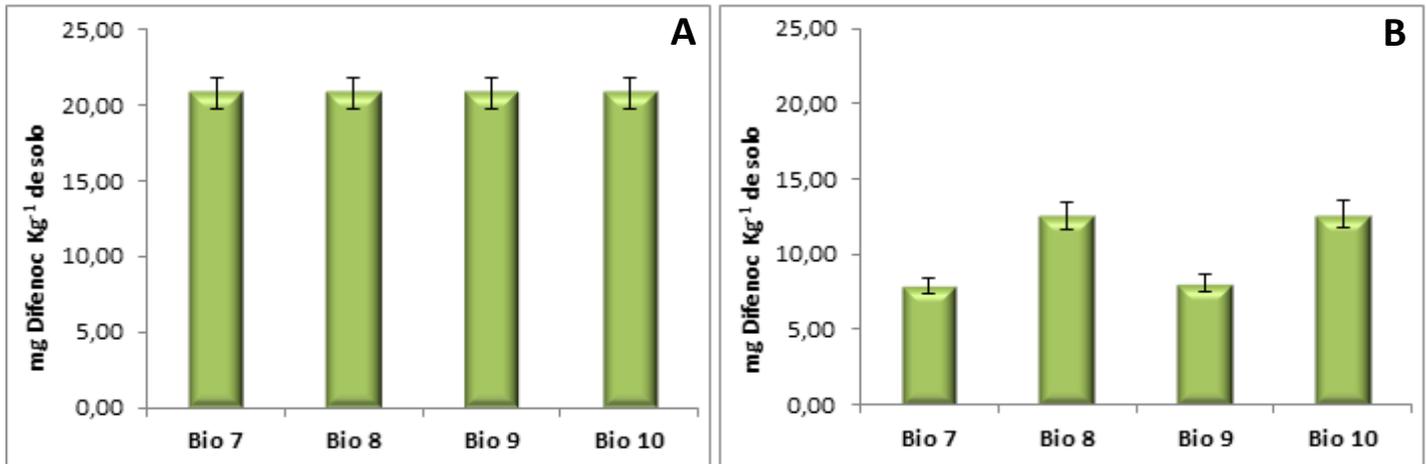


Figura 29- Concentração do pesticida difenoconazol (mg Kg⁻¹ de solo) nas amostras recolhidas ao fim de: A) 0 dias e B) 40 dias após contaminação. Bio 7= Bac 1 + Cortiça; Bio 8= Bac 1 + Vermiculite; Bio 9= Bac 2 + Cortiça; Bio 10= Bac 2 + Vermiculite. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados ± desvio padrão.

Na figura 30, encontram-se os valores de concentração do fungicida difenoconazol para diferentes biomisturas no final dos ensaios de biodegradação com bactérias. De forma a verificar possíveis diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações de pesticida obtidas para as diferentes biomisturas no final do ensaio, sujeitaram-se estes resultados a uma análise estatística.

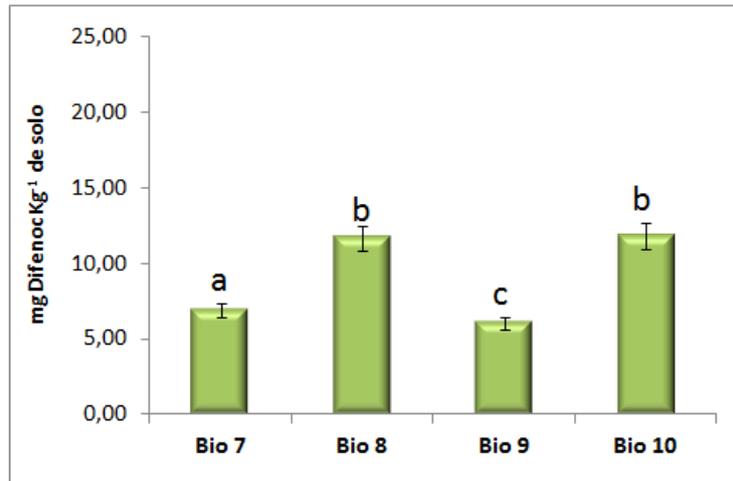


Figura 30- Concentração do pesticida difenoconazol (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de 120 dias após contaminação. Bio 7= Bac 1 + Cortiça; Bio 8= Bac 1 + Vermiculite; Bio 9= Bac 2 + Cortiça; Bio 10= Bac 2 + Vermiculite. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Letras distintas significa que existem diferenças significativas para $p < 0,05$.

No final do ensaio, aos 120 dias de contaminação (Figura 30), as concentrações de difenoconazol nas Bio 7 e 9 diminuíram para $6,90 \pm 0,003 \text{ mg Kg}^{-1}$ e $6,03 \pm 0,003 \text{ mg Kg}^{-1}$, respetivamente, enquanto as biomisturas 8 e 10 não sofreram uma grande alteração nas suas concentrações ($\sim 12 \text{ mg Kg}^{-1}$). No entanto, foi a Bio 9 a que apresentou a menor concentração deste pesticida no final do ensaio, tendo sido a melhor biomistura a remover este pesticida do solo.

Analisando estatisticamente os resultados, e observando a figura 30, podemos constatar que existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a Bio 7 e 9 contendo cortiça, sendo esta última a que apresentou valores de concentração significativamente inferiores ($p < 0,05$).

No que diz respeito às biomisturas com a bactéria Bac 1 (Bio 7 e 8), obtiveram-se concentrações de difenoconazol com diferenças significativas ($p < 0,05$), na qual a primeira biomistura apresentou valores de concentração significativamente inferiores ($p < 0,05$) à segunda. No que diz respeito às biomisturas contendo a bactéria Bac 2 os resultados são semelhantes, em que a biomistura contendo cortiça (Bio 9) apresentou valores de concentração significativamente inferiores ($p < 0,05$) à concentração de difenoconazol na biomistura contendo vermiculite (Bio 10). Assim sendo, podemos concluir que independentemente das bactérias, as biomisturas mais eficazes a remover este pesticida foram as biomisturas com o substrato orgânico cortiça.

Na tabela 7, encontram-se as percentagens de remoção de difenoconazol no final do ensaio. Fazendo a análise e comparação entre todas as biomisturas, verificamos que a biomistura mais bem-sucedida na descontaminação deste fungicida foi a Bio 5, com uma percentagem de remoção de 74,4%, valor também muito próximo do obtido para a Bio 4, de 74,2%. Para a elevada taxa de biodegradação alcançada na Bio 5, pode ter sido fundamental a presença de vermiculite, a qual pode ter sido usada como substrato energético para os microrganismos, dado que nesta biomistura a toxicidade do meio não é atenuada como na presença de cortiça.

Pelo contrário, a biomistura que menos removeu este pesticida foi a Bio 10, com uma percentagem de remoção de 43,2%, o que pode dever-se apenas ao tempo do ensaio.

Tabela 7- Percentagens de remoção do pesticida difenoconazol, 180 dias após a contaminação, nas diferentes biomisturas.

	Bio 1	Bio 2	Bio 3	Bio 4	Bio 5	Bio 6	Bio 7	Bio 8	Bio 9	Bio 10
% Remoção de Difenoconazol	70,3	66,3	72,1	74,2	74,4	67,6	66,9	43,8	71,1	43,2

Apesar dos ensaios de degradação contendo bactérias terem menos tempo de contaminação do que os ensaios contendo fungos (120 dias e 180 dias, respetivamente), os valores de remoção do pesticida difenoconazol para as Bio 7 e 9 não variaram muito em relação às percentagens obtidas para as biomisturas com isolados fúngicos, rondando aproximadamente os 67% e 71%.

Pinto *et al.* (2012), para além de terem realizado o estudo de biodegradação com o pesticida terbutilazina, realizaram também um estudo nas mesmas condições para o fungicida difenoconazol. Os ensaios realizados em culturas líquidas e com uma duração de 10 dias apresentaram uma percentagem de remoção do pesticida (com uma concentração inicial de 19 mg L⁻¹) de aproximadamente 93%, 88%, 87%, 85%, 83%, e com os isolados fúngicos *Penicillium brevicompactum*, *A. oryzae*, *L. saksenae* e *L. edodes*, respetivamente. Todos os fungos foram isolados a partir de uma biomistura de solo e substrato orgânico cortiça, previamente contaminada com o pesticida em questão. Comparando com os nossos resultados, os resultados obtidos por Pinto *et al.* (2012) são superiores aos por nós obtidos, talvez devido ao facto da concentração adicionada aos ensaios ser muito mais baixa do que a adicionada nos

nossos ensaios de biodegradação e por se tratar de culturas líquidas, cuja degradação se torna mais facilitada do que na matriz do solo.

Woo *et al.* (2010), num estudo de degradação em culturas líquidas utilizando dois fungicidas da mesma família do difenoconazol, e com uma duração de 21 dias, conseguiram obter percentagens de remoção de 54% e 75% para o fungicida tebuconazol (concentração inicial de 0,77 Kg m⁻³) e propiconazol (concentração inicial de 1,39 Kg m⁻³), respetivamente.

Nos ensaios de degradação realizados por Rodrigues (2012), os quatro isolados fúngicos *F. oxysporum*, *L. edodes*, *P. variotti* e *T. viride*, obtidos a partir de amostras de solo e/ou biomistura previamente expostas ao pesticida difenoconazol, removeram 82%, 76%, 75%, e 74% da concentração inicial do pesticida (20 mg Kg⁻¹ de solo), respetivamente. Em 120 dias de contaminação e para os ensaios utilizando o isolado fúngico *T. viride*, foi obtida uma percentagem de 74% de remoção de difenoconazol, percentagem igualmente obtida no nosso estudo utilizando as biomisturas 4 e 5 (Bio 4= *L. saksenae*, *T. viride*, *Fusarium* sp. e cortiça e Bio 5= *L. saksenae*, *T. viride*, *Fusarium* sp. e vermiculite), cuja percentagem foi a mais alta obtida.

Em resumo, os resultados obtidos no nosso estudo são promissores, devido ao facto de se tratar de um fungicida relativamente persistente no solo e com uma degradação lenta (Thom *et al.*, 1997; Dong *et al.*, 2013; FAO, 2014).

6.3.3. Diflufenicão

Da figura 31 podemos concluir que em todas as biomisturas a concentração de diflufenicão foi significativamente reduzida ao fim de 100 dias, pelo que aproximadamente 75% da concentração inicial deste pesticida foi removida do solo pelas diferentes biomisturas. Resultados semelhantes foram registados ao fim de 140 dias.

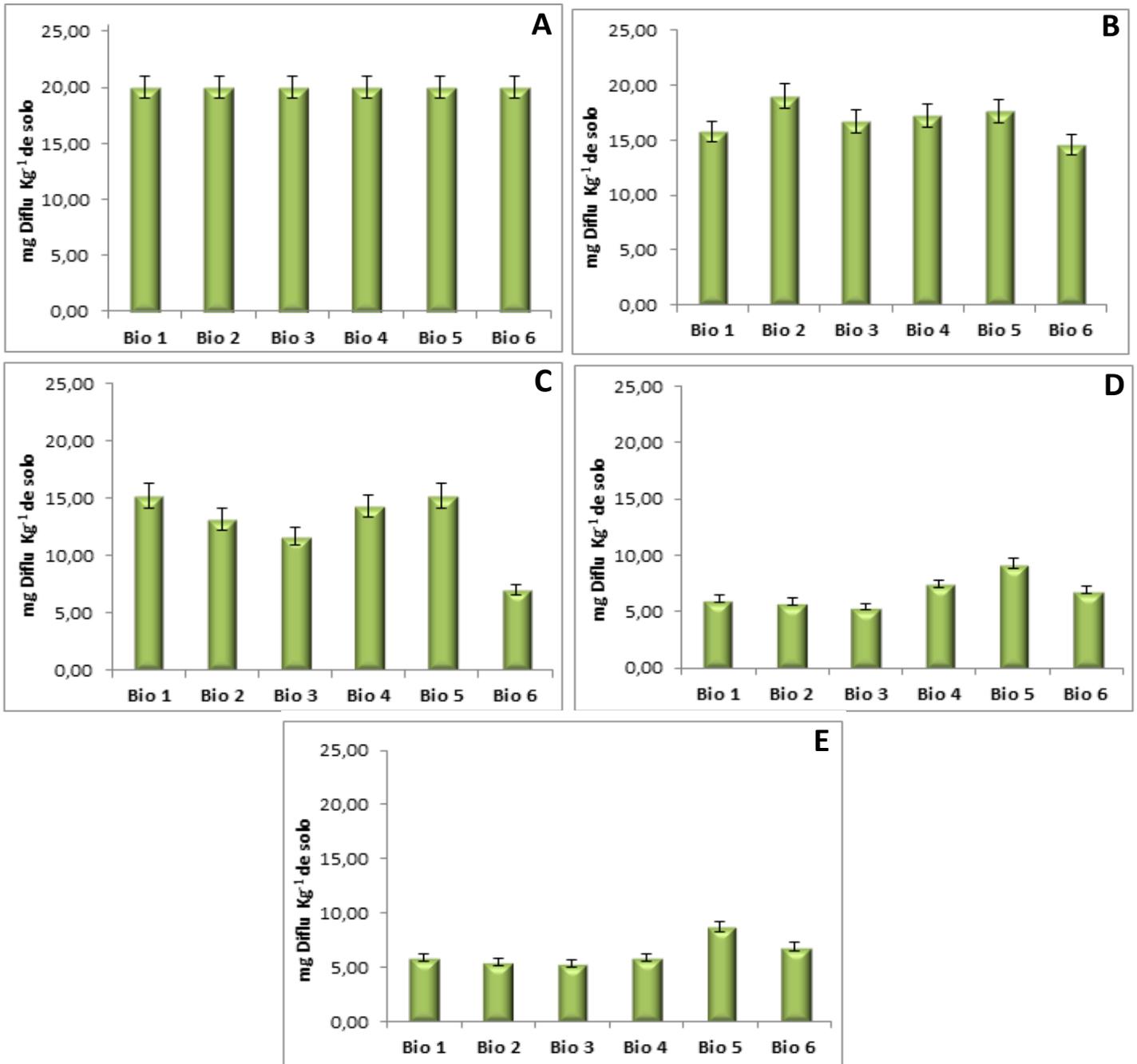


Figura 31- Concentração do pesticida diflufenicão (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de: A) 0 dias; B) 15 dias; C) 30 dias; D) 100 dias e E) 140 dias após contaminação. Bio 1= *L. saksenae* + Cortiça; Bio 2= *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 3= *L. saksenae* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 4= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 5= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Vermiculite; Bio 6= *L. saksenae* + *T. viride* + *F. oxysporum* + *Aspergillus* sp. + Cortiça. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão.

Na figura 32 são apresentados os valores de concentração obtidos para o pesticida pendimetalina nas diferentes biomisturas, no final dos ensaios de biodegradação com fungos e a respetiva análise estatística.

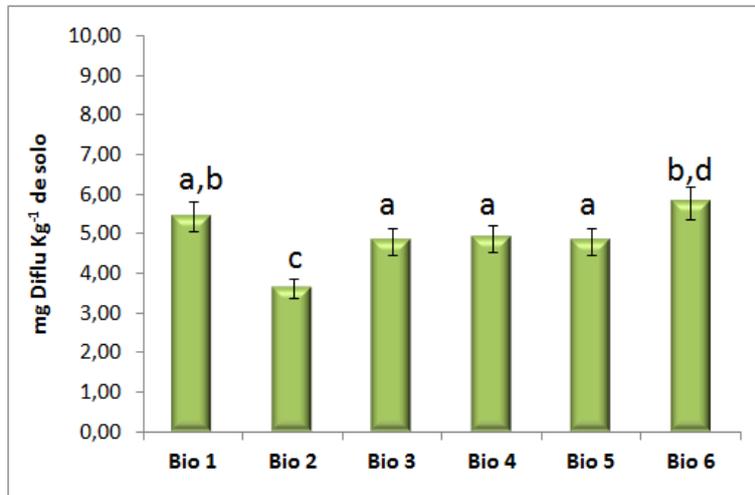


Figura 32- Concentração do pesticida diflufenicão (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de 180 dias após contaminação. Bio 1= *L. saksenae* + Cortiça; Bio 2= *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 3= *L. saksenae* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 4= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 5= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Vermiculite; Bio 6= *L. saksenae* + *T. viride* + *F. oxysporum* + *Aspergillus* sp. + Cortiça. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Letras distintas significa que existem diferenças significativas para $p < 0,05$.

Aos 180 dias (Figura 32), verificamos que é a Bio 2 a mais eficaz a remover este pesticida do solo, com uma concentração residual de $3,62 \pm 0,002 \text{ mg Kg}^{-1}$, indicando que o isolado fúngico *Fusarium* sp. conseguiu uma redução superior a 80% de diflufenicão para o período de tempo estudado. Dado que a capacidade de remoção deste herbicida foi inferior para as restantes biomisturas, podemos concluir que este fungo é mais eficiente isoladamente na biodegradação deste xenobiótico do que os vários consórcios fúngicos avaliados neste trabalho. Os fungos do género *Trichoderma*, bem como do género *Lecanicillium* têm vindo a ser utilizados como agentes de biocontrolo de espécies de fungos fitopatogénicos, como no caso do *Fusarium* spp. (Verma *et al.*, 2007a; Goettel *et al.*, 2008; Ferrigo *et al.*, 2014). A partir destes resultados, talvez se tenha observado uma ação antagonista dos fungos *T. viride* e *L. saksenae* para com o fungo *Fusarium* sp., fazendo com que este último tenha sido mais eficiente na remoção do diflufenicão isoladamente do que em consórcio.

Contrariamente a Bio 6 foi a que menos degradou este pesticida, apesar da concentração residual ter sido $5,79 \pm 0,003 \text{ mg Kg}^{-1}$, tratando-se de uma concentração muito baixa comparando com a concentração inicial. Este resultado demonstra também uma menor eficiência do consórcio utilizado nesta biomistura comparativamente ao *Fusarium* sp. isolado. Fazendo apenas a comparação entre as biomisturas contendo cortiça (Bio 1, 2, 3, 4 e 6), verificamos que existem diferenças significativas ($p < 0,05$). Em relação à Bio 1, constatamos que a concentração de pesticida no final do ensaio é significativamente superior ($p < 0,05$) à concentração remanescente do mesmo pesticida na Bio 2, o que poderá indicar que o *L. saksenae* é menos eficiente que o *Fusarium* sp. na biodegradação desta substância ativa. Da análise global dos resultados podemos concluir que a presença do fungo *Fusarium* sp. isolado ou em consórcio é um fator determinante para a obtenção de maiores taxas de biodegradação do diflufenicão e conseqüentemente menores concentrações residuais no solo.

Comparando as Bio 4 e 5, contendo o mesmo consórcio microbiano diferindo apenas no substrato adicionado (cortiça e vermiculite, respetivamente), verificamos que não existem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações obtidas para estas no final do ensaio ($4,90 \pm 0,002 \text{ mg Kg}^{-1}$ e $4,81 \pm 0,002 \text{ mg Kg}^{-1}$, respetivamente).

Relativamente ao resultado da biodegradação pelas bactérias estudadas podemos concluir pela figura 33 que, 40 dias após a contaminação, ocorreram diferenças significativas entre as biomisturas contendo cortiça (Bio 7 e 9) e vermiculite (Bio 8 e 10). Estas diferenças permitem concluir que a presença de cortiça pode ser um fator determinante na redução da concentração de diflufenicão encontrada nas amostras de solo. O valor mais baixo para a concentração de diflufenicão foi obtido para a Bio 9 com o valor de $7,76 \pm 0,004 \text{ mg de Kg}^{-1}$, seguido da Bio 7 com o valor de $8,62 \pm 0,004 \text{ mg Kg}^{-1}$. Mais uma vez, é importante também referir, a acentuada diminuição das concentrações nas biomisturas 7 e 9, 40 dias após o início dos ensaios.

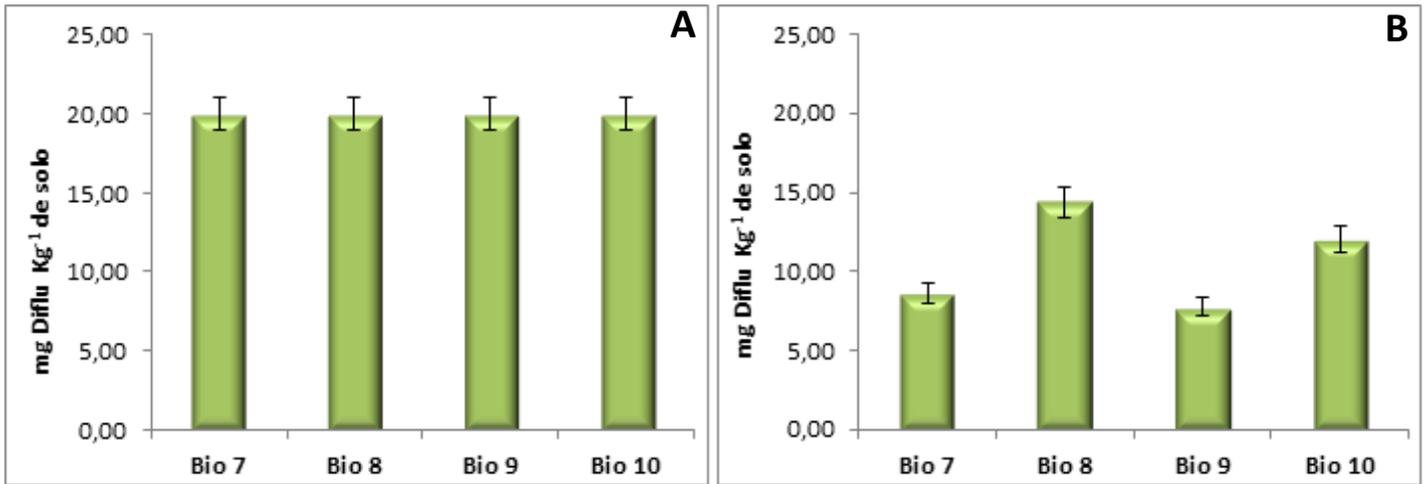


Figura 33- Concentração do pesticida diflufenicão (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas A) 0 dias e B) 40 dias após contaminação dos ensaios de biodegradação com bactérias. Bio 7= Bac 1 + Cortiça; Bio 8= Bac 1 + Vermiculite; Bio 9= Bac 2 + Cortiça; Bio 10= Bac 2 + Vermiculite. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão.

Na figura seguinte (Figura 34) encontram-se representados os resultados obtidos para o pesticida diflufenicão nas diferentes biomisturas, 120 dias após a contaminação. De forma a verificar possíveis diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as concentrações de pesticida obtidas para as diferentes biomisturas no final do ensaio, sujeitaram-se estes resultados a uma análise estatística (Figura 34).

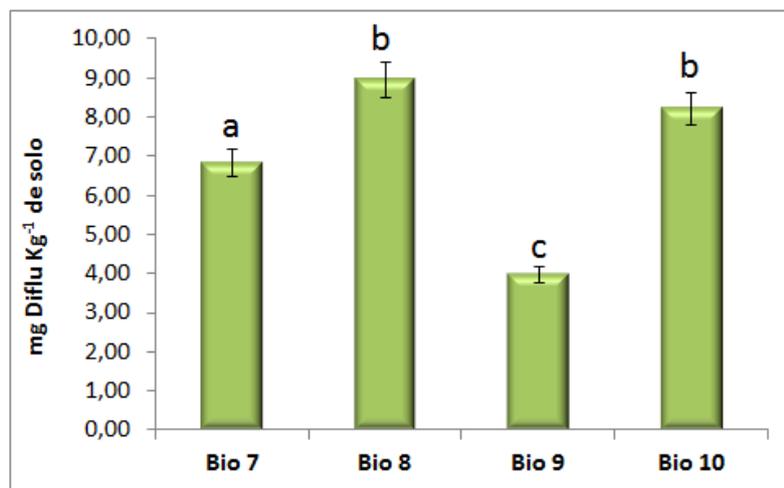


Figura 34- Concentração do pesticida diflufenicão (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de 120 dias após contaminação. Bio 7= Bac 1 + Cortiça; Bio 8= Bac 1 + Vermiculite; Bio 9= Bac 2 + Cortiça; Bio 10= Bac 2 + Vermiculite. Cada coluna representa o valor médio de 3

replicados \pm desvio padrão. Letras distintas significa que existem diferenças significativas para $p < 0,05$.

Como observado na figura 34, no final do ensaio de biodegradação contendo bactérias, a concentração do pesticida diflufenicão na Bio 9 diminuiu para $4,00 \pm 0,002$ mg Kg⁻¹ de solo, enquanto nas biomisturas 8 e 10 a concentração foi reduzida para menos de metade da concentração inicial ($8,98 \pm 0,005$ mg Kg⁻¹ e $8,21 \pm 0,004$ mg Kg⁻¹, respectivamente). No entanto, a Bio 9 foi a que apresentou a menor concentração deste pesticida no final do ensaio de biodegradação, tratando-se de uma concentração significativamente diferente das restantes biomisturas, o que indica que a Bac 2 é a mais eficiente na biodegradação do diflufenicão. Tanto na biomistura com cortiça como na biomistura com vermiculite, esta foi a bactéria cuja presença determinou menores concentrações residuais deste xenobiótico nas amostras de solo avaliadas.

Nas biomisturas contendo a bactéria Bac 1, constatamos que a biomistura contendo cortiça apresenta uma concentração de herbicida significativamente inferior ($p < 0,05$) à concentração de herbicida na biomistura contendo vermiculite, no final do ensaio. O mesmo se verifica nas biomisturas contendo Bac 2 (9 e 10), em que a biomistura contendo cortiça, no final do ensaio, apresenta uma concentração significativamente inferior ($p < 0,05$) à concentração apresentada pela biomistura contendo vermiculite.

Na tabela 8, encontram-se as percentagens de remoção de diflufenicão no final do ensaio. Comparando e analisando todas as biomisturas, verificamos que a biomistura mais bem-sucedida na descontaminação deste herbicida foi a Bio 2, com uma percentagem de remoção de 81,9%, valor aproximado do obtido para a Bio 9, de 80,0%. A primeira trata-se de uma biomistura com um isolado fúngico de *Fusarium* sp. e a segunda um isolado bacteriano Bac 2, ambas com o substrato orgânico cortiça.

Pelo contrário, a biomistura que menos removeu este pesticida foi a Bio 8, com uma percentagem de remoção de 55,1%, o que indica que o isolado bacteriano Bac 1 não possui eficiência suficiente para a biodegradação deste composto. Em resumo, maiores percentagens de remoção de diflufenicão foram observadas nas biomisturas com fungos em detrimento das biomisturas com bactérias, o que mais uma vez pode ser justificado pela menor duração dos últimos.

Tabela 8- Percentagens de remoção do pesticida diflufenicão, 180 dias após a contaminação, nas diferentes biomisturas.

	Bio 1	Bio 2	Bio 3	Bio 4	Bio 5	Bio 6	Bio 7	Bio 8	Bio 9	Bio 10
% Remoção de Diflufenicão	72,8	81,9	76,0	70,6	76,0	71,1	65,8	55,1	80,0	59,0

Pinto *et al.* (2011), realizou um estudo de degradação para o pesticida diflufenicão em culturas líquidas, utilizando o fungo *L. edodes*. Com uma duração do ensaio de 20 dias, tendo sido a percentagem de remoção por eles obtida superior a 70%.

Nos ensaios de degradação, já referidos neste trabalho, realizados por Rodrigues (2012), os quatro isolados fúngicos *F. oxysporum*, *P. variotti*, *L. edodes*, e *T. viride*, obtidos a partir de amostras de solo e/ou biomistura previamente expostas ao pesticida diflufenicão, removeram 76%, 70%, 67%, e 65% da concentração inicial do pesticida (20 mg Kg⁻¹ de solo), após 120 dias, respetivamente. O resultado obtido neste estudo com o *F. oxysporum*, foi superior ao registado no nosso ensaio (71,1%) o que pode ser o resultado deste fungo estar em consórcio com outros e não sob a forma de isolado fúngico. Contrariamente maiores remoções foram encontradas no nosso estudo para os consórcios contendo *T. viride*, comparativamente aos resultados apresentados por Rodrigues (2012).

Existem na bibliografia um número muito reduzido de estudos acerca da biodegradação deste herbicida por culturas de microrganismos (isolados ou em consórcio), pelo que o nosso estudo poderá ser importante na medida que permite perceber mais aprofundadamente quais alguns dos factores que podem afectar a taxa e cinética de biodegradação.

6.3.4. Pendimetalina

Observando a figura 35, verificamos que aos 15 dias de contaminação, não existem grandes diferenças nos valores de concentração de pendimetalina entre as várias biomisturas em estudo, relativamente ao valor inicial.

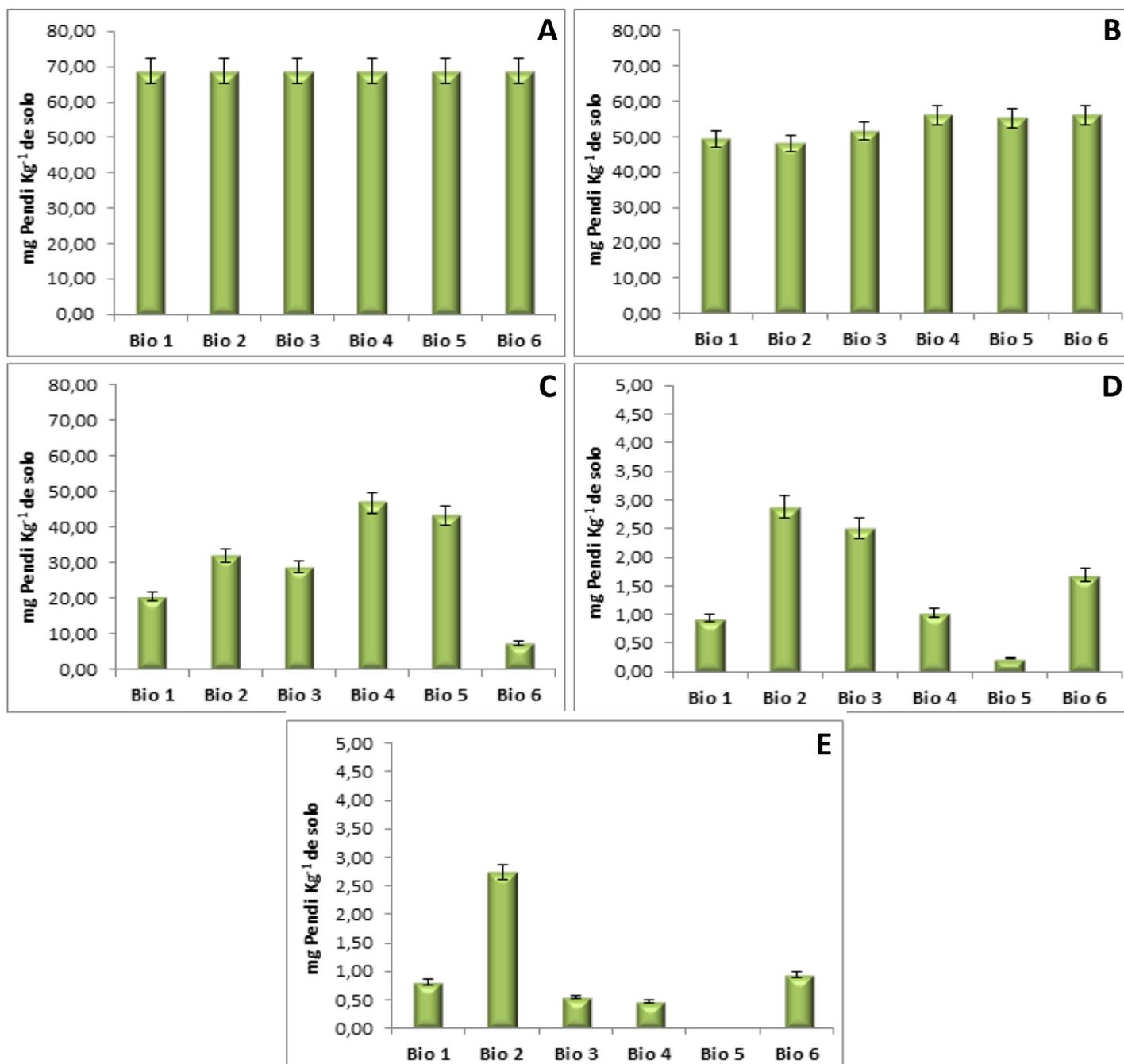


Figura 35- Concentração do pesticida pendimetalina (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de: A) 0 dias; B) 15 dias; C) 30 dias; D) 100 dias e E) 140 dias após contaminação. Bio 1= *L. saksenae* + Cortiça; Bio 2= *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 3= *L. saksenae* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 4= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 5= *L. saksenae* + *T. viride*

+ *Fusarium* sp. + Vermiculite; Bio 6= *L. saksenae* + *T. viride* + *F. oxysporum* + *Aspergillus* sp. + Cortiça. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão.

No entanto, aos 30 dias, já se tornam mais visíveis diferenças de concentração entre as seis biomisturas. Ao fim deste período a Bio 6 já apresenta uma concentração de pendimetalina muito reduzida com um valor de $7,44 \pm 0,004 \text{ mg Kg}^{-1}$, tendo sido este valor reduzido para $1,69 \pm 0,001 \text{ mg Kg}^{-1}$ ao fim de 100 dias. Ao fim deste tempo as concentrações do herbicida pendimetalina já se encontram muito abaixo do valor de contaminação e todas as biomisturas já conseguiram remover mais de metade da concentração inicial do herbicida. A maior concentração de pesticida foi obtida para a Bio 2, no entanto trata-se de uma concentração já muito reduzida ($2,88 \pm 0,002 \text{ mg Kg}^{-1}$). Após 140 dias, não foi possível detectar nas amostras recolhidas da Bio 5 nenhum resíduo de pendimetalina, o que foi confirmado nas análises realizadas posteriormente ao fim de 180 dias quer por HPLC-UV quer por LC-MS.

De realçar que a presença de vermiculite na Bio 5 parece ter sido o fator determinante para a remoção total deste herbicida do solo, dado que a única diferença para a Bio 4 é a presença deste substrato mineral que substituiu a cortiça. Também para o difenoconazol a presença de vermiculite parece ter sido um fator determinante na sua remoção (ver secção 6.1.2).

Na figura 36 são apresentados os valores de concentração obtidos para o pesticida pendimetalina nas diferentes biomisturas, no final dos ensaios de biodegradação com fungos e a respetiva análise estatística.

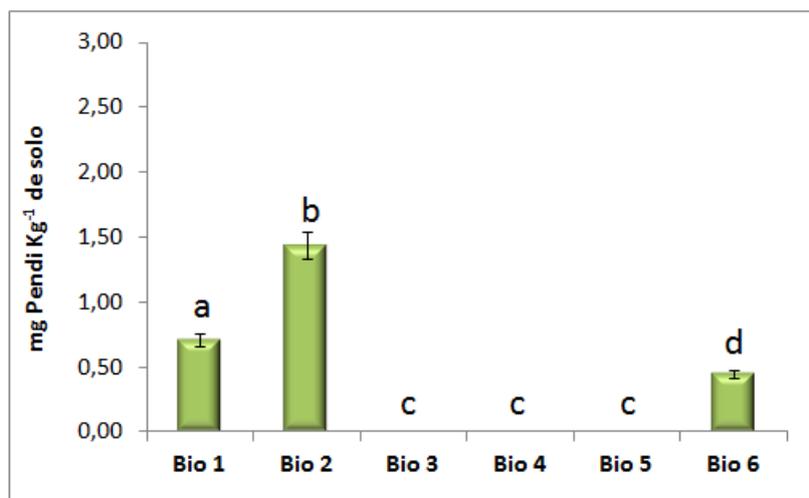


Figura 36- Concentração do pesticida pendimetalina (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de 180 dias após contaminação. Bio 1= *L. saksenae* + Cortiça; Bio 2= *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 3= *L. saksenae* + *Fusarium* sp. + Cortiça; Bio 4= *L. saksenae* + *T. viride* +

Fusarium sp. + Cortiça; Bio 5= *L. saksenae* + *T. viride* + *Fusarium* sp. + Vermiculite; Bio 6= *L. saksenae* + *T. viride* + *F. oxysporum* + *Aspergillus* sp. + Cortiça. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Letras distintas significa que existem diferenças significativas para $p < 0,05$.

Diferenças significativas ($p < 0,05$) foram encontradas para os resultados relativos à concentração de pendimetalina nas várias biomisturas no final dos ensaios. Podemos também verificar que as biomisturas 3, 4 e 5 conseguiram remover do solo o pesticida pendimetalina na sua totalidade. As restantes biomisturas (1, 2 e 6), apesar de não terem removido totalmente este pesticida, também foram muito eficientes, uma vez que as concentrações residuais foram muito baixas, $0,71 \pm 0,0004 \text{ mg Kg}^{-1}$, $1,44 \pm 0,0007 \text{ mg Kg}^{-1}$, $0,45 \pm 0,0002 \text{ mg Kg}^{-1}$, respetivamente. Comparando as Bio 4 e 5, que apresentam a mesma constituição exceto o substrato adicionado (cortiça e vermiculite, respetivamente), também verificamos que todas elas conseguiram, ao fim de 180 dias, remover a pendimetalina na totalidade. É de realçar no entanto, que a remoção total do pendimetalina foi mais rápida na Bio 5, na presença de vermiculite, o que pode indicar uma cinética de biodegradação mais rápida na presença deste substrato mineral.

Comparando os resultados obtidos para a Bio 1 e Bio 2, talvez possamos concluir que o *Fusarium* sp. se mostrou mais eficiente na biodegradação deste xenobiótico, comparativamente ao *L. saksenae*, nas condições deste estudo.

Nos resultados dos ensaios contendo bactérias (Figura 37), podemos observar que após 40 dias, a remoção do pesticida ultrapassou os 70% para todas as biomisturas. No entanto, são as biomisturas 10 e 7 as que apresentaram respectivamente maior e menor concentração de pesticida.

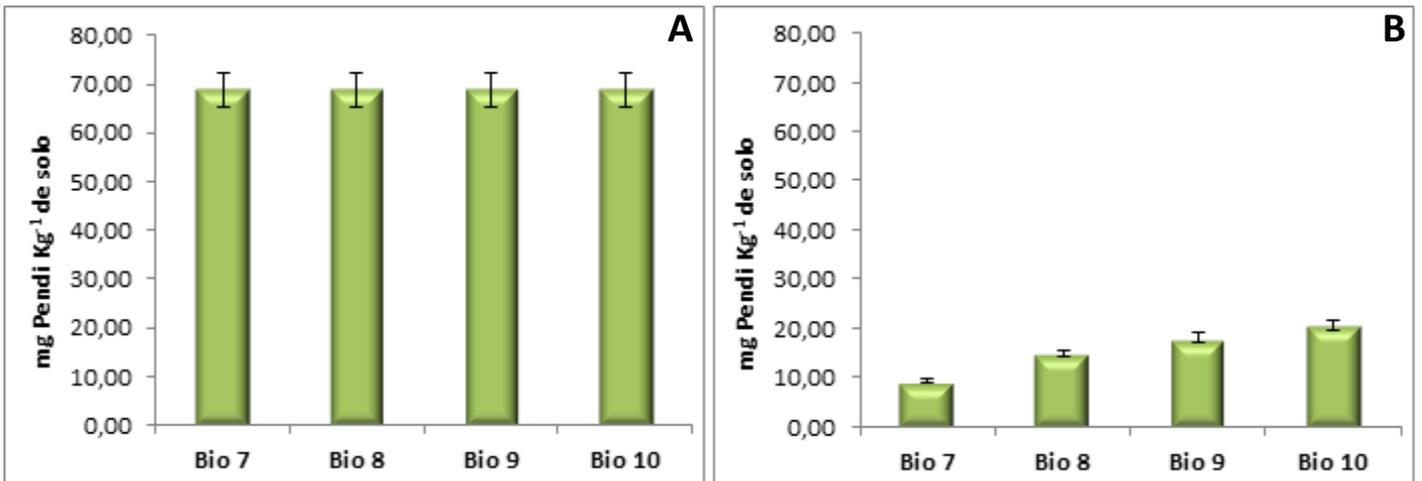


Figura 37- Concentração do pesticida pendimetalina (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas A) 0 dias e B) 40 dias após contaminação dos ensaios de biodegradação com bactérias. Bio 7= Bac 1 + Cortiça; Bio 8= Bac 1 + Vermiculite; Bio 9= Bac 2 + Cortiça; Bio 10= Bac 2 + Vermiculite. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão.

Os resultados obtidos no final do ensaio de biodegradação com bactérias (120 dias de contaminação) encontram-se na figura 38, cujos resultados, foram sujeitos à análise estatística.

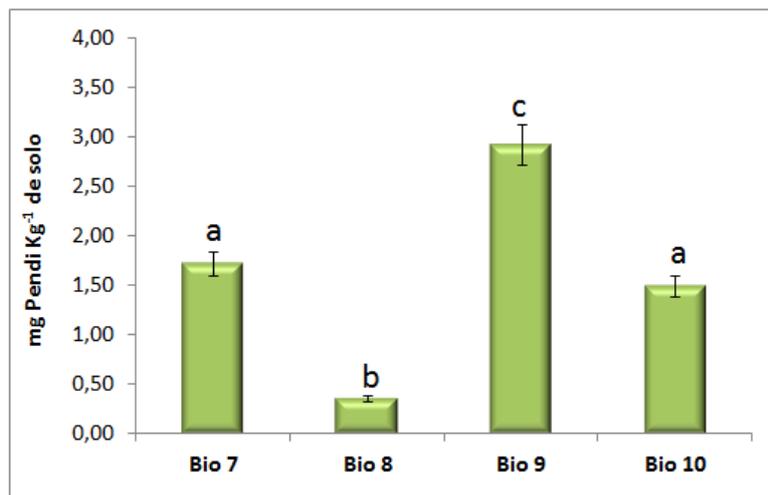


Figura 38- Concentração do pesticida pendimetalina (mg Kg^{-1} de solo) nas amostras recolhidas ao fim de 120 dias após contaminação. Bio 7= Bac 1 + Cortiça; Bio 8= Bac 1 + Vermiculite; Bio 9= Bac 2 + Cortiça; Bio 10= Bac 2 + Vermiculite. Cada coluna representa o valor médio de 3 replicados \pm desvio padrão. Letras distintas significa que existem diferenças significativas para $p < 0,05$.

Da análise da figura 38 podemos concluir que todas as modalidades estudadas apresentaram concentrações remanescentes de pesticida no solo consideravelmente mais baixas do que a concentração inicial. A Bio 8, apresentou um resultado significativamente diferente do obtido para as outras biomisturas ($p < 0,05$) e foi ainda aquela que apresentou maior eficiência na remoção do herbicida, contendo apenas $0,36 \pm 0,0002 \text{ mg Kg}^{-1}$, como concentração residual. É importante realçar que também neste caso a vermiculite na Bio 8 foi um fator determinante para a maior eficiência na remoção deste pesticida. Comparando a composição da Bio 7 com a Bio 8, a única diferença é no substrato, cortiça na Bio 7 e vermiculite na Bio 8. Podemos também concluir que a Bac 1 foi a bactéria mais eficiente i.e. a que conduziu a menores concentrações residuais no solo principalmente na presença de vermiculite.

Na tabela 9, comparando e analisando todas as percentagens de remoção de pendimetalina obtidas para as biomisturas, verificamos que as mais eficazes na remoção deste herbicida do solo foram as Bio 3, 4 e 5, com uma percentagem de remoção de 100% e a Bio 8 com 99,5%. Nas biomisturas contendo fungos foi a Bio 5 aquela onde se conseguiu uma remoção de 100 % num período de tempo mais curto. No caso das biomisturas com bactérias, 120 dias foram suficientes para que a Bac 1 removesse 99,5% do pesticida.

Em resumo o herbicida pendimetalina foi aquele onde se observaram de uma forma geral as maiores taxas de remoção nas condições do nosso estudo, todas as biomisturas apresentaram valores superiores a 95%.

Tabela 9- Percentagens de remoção do pesticida pendimetalina, 180 dias após a contaminação, nas diferentes biomisturas.

	Bio 1	Bio 2	Bio 3	Bio 4	Bio 5	Bio 6	Bio 7	Bio 8	Bio 9	Bio 10
% Remoção de Pendimetalina	99,0	97,9	100,0	100,0	100,0	99,3	97,5	99,5	95,7	97,8

Elsayed e El-Nady (2013), estudaram a capacidade de biodegradação do herbicida pendimetalina em culturas líquidas durante 28 dias, tendo obtido também percentagens de remoção de 100%, em culturas com uma concentração inicial de pesticida de $100 \mu\text{g/mL}$.

Nos ensaios de biodegradação realizados por Rodrigues (2012), os quatro isolados fúngicos utilizados *F. oxysporum*, *L. edodes*, *P. variotti* e *T. viride*, cujo

isolamento foi feito a partir de amostras de solo e/ou biomistura previamente expostas ao pesticida em questão, conseguiram remover respetivamente, 99%, 99%, 98%, e 97% da concentração inicial do pesticida (70 mg Kg^{-1} de solo), ao fim de 120 dias.

Pinto *et al.* (2012), utilizando culturas líquidas dos fungos *L. saksenae*, *F. oxysporum*, *A. oryzae*, *P. brevicompactum* e *L. edodes*, obtiveram percentagens de remoção de 99,5%, 99,4%, 99,1%, 98,8 e 96,1%, respetivamente, ao fim de 10 dias de ensaio.

Podemos verificar que em todos os estudos de biodegradação acima referidos, as percentagens de degradação para este pesticida foram sempre mais elevadas, comparativamente aos restantes pesticidas estudados, tratando-se de um herbicida considerado moderadamente persistente no solo (Rodríguez-Liévana *et al.*, 2014).

6.3.5. Considerações finais

Relativamente à modalidade controlo i. e. sem adição de microrganismos, os resultados obtidos por nós mostram taxas de biodegradação inferiores a 3%, ao fim dos 180 dias. Relativamente à adsorção ao substrato orgânico verificámos que no controlo solo + cortiça, a quantidade de pesticida adsorvido duplicou quando comparamos o valor adsorvido às 48h com o valor adsorvido na desmontagem do ensaio, ao fim dos 180 dias. De uma forma geral, este comportamento foi comum a todas as modalidades i. e. a percentagem de adsorção ao substrato aumentou, ao longo do ensaio, sendo este aumento muito inferior nas modalidades com microrganismos, comparativamente à situação de ausência. Para os compostos que apresentaram taxas de remoção próximas de 100% como o herbicida pendimetalina, a adsorção ao substrato diminuiu no final do ensaio comparativamente ao valor inicial, pelo que existe nitidamente uma redução na adsorção com o aumento da biodegradação do composto na biomistura, o que demonstra que a adsorção dos compostos à cortiça deve ser um processo reversível.

De uma forma geral, a adsorção à cortiça verificada no final do ensaio foi sempre inferior a 5% da concentração inicial para todos os compostos em estudo, sendo menor quanto maior a remoção do respetivo composto.

No final de todos os ensaios de degradação em solos, quer na presença de fungos ou bactérias, a ordem de eficiência na remoção dos pesticidas foi a seguinte: pendimetalina > terbutilazina > diflufenicão > difenoconazol.

6.4. Biodegradação dos pesticidas

Para verificar a metabolização dos xenobióticos resultante da atividade microbiana presente nas diferentes biomisturas estudadas, foram analisadas diferentes amostras recolhidas ao fim de 100 e 180 dias por LC-ESI-MS e LC-ESI-MS², após tratamento adequado (ver seção 5.6. e 5.7.).

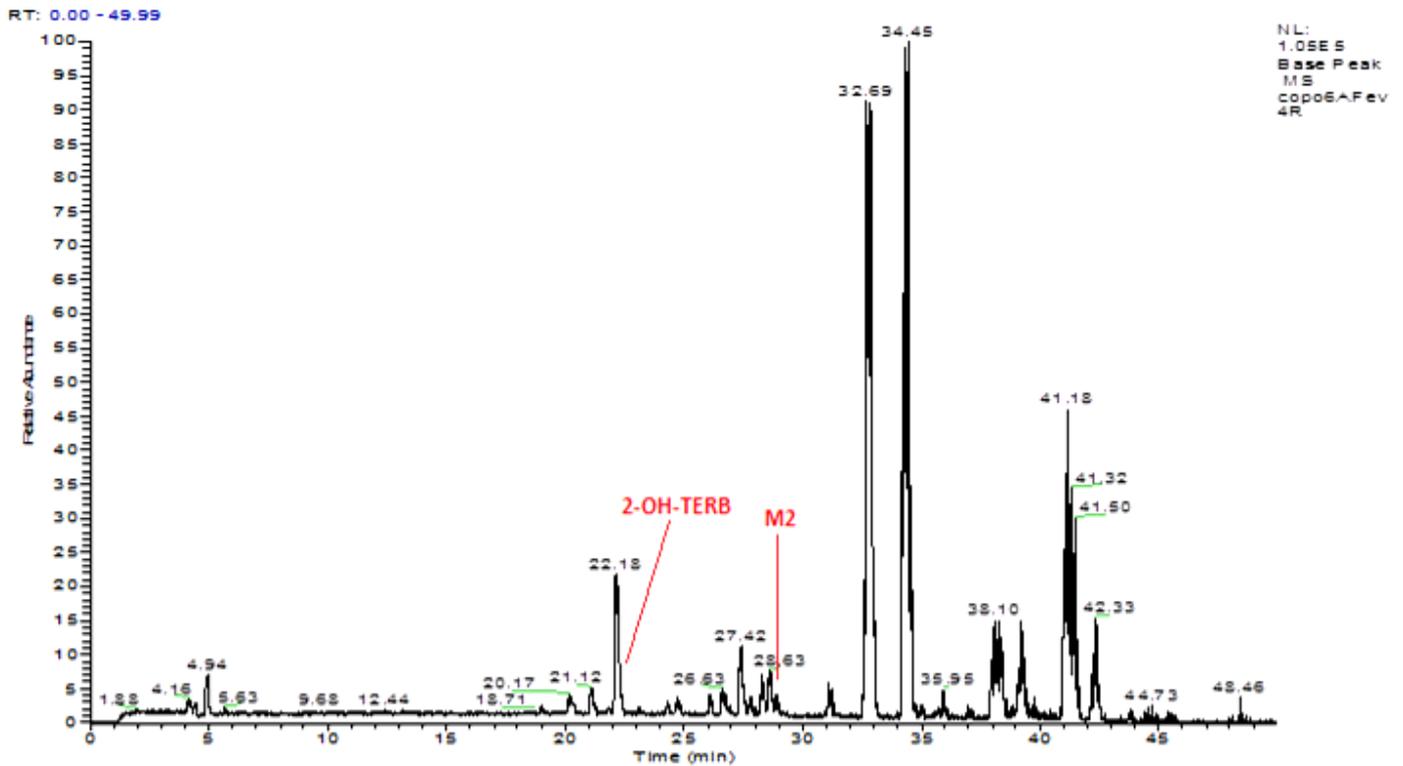


Figura 39- Cromatograma de corrente iónica total (TIC) obtido para as amostras de solo da Bio 4, recolhidas 100 dias após a contaminação. Compostos com tr 22,18 e 28,67 min identificados como sendo 2-hidroxi-terbutilazina (2-OH-TERB) e *N*-(1-etil-1-propil)-3,4dicarboxi-2'6-dinitrobenzenamina-*N*-óxido (M2), respetivamente.

O cromatograma obtido para as amostras da Bio 4 (Figura 39) após 100 dias, permitiu a identificação dos quatro pesticidas em estudo aos tempos de retenção (tr) 32,68; 41,18; 42,33 e 48,44, respetivamente para terbutilazina (Huff & Foster, 2014), difenoconazol (Khalil & Huat, 2012), diflufenicão (Thurman & Ferrer, 2008) e pendimetalina (Ferrer & Thurman, 2006). Adicionalmente, foram identificados dois outros picos com tempo de retenção (tr) 22,18 e 28,67 min que correspondem provavelmente aos metabolitos dos herbicidas terbutilazina e pendimetalina, 2-hidroxi-

terbutilazina (2-OH-TERB) e *N*-(1-etil-1-propil)-3,4dicarboxi-2'6-dinitrobenzenamina-*N*-óxido (M2), respetivamente, uma vez que os espectros de full MS (Figura 40 e Figura 42) e MS² (dados não apresentados) para estes metabolitos são coincidentes com os espectros reportados para estes compostos (Ramakrishna *et al.*,2008; Lambropoulou & Nollet, 2014).

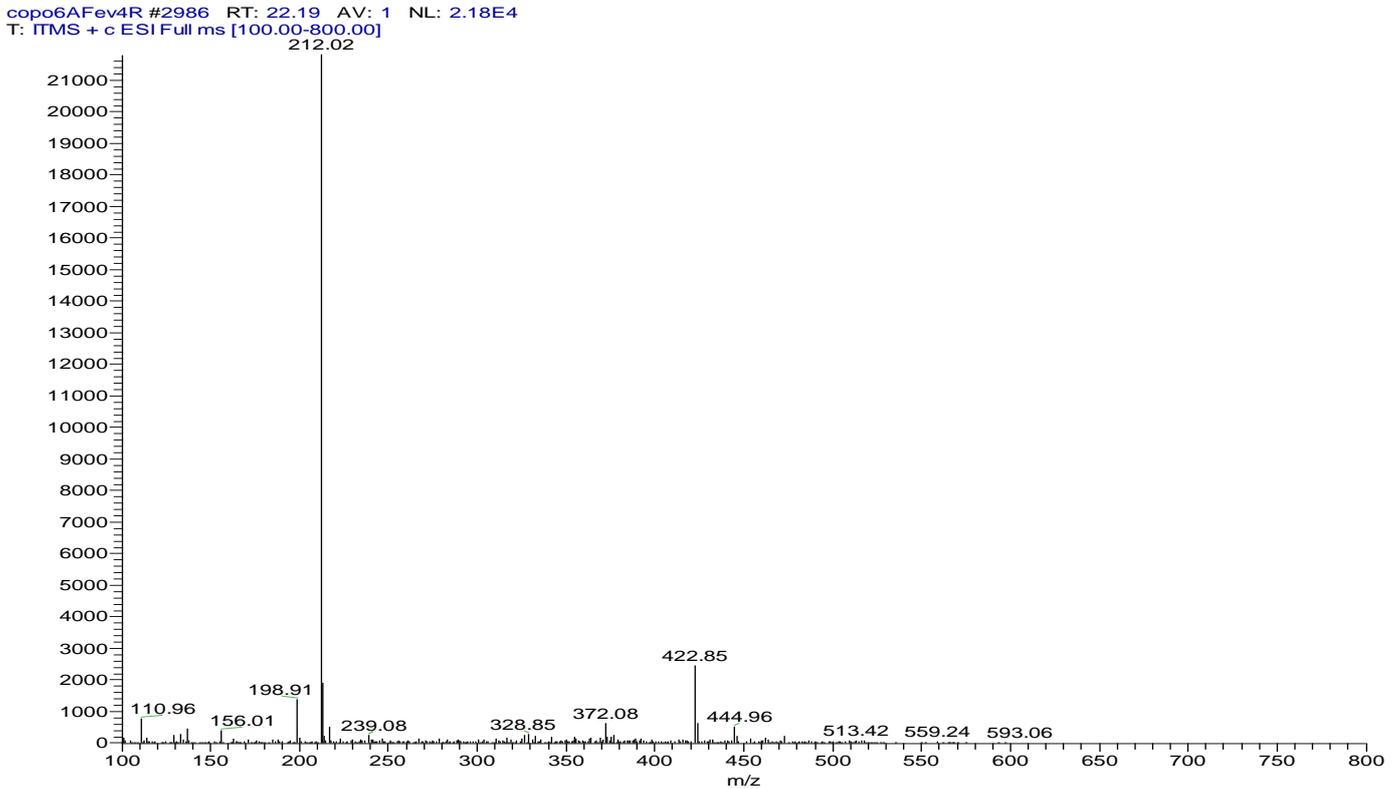


Figura 40- Espectro full MS obtido para o composto 2-hidroxi-terbutilazina (2-OH-TERB), com tr 22,18 min, na amostra da Bio 4 após 100 dias.

No espectro de full MS, apresentado na figura 40, podemos observar dois iões a m/z 212 (100%) e a m/z 156 (5%) que correspondem, respetivamente, ao ião molecular $[M+H]^+$ e ao fragmento $[C_5H_{10}N_5O]$. Este padrão de fragmentação encontra-se de acordo com a via proposta por Lambropoulou & Nollet (2014) para o produto de degradação de terbutilazina, 2-OH-TERB.

Entre os pesticidas s-triazinas, o composto terbutilazina é o mais persistente no ambiente (p. e. água superficial e solo) (Palma *et al.*, 2014). A formação de metabolitos é principalmente devido a processos bioquímicos, como a desalquilação, descloração, hidroxilação, desaminação e clivagem dos anéis dos compostos originais (Grenni, 2011; Grenni *et al.*, 2013). Os metabolitos desaminados e desalquilados formam-se maioritariamente por mecanismos de degradação biótica, enquanto os

hidroxilados podem-se formar tanto por via biótica como abiótica. Os metabolitos desalquilados, desaminados e hidroxilados têm toxicidades semelhantes ou mesmo superiores aos seus compostos de origem (Portugal, 2010).

O pesticida terbutilazina, na água e no solo, encontra-se sujeito a vários processos de degradação, sendo um dos possíveis intermediários o composto 2-hidroxi-terbutilazina, que se forma a partir do processo de hidroxilação (Bottoni *et al.*, 2013). Esta via metabólica já se encontra descrita para a bactéria *Pseudomonas* sp. (Figura 41) (Grenni, 2011), mas ainda não existem relatos na literatura acerca desta via de biodegradação em fungos.

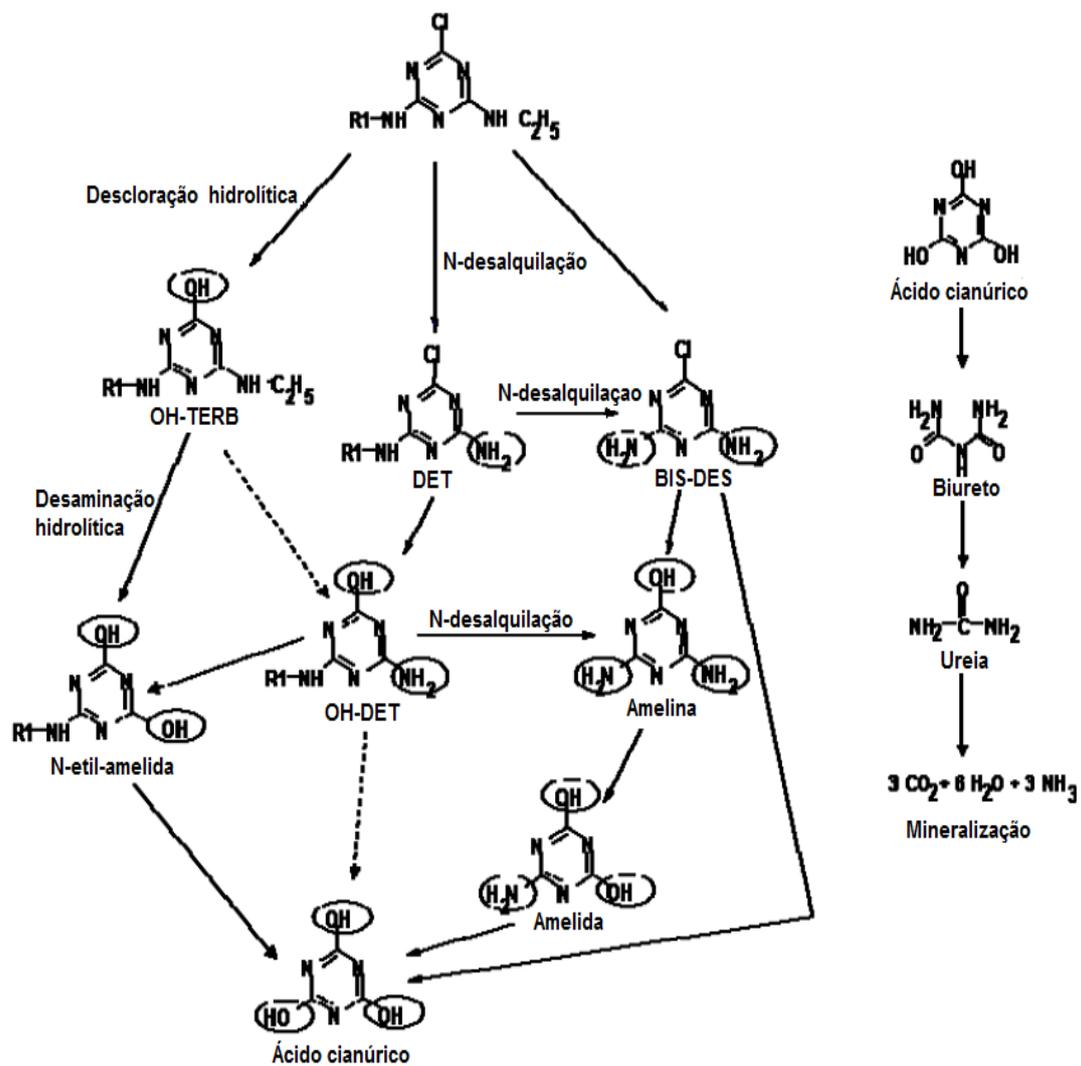


Figura 41- Vias de metabolização do herbicida terbutilazina pela bactéria *Pseudomonas* sp. R1 = C(CH₃)₃; OH- TERB: Hidroxi-terbutilazina; DET: Desetil-terbutilazina; OH-DET: Hidroxi-desetil-terbutilazina; BIS-DES: Di-butil-desetil-terbutilazina (adaptado de Grenni, 2011).

No entanto, a presença eventual do produto de hidroxilação 2-OH-TERB, nas amostras avaliadas, parece indicar que a hidroxilação é um dos possíveis processos de metabolização utilizados por este consórcio microbiano (*L. saksenae*, *T. viride* e *Fusarium* sp.).

Relativamente ao herbicida pendimetalina podemos observar no espectro de full MS apresentado na figura 42, a presença de um íon molecular $[M+H]^+$ a m/z 356 com abundância de 100% e dois íões menos intensos a m/z 311 e 173. Este padrão de fragmentação encontra-se de acordo com a via de fragmentação proposta por Ramakrishna *et al.* (2008) para o produto de degradação, *N*-(1-etil-1-propil)-3,4dicarboxi-2'6-dinitrobenzenamina-*N*-óxido (decrítico como M2 na figura 16 da seção 4.6.4., página 28).

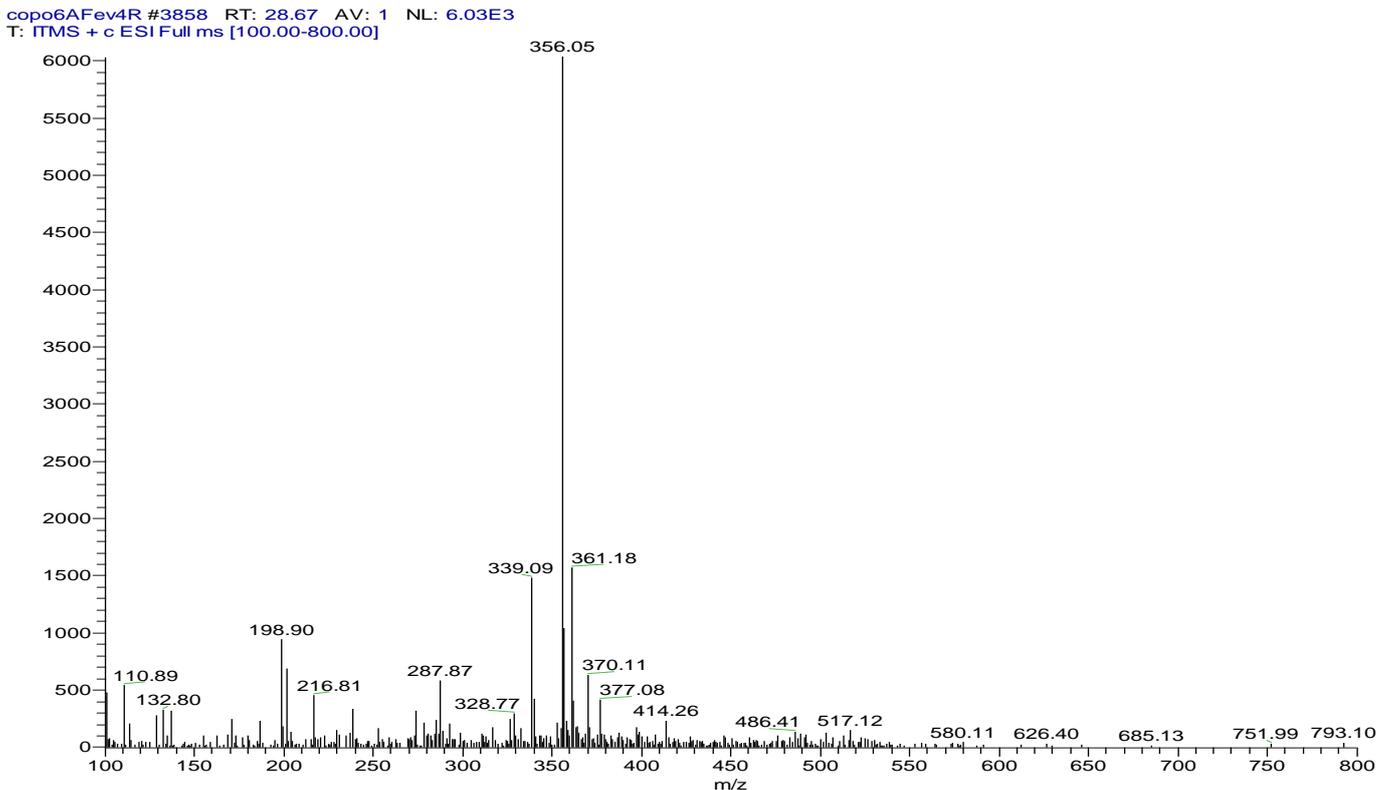


Figura 42- Espectro full MS obtido para o composto *N*-(1-etil-1-propil)-3,4dicarboxi-2'6-dinitrobenzenamina-*N*-óxido (M2), com tr 28,67 min, na amostra da Bio 4 após 100 dias.

O herbicida pendimetalina é moderadamente persistente no solo, e devido ao facto de apresentar uma baixa capacidade de sorção à matéria orgânica, torna-se facilmente móvel no ambiente, levando à contaminação de águas subterrâneas e

com tr 22,18 e 28,67 min, que correspondem provavelmente aos metabolitos dos herbicidas terbutilazina e pendimetalina, 2-OH-TERB e M2, respetivamente. Esta confirmação foi efetuada através dos espectros de full MS (dados não apresentados), que permitiu obter um padrão de fragmentação para estes dois compostos semelhante aos apresentados nas figuras 40 e 42.

Estes resultados permitem verificar a presença destes dois produtos de degradação nos extratos de desadsorção da cortiça, nas amostras recolhidas aos 100 dias, confirmando que para além do composto original também os respetivos metabolitos podem sofrer uma adsorção à superfície deste substrato orgânico.

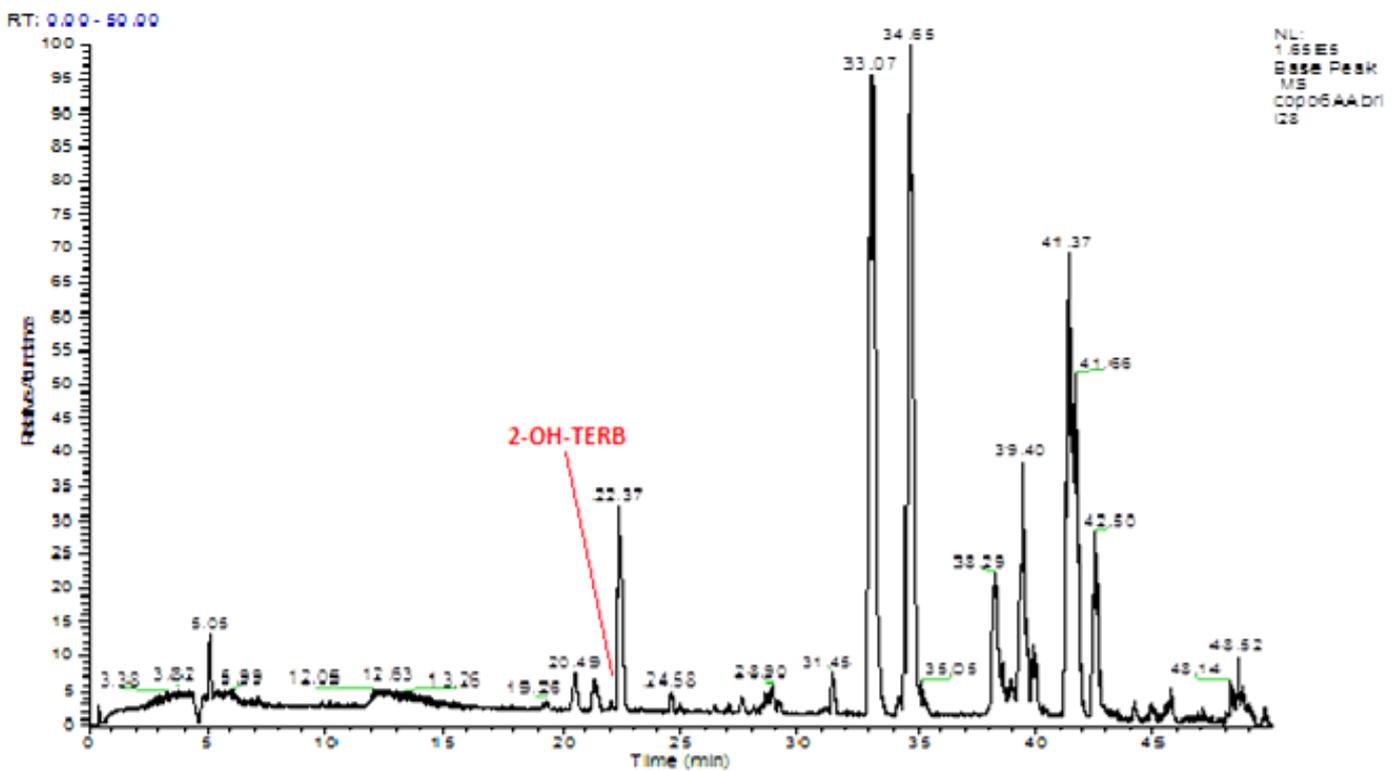


Figura 44- Cromatograma de corrente iónica total (TIC) obtido para as amostras de solo da Bio 4, recolhidas após 180 dias. Composto com tr 22,18 min identificado como sendo o 2-hidroxi-terbutilazina (2-OH-TERB).

O cromatograma obtido para as amostras de solo no final do ensaio (180 dias), na Bio 4 (Figura 44) permitiu também identificar o pico de 2-OH-TERB com tr 22,18 min. No caso do produto de degradação do herbicida pendimetalina, não foi possível

identificar a sua presença nestas amostras, indicando assim que este metabolito no final do ensaio já não se encontrava presente no solo.

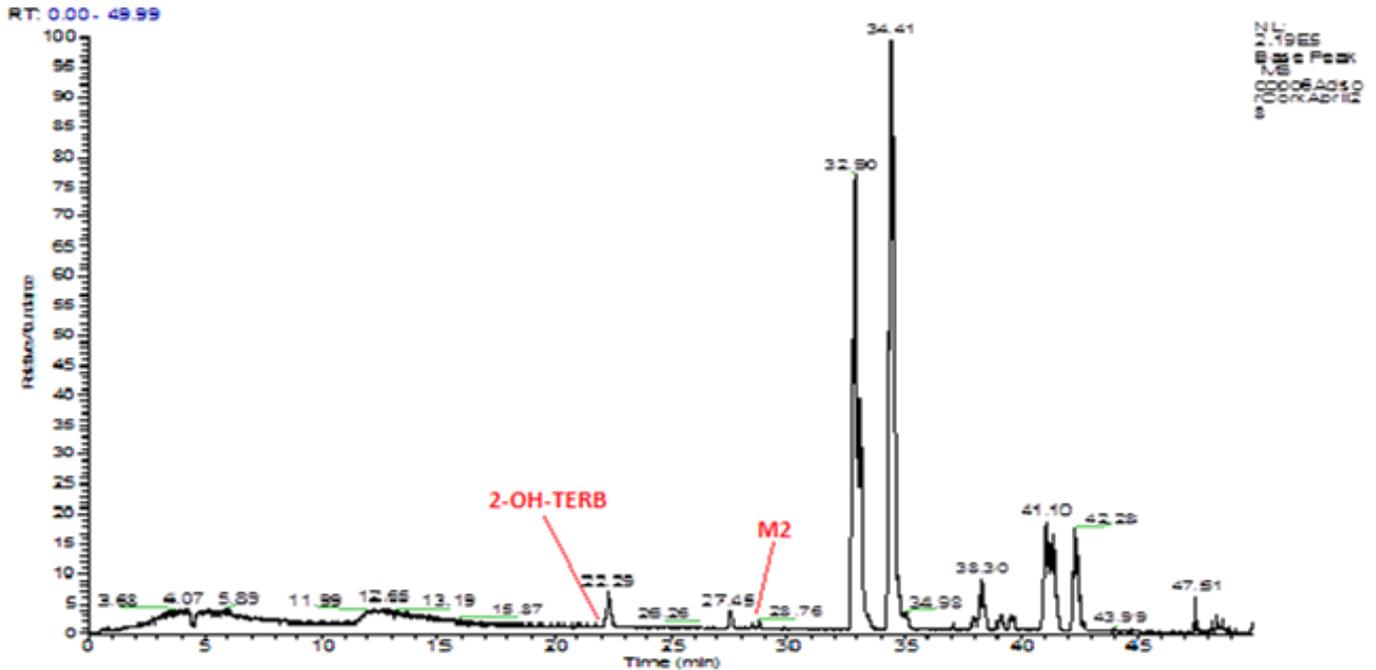


Figura 45- Cromatograma de corrente iónica total (TIC) obtido para extratos resultantes dos ensaios de desadsorção da cortiça (ver seção 5.7.), para a Bio 4, 180 dias após a contaminação. Compostos com tr 22,18 e 28,67 min identificados como sendo 2-hidroxi-terbutilazina (2-OH-TERB) e *N*-(1-etil-1-propil)-3,4dicarboxi-2'6-dinitrobenzenamina-*N*-óxido (M2), respetivamente.

O cromatograma obtido para as amostras de desadsorção da cortiça no final do ensaio (180 dias), na Bio 4 (Figura 45) permitiu também a identificação dos picos de 2-OH-TERB com tr 22,18 min e M2 com tr 28,67 min. Ao contrário do que foi verificado no cromatograma das amostras de solo no final do ensaio (Figura 43), o metabolito do herbicida pendimetalina foi identificado nos extratos de desadsorção da cortiça. Isto demonstra que nesta biomistura, o metabolito M2 no final do ensaio deixou de se encontrar presente no solo mas ainda se encontrava adsorvido à cortiça, sendo provavelmente necessário uma duração superior do ensaio para que também este metabolito fosse posteriormente biodegradado por ação microbiana.

Na tabela 10, encontram-se os resultados obtidos, após 100 e 180 dias, para os: i) metabolitos encontrados no extrato de amostras de solo após tratamento

adequado- Metabolitos (S) e ii) metabolitos encontrados nos extratos de desadsorção da cortiça – Metabolitos (C).

Tabela 10- Presença (✓) ou ausência (-) dos produtos de degradação 2-hidroxi-terbutilazina (2-OH-TERB) e *N*-(1-etil-1-propil)-3,4dicarboxi-2'6-dinitrobenzenamina-*N*-óxido (M2), nos extratos de amostras de solo e extratos de desadsorção da cortiça, após 100 e 180 dias na presença de fungos.

Biomistura	Tempo (dias)	Metabolitos (S)		Metabolitos (C)	
		2-OH-TERB	M2	2-OH-TERB	M2
Bio 1	100	✓	-	✓	✓
	180	✓	-	✓	-
Bio 2	100	✓	✓	✓	✓
	180	✓	-	✓	-
Bio 3	100	✓	✓	✓	✓
	180	✓	-	✓	-
Bio 4	100	✓	✓	✓	✓
	180	✓	-	✓	✓
Bio 5	100	✓	✓	-	-
	180	✓	-	-	-
Bio 6	100	✓	✓	✓	✓
	180	✓	✓	✓	✓

M2: *N*-(1-etil-1-propil)-3,4dicarboxi-2'6-dinitrobenzenamina-*N*-óxido (Figura 16, secção 4.6.4).

2-OH-TERB: 2- hidroxi-terbutilazina.

Metabolitos (S): metabolitos encontrados no extracto de amostras de solo, após tratamento adequado.

Metabolitos (C): metabolitos encontrados no extracto resultante dos ensaios de desadsorção da cortiça.

Observando a tabela 10 verificamos que o metabolito da degradação do terbutilazina, identificado como 2-OH-TERB, se encontra presente em todas as amostras de solo e cortiça (aos 100 e 180 dias), para todas as biomisturas em estudo.

Um facto interessante observado na Bio 1 é que o produto de degradação do herbicida pendimetalina, identificado como M2, aos 100 dias de contaminação não se encontra presente nos extratos das amostras de solo, mas foi detetado nos extratos de desadsorção da cortiça. No entanto, no final do ensaio, o metabolito deste pesticida não é detetado nem no solo nem na cortiça. Este resultado parece ser mais uma confirmação de que a adsorção dos pesticidas, bem como dos seus produtos de degradação, é um processo reversível.

Nas Bio 2 e Bio 3, o metabolito M2 foi detetado em extratos de amostras de solo e em extrato de desadsorção da cortiça, após 100 dias, verificando-se a sua ausência em ambos os extratos no final do ensaio i.e. após 180 dias.

No caso da Bio 4, o metabolito do herbicida pendimetalina foi detetado em ambas as amostras (solo e cortiça), após 100 dias, enquanto no final do ensaio apenas foi detetado nos extratos de desadsorção da cortiça, indicando uma possível degradação total do metabolito M2 presente no solo.

Para a Bio 5, não foram realizados ensaios de desadsorção dado que não é possível proceder à separação entre o solo e a vermiculite, tendo sido analisadas apenas amostras conjuntas (solo + vermiculite). Através da tabela 10, podemos verificar que o metabolito M2 se encontra no solo aos 100 dias, mas já não está presente aos 180 dias, o que está de acordo com a remoção obtida para este herbicida nesta biomistura (ver seção 6.3.4, Tabela 9).

Para finalizar, observamos também que na Bio 6 o metabolito M2 foi detetado quer no solo quer na cortiça, em ambas as recolhas realizadas.

Estes resultados permitem concluir que a cortiça é um material natural com uma elevada capacidade de adsorção, nomeadamente em relação aos compostos em estudo. Esta adsorção pode ser considerada um fator muito importante na redução da toxicidade do meio, permitindo um maior desenvolvimento e conseqüentemente uma maior biodegradação por parte da comunidade microbiana presente.

No que diz respeito ao herbicida diflufenicão, não foi detetado qualquer produto resultante da sua degradação. Quanto ao fungicida difenoconazol, ter-se-á detetado a presença eventual do seu metabolito 1,2,4-triazol nas amostras de solo recolhidas da Bio 1, no final do ensaio aos 180 dias. No entanto, a quantidade deste metabolito parece ser muito reduzida, o que não permite a sua identificação inequívoca através dos espectros de massa obtidos.

Os resultados parecem indicar que as espécies fúngicas utilizadas neste trabalho utilizam a hidroxilação e a hidrólise como vias de degradação/metabolização dos herbicidas terbutilazina e pendimetalina, respetivamente. Apesar de não haver a total confirmação da existência do metabolito 1,2,4-triazol nas amostras da Bio 1 no final do ensaio, talvez haja uma indicação de que o fungo *L. saksenae*, presente nesta biomistura, utilize a desalquilação para degradar/metabolizar o fungicida difenoconazol.

7. Conclusão

De uma forma geral, podemos concluir que todos os isolados microbianos bem como os consórcios utilizados neste estudo, mostraram elevada capacidade de remoção/biodegradação dos pesticidas selecionados.

O pesticida mais biodegradado/removido foi o herbicida pendimetalina, apesar de se tratar de um herbicida moderadamente persistente, remoções de 100% foram obtidas com a Bio 3 (*L. saksenae*, *Fusarium* sp. e cortiça), 4 (*L. saksenae*, *T. viride*, *Fusarium* sp. e cortiça) e 5 (*L. saksenae*, *T. viride*, *Fusarium* sp. e vermiculite), demonstrando a capacidade de degradação destes diferentes sistemas.

A maior eficiência na remoção do herbicida terbutilazina do solo foi exercida pela Bio 9 com uma percentagem de remoção de 89,4%. A segunda remoção mais eficaz deste herbicida foi realizada pelo isolado fúngico *L. saksenae*, demonstrando a grande potencialidade deste fungo na biodegradação deste xenobiótico.

As biomisturas 4 e 5 com o consórcio microbiano: *L. saksenae*, *T. viride*, *Fusarium* sp. e cortiça ou vermiculite, respetivamente, mostraram ser as biomisturas com maior potencial para a biodegradação do difenoconazol, apresentando percentagens de remoção de cerca de 74%. De realçar o desempenho obtido na biodegradação do difenoconazol na presença de vermiculite (Bio 5), e o facto de se tratar de uma biomistura que não produz qualquer tipo de resíduo.

Relativamente ao herbicida diflufenicão o *Fusarium* sp. (presente na Bio 2) foi o mais eficiente, com taxas de remoção superiores a 80%.

Fazendo uma comparação entre todas as biomisturas, os pesticidas foram removidos com a seguinte ordem de eficiência: pendimetalina>terbutilazina>diflufenicão>difenoconazol.

No que diz respeito ao tempo de meia-vida dos pesticidas estudados, verificou-se que foi com a Bio 6 (*L. saksenae*, *T. viride*, *F. oxysporum*, *Aspergillus* sp. e cortiça), que a cinética de biodegradação foi mais rápida. Assim sendo, utilizando a Bio 6 foi possível obter um tempo de meia-vida de 15 dias para o pesticida terbutilazina e um tempo de meia-vida de aproximadamente, 30 dias para os pesticidas difenoconazol, diflufenicão e pendimetalina.

No que diz respeito aos substratos utilizados (cortiça e vermiculite), demonstraram ser bons aliados na biodegradação/remoção dos pesticidas estudados. A cortiça sendo um material natural, apresentou uma elevada capacidade de adsorção, em relação aos compostos em estudo. Esta adsorção pode ser considerada um fator muito importante na redução da toxicidade do meio, o que irá permitir um maior desenvolvimento e conseqüentemente uma maior biodegradação por parte da comunidade microbiana presente. O substrato mineral vermiculite, também

demonstrou ser um bom aliado na biodegradação dos pesticidas em estudo, mostrando-se o fator determinante para uma maior remoção do fungicida difenoconazol.

Através de LC-ESI-MS e LC-ESI-MS² foi ainda possível identificar a presença de dois metabolitos nos extratos de solo e no substrato orgânico cortiça, confirmando assim a metabolização microbiana dos dois pesticidas terbutilazina e pendimetalina por hidroxilação e hidrólise, respetivamente. Ter-se-á detetado também a presença eventual do metabolito 1,2,4-triazol (produto de degradação do difenoconazol), nas amostras de solo recolhidas (Bio 1), no final do ensaio.

8. Referências bibliográficas

- Abourashed, E. A., Clark, A. M. & Hufford, C. D. (1999). Microbial models of mammalian metabolism of xenobiotics: An updated review. *Current Medicinal Chemistry*, 6, 359-374;
- Accinelli, C., Mallegni, R. & Vicari, A. (2003). Herbicide Losses in Subsurface Drainage Water from a Wheat Field. *Ital. J. Agron.*, 7, 33-40;
- Aktas, E. & Yigit, N. (2009). Determination of antifungal susceptibility of *Aspergillus* spp. responsible for otomycosis by E-test method. *Journal de Mycologie Médicale*, 19, 122-125;
- Andreu, V. & Picó, Y. (2004). Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. *Trends in Analytical Chemistry*, 23, 772-789;
- Aschi, M., D'Archivio, A. A., Maggi, M. A., Mazzeo, P. & Ruggieri, F. (2007). Quantitative structure-retention relationships of pesticides in reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 582, 235-242;
- Atlas, R. M. & Philp, J. C. (2006). Bioremediation. Applied Microbial Solutions for Real-World Environmental Cleanup. *Cent. Eur. J. Publ. Health*, 14, 145.
- Balba, M. T., Al-Awadhi, N. & Al-Daher, R. (1998). Bioremediation of oil-contaminated soil: microbiological methods for feasibility assessment and field evaluation. *Journal of Microbiological Methods*, 32, 155-164;
- Beizhen, H. U., Weihua, S., Liping, X. & Tiefeng, S. (2008). Determination of 33 pesticides in tea using accelerated solvent extraction/gel permeation chromatography and solid phase extraction/gas chromatography-mass spectrometry. *Chinese Journal of Chromatography*, 26, 22-28;
- Bending, G. D., Friloux, M. & Walker, A. (2002). Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. *FEMS Microbiology Letters*, 212, 59-63;
- Bhalerao, T. S. & Puranik, P. R. (2007). Biodegradation of organochlorine pesticide, endosulfan, by a fungal soil isolate, *Aspergillus niger*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59, 315-321;

- Boopathy, R. (2000). Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technology*, 74, 63-67;
- Bottoni, P., Grenni, P., Lucentini, L. & Caracciolo, A. B. (2013). Terbutylazine and other triazines in Italian water resources. *Microchemical Journal*, 107, 136-142;
- Brown, C. D. & Beinum, W. V. (2009). Pesticide transport via sub-surface drains in Europe. *Environmental Pollution*, 157, 3314-3324;
- Brum, C. S. (2012). Degradação do herbicida Sulfentrazone em dois solos de Mato Grosso do Sul. *Dissertação de Pós-Graduação em Recursos Naturais*. Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, 1-76;
- Cabrera, A., Cox, L., Fernández-Hernández, A., Civantos, C. G. & Cornejo, J. (2009). Field appraisalment of olive mills solid waste application in olive crops: Effect on herbicide retention. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 132, 260-266;
- Cai, W., Li, J. & Zhang, Z. (2007). The characteristics and mechanisms of phenol biodegradation by *Fusarium* sp.. *Journal of Hazardous Materials*, 148, 38-42;
- Caldeira, A. T., Rodrigues, S., Teixeira, D., Pinto, P. (2013). *Fusarium oxysporum* strain PP0030 28S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence. *GenBank*, NCBI, KC512816.
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W. & Keller, N. P. (2002). Relationship between Secondary Metabolism and Fungal Development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66, 447-459;
- Caracciolo, A. B., Giuliano, G., Corcia, A. D., Crescenzi, C. & Silvestri, C. (2001). Microbial Degradation of Terbutylazine en Surface Soil and Subsoil at Two Different Temperatures. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 67, 815-820;
- Castillo, M. P., Torstensson, L., Stenström, J. (2008). Biobeds for Environmental Protection from Pesticide Uses A Review. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 6206-6219;
- Chen, B., Chen, S. Lin, M. & Chang, J. (2006). Exploring bioaugmentation strategies for azo-dye decolorization using a mixed consortium of *Pseudomonas luteola* and *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, 41, 1574-1581;
- Chi, X., Zhang, J., Zhao, S & Zhou, N. (2013). Bioaugmentation with a Consortium of bacterial nitrophenol-degraders for remediation of soil contaminated with three nitrophenol isomers. *Environmental Pollution*, 172, 33-41;

- Chirnside, A. E. M., Ritter, W. F. & Radosevich, M. (2007). Isolation of a selected microbial consortium from a pesticide-contaminated mix-load site capable of degrading the herbicides atrazine and alachlor. *Soil Biology & Biochemistry*, 39, 3056-3065;
- Chun, M., Chngchun, S., Yanghao, G., Xian'ai, S., Jianfeng, C. & Fen, Y. (2004). Study on characteristics of biocometabolic removal of omethoate by the *Aspergillus* spp.. *Water Research*, 38, 1139-1146;
- Comissão Europeia (2000). Diretiva 2000/60/CE do Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 327/1;
- Comissão Europeia (2008). Diretiva 2008/105/EC do Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial das Comunidades Europeias*, L 348/84;
- Conci, L. G. A. (2009). Efeito do Hidrolisado de Peixe na Supressividade do Solo para o Controlo do Amarelo (*Fusarium oxysporum* f. sp. *zingiberi*) do Gengibre em Experiência Agroecológica em Tapiraí-SP. *Dissertação de Mestrado em Agroecologia e Desenvolvimento Rural*. Universidade Federal de São Carlos, Araras, 1-83;
- Conte, E., Milani, R., Morali, G. & Abballe, F. (1997). Comparison between accelerated solvent extraction and traditional extraction methods for the analysis of the herbicide diflufenican in soil. *Journal of Chromatography*, 765, 121-125;
- Coppola, L., Comitini, F., Casucci, C., Milanovic, V., Monaci, E., Marinozzi, M., Taccari, M., Ciani, M. & Vischetti, C. (2011). Fungicides degradation in anorganic biomixture: impact on microbial diversity. *New Biotechnology*, 29, 99-106;
- Costa, E. M. B., Oliveira, V. & Pimenta, F. C. (2004). Citocromos P450 e Biotransformação Microbiana. *Revista de Patologia Tropical*, 33, 21-31;
- Decreto-Lei nº306/2007 de 27 Agosto. Diário da República nº164- I Série. Lisboa: Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional;
- Diez, M. C., Tortella, G. R., Briceño, G., Castillo, M. P., Díaz, J., Palma, G., Altamirano, C., Calderón, C. & Rubilar, O. (2013). Influence of novel lignocellulosic residues in a biobed biopurification system on the degradation of pesticides applied in repeatedly high doses. *Electronic Journal of Biotechnology*, 16, 1-11;

- Dong, F., Li, J., Chankvetadze, B., Cheng, Y., Xu, J., Liu, X., Li, Y., Chen, X., Bertucci, C., Tedesco, D., Zanasi, R. & Zheng, Y. (2013). Chiral Triazole Fungicide Difenoconazole: Absolute Stereochemistry, Stereoselective Bioactivity, Aquatic Toxicity, and Environmental Behavior in Vegetables and Soils. *Environ. Sci. Technol.*, 47, 3386-3394;
- Dong, X., Ling, N., Wang, M., Shen, Q. & Guo, S. (2012). Fusaric acid is a crucial factor in the disturbance of leaf water imbalance in *Fusarium*-infected banana plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 60, 171-179;
- Du, B., Zhu, F. & Xu, B. (2014a). β -Glucan extraction from bran hull-less barley by accelerated solvent extraction combined with response surface methodology. *Journal of Cereal Science*, 59, 95-100;
- Du, T., Cheng, J., Wu, M., Wang, X., Zhou, H. & Cheng, M. (2014b). An in situ immobilized pipette tip solid phase microextraction method based on molecular imprinted polymer monolith for the selective determination of difenoconazole in tap water and grape juice. *Journal of Chromatography B*, 951-952, 104-109;
- Düring, R. & Hummel, H. E. (1999). Herbicide and metabolite movement in different soils as studied by computer assisted microlysimeters. *Chemosphere*, 39, 641-654;
- EFSA (European Food Safety Authority). (2011). Modification of the existing MRLs for pendimethalin in various crops. *EFSA Journal*, 9, 1-31;
- EFSA (European Food Safety Authority). (2013a). Reasoned opinion on the modification of the existing MRLs for the difenoconazole in various crops. *EFSA Journal*, 11, 1-37;
- EFSA (European Food Safety Authority). (2013b). Reasoned opinion on the review of the existing maximum residue levels (MRLs) for diflufenican according to Article 12 of Regulation (EC) No 396/2005. *EFSA Journal*, 11, 1-42;
- Elsayed, B. B. & El-Nady, M. F. (2013). Bioremediation of pendimethalin-contaminated soil. *African Journal of Microbiology Research*, 7, 2574-2588;
- EUPD (European Union Pesticide Database), http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/?event=activesubstance.selection, 2014. [acessado a Fevereiro de 2014];

- European Commission. (2003). Guidance Document on the Assessment of the Relevance of Metabolites in Groundwater of Substances Regulated Under Council Directive 91/414/EEC. *Sanco/221/2000-rev. 10-final*, 1-14;
- Fait, G., Balderacchi, M., Ferrari, F., Ungaro, F., Capri, E. & Trevisan, M. (2010). A field study of the impact of the different irrigation practices on herbicide leaching. *Europ. J. Agronomy*, 32, 280-287;
- Fang, X. & Barbetti, M. J. (2014). Differential protein accumulations in isolates of the strawberry wilt protein pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* differing in virulence. *Journal of Proteomics*, 108, 223-237;
- FAO (Food and Agriculture Organization), http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JM PR/Evaluation07/Difenoconazole.pdf, 2014. [acessado a Junho de 2014];
- Farlin, J., Gallé, T., Bayerle, M., Pittois, D., Braun, C., Khabbaz, H. E., Lallement, C., Leopold, U., Vanderborght, J. & Weihermueller, L. (2013). Using the long-term memory effect of pesticide and metabolite soil residues to estimate field degradation half-life and test leaching predictions. *Geoderma*, 207-208, 15-24;
- Ferrer, I. & Thurman, E. M. (2006). Multiresidue Analysis of 100 Pesticides in Food Samples by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *Agilent Technologies*, 5989-5469EN;
- Ferrigo, D., Raiola, A., Rasesa, R. & Causin, R. *Trichoderma harzianum* seed treatment controls *Fusarium verticillioides* colonization and fumonisin contamination in maize under field conditions. *Crop Protection*, 65, 51-56;
- Flaherty, R. J., Nshime, B., DeLaMarre, M., DeJong, S., Scott, P. & Lantz, A. W. (2013). Cyclodextrins as complexation and extraction agents for pesticides from contaminated soil. *Chemosphere*, 91, 912-920;
- Fogg, P., Boxall, A. B. A., Walker, A. & Jukes, A. A. (2003). Pesticides degradation in a 'biobed' composting substrate. *Pest. Management Science*, 59, 527-537;
- Getenga, Z., Dörfler, U., Iwobi, A., Schmid, M. & Schroll, R. (2009). Atrazine and terbuthylazine mineralization by an *Arthrobacter* sp. isolated from a sugarcane-cultivated soil in Kenya. *Chemosphere*, 77, 534-539;

- Goettel, M. S., Koike, M., Kim, J. J., Aiuchi, D., Shinya, R. & Brodeur, J. (2014). Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98, 256-261;
- Gonçalves, J. S. (2013). Estratégias de biorremediação para solos contaminados com o herbicida terbutilazina com base na bioadição de *Pseudomonas* sp. ADP. *Dissertação de Mestrado em Microbiologia Aplicada*. Universidade de Lisboa, 1-69;
- Grenni, P. (2011). Effects of pesticides and pharmaceuticals on soil and water bacterial communities. *Tese de Doutoramento em Ciências Ambientais*. Universidade de Milão, 1-209;
- Grenni, P., Gibello, A., Caracciolo, A. B., Fajardo, C., Nande, M., Vargas, R., Saccà, M. L., Martínez-Iñigo, M. J., Ciccoli, R. & Martín, M. (2009). A new fluorescent oligonucleotide probe for in situ detection of s-triazine-degrading *Rhodococcus wratislaviensis* in contaminated groundwater and soil samples. *Water Research*, 43, 2999-3008;
- Grenni, P., Rodríguez-Cruz, M. S., Herrero-Hernández, E., Marín-Benito, J. M., Sánchez-Martín, M. J. & Caracciolo, A. B. (2012). Effects of wood amendments on the degradation of terbuthylazine and on soil microbial community activity in clay loam soil. *Water Air and Soil Pollution*, 223, 5401-5412;
- Hernández, A. F., Lacasaña, M., Gil, F., Rodríguez-Barranco, M., Pla, A. & López-Guarnido, O. (2013). Evaluation of pesticide-induced oxidative stress from a gene-environment interaction perspective. *Toxicology*, 307, 95-102;
- Herrero-Hernández, E., Andrades, M. S., Álvarez-Martín, A., Pose-Juan, E., Rodríguez-Cruz, M. S. & Sánchez-Martín, M. J. (2013). Occurrence of pesticides and some of their degradation products in waters in a Spanish wine region. *Journal of Hydrology*, 486, 234-245;
- Huff, T. B. & Foster, G. D. (2014). Parts-per-trillion LC-MS(Q) analysis of herbicides and transformation products in surface water. *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 46, 723-734;
- Jacques, R. J. S., Okeke, B. C., Bento, F. M., Teixeira, A. S., Peralba, M. C. R. & Camargo, F. A. O. (2008). Microbial Consortium bioaugmentation of a polycyclic

aromatic hydrocarbons contaminated soil. *Bioresource Technology*, 99, 2637-2643;

Janbandhu, A. & Fulekar, M. H. (2011). Biodegradation of phenanthrene using adapted microbial consortium isolated from petrochemical contaminated environment. *Journal of Hazardous Materials*, 187, 333-340;

Jentzer, J., Alignan, M., Vaca-Garcia, C., Rigal, L. & Vilarem, G. (2014). Response surface methodology to optimize accelerated solvent extraction of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *Food Chemistry*, 1-31;

Karanasios, E. C., Tsiropoulos, N. G. & Karpouzas, D. G. (2013). Quantitative and qualitative differences in the metabolism of pesticides in biobed substrates and soil. *Chemosphere*, 93, 20-28;

Karanasios, E., Tsiropoulos, N. G., Karpouzas, D. G. & Menkissoglu-Spiroudi, U. (2010). Novel biomixtures based on local Mediterranean lignocellulosic materials: Evaluation for use in biobed systems. *Chemosphere*, 80, 914-921;

Khalil, N. H. H. & Huat, T. G. (2012). Determination of Triazole Fungicides in Fruits and Vegetables by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS). *International Journal of Agricultural Chemistry*, 1, 1-9;

Khandelwal, M., Datta, S., Mehta, J., Naruka, R., Makhijani, K., Sharma, G., Kumar, R. & Chandra, S. (2012). Isolation, characterization & biomass production of *Trichoderma viride* using various agro products- A biocontrol agent. *Advances in Applied Science Research*, 3, 3950-3955;

Kodama, T., Ding, L., Yoshida, M. & Yajima, M. (2001). Biodegradation of an s-triazine herbicide, simazine. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 1073-1078;

Kumar, S. & Kannabiran, K. (2010). Antifungal activity of *Streptomyces VITSVK5* spp. against drug resistant *Aspergillus* clinical isolates from pulmonary tuberculosis patients. *Journal de Mycologie Médicale*, 20, 101-107;

Laini, A., Bartoli, M., Lamastra, L., Capri, E., Balderacchi, M & Trevisan, M. (2012). Herbicide contamination and dispersión pattern in lowland springs. *Science of the Total Environment*, 438, 312-318;

Lambropoulou, D. A. & Nollet, L. M. L. (2014). Occurrence of Transformation Products of Emerging Contaminants in Water Resources *In Transformation Products of*

Emerging Contaminants in the Environment: Analysis, Processes, Occurrence, Effects and Risks (1ª Edição), 718-719, John Wiley and Sons Ltd, Reino Unido;

- Leitão, A. S. P. (2010). Análise dos ácidos clorogénicos e avaliação dos seu papel na interacção *Coffea arábica-Hemileia vastrix*. *Dissertação de Mestrado em Engenharia Alimentar*. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, 1-87;
- Li, J., Cai, W. & Zhu, L. (2011). The characteristics and enzyme activities of 4-chlorophenol biodegradation by *Fusarium* sp.. *Bioresource Thechnology*, 102, 2985-2989;
- Li, X., Lin, X., Li, P., Liu, W., Wang, L., Ma, F. & Chukwuka, K. S. (2009). Biodegradation of the low concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by microbial consortium during incubation. *Journal of Hazardous Materials*, 172, 601-605;
- Lozowicka, B., Kaczynski, P., Paritova, A. E., Kuzembekova, G. B., Abzhalieva, A. B., Sarsembayeva, N. B. & Alihan, K. (2014). Pesticides residues in grain from Kazakhstan and potential risks associated with exposure to detected pesticides. *Food and Chemical Toxicology*, 64, 238-248;
- Ma, X., Wang, J., Wu, Q., Wang, C. & Wang, Z. (2014). Extraction of carbamate pesticides in fruit samples by grapheme reinforced hollow fibre liquid microextraction followed by high performance liquid chromatographic detection. *Food Chemistry*, 157, 119-124;
- Madueño, L., Coppotelli, B. M., Alvarez, H. M. & Morelli, I. S. (2011). Isolation and characterization of indigenous soil bacterial for bioaugmentation of PAH contaminated soil of semiarid Patagonia, Argentina. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65, 345-351;
- Mancera-López, M. E., Esparza-García, F., Chávez- Gómez, B., Rodríguez-Vásquez, R., Saucedo-Castañeda, G. & Barrera-Cortés, J. (2008). Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61, 151-160;
- Marín-Benito, J. M., Brown, C. D., Herrero-Hernández, E., Arienzo, M., Sánchez-Martín, M. J. & Rodríguez-Cruz, M. S. (2013). Use of raw or incubated organic

wastes as amendments in reducing pesticides leaching through soil columns. *Science of the Total Environment*, 463-464, 589-599;

Martins, M. K. (2005). Variabilidade Genética de Isolados de *Fusarium* spp. e Estudo da Interação com a Planta Hospedeira. *Dissertação de Doutorado em Agronomia*. Universidade de São Paulo, São Paulo, 1-124;

Megadi, V. B., Tallur, P. N., Hoskeri, R. S., Mulla, S. I. & Ninnekar, H. Z. (2010). Biodegradation of pendimethalin by *Bacillus circulans*. *Indian Journal of Biotechnology*, 9, 173-177;

Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N. & Naidu, R. (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants: A critical perspective. *Environment International*, 37, 1362-1375;

Mercadante, R., Polledri, E., Giavini, E., Menegola, E., Bertazzi, P. A. & Fustinoni, S. (2012). Terbutylazine in hair as a biomarker of exposure. *Toxicology Letters*, 210, 169-173;

Metta, H., Corti, M., Redini, L., Bruggesser, F., Arechavala, A., Negroni, R. & Veliz, L. (2010). Renal abscess due to *Aspergillus fumigatus* as the only sign of disseminated aspergillosis in a patient with AIDS. *Revista Iberoamericana de Micología*, 27, 136-139;

Mishra, A., Kumari, M., Pandey, S., Chaudhry, V., Gupta, K. C. & Nautiyal, C. S. (2014). Biocatalytic and antimicrobial activities of gold nanoparticles synthesized by *Trichoderma* sp.. *Bioresource Technology*, 166, 235-242;

Mishra, B. K., Mishra, R. K., Mishra, R. C., Tiwari, A. K., Yadav, R. S. & Dikshit, A. (2011). Biocontrol efficacy of *Trichoderma viride* isolates against fungal plant pathogens causing disease in *Vigna radiata* L. *Advances in Applied Science Research*, 3, 361-369;

Mohan, S. V., Krishna, M. R., Muralikrishna, P., Shailaja, S. & Sarma, P. N. (2007). Solid phase bioremediation of pendimethalin in contaminated soil and evaluation of leaching potential. *Bioresource Technology*, 98, 2905-2910;

Mrozik, A. & Piotrowska-Seget, Z. (2010). Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Microbiological Research*, 165, 363-375;

- Mu, X., Pang, S., Sun, X., Gao, J., Chen, J., Chen, X., Li, X. & Wang, C. (2013). Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays. *Environmental Pollution*, 175, 147-157;
- Mukherjee, A., Das, D., Mondal, S. K., Biswas, R., Das, T K., Boujedaini, N. & Khuda-Bukhsh, A. R. (2010). Tolerance of arsenate-induced stress in *Aspergillus niger*, a possible candidate for bioremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73, 172-182;
- Nawrocka, J. & Malolepsza, U. (2013). Diversity in plant systemic resistance induced by *Trichoderma*. *Biological Control*, 67, 149-156;
- Neethu, K., Rubeena, M., Sajith, S., Sreedevi, S., Priji, P., Unni, K. N., Josh, M. K. S., Jisha, V. N., Pradeep, S. & Benjamin, S. (2012). A novel strain of *Trichoderma viride* shows complete lignocellulolytic activities. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 3, 1160-1166;
- Nourmoradi, H., Nikaeen, M., Stensvold, C. R. & Mirhendi, H. (2012). Ultraviolet irradiation: An effective inactivation method of *Aspergillus* spp. in water for the control of waterborne nosocomial aspergillosis. *Water Research*, 46, 5935-5940;
- Omirou, M., Dalias, P., Costa, C., Papastefanou, C., Dados, A., Ehaliotis, C. & Karpouzias, D. G. (2012). Exploring the potential of biobeds for the depuration of pesticide-contaminated wastewaters from the citrus production chain: Laboratory, column and field studies. *Environmental Pollution*, 166, 31-39;
- Palma, P., Köck-Schulmeyer, M., Alvarenga, P., Ledo, L., Barbosa, I. R., López de Alda, M. & Barceló, D. (2014). Risk assessment of pesticides detected in surface water of the Alqueva reservoir (Guadiana basin, southern of Portugal). *Science of the Total Environment*, 488-489, 208-219;
- Park, H. & Kim, K. (2010). Selection of *Lecanicillium* Strains with High Virulence against Developmental Stages of *Bemisia tabaci*. *Mycobiology*, 38, 210-214;
- Pedlowski, M. A., Canela, M. C., Terra, M. A. C. & Faria, R. M. R. (2012). Modes of pesticides utilization by Brazilian smallholders and their implications for human health and the environment. *Crop Protection*, 31, 113-118;
- Pinto, A. P., Caldeira, A. T., Teixeira, D. M., Mestrinho, E., Dordio, A. V., Romeira, M. (2011). Degradation of terbuthylazine, diflufenican, and pendimethalin pesticides by *Lentinula edodes*. *Current Opinion in Biotechnology*, 22, supplement 1, S70;

- Pinto, A. P., Serrano, C., Pires, T., Mestrinho, E., Dias, L., Teixeira, D. M. & Caldeira, A. T. (2012). Degradation of terbutylazine, difenoconazole and pendimethalin pesticides by selected fungi cultures. *Science of the Total Environment*, 435-436, 402-410;
- Plakas, K. V. & Karabelas, A. J. (2012). Removal of pesticides from water by NF and RO membranes- A review. *Desalination*, 287, 255-265;
- Portugal, F.C.M. (2010). Desenvolvimento, Optimização e Aplicação de Novas Fases Poliméricas (Poliuretanos) Para Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE). *Tese de Doutoramento em Química*. Universidade de Lisboa, 1-264.
- Ramakrishna, M., Mohan, S. V., Shailaja, S., Narashima, R. & Sarma, P. N. (2008). Identification of metabolites during biodegradation of pendimethalin in bioslurry reactor. *Journal of Hazardous Materials*, 151, 658-661;
- Ratola, N., Homem, V., Silva, J. A., Araújo, R., Amigo, J. M., Santos, L. & Alves, A. (2014). Biomonitoring of pesticides by pine needles - Chemical scoring, risk of exposure, levels and trends. *Science of the Total Environment*, 476-477, 114-124;
- Rehm, H. & Reed, G. (2008). Principles of Bacterial Degradation *In Biotechnology: Environmental Processes II* (2ª Edição), 145-155, WILEY-VCH, Alemanha;
- Ribas, L. C. C., Mendonça, M. M., Camellini, C. M. & Soares, C. H. L. (2009). Use of spent mushroom substrates from *Agaricus subrufescens* (syn. *A. blazei*, *A. brasiliensis*) and *Lentinula edodes* productions in the enrichment of a soil-based potting media for lettuce (*Lactuca sativa*) cultivation: Growth promotion and soil bioremediation. *Bioresource Technology*, 100, 4750-4757;
- Rinaldo dos Reis, R., Sampaio, S. C. & Borges de Melo, E. (2014). An alternative approach for the use of water solubility of nonionic pesticides in the modeling of the soil sorption coefficients. *Water Research*, 53, 191-199;
- Rocha, D. A. M (2004). Alterações de Enzimas de Biotransformação de Xenobióticos na Fase Inicial da Esquistossomose Mansônica Murina. *Dissertação de Mestrado em Saúde Pública*. Escola Nacional de Saúde Pública - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 1-133;

- Rodrigues, S. C. C. (2012). Degradação dos pesticidas terbutilazina, difenoconazol, diflufenicão e pendimetalina por microrganismos selecionados. *Relatório de Estágio de Licenciatura em Bioquímica*. Universidade de Évora, Évora, 1-55;
- Rodrigues, S. C. C. (2014). Degradação de pesticidas por microrganismos selecionados. *Apresentação de Comunicação nas Jornadas do Ambiente*. Universidade de Évora.
- Rodríguez-Liébana, J. A., ElGouzi, S., Mingorance, M. D., Castillo, A. & Peña, A. (2014). Irrigation of a Mediterranean soil under field conditions with urban wastewater: Effect on pesticide behavior. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 185, 176-185;
- Sarma, P. N., Mohan, S. V., Krishna, M. R. & Shailaja, S. (2006). Bioremediation of pendimethalin contaminated soil by augmented bioslurry phase reactor operated in sequential batch (SBR) mode: Effect of substrate concentration. *Indian Journal of Biotechnology*, 5, 169-174;
- Schäfer, R. B., Muller, R., Brack, W., Wenzel, K., Streck, G., Ruck, W. & Liess, M. (2008). Determination of 10 particle-associated multiclass polar and semi-polar pesticides from small streams using accelerated solvent extraction. *Chemosphere*, 70, 1952-1960;
- Shehzad, F., Khan, R., Ara, B. & Muhammad, M. (2012). Determination of Dinitroaniline Herbicide in Food Samples and Commercial Formulations using Spectrophotometric Methods. *Pak. J. Weed Sci. Res.*, 18, 265-275;
- Shinde, S. (2013). Bioremediation. An overview. *Recent Research in Science and Technology*, 5, 67-72;
- Silva, C. M. S., Melo, I. S. & Fay, E. F. (2004). Biotransformação de Agrotóxicos e Biorremediação *In Agrotóxicos e Ambiente* (1ª Edição), 145-193, Embrapa, Brasília;
- Silva, J. M. (2009). Desenvolvimento e Validação de Métodos para Determinação de Agrotóxicos em Sedimentos por Cromatografia Gasosa Monodimensional e Bidimensional Abrangente com Micro Detector por Captura de Elétrons. *Dissertação de Mestrado em Química*. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1-147;

- Sinha, S., Chattopadhyay, P., Pan, L., Chatterjee, S., Chanda, P., Bandyopadhyay, D., Das, K. & Sen, S. (2009). Microbial transformation of xenobióticos for environmental bioremediation, *African Journal of Biotechnology*, 8, 6016-6027;
- Sun, H., Ge, X., Lv, Y. & Wang, A. (2012). Application os accelerated solvent extraction in the analysis of organic contaminants, bioactive and nutritional compounds in food and feed. *Journal of Chromatography A*, 1-82;
- Tavares dos Passos, C., Burkert, J. F. M., Kalil, S. J. & Burkert, C. A. V. (2009). Biodegradação de Fenol por uma Nova Linhagem de *Aspergillus* sp. Isolada de um Solo Contaminado do Sul do Brasil. *Química Nova*, 32, 950-954;
- Teixeira, A. S. D. (2010). Monitorização de Pesticidas em Águas de Esposende. *Dissertação de Mestrado em Engenharia Química*. Instituto Superior de Engenharia do Porto, 1-95;
- Teixeira, D. M. F. M. G. (2006). Novos Métodos para a Extração de Compostos Fenólicos de Plantas da Família *Moraceae- Maclura pomífera Ficus carica e Ficus elastica* uma contribuição para o seu estudo. *Dissertação de Doutoramento em Química*. Universidade de Évora, 1-442;
- Tejada, M. (2009). Evolution of soil biological properties after addition of glyphosate, diflufenican and glyphosate+diflufenican herbicides. *Chemosphere*, 76, 365-373.
- Tejada, M., Toro, M., Gómez, I. & Parrado, J. (2011). Application of Diflufenican Herbicide on Soils Amended with Different Organic Wastes. *Herbicides and Environment*, 14, 295-314;
- Tharp, C. (2012). Minimizing Pesticide Contaminated Soil Around the Home and Garen. Montana State University Extention, *A self-Lerning Resouce From MSU Extention*, 1-4;
- Thom, E., Ottow, J. C. G. & Benckiser, G. (1997). Degradation of the Fungicide Difenonazole in a Silt Loam Soil as Affected by Pretreatment and Organic Amendment. *Environmental Pollution*, 96, 409-414;
- Thurman, E. M. & Ferrer, I. (2008). Multiresidue Analysis of 301 Pesticides in Food Samples by LC/Triple Quadrupole Mass Spectrometry. *Agilent Technologies*, 5889-8614EN;

- Tortella, G. R., Rubilar, O., Castillo, M. D. P., Cea, M., Mella-Herrera, R. & Diez, M. C. (2012). Chlorpyrifos degradation in biomixture of biobed at different maturity stages. *Chemosphere*, 88, 224-228;
- Tortella, G. R., Rubilar, O., Cea, M., Briceño, G., Quiroz, A., Diez, M. C. & Parra, L. (2013). Natural wastes rich in terpenes and their relevance in the matrix of an on-farm biopurification system for the biodegradation of atrazine. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85, 8-15;
- Ündeğer, Ü., Schlumpf, M. & Lichtensteiger, W. (2010). Effect of the herbicide pendimethalin on rat urine weight and gene expression and in silico receptor binding analysis. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 502-508;
- União Europeia (2013). Diretiva 2013/39/UE do Parlamento Europeu e do Conselho. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 226/1;
- Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Sahai, V., Prévost, D., Valéro, J. R. & Surampalli, R. Y. (2007a). Bench-scale fermentation of *Trichoderma viride* on wastewater-sludge: Rheology, lytic enzymes and biocontrol activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 764-771;
- Verma, M., Brar, S. K., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y. & Valéro, J. R. (2007b). Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*, 37, 1-20;
- Vischetti, C., Capri, E., Trevisan, M., Casucci, C. & Perucci, P. (2004). Biomassbed: a biological system to reduce pesticide point contamination at farm level. *Chemosphere*, 55, 823-828;
- Vischetti, C., Coppola, L., Monaci, E., Cardinali, A. & Castillo, M. (2007). Microbial impact of the pesticide chlorpyrifos on Swedish and Italian biobeds. *Agron. Sustain. Dev.*, 27, 267-272;
- Wagner, A. O., Schwarzenauer, T. & Illmer, P. (2013). Improvement of methane generation capacity by aerobic pre-treatment of organic waste with a cellulolytic *Trichoderma viride* culture. *Journal of Environmental Management*, 129, 357-360;
- Wang, C., Wang, F., Wang, T., Bian, Y., Yang, X. & Jiang, X. (2013). PAHs biodegradation potential of indigenous consortia from agricultural soil and contaminated soil in two-liquid-phase bioreactor (TLPB). *Journal of Hazardous Materials*, 176, 41-47;

- Wang, K., Wu, J. X. & Zhang, H. Y. (2012). Dissipation of difenoconazole in rice, paddy soil, and paddy water under field conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 86, 111-115;
- Wang, W., Meng, B., Lu, X., Liu, Y. & Tao, S. (2007). Extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides from soils: A comparison between Soxhlet extraction, microwave-assisted extraction and accelerated solvent extraction techniques. *Analytica Chimica Acta*, 602, 211-222;
- Watanabe, E., Kobara, Y., Baba, K. & Eun, H. (2014). Aqueous acetonitrile extraction for pesticide residue analysis in agricultural products with HPLC-DAD. *Food Chemistry*, 154, 7-12;
- Waweru, B., Turoop, L., Kahangi, E., Coyne, D. & Dubois, T. (2014). Non-pathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes provide field control of nematodes, improving yield of banana (*Musa* sp.). *Biological Control*, 74, 82-88;
- Woo, C., Daniels, B., Stirling, R., Morris, P. (2010). Tebuconazole and propiconazole tolerance and possible degradation by Basidiomycetes: A wood-based bioassay. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 64, 403-408;
- Xu, C. & Armstrong, D. W. (2013). High-performance liquid chromatography with paired ion electrospray ionization (PIESI) tandem mass spectrometry for the highly sensitive determination of acidic pesticides in water. *Analytica Chimica Acta*, 792, 1-9;
- Xu, X., He, F., Zhang, X., Bao, J. & Qi, S. (2013). New Mycotoxins from marine-derived fungus *Aspergillus* sp. SCSGAF0093. *Food and Chemical Toxicology*, 53, 46-51;
- Zang, H., Ren, J., Wang, Y., Sheng, C., Wu, Q., Diao, A. & Zhu, D. (2013). Effective multi-step functional biotransformation of steroids by a new isolated *Fusarium oxysporum* SC1301. *Tetrahedron*, 69, 184-189;
- Zhihui, B., Bo, J., Yuejie, L., Jian, C. & Zuming, L. (2008). Utilization of winery wastes for *Trichoderma viride* biocontrol agent production by solid state fermentation. *Journal of Environmental Science*, 20, 353-358.