

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

MARCELA MARIA DE CASTRO CAMPOS

**ESTUDO DA REMOÇÃO E TOXICIDADE DOS PESTICIDAS ATRAZINA E
OXIFLUORFEM PELA CIANOBACTÉRIA *Microcystis novacekii*
EM CONDIÇÕES DE CULTIVO**

Belo Horizonte – MG

2009

MARCELA MARIA DE CASTRO CAMPOS

**ESTUDO DA REMOÇÃO E TOXICIDADE DOS PESTICIDAS
ATRAZINA E OXIFLUORFEM PELA CIANOBACTÉRIA
Microcystis novacekii EM CONDIÇÕES DE CULTIVO**

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

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dra. Sérgia Maria Starling Magalhães

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Antônio Rodrigues Barbosa

Belo Horizonte

2009

Dedico este trabalho aos meus amados pais e à minha orientadora e amiga, Prof. Sérgia, por todos ensinamentos transmitidos, carinho e paciência durante os anos de convivência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder tantas boas oportunidades, por me dar uma família linda que eu tanto amo e por ser minha fortaleza e meu auxílio nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Marcelo e Cidinha, que são minha inspiração, meus grandes incentivadores e ao mesmo tempo meus maiores críticos. Tudo que eu possa fazer nunca será o suficiente para agradecer tamanho carinho e amor com que me cercam! À minha grande amiga e irmã, Mariana, que acompanhou minhas alegrias e minhas angústias tão de perto. E ao Lucas, meu irmão querido!

Agradeço de uma forma muito especial à minha grande mestra, Sérgia, que tem todo o mérito da realização deste trabalho. Obrigada por me conduzir nos caminhos da pesquisa desde a iniciação científica, mas mais ainda por ser tão sensata e sempre encontrar soluções para os vários imprevistos que surgiram durante esta jornada!

A todos os meus amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Águas e do Serviço de Microbiologia de Produtos da Funed, em especial à Crisolita, que muito me incentivou e ajudou para que eu alcançasse meus objetivos.

Ao Laboratório de Resíduos de Pesticidas da Funed, onde foram realizadas as análises cromatográficas deste trabalho.

A todos do Departamento de Farmácia Social, principalmente ao pessoal do Laboratório de Água/Saúde Pública, os quais muitas vezes eu nem encontrava, mas sabia que podia contar. Não posso deixar de homenagear aqui aquelas que tão bem me acolheram logo quando iniciei minhas atividades no meu primeiro estágio: Maria Angela e Edna, obrigada!

Ao Prof. Francisco Barbosa por abrir as portas do Laboratório de Limnologia do ICB e disponibilizar as culturas de cianobactérias para realização deste trabalho.

À Isabela, companheira de mestrado, e às bolsistas Taciane e Iara do Laboratório de Limnologia do ICB por todo o suporte que viabilizou a realização dos experimentos.

Ao Gleydson, meu amigo de todas as horas, com quem eu realmente pude contar nos momentos em que mais precisei. Suas conversas e experiências nunca me deixaram desanimar.

Ao Laboratório de Química Farmacêutica FAFAR pela realização dos espectros no infra-vermelho e ao Departamento de Química ICEX/UFMG pela realização dos espectros de ressonância magnética nuclear.

À FAPEMIG pelo financiamento do Projeto.

Realmente, sozinha, eu nunca teria concluído este trabalho, mais do que qualquer outro que eu já possa ter iniciado. Portanto, meus agradecimentos são sinceros e de coração. Obrigada a todos que de alguma forma fizeram parte desta jornada!

“Quando alguém julga ter alcançado o saber,
é porque ainda não sabe onde está
o verdadeiro conhecimento”.

Cor 8, 2.

RESUMO

A contaminação das águas por pesticidas devido às atividades antropogênicas tem se tornado uma preocupação mundial em função dos danos ambientais e à saúde pública. As cianobactérias são micro-organismos capazes de crescer em ambientes poluídos e seu potencial como agente de biorremediação de ambientes contaminados é promissor. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial de remoção dos pesticidas atrazina e oxifluorfem pela *Microcystis novacekii* e a toxicidade desses agentes para a cianobactéria em condições de cultivo em laboratório. O ensaio de biodegradação foi realizado em cinco concentrações de cada pesticida em meio de cultura WC (water culture), durante 96 horas e as análises quantitativas, por cromatografia gasosa acoplada a detector de nitrogênio/fósforo e captura de elétrons. A cianobactéria demonstrou potencial para degradação da atrazina do meio em concentração igual ou superior a 50µg/L, com médias de remoção de 22,2% em 96 horas. Em concentrações mais baixas, 25µg/L, a degradação não aconteceu em valores significativos, sugerindo a existência de uma concentração mínima do herbicida para ativação dos processos metabólicos celulares. O oxifluorfem apresentou concentrações significativamente baixas no início do experimento na presença da cianobactéria, além de uma alta taxa de remoção no grupo controle ao final do experimento; indicando que além de mecanismos biológicos de remoção do meio, ele é passível de remoção por outras vias, sendo a fotólise uma possibilidade. Em relação à toxicidade, a *Microcystis novacekii* mostrou-se tolerante a elevadas concentrações dos pesticidas, sendo a EC₅₀ (96 horas) 4,2 mg/L e 17,6 mg/L para atrazina e oxifluorfem, respectivamente, confirmando a resistência da espécie. Os resultados do presente estudo podem subsidiar novos trabalhos para avaliação do potencial da *Microcystis novacekii* como futuro agente de biorremediação de ambientes contaminados com estes e outros pesticidas.

Palavras-chave: Cianobactéria. *Microcystis novacekii*. Biodegradação. Toxicidade. Pesticidas. Atrazina. Oxifluorfem.

ABSTRACT

Water contamination by pesticides due to anthropogenic activities has become a global concern in terms of environmental damage and public health. The cyanobacteria are microorganisms capable of growing in polluted environments and their potential as agents of bioremediation of contaminated environments is promising. This study aimed to evaluate the potential for removal of the pesticides atrazine and oxyfluorfen by the cyanobacteria *Microcystis novacekii* and their toxicity in a laboratory culture. The biodegradation test was conducted in five concentrations of each pesticide in the culture medium WC (water culture) for 96 hours and quantitative analysis by gas chromatography coupled to detection of nitrogen/phosphorus and electron capture. The cyanobacteria showed potential for atrazine degradation of the medium in concentrations equal or greater than 50µg/L, with average removal of 22.2% in 96 hours. In lower concentrations, 25 µg/L, the degradation did not occur in significant values, suggesting the existence of a minimum concentration of the herbicide for activation of cellular metabolic processes. The oxyfluorfen showed significantly lower concentrations at the beginning of the experiment in the presence of cyanobacteria and a pronounced spontaneous degradation in the control group at the end of the experiment, indicating that others mechanisms for degradation is likely to happen, as photolysis. Regarding toxicity, *Microcystis novacekii* shown to be tolerant to high concentrations of pesticides, and the EC₅₀ (96 hours) 4.2 mg/L and 17.6 mg/L for atrazine and oxyfluorfen, respectively, confirming the resistance of the specie. The results of this study may support further work to evaluate the potential of *Microcystis novacekii* as a future bioremediation agent of environments contaminated with these and other pesticides.

Keywords: Cyanobacteria. *Microcystis novacekii*. Biodegradation. Toxicity. Pesticides. Atrazine. Oxyfluorfen.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura química da atrazina.....	21
Figura 2 – Degradação da atrazina e formação de seus principais metabólitos.....	23
Figura 3 – Estrutura química do oxifluorfem.....	26
Figura 4 – Fotos da <i>Microcystis novacekii</i>	31
Figura 5 – Mecanismo de biodegradação da atrazina por <i>Pseudomonas</i> sp (ADP).....	34
Figura 6 – Esquema do ensaio de biodegradação.....	47
Figura 7 – Esquema do ensaio de toxicidade.....	49
Figura 8 – Espectro no IV da atrazina.....	54
Figura 9 – Espectro de RMN ¹ H (DMSO deuterado, 200 MHz) da atrazina.....	54
Figura 10 – Espectros atrazina de RMN ¹³ C e DEPT (DMSO deuterado, 50 MHz).....	55
Figura 11 – Espectro no IV do oxifluorfem.....	57
Figura 12 – Espectro de RMN ¹ H (DMSO deuterado, 200 MHz) do oxifluorfem.....	57
Figura 13 – Espectro de RMN ¹³ C (DMSO deuterado, 50 MHz) do oxifluorfem.....	58
Figura 14 – Cromatograma do padrão de referência e da atrazina purificada.....	59
Figura 15 – Cromatograma do padrão de referência e do oxifluorfem purificado.....	60
Figura 16 – Correlação entre absorvância a 680 nm e a contagem celular para <i>Microcystis novacekii</i>	62
Figura 17 – Correlação entre absorvância a 680 nm e a contagem celular para <i>Microcystis novacekii</i> na presença de atrazina (100 µg/L).....	62
Figura 18 – Correlação entre absorvância a 680 nm e a contagem celular para <i>Microcystis novacekii</i> na presença de oxifluorfem (1000 µg/L).....	63
Figura 19 – Curva de calibração para quantificação atrazina.....	64
Figura 20 – Monitorização por DO ₆₈₀ do crescimento da <i>Microcystis novacekii</i> durante ensaio de biodegradação da atrazina.....	66
Figura 21 – Curva de calibração para quantificação do oxifluorfem.....	70
Figura 22 – Monitorização por DO ₆₈₀ do crescimento da <i>Microcystis novacekii</i> durante ensaio de biodegradação do oxifluorfem.....	71
Figura 23 – Fotólise do oxifluorfem e a formação de metabólitos.....	75

Figura 24 – Crescimento da <i>Microcystis novacekii</i> estimado por DO ₆₈₀ durante 96 horas de monitoramento do ensaio toxicidade da atrazina.....	78
Figura 25 – Porcentagem de inibição do crescimento da <i>Microcystis novacekii</i> exposta a atrazina por 96 horas.....	78
Figura 26 – Crescimento da <i>Microcystis novacekii</i> estimado por DO ₆₈₀ durante 96 horas de monitoramento do ensaio de toxicidade do oxifluorfem.....	79
Figura 27 – Porcentagem de inibição do crescimento da <i>Microcystis novacekii</i> exposta ao oxifluorfem por 96 horas	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Padrão de potabilidade para pesticidas segundo a Portaria nº518/2004.....	20
Tabela 2 – Composição do meio WC.....	43
Tabela 3 – Concentrações dos pesticidas para o teste de toxicidade.....	49
Tabela 4 – Dados espectrométricos da atrazina.....	53
Tabela 5 – Dados espectrométricos do oxifluorfem.....	56
Tabela 6 – Determinação da pureza da atrazina por injeção no CG juntamente com o padrão cromatográfico.....	59
Tabela 7 – Determinação da pureza do oxifluorfem por injeção no CG juntamente com o padrão cromatográfico.....	60
Tabela 8 – Resultados da biodegradação da atrazina pela cianobactéria <i>Microcystis novacekii</i>	65
Tabela 9 – Resultados da biodegradação do oxifluorfem pela cianobactéria <i>Microcystis novacekii</i>	70
Tabela 10 – Inibição do crescimento da <i>Microcystis novacekii</i> pelo herbicida atrazina.....	77
Tabela 11 – Inibição do crescimento da <i>Microcystis novacekii</i> pelo herbicida oxifluorfem.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
CG	Cromatografia Gasosa
CG-ECD	Cromatografia gasosa acoplada a detector de captura elétrons
CG-NPD	Cromatografia gasosa acoplada a detector de nitrogênio e fósforo
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	<i>Enzyme linked immuno sorbent assay</i> – teste imunoenzimático
δ	Deslocamento químico (RMN) / deformação angular (IV)
d	Dupleto
dd	Dupleto duplo
Hz	Hertz
IV	Infra-vermelho
J	Constante de acoplamento
lx	Lux – unidade de medida de iluminação
m	Multiplete
mL	Mililitro
mg/L	Miligrama por litro
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino]propanesulfônico (C ₇ H ₁₅ NO ₄ S)
μ L	Microlitro
μ g/L	Micrograma por litro
ng/L	Nanograma por litro
nm	Nanômetros
q	Quarteto
rpm	Rotações por minuto
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
SPE	Extração em fase sólida
t	Triplete
WC	Water Culture
\ddot{u}	Número de onda
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Pesticidas.....	17
2.1.1 Atrazina.....	21
2.1.2 Oxifluorfem.....	25
2.2 Biodegradação como técnica de recuperação ambiental.....	27
2.3 As cianobactérias.....	29
2.3.1 <i>Microcystis novacekii</i> (KOMÁREK) COMPÈRE.....	31
2.4 As cianobactérias como agentes de biodegradação.....	31
2.5 Toxicidade ambiental.....	33
2.6 Parque Estadual do Rio Doce.....	36
2.7 Alguns aspectos analíticos do monitoramento de pesticidas.....	37
3 OBJETIVO	40
3.1 Geral.....	40
3.2 Específicos.....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Pesticidas atrazina e oxifluorfem.....	41
4.2 Padrões cromatográficos, solventes, reagentes e cartuchos para SPE.....	41
4.3 Instrumental.....	41
4.4 Vidrarias.....	42
4.5 Purificação dos pesticidas.....	42
4.6 Meio de cultura.....	42
4.7 Cultivo da cianobactéria <i>Microcystis novacekii</i>	43
4.8 Contagem de células ao microscópio óptico / curva de crescimento.....	44
4.9 Correlação entre contagem celular e densidade óptica.....	45
4.10 Ensaio de biodegradação.....	45
4.11 Metodologia analítica.....	46
4.12 Ensaio de toxicidade.....	48
4.12.1 Cálculo da inibição do crescimento.....	50

5 RESULTADOS	52
5.1 Identificação e grau de pureza dos pesticidas atrazina e oxifluorfem.....	52
5.2 Contagem celular X densidade óptica.....	61
5.3 Ensaio de biodegradação.....	63
5.3.1 Biodegradação atrazina.....	64
5.3.2 Biodegradação oxifluorfem.....	69
5.4 Toxicidade.....	76
5.4.1 Toxicidade atrazina.....	77
5.4.2 Toxicidade oxifluorfem.....	78
5.4.3 O efeito do metanol sobre o crescimento da <i>Microcystis novacekii</i>	82
6 CONCLUSÃO	84
REFERÊNCIAS	86

1 INTRODUÇÃO

A água é o recurso natural mais elementar e fundamental do qual dependem todos os processos e toda a biota existente. Além de ser um recurso vital para a sobrevivência de todas as espécies do planeta Terra, é imprescindível no desenvolvimento econômico e social, para a saúde humana e para manter a sustentabilidade dos processos biológicos. O Brasil possui não menos que 12% da água doce do planeta Terra e provavelmente 25% das espécies de peixes conhecidas. Por outro lado, possui um baixíssimo nível de tratamento de esgotos domésticos e industriais, lançando em seus corpos d'água pelo menos 70% dos esgotos coletados sem qualquer tratamento. Como resultado observa-se ampla degradação ambiental, perda de biodiversidade aquática e riscos à saúde humana (BARBOSA, 2008).

A qualidade da vida na Terra está estritamente ligada às condições ambientais. Até recentemente acreditava-se que os recursos naturais eram abundantes e ilimitados, hoje em dia, no entanto, o comprometimento desses recursos mostra, em maior ou menor grau, a negligência humana ao utilizá-los. O problema é global, a contaminação ambiental é observada em todo o planeta, embora seja amplamente reconhecido que a degradação das condições ambientais é uma ameaça potencial à saúde pública (VIDALI, 2001).

Os contaminantes químicos na água são geralmente considerados de menor gravidade do que os microbianos. Possivelmente devido aos efeitos adversos à saúde humana provenientes dos poluentes químicos, em baixas concentrações, estarem associados a longos períodos de exposição, ao passo que efeitos microbianos são praticamente imediatos. No entanto, a presença de contaminantes químicos na água pode causar sérios problemas à saúde (WHO, 2007).

A água por suas características físicas e químicas veicula inúmeras substâncias potencialmente tóxicas aos humanos e para os diversos organismos expostos por longos períodos ou a quantidades elevadas (BONAVENTURA e JOHNSON, 1997).

O número de substâncias químicas de origem antropogênica expandiu-se enormemente a partir do século passado, com isso, grandes quantidades de produtos tóxicos, como combustíveis, detergentes, fertilizantes, lubrificantes, pesticidas e muitos outros são lançados no ambiente, contaminando o ar, o solo e os cursos d'água (BONAVENTURA e JOHNSON, 1997).

O aumento da população mundial e a demanda crescente por alimentos tem incentivado o agronegócio e motivado o uso de grandes quantidades de pesticidas nas plantações, para prevenir ou combater pragas, assegurando maior produtividade. Como consequência, concentrações residuais de agrotóxicos são encontradas nos diversos ambientes, principalmente na água e nos alimentos. Além dos efeitos sobre a saúde humana, a contaminação ambiental pode acarretar grandes alterações da flora e da fauna resultando em sérios problemas ambientais (MARASCHIN, 2003).

A contaminação das águas superficiais por pesticidas é decorrente da lixiviação do solo por enxurradas, da ação do vento que carrega o pesticida aplicado, em geral, na forma de aerossol, do uso e descarte incorretos destes produtos e do descarte inadequado das embalagens. Os lençóis freáticos também podem ser contaminados por percolação destes compostos (SANCHES *et al.*, 2003).

Uma vez que a contaminação ambiental já tenha ocorrido, a prevenção de novas fontes de poluição e a remediação do ambiente contaminado tornam-se estratégias fundamentais para garantir a sustentabilidade ambiental. As técnicas de recuperação ambiental tem como objetivo a completa degradação dos poluentes, ou, pelo menos, a diminuição de sua concentração até níveis aceitáveis ou sua conversão a substâncias de menor toxicidade, reduzindo os danos ambientais e preservando a saúde humana (BONAVENTURA e JOHNSON, 1997; VIDALI, 2001).

Entre as técnicas de recuperação ambiental o uso de micro-organismos apresenta-se como uma das estratégias mais eficientes, tanto do ponto de vista de efetividade quanto de remoção com relação ao custo e geração de resíduos secundários (BOOPATHY, 2000).

A biodiversidade da flora e da fauna brasileira incentiva os estudos para identificação de espécies locais, facilmente acessíveis, que possam contribuir para a recuperação de áreas poluídas. Neste contexto, o estudo do potencial de cianobactérias isoladas de lagos brasileiros para biodegradação de pesticidas permite conhecer o impacto toxicológico desses agentes sobre esse grupo de produtores primários, além de estimar o potencial metabólico dessas espécies. As cianobactérias são ubíquas no ambiente e possuem mecanismos bem desenvolvidos de adaptação às condições ambientais, o que lhes confere grande resistência em ambientes poluídos, podendo ser utilizadas como agentes de recuperação de áreas impactadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Pesticidas

Os termos pesticida, biocida, defensivo agrícola, praguicida e agrotóxico são comumente usados com o mesmo significado, embora definições mais restritas possam incluir ou excluir dessas classificações diferentes grupos de substâncias químicas (MARASCHIN, 2003). Algumas definições para estes agentes são apresentados a seguir.

No Brasil, a Lei nº 7.802 de 11.07.89 define: “Agrotóxicos são os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora e da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores do crescimento” (BRASIL, 1989).

Segundo a *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) um pesticida é qualquer substância ou mistura de substâncias com capacidade de prevenir, destruir, repelir ou atenuar qualquer peste (USEPA, 2009).

Os pesticidas podem ser classificados em função de vários aspectos que os diferenciam em classes. Por exemplo, de acordo com o tipo de peste que controlam: algicidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas, entre outros. Uma outra forma de classificá-los é de acordo com a sua estrutura química (USEPA, 2009).

Uma classificação também bastante utilizada para pesticidas é em relação à sua toxicidade. Os pesticidas estão divididos em quatro classes toxicológicas. A classe I abrange os compostos considerados altamente tóxicos para seres humanos; a II, os mediamente tóxicos; a III, os pouco tóxicos e a IV, os compostos considerados praticamente não-tóxicos para seres humanos (SANCHES *et al.*, 2003).

A capacidade atual dos países desenvolvidos de produzir e colher grandes quantidades de alimentos em áreas relativamente pequenas com participação reduzida de trabalho humano tem sido possível graças ao uso de pesticidas (MIRANDA *et al.*, 2007).

Praticamente, desde sua introdução, os pesticidas sintéticos constituem um problema, devido ao seu impacto potencial sobre a saúde humana, em virtude do contato direto e da ingestão de água e alimentos contaminados. Acrescenta-se o fato de que muitos pesticidas tem dado origem a problemas ambientais devido à sua toxicidade, persistência, hidrofobicidade e capacidade de se bioacumular em organismos aquáticos (BAIRD, 2002).

O Brasil assumiu, em 2008, a liderança mundial no consumo de pesticidas, superando os Estados Unidos, onde as lavouras ocupam uma área maior. O levantamento do Instituto Internacional de Pesquisa em Agronegócios mostra um crescimento de quase 30% no mercado interno de insumos agrícolas no ano passado, enquanto a demanda global cresceu 15% em comparação com 2007 (BOTELHO, 2009).

As características físico-químicas dos pesticidas, assim como a forma de uso e as propriedades do solo, são fatores importantes para explicar a dinâmica desses resíduos no ambiente. Pesticidas quimicamente estáveis tendem a permanecer mais tempo no ambiente aumentando a probabilidade de dissipar-se para locais cada vez mais distantes do local de aplicação. A forma de aplicação também afeta a sua distribuição inicial (WAUCHOPE *et al.*, 1992).

O grau com que os pesticidas alcançam as águas superficiais depende de uma série de fatores, que inclui a quantidade utilizada durante a aplicação, a extensão com que essas substâncias são adsorvidas pelo solo, sua volatilização, a taxa de degradação, sua solubilidade na água e a quantidade percolada. A quantidade lixiviada até as águas superficiais depende principalmente do índice pluviométrico local e da extensão com que tais agentes são adsorvidos pelo solo. A pulverização de pesticidas próxima aos cursos d'água e a disposição inadequada de resíduos e embalagens também são importantes fatores de contaminação (WHO, 2007).

É importante ressaltar que, em alguns casos, menos de 0,1% da quantidade de pesticidas aplicados alcançam o alvo proposto, os 99,9% restantes tem potencial de atingir outros compartimentos ambientais, como as águas superficiais e subterrâneas, que aparecem como o destino final dos pesticidas (RIBEIRO, 2007).

Os efeitos dos pesticidas nos ecossistemas não ficam restritos aos organismos alvo a que devem atuar, mas se estendem a muitos outros organismos, como as algas, que tem um papel importante no ecossistema aquático como produtores primários (MA e LIANG, 2001).

Considerando ainda que o ambiente aquático abriga micro-organismos que participam dos ciclos dos nutrientes e decomposição nos ecossistemas, os efeitos dos pesticidas sobre esses podem ter impactos subseqüentes nos níveis tróficos mais altos da cadeia alimentar. A toxicidade dos pesticidas pode afetar os micro-organismos tanto em sua estrutura quanto na função exercida pelos mesmos. Os pesticidas podem ser metabolizados ou bioacumulados pelos micro-organismos. Os mecanismos de toxicidade variam, dependendo do tipo de pesticida e das espécies microbianas expostas. Os herbicidas geralmente são os mais tóxicos para os micro-organismos fotossintetizantes, já que exercem sua toxicidade inibindo a fotossíntese. Os dados de toxicidade dos pesticidas para micro-organismos do solo são mais comuns do que aqueles envolvendo micro-organismos aquáticos (DELORENZO, SCOTT e ROSS, 2001).

O uso intensivo de agrotóxicos no Brasil tem suscitado a preocupação de profissionais de diversos setores face aos riscos potenciais que essas substâncias trazem ao ambiente e aos seres humanos. Nesse contexto, a água para consumo humano pode ser uma importante forma de exposição. O padrão nacional de potabilidade da água é regulamentado pela Portaria do Ministério da Saúde nº 518/2004 e contempla 22 pesticidas, apresentados na Tabela 1.

Os efeitos sobre a saúde humana decorrentes do consumo de água contaminada por pesticidas variam segundo a classe toxicológica do mesmo. Dentre os problemas já identificados destacam-se os distúrbios hepáticos, danos ao sistema nervoso central, como dores de cabeça, tonturas, irritabilidade, movimentos

musculares involuntários, transtornos cardiovasculares e reprodutivos. Há ainda evidências de desregulação endócrina e danos oculares e renais, além de anemia e aumento do risco de desenvolvimento de câncer (FERNANDES NETO e SARCINELLI, 2009).

Tabela 1 – Padrão de potabilidade para pesticidas segundo a Portaria nº 518/2004

Pesticida	VMP ¹ (µg/L)
Alaclor	20,0
Aldrin e Dieldrin	0,03
Atrazina	2
Bentazona	300
Clordano (isômeros)	0,2
2,4 D	30
DDT (isômeros)	2
Endossulfan	20
Eldrin	0.6
Glifosato	500
Heptacloro e Heptacloro epóxido	0,03
Hexaclorobenzeno	1
Lindano (γ-BHC)	2
Metolacloro	10
Metoxicloro	20
Molinato	6
Pendimetalina	20
Pentaclorofenol	9
Permetrina	20
Propanil	20
Simarazina	2
Trifluralina	20

Fonte: Portaria do Ministério da Saúde nº518/2004.

¹ VMP: Valor Máximo Permitido.

Atualmente o desafio consiste em desenvolver pesticidas cada vez mais seletivos e menos prejudiciais ao homem e ao meio ambiente; assim como possibilitar a

substituição dos pesticidas pelo controle com agentes biológicos naturais para atenuação das pragas e pelo melhoramento genético das plantas (MARASCHIN, 2003).

Dado o impacto ambiental dessas substâncias, o desenvolvimento de metodologias que tenham por objetivo a sua depuração é de extrema importância, tanto do ponto de vista ambiental quanto de saúde pública.

2.1.1 Atrazina

A atrazina é um dos herbicidas mais utilizados e mais estudados em todo o mundo, sendo frequentemente encontrada em ambientes aquáticos (NRA, 1997; TANG, HOAGLAND e SIEGFRIED, 1998; STRUTHERS, JAYACHANDRAN e MOORMAN, 1998; GRAYMORE, STAGNITTI e ALLINSON, 2001; KADIAN *et al.*, 2007). Sua estrutura química está apresentada na Figura 1.

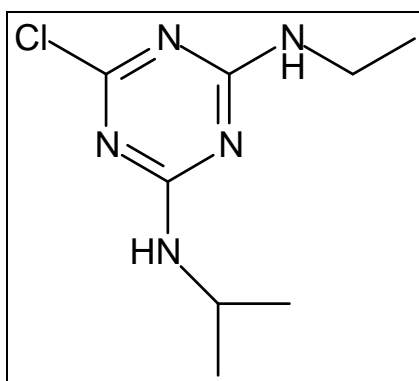


Figura 1 – Estrutura química da atrazina

Dentre os herbicidas da classe das triazinas, a atrazina é o mais conhecido. Foi introduzida no mercado em 1958 e é usada em enormes quantidades para destruir ervas daninhas em lavouras. Do ponto de vista bioquímico, a atrazina atua bloqueando a realização da fotossíntese. Em concentrações elevadas, tem sido utilizada para eliminar todas as plantas vivas, por exemplo, para criar áreas de estacionamento de veículos (BAIRD, 2002).

A atrazina, herbicida de classe III, tem seu uso agrícola autorizado no Brasil para aplicação em pré e pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de abacaxi, cana-de-açúcar, milho, pinus, seringueira, sisal e sorgo (ANVISA, 2007a).

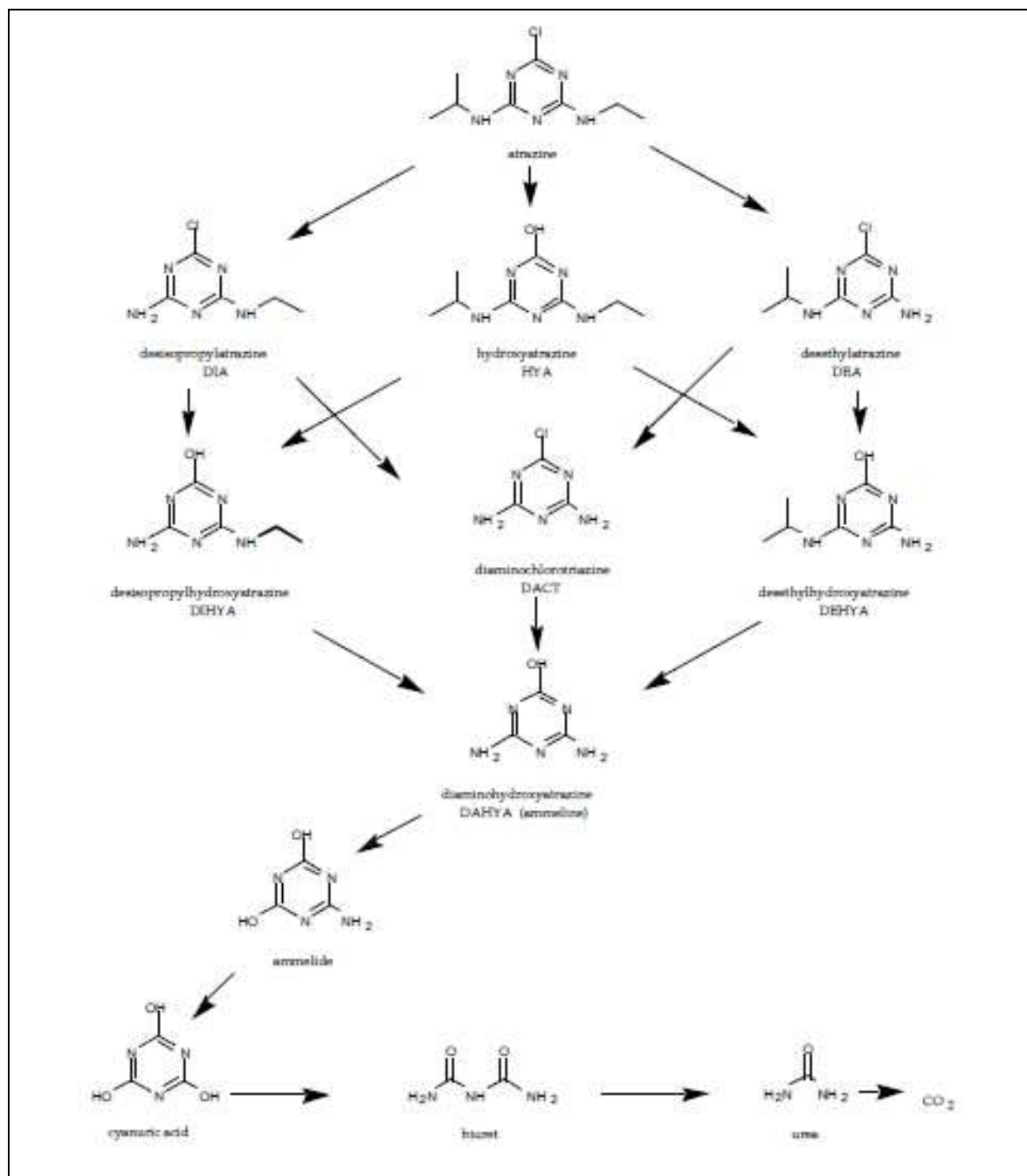
Devido ao seu elevado uso em todo o mundo, a atrazina é um dos herbicidas mais prevalentes no meio ambiente. Apresenta uma solubilidade em água de aproximadamente 30 mg/L e uma meia-vida no solo entre 15 e 100 dias. Embora persista na maioria dos solos durante apenas alguns meses, quando a atrazina e seus metabólitos alcançam os cursos d'água sua meia-vida é da ordem de anos (RALEBITSO, SENIOR e VANVERSEVELD, 2002; BAIRD, 2002).

A estabilidade da atrazina pode ser explicada pela configuração eletrônica do anel heterocíclico, semelhante à do benzeno. É estável à temperatura ambiente e na faixa de pH comum aos vários compartimentos ambientais. A atrazina pode se degradar em vários metabólitos, que variam em persistência no ambiente e em toxicidade. Os metabólitos mais comuns são a hidroxiatrazina (HA), dietilatrazina (DEA), diisopropilatrazina (DIA), didealquilatrazina (DDA) e dietilhidroxiatrazina (DEHA). DIA, DEA e DDA são formados por biodegradação, enquanto HA e DEHA podem ser formados tanto por reações químicas quanto por biodegradação. DEA e DIA são fitotóxicos e o DEA é o metabólito de maior interesse, pois é considerado quase tão tóxico quanto a atrazina (SANCHES *et al.*, 2003; GRAYMORE, STAGNITTI e ALLINSON, 2001). O esquema de degradação da atrazina e formação de seus metabólitos é apresentado na Figura 2.

A degradação da atrazina na água ocorre principalmente por processos biológicos, incluindo *N*-dealquilação, descloração e clivagem do anel; podendo também ser degradada via processos fotoquímicos, no entanto, estes tendem a ser muito menores do que as primeiras formas mencionadas (STRUTHERS, JAYACHANDRAN e MOORMAN, 1998).

Apesar das suas limitações como fonte de energia, devido a total oxidação dos carbonos do anel aromático, sua susceptibilidade ao catabolismo é aumentada pela presença de carbono e nitrogênio em sua estrutura química, comportando-se como

fonte desses elementos em condições limitantes de nutrientes (RALEBITSO, SENIOR e VANVERSEVELD, 2002).



Fonte: The NRA Review of Atrazine, 1997.

Figura 2 - Degradação da atrazina e formação de seus principais metabólitos.

Considerando que a ação da atrazina envolve a inibição do processo fotossintético, em meio aquático natural os efeitos tóxicos mais diretos da atrazina sobre a biota ocorrem sobre as algas. Estes efeitos no ecossistema aquático não são completamente elucidados, embora muitos estudos científicos afirmem que impactos significantes podem ocorrer em baixas concentrações por um longo período de exposição. Deve-se salientar que os metabólitos da atrazina podem se apresentar mais persistentes e em concentrações mais altas que a própria atrazina em períodos bem após a estação de aplicação do pesticida (GRAYMORE, STAGNITTI e ALLINSON, 2001).

A grande dissipação da atrazina nas águas superficiais e subterrâneas faz com que ela seja frequentemente encontrada em águas de abastecimento nos Estados Unidos e, por essa razão, passou a ser considerada importante indicador de contaminação. A USEPA classifica a atrazina como possível agente carcinógeno humano e tem assessorado a realização de projetos com o objetivo de proteger os cursos d'água da contaminação por esse herbicida (SANCHES *et al.*, 2003).

Em outros países as concentrações encontradas de atrazina variam de 0,2 µg/L até concentrações acima de 1000 µg/L (NRA, 1997), sendo também encontrada em sedimentos de rios, indicando que esse pesticida, uma vez ligado ao sedimento é moderadamente persistente neste ambiente (GRAYMORE, STAGNITTI e ALLINSON, 2001).

Um estudo em Queensland, Austrália, evidenciou que a atrazina é o contaminante mais abundante nas águas, estando presente por mais de três anos em 35% das amostras. Na Austrália, este pesticida tem sido detectado frequentemente em águas superficiais e subterrâneas, particularmente em áreas de agricultura irrigada e plantações; sua concentração pode chegar a 2 mg/L em amostras de água em programas de monitoramento (NRA, 1997).

A atrazina já foi inclusive detectada em água da chuva. Hall *et al.* (1993) encontraram concentrações de até 445 ng/L desse herbicida em água de precipitação.

Tang, Hoagland e Siegfried (1997) relatam que estudos tem indicado que a atrazina inibe o crescimento e a fotossíntese das algas e que esta resposta ao pesticida varia enormemente dependendo da concentração utilizada, da duração da exposição e da espécie testada.

A toxicidade potencial da atrazina tem motivado pesquisas direcionadas para a sua biorremediação. Esta técnica tem sido considerada a metodologia de escolha para a recuperação de áreas comprometidas devido ao potencial de metabolização dos micro-organismos, custo relativamente baixo e reduzido impacto ambiental (RALEBITSO, SENIOR e VanVERSEVELD, 2002).

2.1.2 Oxifluorfem

O oxifluorfem é um herbicida do grupo químico éter-difenílico com classificação toxicológica III, apresentando-se levemente tóxico a praticamente não tóxico para humanos. Oxifluorfem é praticamente atóxico pela ingestão; seu contato com pele e mucosas pode desencadear irritações cutâneas e oculares. Por ser altamente hidrofóbico, apresenta potencial de bioacumulação no tecido adiposo das espécies aquáticas, sendo muito tóxico aos invertebrados, moluscos, plantas e peixes (USDA, 2005).

A Organização Mundial de Saúde classificou o oxifluorfem como um pesticida que dificilmente causará intoxicação aguda no homem, desde que utilizado adequadamente. Após exposição oral, oxifluorfem é rapidamente absorvido e excretado praticamente na forma inalterada nas fezes e urina; sendo que muito pouco permanece nos tecidos (WHO, 2002).

Esta classe de herbicidas é principalmente composta por éteres, mas alguns compostos são ácidos ou apresentam comportamento ácido. A estrutura do oxifluorfem é apresentada na Figura 3.

Oxifluorfem atua inibindo a enzima protoporfirinogênio oxidase (protox) que é uma enzima importante na síntese de porfirina nos cloroplastos. A inibição desta enzima bloqueia a formação da clorofila e causa um acúmulo dos seus precursores, que, na

presença de luz são convertidos em moléculas reativas que rompem a membrana celular (LAGANA *et al.*, 2000).

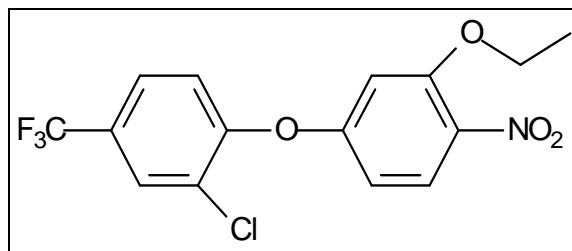


Figura 3 – Estrutura química do oxifluorfem

Oxifluorfem apresenta meia-vida no solo em intervalo abrangente: de 30 a 603 dias. Devido à sua baixa solubilidade em água, 0,1 mg/L, tem a tendência de permanecer ligado aos solos e sedimentos (EXTOXNET, 2002; SCRANO *et al.*, 1999, 2004; USDA, 2005).

Os éter-difenílicos são comumente usados como herbicidas para o controle de muitos tipos de ervas daninhas, conseqüentemente, já foram detectados em águas superficiais e água potável. As concentrações de oxifluorfem podem atingir uma faixa de 0,6 a 1,5 mg/L, com média de até 1 mg/L em ambientes aquáticos. Dados de monitoramento já registraram picos de concentração de até 40 mg/L em águas superficiais, concentrações bem acima da própria solubilidade do herbicida na água, sendo consideradas acidentais e atípicas (JINNO *et al.*, 1999; USDA, 2005).

A taxa de dissipação do oxifluorfem em solos depende tanto da temperatura quanto da umidade, mas a temperatura parece ser o fator mais importante; praticamente não há dissipação de oxifluorfem a temperaturas de 10°C. Devido ao fato do oxifluorfem não ser muito móvel no solo, provavelmente não contamine águas subterrâneas em profundidade maior que três metros. Mas alguns solos com menor coeficiente de adsorção podem permitir a contaminação de águas subterrâneas mais profundas. A meia-vida do herbicida é significativamente menor na água do que no solo e os micro-organismos parecem desempenhar um papel importante neste contexto (YEN, SHEU e WANG, 2003).

A toxicidade dos herbicidas éter-difenílicos pode permanecer no ambiente devido à sua estabilidade e conseqüentemente capacidade de entrar na cadeia alimentar e água. Entre os éter-difenílicos, bifenox e oxifluorfem são compostos considerados carcinogênicos ou possivelmente carcinogênicos. Em bioensaios com camundongos foi observado um aumento na incidência de carcinoma hepático, o que resultou na classificação do oxifluorfem como sendo um possível carcinógeno humano (SHEU *et al.*, 2006).

As algas são mais sensíveis à ação do oxifluorfem do que os peixes, sendo que as formulações contendo oxifluorfem apresentam-se mais tóxicas do que a substância com alto teor de pureza (> 95%). Acrescenta-se que as algas verdes são mais sensíveis e as espécies mais tolerantes parecem ser as cianobactérias (USDA, 2005).

O uso agrícola do oxifluorfem é autorizado, no Brasil, para a aplicação em pré-emergência das plantas infestantes nas culturas de algodão, arroz, café, cana-de-açúcar, cebola, citros e soja e para uso em pré e pós-emergência das plantas infestantes nas culturas de eucalipto e pinus (ANVISA, 2007b).

No que diz respeito ao padrão de potabilidade da água para consumo humano estabelecido pela Portaria do Ministério da Saúde nº 518/2004, não há um limite máximo permissível para o oxifluorfem.

2.2 Biodegradação como técnica de recuperação ambiental

A biodegradação é a capacidade dos micro-organismos (bactérias, fungos, algas) de metabolização de produtos químicos (BAIRD, 2002). A biorremediação é definida como a técnica que emprega micro-organismos para a recuperação de locais contaminados (absorção / degradação de resíduos ambientais de forma a eliminá-los completamente ou a transformá-los em espécies menos tóxicas). Baseia-se na exploração do potencial biológico para a recuperação de áreas ambientais degradadas, até se eliminar completamente o contaminante ou atingir limites abaixo das concentrações legalmente permitidas. Para a biorremediação ser efetiva, os

micro-organismos devem metabolizar os poluentes e convertê-los a produtos menos tóxicos (BONAVENTURA e JOHNSON, 1997; VIDALI, 2001).

A busca de métodos mais eficientes, baratos e seguros para tratamento de resíduos das atividades antropogênicas mostra-se como uma necessidade urgente frente ao amplo número de substâncias contaminantes do ambiente. Entre as tecnologias tradicionais utilizadas para a recuperação ambiental destacam-se a incineração de resíduos a altas temperaturas e vários tipos de decomposição química. Tais métodos apresentam vários inconvenientes, destacando-se sua complexidade tecnológica, o custo e a pouca aceitação pelo público, especialmente para a incineração, que pode aumentar a exposição aos contaminantes pelos trabalhadores e moradores nos arredores da instalação, apresenta elevado gasto energético, produção de gases tóxicos e CO₂ (BAIRD, 2002).

Como alternativa são propostos métodos biológicos para o tratamento dos resíduos, sendo desejável a mineralização dos mesmos, ou seja, sua conversão total em CO₂ e H₂O. A remediação, baseada na absorção e na biodegradação de poluentes por micro-organismos selecionados ou geneticamente modificados, tem se mostrado promissora para a recuperação de ambientes contaminados. É uma tecnologia relativamente simples, com grande aceitação por parte do público, custo relativamente baixo e pode ser conduzida *in locu* (VIDALI, 2001).

Ressalta-se que a biotecnologia ambiental não é um campo novo; compostagem e tratamento de esgoto são exemplos clássicos de aplicação desse método, no entanto, estudos recentes oferecem oportunidades para processos biológicos mais eficientes (SEECH *et al.*, 2008).

Como outras tecnologias, a biorremediação tem suas limitações: alguns contaminantes são resistentes ao ataque microbiano e a toxicidade do composto químico para o agente de biorremediação é outra limitação importante (VIDALI, 2001). Além disso, os processos biológicos podem levar à ativação toxicológica formando metabólitos mais tóxicos do que a substância original e podem ainda expor os micro-organismos a substâncias potencialmente mutagênicas, levando a

alterações do material genético dessas espécies com conseqüências pouco conhecidas.

Recentemente tem aumentado o interesse na utilização das cianobactérias como agentes de controle da poluição, já que elas possuem muitas vantagens em relação a outros micro-organismos tradicionalmente estudados, como bactérias e fungos. As cianobactérias são conhecidas por tolerar e habitar ambientes com alto grau de poluição e mostram alta eficiência como acumuladoras e degradadoras de diferentes tipos de contaminantes ambientais, incluindo metais pesados e pesticidas, respectivamente. No entanto, os benefícios reais da sua aplicação como agentes de remediação e descontaminação requerem mais estudos (EL-BESTAWY, 2008).

2.3 As cianobactérias

As cianobactérias originaram-se há cerca de 3,5 bilhões de anos, sendo provavelmente os primeiros produtores primários de matéria orgânica a liberarem oxigênio elementar na atmosfera primitiva. São micro-organismos procariontes (não possuem núcleo verdadeiro), sem flagelos, caracterizados pela ausência de núcleo definido e de organelas citoplasmáticas. Os pigmentos e demais componentes celulares encontram-se distribuídos em toda a massa protoplasmática da célula (CARMICHAEL, 1994; LACEN PE, 2008).

As cianobactérias são encontradas nos mais variados tipos de *habitats*, mas predominam em água doce como rios e lagos, podendo ocorrer também em solos, fontes termais, geleiras e desertos. Preferencialmente ocorrem em temperaturas mais elevadas, em torno de 26 °C, pH de 6 a 9 e ambientes mais estáveis (lênticos) como lagos e reservatórios (CETESB, 2004; VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

Existem cianobactérias unicelulares, coloniais e filamentosas. Algumas espécies produzem células diferenciadas: os heterocitos, especializados na fixação de nitrogênio, e os acinetos, especializados na acumulação de substâncias de reserva. Podem apresentar aerótopos, que são estruturas que acumulam gases resultantes do metabolismo, responsáveis pela migração vertical na coluna d'água. Geralmente

são envolvidas por uma massa gelatinosa ou revestidas por uma bainha mucilaginosa (CETESB, 2004).

A maioria das cianobactérias é aeróbica fotoautotrófica, sendo a fotossíntese a principal forma de metabolismo energético. Algumas cianobactérias também mostram uma distinta habilidade de nutrição heterotrófica, sendo consideradas mixotróficas (capacidade de assimilar compostos orgânicos), o que possibilita a sua existência nas partes mais profundas de lagos, na ausência de luz (CHORUS e BARTRAM, 1999).

As cianobactérias, no entanto, podem ser fonte de consideráveis transtornos em algumas situações. O seu crescimento abundante (*bloom*) em reservatórios de água e mananciais cria problemas severos para o abastecimento de água, já que algumas espécies são produtoras de cianotoxinas (CHORUS e BARTRAM, 1999).

As florações de cianobactérias estão relacionadas com o crescimento exacerbado e a mudança gradual da comunidade algal dominante em ambientes aquáticos, principalmente no que se refere à substituição da dominância das algas verdes pelas cianobactérias. As razões para essas alterações não são somente fatores físicos (temperatura e luminosidade), mas também fatores nutricionais (nitrogênio e fósforo). No entanto, existem poucos relatos no que se refere a outros fatores, como os poluentes, aos quais esses organismos apresentam diferentes sensibilidades. Os contaminantes podem atingir o ambiente aquático e resultar em uma mudança na estrutura desses grupos, com alteração na dominância de algas verdes para cianobactérias. Se elas apresentam sensibilidades bem diferentes às substâncias químicas e sendo o último grupo bem menos sensível aos poluentes, a contaminação do ambiente aquático por pesticidas pode resultar em uma mudança da dominância, podendo ser um fator importante para sustentar as florações de cianobactérias em algumas situações (MA *et al.*, 2005).

As cianobactérias constituem um dos grupos fitoplanctônicos mais pesquisados atualmente devido a característica de rápida resposta às modificações ambientais. Elas habitam vários ambientes aquáticos poluídos, atuando de forma dominante em relação a outras espécies. Apresentam efetiva ação de acúmulo e biodegradação de

diferentes tipos de poluentes e também mostram-se como micro-organismos eficientes na assimilação de compostos orgânicos em meios de cultivo, assim como na remoção de metais pesados (EL-BESTAWY, 2008).

2.3.1 *Microcystis novacekii* (KOMÁREK) COMPÈRE

Essa espécie caracteriza-se por denso arranjo celular no centro da colônia e com células isoladas na periferia. Suas colônias jovens são esféricas a levemente ovais, a maioria de 50 a 70 µm de diâmetro. Difere-se da *Microcystis aeruginosa* por suas células ligeiramente menores e característica mucilagem hialina. *Microcystis novacekii* não faz parte do grupo de cianobactérias bem-conhecidas e raramente é citada na literatura em trabalhos de ficologia (HINDÁK, 2006). A Figura 4 apresenta duas fotografias da espécie.



Fonte: HINDÁK, 2006.

Figura 4 – Fotos da *Microcystis novacekii*

2.4 As cianobactérias como agentes de biodegradação

A maioria das publicações envolvendo a degradação de pesticidas tem seu foco na utilização de bactérias, enquanto o papel das algas e cianobactérias na transformação destes poluentes recebe uma atenção limitada. Apesar de apresentarem ampla capacidade metabolizadora, tanto para produtos naturais quanto para agentes tóxicos, existem poucos dados a respeito do papel das cianobactérias na biodegradação de pesticidas.

Megharaj *et al.* (1994) avaliaram o potencial de duas algas verdes (*Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus bijugatus*) e quatro cianobactérias (*Nostoc linckia*, *Nostoc muscorum*, *Oscillatoria animalis* e *Phormidium foveolarum*) para metabolizar metil paration. As cianobactérias apresentaram maior efetividade do que as algas verdes na metabolização do inseticida, sendo que *N. muscorum* foi capaz de degradar completamente o metil paration e o seu produto de hidrólise, p-nitrofenol.

Em estudo conduzido por Mansy e El-Bestawy (2002) foi avaliada a biotransformação da fluometurona pelas cianobactérias *Microcystis aeruginosa*, *Anabaena cylindrica*, *Anabaena flos-aquae* e *Anabaena spiroides*. Todas as espécies apresentaram grande capacidade de metabolizar o herbicida. Em cinco dias as espécies reduziram entre 87,5 e 93,0% a concentração do pesticida no meio.

El-Bestawy *et al.* (2007) descreveram que as cianobactérias dos gêneros *Synechococcus*, *Oscillatoria*, *Nostoc*, *Nodularia* e *Cyanothece* foram capazes de degradar o pesticida lindano rapidamente. Kuritz e Wolk (1995) também verificaram o potencial das cianobactérias *Anabaena* sp e *Nostoc ellipsosporum* em metabolizar o mesmo pesticida.

Cáceres, Megharaj e Naidu (2008) estudaram a degradação de um pesticida organofosforado, fenamifos, por cinco diferentes espécies de algas verdes (*Scenedesmus* sp. MM1, *Scenedesmus* sp. MM2, *Chlamydomonas* sp., *Stichococcus* sp. e *Chlorella* sp.) e cinco espécies de cianobactérias (*Nostoc* sp. MM1, *Nostoc* sp. MM2, *Nostoc* sp. MM3, *Nostoc muscorum* e *Anabaena* sp.) todas isoladas de solos contaminados por este pesticida. Todas as espécies testadas foram capazes de metabolizar o pesticida, sendo consideradas pelos autores como potenciais agentes a serem utilizados na biorremediação de áreas contaminadas por este organofosforado.

González-Barreiro *et al.* (2006), avaliando o potencial de remoção de herbicidas triazínicos (atrazina e terbutrina) de meio aquoso por uma espécie de alga verde (*Chlorella vulgaris*) e uma espécie de cianobactéria (*Synechococcus elongatus*) verificaram rápida eliminação dos pesticidas do meio e concluíram que tais microorganismos podem ser empregados em técnicas de biorremediação de ambientes

aquáticos poluídos com herbicidas triazínicos. Complementa-se que a cianobactéria se mostrou mais resistente à presença da atrazina.

Muitas pesquisas tem sido conduzidas com o objetivo de isolar e melhorar micro-organismos de áreas contaminadas que sejam capazes de mineralizar e utilizar atrazina como uma fonte de carbono e energia. Estes micro-organismos podem ser utilizados sozinhos ou em consórcios, variando sua efetividade na degradação da atrazina (RALEBITSO, SENIOR e VanVERSEVELD, 2002).

Apesar de bastante estudada, nenhum trabalho descrito na literatura apresenta a proposta de um mecanismo de degradação da atrazina pelas cianobactérias. No entanto, em um trabalho de Mandelbaum, Allan e Wackett (1995) foi isolada uma cepa de *Pseudomonas* sp, ADP, que se mostrou capaz de biodegradar o pesticida em concentrações maiores que 1000 mg/L e se tornou uma cepa referência e extensivamente estudada para elucidação do metabolismo de biodegradação da atrazina. O esquema de degradação da atrazina pela *Pseudomonas* sp, cepa ADP, está apresentado na Figura 5.

Com relação ao oxifluorfem existem poucos estudos. A sensibilidade das algas verdes e a tolerância das cianobactérias às formulações de oxifluorfem são confirmadas pela literatura. Rojickova-Padrtova e Marsalek (1999) conduziram um trabalho com seis espécies de algas verdes e uma cianobactéria expostas ao herbicida e a espécie que se mostrou mais tolerante foi *Synechococcus leopoliensis*.

Estes estudos podem contribuir para o desenvolvimento de processos de biorremediação usando cianobactérias.

2.5 Toxicidade ambiental

A toxicologia ambiental se preocupa com os efeitos dos agentes tóxicos sobre a saúde e o bem-estar de humanos, animais e plantas, por meio da interação desses organismos (COSTA *et al*, 2008). Considerando ainda que os efeitos dos herbicidas nos ecossistemas não são restritos aos organismos-alvo, mas se estendem a toda a

biota, os estudos de toxicidade tornam-se ferramentas importantes para o gerenciamento e controle ambiental (MA e LIANG, 2001).

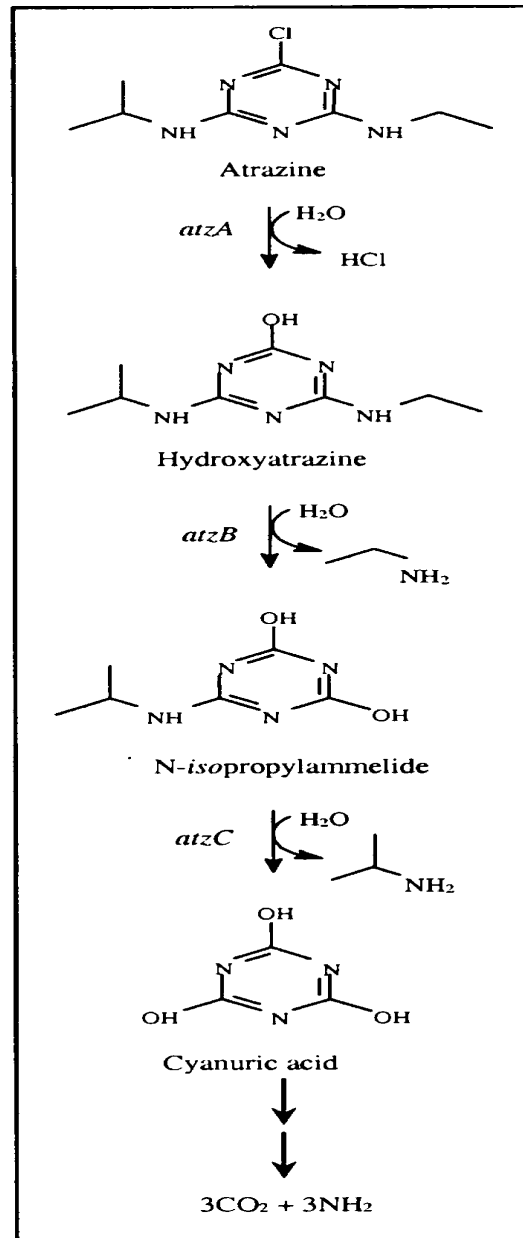


Figura 5 – Mecanismo de biodegradação da atrazina por *Pseudomonas* sp (ADP).

Ensaio de toxicidade são métodos utilizados na detecção e avaliação da capacidade inerente de um agente em produzir efeitos deletérios nos organismos vivos. Consistem na exposição de organismos padronizados a diferentes concentrações de substâncias químicas, presentes nos efluentes ou água, por um determinado período de tempo (RODRIGUES *et al.*, 2003).

Os testes de toxicidade não permitem obter uma resposta absoluta sobre o risco que uma substância apresenta para populações específicas, uma vez que é muito difícil extrapolar os resultados de toxicidade obtidos para os organismos-teste em laboratório para outras espécies (RIBO, 1997).

A utilização de ensaios de caráter ecotoxicológico, que venham a dar informações quanto ao efeito tóxico causado em ecossistemas por substâncias químicas nele presentes, torna-se a cada dia mais importante nas avaliações de impacto ambiental. Os testes de toxicidade aquática são bastante utilizados porque os ecossistemas aquáticos constituem os principais receptores de contaminantes, sejam eles lançados diretamente nos corpos d'água por meio das descargas de efluentes, emitidos no ar ou depositados nos solos (COSTA *et al.*, 2008).

Dentre os organismos mais recomendados para ensaios de avaliação da toxicidade aquática estão as algas, pois são produtores primários dominantes na cadeia alimentar no ambiente aquático (RODRIGUES *et al.*, 2003).

O uso de algas como indicadores biológicos é importante porque qualquer alteração na dinâmica de suas comunidades pode afetar os níveis tróficos superiores. Dentre as vantagens em se utilizar algas em testes de toxicidade podemos destacar o seu ciclo de vida relativamente curto, o que possibilita a observação de efeitos tóxicos em várias gerações (COSTA *et al.*, 2008).

A sensibilidade de diferentes espécies expostas a uma mesma substância química é muito variável. De acordo com Ma e Liang (2001), pesquisas utilizando diferentes espécies de algas como organismos-teste tem mostrado uma grande variação nas suas respostas às substâncias químicas.

Existe muita informação a respeito dos aspectos toxicológicos dos pesticidas sobre as algas verdes, no entanto, muito pouco é conhecido com relação às cianobactérias (MA *et al.*, 2005).

Em geral, estudos dos efeitos dos pesticidas para micro-organismos do solo são mais comuns do que para os do meio aquático. Os dados de toxicidade dos

pesticidas para micro-organismos em conjunto com os dados de monitoramento destas substâncias no ambiente podem ajudar na avaliação de risco ambiental e dos impactos sobre a saúde humana (DELORENZO, SCOTT e ROSS, 2001).

2.6 Parque Estadual do Rio Doce

O Parque Estadual do Rio Doce (PERD) está situado na porção sudoeste do Estado de Minas Gerais, a 248 km de Belo Horizonte, na região do Vale do Aço, inserido nos municípios de Marliéria, Dionísio e Timóteo. A unidade de conservação abriga a maior floresta tropical de Minas, em seus 36.970 hectares e é a primeira unidade de conservação estadual criada em Minas Gerais. O Decreto Lei nº 1.119, que criou oficialmente o Parque, foi assinado 14 de julho de 1944 (IEF, 2009).

O PERD é o terceiro maior sistema lacustre brasileiro, formado por um conjunto de 130 lagos naturais nos mais diversos estágios de trofia. O Parque vem sendo objeto de vários estudos ambientais que visam, basicamente, avaliar seus habitats e ecossistemas, considerando, principalmente, os inúmeros impactos antrópicos de seu entorno (TUNDISI e SAIJO, 1997).

De maneira geral, grande parte dos corpos de água que compõem o sistema de lagos tem sofrido algum tipo de impacto, seja pelo uso da água ou pela modificação da paisagem. Apenas na área onde se encontra o Parque as lagoas estão preservadas. Nos entornos do PERD encontram-se áreas submetidas a impactos antrópicos variados. Destacam-se áreas ocupadas por extensas plantações de *Eucalyptus* sp para atender à indústria siderúrgica e, mais recentemente, à de celulose. A área restante é ocupada por pastagens e culturas diversificadas. Adicionalmente, há ainda a poluição das águas pela carga considerável de esgotos domésticos e industriais.

O sistema de lagos do médio Rio Doce desperta grande interesse por apresentar uma grande diversidade de espécies e desde a década de 70 vem sendo estudado. O Laboratório de Limnologia do ICB/UFMG tem coordenado pesquisas dirigidas ao sistema lacustre do PERD. Uma das linhas de pesquisa desenvolvidas por este Laboratório envolve a manutenção de um banco de cianobactérias, fazendo o

isolamento, identificação e manutenção de culturas de espécies provenientes das lagoas do PERD. Atualmente são mantidas no Laboratório de Limnologia do ICB/UFMG as culturas de *Microcystis novacekii*, *Microcystis aeruginosa*, *Microcystis protocystis*, *Cylindrospermopsis raciborskii* e *Merismopedia* sp.

2.7 Alguns aspectos analíticos do monitoramento de pesticidas

A extração em fase sólida (*Solid-Phase Extraction* – SPE) é um método bem conhecido de preparação de amostras. Trata-se de uma técnica de separação líquido-sólido baseada nos mecanismos de separação da cromatografia líquida de baixa pressão. Do ponto de vista prático, a SPE, em sua forma mais simples e conhecida, comporta-se como uma cromatografia líquida empregando-se uma pequena coluna aberta, usualmente denominada cartucho/seringa de extração, o qual contém a fase sólida, denominada fase estacionária em cromatografia (HENNION, 1999).

Até recentemente, a técnica analítica mais usada no preparo de amostras complexas para análise era a extração líquido-líquido (LLE), que se baseia na solubilidade relativa dos analitos presentes na amostra em dois solventes, idealmente imiscíveis. É um procedimento demorado, requer grandes volumes de solventes orgânicos, apresenta custo elevado, é de difícil automação e geralmente de pequena repetibilidade/reprodutibilidade em decorrência da necessidade de várias etapas envolvendo o analito de interesse. Enquanto a LLE envolve a manipulação do analito várias vezes, na SPE isto não ocorre. O tempo total típico para a extração empregando LLE é de uma hora, contra apenas cinco minutos para a SPE. Adicionalmente, o volume total de solvente orgânico consumido nos métodos de LLE é de aproximadamente 500 mL contra apenas alguns mililitros na SPE. Ressalta-se ainda que a SPE é facilmente automatizada, permitindo extrair dezenas de amostras simultaneamente, o que não ocorre com a LLE (LANÇAS, 2004).

Os cartuchos para extração foram introduzidos no mercado em 1979, mas sua aceitação ampliou-se nos últimos anos, devido à pressão para a diminuição do uso de solventes orgânicos nos laboratórios, que foram encorajados a substituir processos com grande geração de resíduos líquidos e particularmente solventes

orgânicos. A SPE é reconhecida pela USEPA como uma técnica alternativa para a preparação de amostras em relação à extração líquido-líquido em vários procedimentos para a análise de compostos orgânicos em amostras de água e efluentes (HENNION, 1999).

Os parâmetros relevantes para a SPE são: as propriedades físico-químicas do analito de interesse, a concentração necessária, a natureza da matriz, o tipo de cromatografia envolvida e o modo de detecção (LANÇAS, 2004).

O processamento da amostra na SPE consiste em quatro etapas distintas. Inicialmente, a fase sólida (o cartucho) é condicionada com solvente para melhorar a reprodutibilidade da retenção do analito e para reduzir o carreamento de impurezas da fase sólida durante a eluição. Em seguida, o solvente é substituído pelo mesmo solvente da amostra e então o cartucho é carregado com a amostra em fluxo controlado. Opcionalmente, após o processamento da amostra, a fase sólida pode ser lavada com um determinado solvente para eluir componentes de matriz indesejáveis sem eluir o analito. Os analitos de interesse são então eluídos da fase sólida com um pequeno volume de um segundo solvente para a subsequente determinação cromatográfica (POOLE, GUNATILLEKA e SETHURAMAN, 2000).

Em relação à fase sólida, durante muitos anos, a maioria dos processos para o tratamento de amostras aquosas, biológicas ou ambientais, foi realizado utilizando sílica C₁₈. No entanto, uma limitação da sílica de fase reversa é que ela deve ser condicionada com um solvente aquoso e permanecer hidratada até o carregamento da amostra (HENNION, 1999).

Atualmente, muitas fases são especificadas como tendo uma ampla faixa de polaridade. Uma nova geração de polímeros (Oasis, Waters[®]) foi desenvolvida para a extração de um grande espectro de analitos, por exemplo: lipofílicos, hidrofóbicos, ácidos, básicos e neutros em um mesmo cartucho, sendo considerados “universais” por esta razão. O Oasis[®] HLB é uma fase com equilíbrio hidrofílico-lipofílico, umidecível por água e de fase reversa que atende a todos os tipos de extração em fase sólida. Estas fases têm excelente capacidade de retenção, aceitando um

espectro maior de polaridade dos analitos, mesmo se a fase sólida secar durante o condicionamento ou carregamento da amostra (ÖLLERS *et al.*, 2001).

A SPE é usualmente empregada com o propósito de isolar ou concentrar um ou mais analitos presentes em uma matriz complexa para posterior análise por intermédio do uso de um método instrumental (LANÇAS, 2004).

3 OBJETIVO

3.1 Geral

Avaliar o potencial de remoção dos pesticidas atrazina e oxifluorfem do meio de cultura WC (Water Culture) pela cianobactéria *Microcystis novacekii* em condições de cultivo em laboratório.

3.2 Específicos

- Estimar a eficiência dos processos de remoção biológica dos pesticidas do meio de cultivo;
- Verificar a toxicidade dos pesticidas estudados, para a *Microcystis novacekii*, estabelecendo a dose que causa 50% de inibição do crescimento (EC_{50});
- Discutir possíveis mecanismos de degradação dos pesticidas atrazina e oxifluorfem pela espécie *Microcystis novacekii*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Pesticidas atrazina e oxifluorfem

As matérias-primas atrazina e oxifluorfem foram gentilmente fornecidas pela empresa Milenia Agrociências SA; com teor de pureza rotulado para atrazina de 80,2% e de 86,9% para o oxifluorfem.

4.2 Padrões cromatográficos, solventes, reagentes e cartuchos para SPE

Padrões cromatográficos. Os padrões cromatográficos utilizados foram adquiridos da Supelco (atrazina) e Chem Service (oxifluorfem), com teor de pureza 99,9%.

Solventes e Reagentes. Os solventes utilizados, metanol e acetato de etila, foram grau pesticida adquiridos dos laboratórios Merck e Tedia, respectivamente.

SPE. Para a extração em fase sólida utilizou-se cartucho Oasis[®] HLB (Waters) 30 μm , 1 cc, 30 mg e *manifold* a vácuo para SPE.

4.3 Instrumental

Os espectros na região do infravermelho (IV) foram registrados em espectrômetro ATR-IR, Spectrum One, Perkin Elmer (Laboratório de Química Farmacêutica, FaFar, UFMG).

Os espectros de RMN ^1H e de RMN ^{13}C foram realizados em aparelho BRUKER AVANCE DRX-400 (Laremar, Departamento de Química, ICEX, UFMG), utilizando-se sonda dual ^{13}C e ^1H de detecção direta de 5 mm para os experimentos unidimensionais de RMN ^1H , de ^{13}C e DEPT 135 e sonda de detecção inversa de 5 mm equipada com bobina para o emprego de pulsos de gradiente de campo para os experimentos bidimensionais (COSY e HMQC). Como referência interna utilizou-se o tetrametilsilano (TMS).

Os espectros em cromatografia gasosa foram realizados em Cromatógrafo a Gás 6890 N Agilent Technologies com injeção automática 7683 Agilent, no Laboratório de Resíduos de Pesticidas da Fundação Ezequiel Dias – Funed.

Para acompanhamento do crescimento da cianobactéria utilizou-se espectrofotômetro MERCK Spectroquant® NOVA 400.

A contagem celular foi realizada em microscópio óptico da marca Olympus modelo CX 41 utilizando-se câmara de Fuchs-Rosenthal.

4.4 Vidrarias

Toda vidraria utilizada nos experimentos foi submetida a imersão em banho de hipoclorito de sódio (5%), lavada com detergente neutro Extran (Merck) e enxaguada exaustivamente com água corrente, sendo o último enxágüe por água destilada. Toda vidraria foi esterilizada em autoclave a 121°C , por 20 minutos.

4.5 Purificação dos pesticidas

Para a utilização experimental, o ideal é que as substâncias apresentem teor de pureza acima de 95%, por isso conduziu-se procedimento de purificação dos pesticidas atrazina e oxifluorfem no Laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Farmácia da UFMG.

Para a purificação, os pesticidas foram recristalizados em metanol/água e resfriamento em banho de gelo permanecendo *overnight* em geladeira. O precipitado foi filtrado a vácuo e lavado com água (3 x 30 mL). Após a secagem acondicionou-se em recipiente âmbar.

Foram realizados testes para confirmação da substância purificada e grau de pureza. As substâncias foram identificadas por espectros no IV e RMN, além de comparação com padrão de referência e quantificação por CG.

4.6 Meio de cultura

O meio de cultura utilizado para cultivo da *Microcystis novacekii*, com características não axênicas, para os experimentos de toxicidade e biodegradação foi o meio de cultura WC (Water Culture). A composição do meio está descrita na Tabela 2.

Após o preparo, o meio foi autoclavado a 121°C por 20 minutos. Os micronutrientes, as vitaminas e o tampão MOPS (pKa 7,2) foram adicionados ao meio após autoclavação, à temperatura ambiente. O pH final do meio foi de $7,0 \pm 0,5$.

Tabela 2 – Composição do meio WC

Componentes	Concentração (mg/L)
Macronutrientes	
CaCl ₂ . 2H ₂ O	36,76
MgSO ₄ . 7H ₂ O	36,97
NaHCO ₃	12,60
K ₂ HPO ₄	8,71
NaNO ₃	85,01
Na ₂ SiO ₃ . 9H ₂ O	28,42
Micronutrientes	
Na ₂ . EDTA	4,36
FeCl ₃ . 6H ₂ O	3,15
CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,01
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	0,022
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,01
MnCl ₂ . 4H ₂ O	0,18
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,006
H ₃ BO ₃	1,0
Vitaminas	
Tiamina . HCl	0,1
Biotina	0,0005
Vitamina B ₁₂	0,0005

Fonte: Guillard e Lorenzen, 1972.

4.7 Cultivo da cianobactéria *Microcystis novacekii*

Neste trabalho foi utilizada a cultura de *Microcystis novacekii* isolada da água de uma lagoa do PERD e mantida em cultivo pelo Laboratório de Limnologia do ICB/UFMG.

Ressalta-se que em estudo não publicado realizado pelo Laboratório de Biotecnologia e Marcadores Moleculares do ICB/UFMG a avaliação genética da cepa de *Microcystis novacekii* isolada do PERD não apresentou o gene para produção de cianotoxina (microcistina), tratando-se, portanto, de cepa não toxigênica. Esses resultados foram confirmados pela aplicação da técnica de imunoenensaio (ELISA), para detecção de microcistina, no laboratório central da COPASA (Companhia de Saneamento de Minas Gerais).

As culturas foram mantidas em câmara ambiente para germinação a temperatura de $25,0 \pm 2,0^{\circ}\text{C}$ e fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro), com intensidade de luminosidade $30\text{-}86 \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. O meio de cultura utilizado foi o meio WC.

As cepas foram mantidas em erlenmeyers de 250 mL, com 100 mL de meio de cultura WC. Os meios foram preparados e os cultivos repicados a cada sete dias. Semanalmente, as culturas foram monitoradas por observação ao microscópio óptico.

4.8 Contagem de células ao microscópio óptico / Curva de crescimento

O crescimento da cultura de *Microcystis novacekii* foi estimado pelo número de células/mL obtido por contagem ao microscópio óptico (MCALICE, 1971). Foram acrescentadas duas gotas da solução de lugol a 1 mL da cultura de *Microcystis novacekii*; manteve-se ao abrigo da luz por 30 minutos. A digestão da mucilagem foi obtida pela adição de 500 μL de NaOH (1 M) à alíquota e aquecimento em banho-maria a 80°C , por cinco minutos.

Após homogeneização em agitador tipo *vortex* por 30 segundos, a amostra foi transferida para a câmara de Fuchs-Rosenthal, para contagem ao microscópio óptico. Após sedimentação de dez minutos foram contadas todas as células presentes nos campos até que se obtivesse 400 células, sendo estimada a densidade da cultura (células/mL).

4.9 Correlação entre contagem celular e densidade óptica

Avaliou-se a correlação entre a contagem celular (em células/mL) e a densidade óptica (medida em espectrofotômetro) do crescimento da *Microcystis novacekii* em meio WC, na presença e ausência dos pesticidas atrazina na concentração de 100 µg/L e oxifluorfem 1000 µg/L. Todos os testes foram realizados em triplicata.

À cultura da *Microcystis novacekii* em meio WC (200 mL) foram adicionados 100 µg/L de solução metanólica de atrazina ou 1000 µg/L de oxifluorfem. A cultura foi incubada a $25,0 \pm 2,0$ °C, fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro), sob iluminação por luz fluorescente branca/fria de intensidade 3500 lx, durante cinco dias. Diariamente foram retiradas duas alíquotas (5 mL), após homogeneização, para contagem celular ao microscópio óptico e para a medida da DO_{680} em espectrofotômetro.

Para estimar o crescimento pela DO_{680} , as alíquotas foram transferidas para cubeta de 10 mm e verificada a medida da absorvância das amostras de cada frasco, a 680 nm em espectrofotômetro. O branco foi registrado pela medida da absorvância do meio WC sem a adição dos pesticidas e da cultura contendo as células de *Microcystis novacekii*.

A contagem ao microscópio óptico foi realizada segundo o procedimento descrito no item 4.8.

4.10 Ensaio de biodegradação

Os testes de biodegradação da atrazina e oxifluorfem pela cianobactéria *Microcystis novacekii* foram realizados seguindo o protocolo OECD – *Guidelines for testing of chemicals* (2003).

A preparação dos experimentos foi realizada em capela de fluxo laminar, a fim de manter a cultura isenta de contaminação.

Os ensaios foram realizados em erlenmeyers de vidro borossilicato de 250 mL, com volume final de 200 mL do meio de cultura WC. O inóculo inicial da *Microcystis*

novacekii, 10 mL, padronizado em aproximadamente 10^6 células/mL, em fase exponencial de crescimento, foi adicionado em cada frasco, de forma que em cada unidade experimental a concentração de partida da cianobactéria fosse da ordem de 10^5 células/mL. Todos os frascos foram mantidos a temperatura de $25,0 \pm 2,0$ °C, fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, iluminação por luz fluorescente branca/fria de intensidade 3500 lx. Os testes de biodegradação da atrazina foram incubados sem agitação, já os ensaios de biodegradação do oxifluorfem foram incubados sob agitação contínua (100 rpm).

No quarto dia de crescimento da cultura foram adicionados volumes pré-definidos de solução estoque dos pesticidas de forma a obter as concentrações finais de 25, 50, 100, 250 e 500 µg/L. A solução estoque dos pesticidas foi preparada dissolvendo-se cada herbicida em metanol grau pesticida e mantendo-se a solução sob refrigeração e ao abrigo da luz.

O crescimento da *Microcystis novacekii* na ausência do pesticida foi utilizado como controle positivo e o meio de cultura não inoculado, adicionado das mesmas concentrações do pesticida, foi usado como controle da degradação espontânea das substâncias. Culturas contendo apenas o solvente utilizado como veículo do pesticida (metanol) também foram avaliadas para excluir possíveis interferências do solvente no processo de biodegradação. Todas as concentrações e os controles foram testados em triplicata. Na Figura 6 é apresentado um esquema do ensaio de biodegradação.

O crescimento da cianobactéria foi monitorado por densidade óptica a 680 nm durante 96 horas. Alíquotas de 10 mL foram retiradas das culturas, filtradas em filtros Milex[®] 0,45 µm, e utilizadas para a quantificação da concentração do pesticida.

4.11 Metodologia analítica

Atrazina e oxifluorfem foram extraídos por extração em fase sólida.

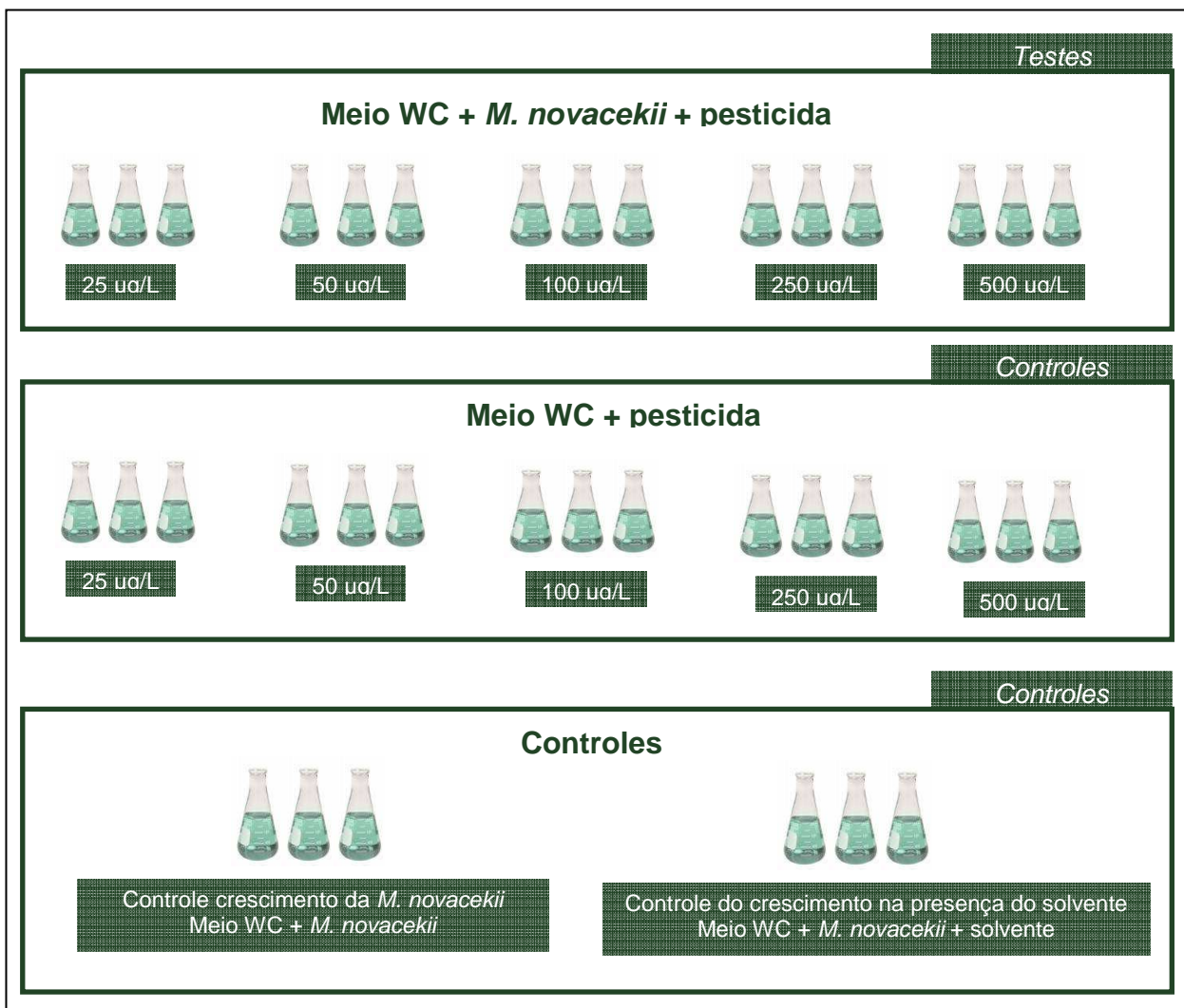


Figura 6 – Esquema do ensaio de biodegradação

Atrazina. As extrações foram conduzidas utilizando cartuchos Oasis[®] HLB (Waters) condicionados com 1 mL de metanol seguido de 1 mL de água Milli-Q (Millipore[®]). As amostras foram acidificadas (pH 3) com ácido clorídrico 1N e os cartuchos carregados com 10 mL da amostra, em fluxo de 1 a 3 mL/min sob vácuo. Os cartuchos foram lavados com 1 mL de solução metanol/água (5:95). Após secagem a vácuo por 15 minutos, os herbicidas foram eluídos com 1 mL de acetato de etila.

Após a concentração, realizou-se a quantificação da atrazina utilizando-se cromatografia em fase gasosa com detector de nitrogênio/fósforo (CG-NPD) equipado com coluna DB-1, Agilent Technologies. Fluxo constante 1,4 mL/min. Rampa: 100°C por 2 min, 30°C/min até 170°C por 6 min, 20°C/min até 200°C por 8 min, 30°C/min até 280°C por 25 min. Injetor: 250°C e detector 310°C.

Oxifluorfem. As condições de extração foram as mesmas, com exceção do volume de carregamento da amostra que foi de 1 mL.

Após a concentração, realizou-se a quantificação do oxifluorfem utilizando-se cromatografia em fase gasosa com detector de captura de elétrons (CG-ECD) equipado com coluna DB-1, Agilent Technologies. Fluxo constante 1,2 mL/min. Rampa: 100°C por 1 min, 30°C/min até 180°C por 2 min, 15°C/min até 250°C por 8 min, 15°C/min até 280°C por 40 min. Injetor: 220°C e detector 310°C.

Em paralelo à análise quantitativa dos pesticidas atrazina e oxifluorfem, foi realizada também injeção dos padrões de referência dos mesmos para comparação dos tempos dos picos característicos.

4.12 Ensaio de Toxicidade

Os testes de toxicidade da atrazina e oxifluorfem para a cianobactéria *Microcystis novacekii* foram realizados seguindo o protocolo OECD 201 *Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test*, 2006.

A erlenmeyers de 250 mL, contendo 200 mL do meio de cultura WC, adicionaram-se 10 mL do inóculo contendo aproximadamente 10^6 células/mL, em fase exponencial de crescimento. Todos os frascos foram mantidos a temperatura de $25,0 \pm 2,0$ °C, fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, iluminação por luz fluorescente branca/fria de intensidade 3500 lx e agitação contínua de aproximadamente 100 rpm.

No quarto dia de crescimento da *Microcystis novacekii* foram adicionados à cultura volumes pré-definidos de solução estoque dos pesticidas de forma a obter as concentrações finais descritas na Tabela 3.

Após a inoculação dos pesticidas, todos os frascos foram mantidos a temperatura de $25,0 \pm 2,0$ °C, fotoperíodo de 12 horas claro/escuro, iluminação por luz fluorescente branca/fria de intensidade 3500 lx e agitação contínua de aproximadamente 100 rpm. Os frascos foram distribuídos aleatoriamente na mesa agitadora, sendo as

posições alteradas diariamente, de modo a diminuir possíveis diferenças de luminosidade e temperatura no crescimento da cianobactéria.

Tabela 3 – Concentrações dos pesticidas para o teste de toxicidade

Ensaio toxicidade da atrazina	Ensaio toxicidade oxifluorfem
Atrazina (µg/L)	Oxifluorfem (µg/L)
1000	2000
2000	4000
4000	8000
8000	16000
10000	20000

Foram realizados controles de crescimento da cianobactéria na ausência da substância teste e controles do efeito do solvente no crescimento da cianobactéria. A concentração de metanol foi de 0,05% v/v nos frascos dos experimentos. Todas as concentrações teste e os controles foram avaliados em triplicata. Na Figura 7 é apresentado um esquema do ensaio de toxicidade.

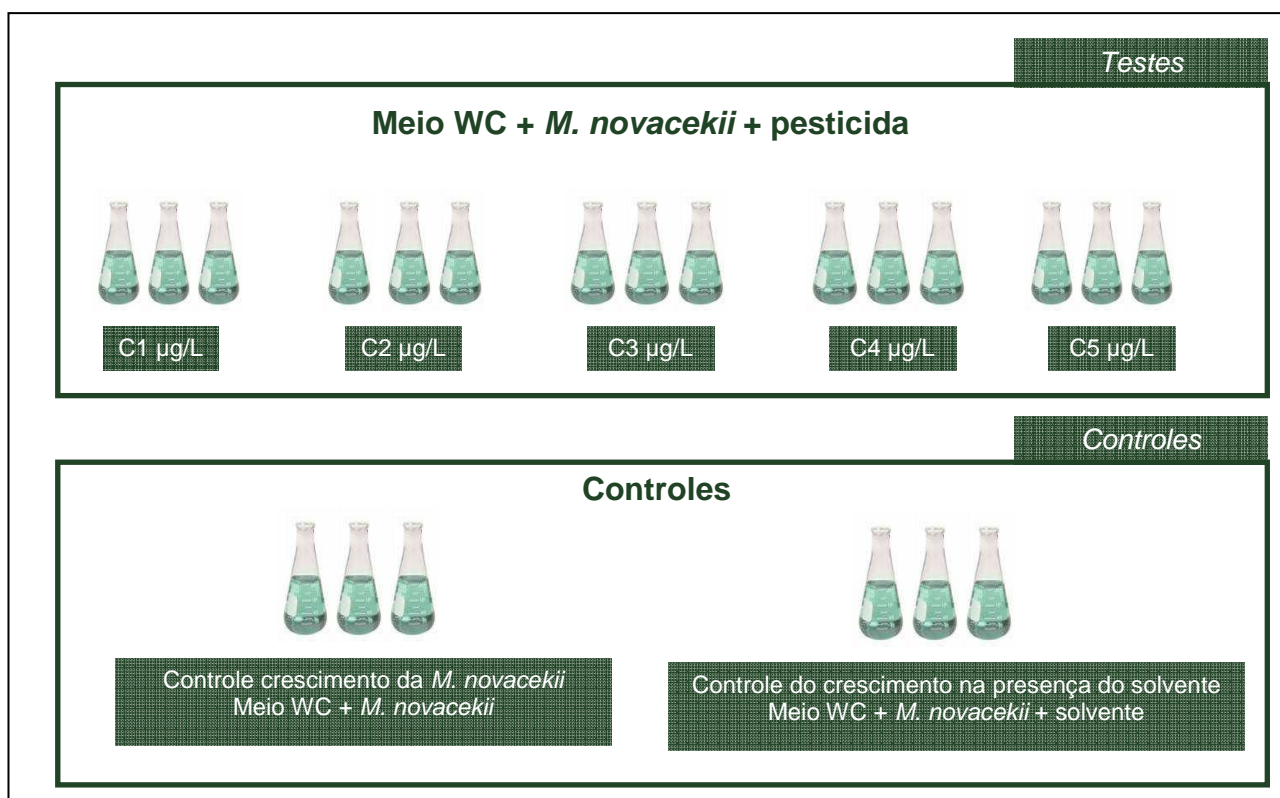


Figura 7 - Esquema do ensaio de toxicidade

O crescimento celular das culturas controle e das culturas teste foi monitorado diariamente, durante 96 horas, pela medida da densidade óptica a 680 nm.

De acordo com o protocolo OECD, 2006, a série de concentrações a ser testada para cada substância deve, de preferência, apresentar inibição do crescimento da cianobactéria na faixa de 5 a 75%.

4.12.1 Cálculo da inibição do crescimento

Os resultados do crescimento obtidos em 96 horas de experimento foram utilizados para calcular os valores da EC₅₀ (dose de pesticida que tem como resposta 50% de inibição do crescimento da espécie) de cada pesticida para a *Microcystis novacekii*, usando análise de regressão linear da concentração do herbicida (ln) pela porcentagem de inibição.

A taxa média de crescimento para um período específico (96 horas) foi calculada como o aumento logarítmico da densidade das células de *Microcystis novacekii* para cada concentração e controles testados, de acordo com a fórmula nº 1, a seguir:

$$\mu_{i,j} = \frac{\ln X_j - \ln X_i}{t_j - t_i} \text{ (dia}^{-1}\text{)} \quad (\text{n}^\circ 1)$$

Onde:

$\mu_{i,j}$ é a média específica de crescimento do período i a j ;

X_i é a medida do crescimento no tempo i ;

X_j é a medida do crescimento no tempo j .

Para calcular a porcentagem de inibição referente a cada concentração testada, aplicou-se a fórmula nº 2:

$$\% I_r = \frac{\mu_c - \mu_i}{\mu_c} \times 100 \quad (\text{n}^\circ 2)$$

Onde:

$\%I_r$ é a porcentagem de inibição na taxa de crescimento (referente àquela concentração);

μ_c é a taxa de crescimento médio do grupo controle;

μ_t é a taxa de crescimento médio para a concentração avaliada.

Para a finalidade de cálculo da porcentagem de inibição da cianobactéria pelos pesticidas, foi considerado grupo controle as unidades de meio de cultivo sem adição do pesticida, mas com a presença do solvente usado como veículo dos herbicidas (metanol), com o objetivo de eliminar as interferências da presença do solvente no crescimento da espécie.

As porcentagens de inibição do crescimento em função do logaritmo das concentrações dos pesticidas foram inseridas em gráfico e o valor da concentração que levou a 50% de inibição foi estabelecida por interpolação, utilizando-se a equação da reta.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação e grau de pureza dos pesticidas atrazina e oxifluorfem

A confirmação estrutural da atrazina e do oxifluorfem foi obtida por meio dos espectros no IV, de RMN ^1H e de RMN ^{13}C e DEPT (atrazina).

Após purificação por recristalização, a atrazina foi obtida como um sólido amorfo de cor branca, conforme descrito no *The NRA Review of Atrazine* (1997) e o oxifluorfem como um sólido amorfo de cor amarela compatível com a descrição da substância pura no USDA (2005).

Os espectros no IV dos pesticidas atrazina (Figura 8) e oxifluorfem (Figura 11) foram comparados com as principais absorções descritas no *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons* e mostraram-se concordantes.

Nas Tabelas 4 e 5 estão apresentadas as principais absorções no IV para os herbicidas atrazina e oxifluorfem, respectivamente, assim como os valores dos deslocamentos químicos dos sinais observados nos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C e suas atribuições.

No espectro de RMN ^1H para a atrazina, Figura 9, verifica-se um multiplete em 7,77 - 7,64 correspondente a 2H do grupo N-H. Dois quartetos foram observados em 4,0 e 3,28 correspondentes aos hidrogênios 2 e 2', respectivamente. Observou-se também um multiplete em 1,21 - 1,02 correspondente a 9H (H1 e H1').

A análise do espectro de RMN ^{13}C e DEPT (atrazina), Figura 10, indicou a presença de sinais correspondentes aos carbonos metílicos (C1 e C1'), metilênicos (C2 e C2') e aos carbonos aromáticos (C3 e C4). As atribuições estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4 – Dados espectrométricos da atrazina

IV: Figura 8

$\tilde{\nu}_{\max}$ (cm ⁻¹)	Atribuição
804	C – Cl (deformação angular)
1343	C – N amina (deformação angular)
1402	C – H metila (deformação angular)
1539	N – H amina (deformação angular)
1616	C = N imina (estiramento)
2972	C – H alifático (deformação angular)
3113 e 3253	N – H amina secundária (deformação angular)

RMN ¹H (DMSO, 200 MHz): Figura 9

δ (ppm)	Multiplicidade	Integral	Atribuição	J (Hz)
7,77 – 7,64	m	2H	N-H	-
4,00	q	1H	H – 2	J_{2-1} 6,6
3,28	q	2H	H – 2'	$J_{2'-1'}$ 6,4
1,21 – 1,02	m	9H	H1 e H1'	-

RMN ¹³C (DMSO, 50MHz): Figura 10

δ (ppm)	Atribuição
167,54	C – 6
165,18 e 164,50	C – 2
42,00	C – 2''
35,01	C – 2'
22,11	C – 1'' (2 C)
14,30	C – 1'

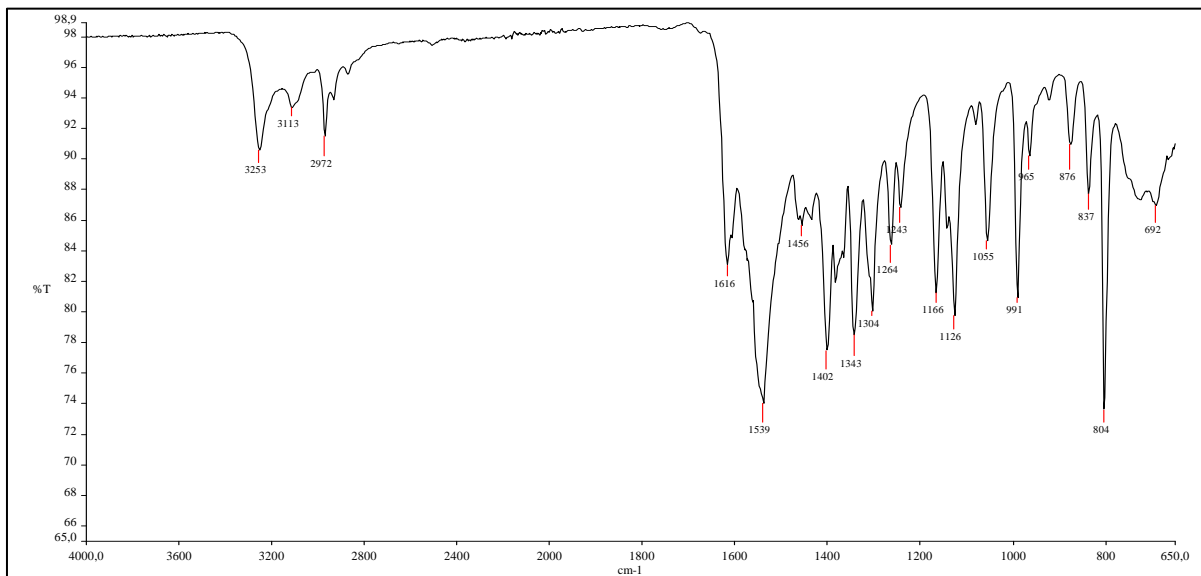


Figura 8 – Espectro no IV da atrazina

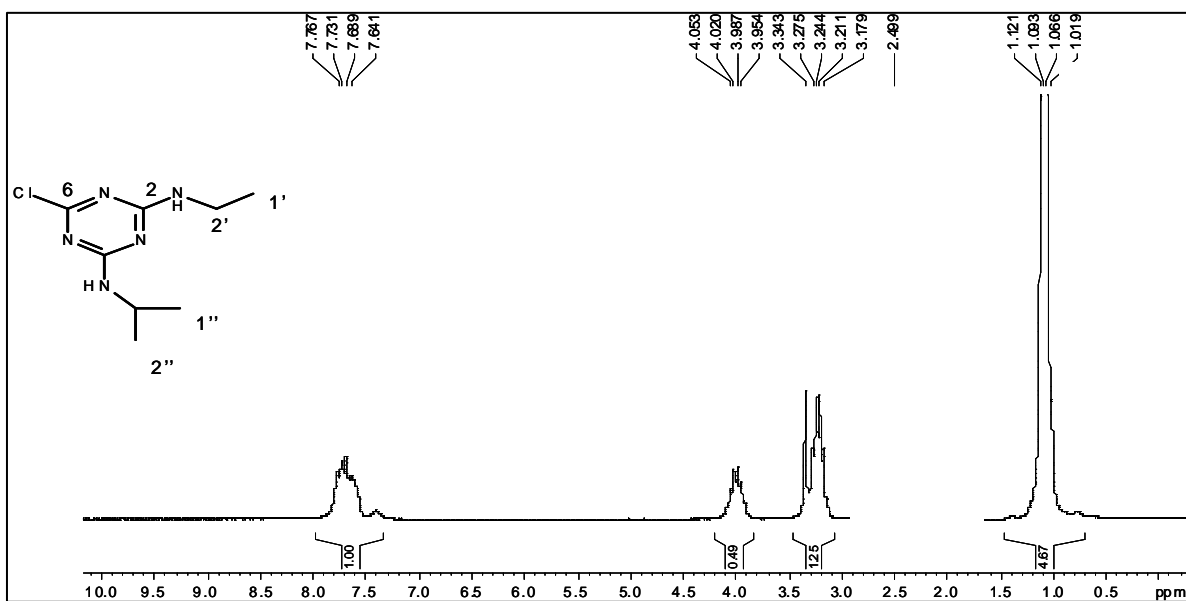


Figura 9 – Espectro de RMN ^1H (DMSO deuterado, 200 MHz) da atrazina

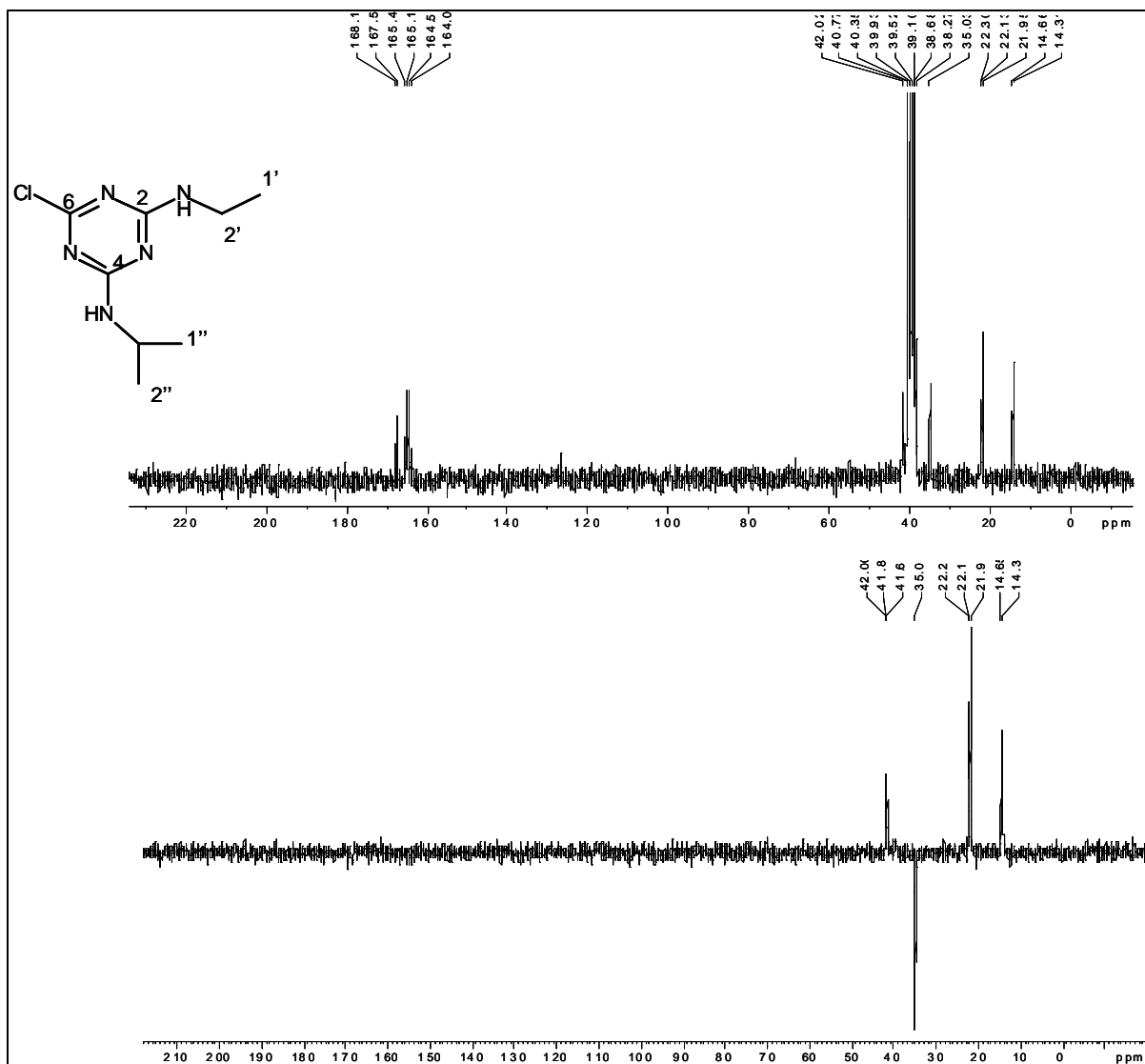


Figura 10 – Espectros atrazina de RMN ^{13}C e DEPT (DMSO deuterado, 50 MHz)

Em relação ao oxifluorfem, no espectro de RMN ^1H , Figura 12, foram observados dupletos em 7,92 e 7,20 correspondentes aos hidrogênios H3 / H6; dupletos em 7,79 e 6,70 atribuídos aos hidrogênios H5 / H8; um duplete duplo em 7,58 e outro em 6,44 correspondentes aos hidrogênios H4 / H7. Verificou-se também a presença de um quarteto em 4,14 e um triplete em 1,49 correspondentes aos hidrogênios H2 e H1, respectivamente, do grupo etila.

No espectro de RMN ^{13}C do oxifluorfem, Figura 13, verificou-se a presença dos sinais correspondentes aos deslocamentos dos carbonos aromáticos, do

grupamento CF₃ e dos carbonos do grupo alquil cujas atribuições estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Dados espectrométricos do oxifluorfem

IV: Figura 11

$\bar{\nu}_{\max}$ (cm ⁻¹)	Atribuição
3122	ν C – H aromático (deformação angular)
2985	ν C – H alifático (deformação angular)
1609; 1577; 1501	ν C = CH aromático (estiramento)
1265 e 1121	ν C-O-C diaril éter (deformação angular)
1519 e 1323	δ NO ₂ aromático (deformação angular)
1078	ν C-O éter alifático (deformação angular)

RMN ¹H (DMSO, 200MHz): Figura12

δ (ppm)	Multiplicidade	Integral	Atribuição	J (Hz)
7,92	d	1H	H-3 ou H-6	J_{3-4} ou $J_{6-7} = 9,0$
7,79	d	1H	H-5 ou H-8	J_{5-4} ou $J_{8-7} = 1,5$
7,58	dd	1H	H-4 ou H-7	J_{4-3} ou $J_{6-7} = 8,5$ J_{4-5} ou $J_{7-8} = 1,5$
7,20	d	1H	H-3 ou H-6	J_{4-3} ou $J_{6-7} = 8,5$
6,70	d	1H	H-5 ou H-8	J_{5-4} ou $J_{8-7} = 2,4$
6,44	dd	1H	H-4 ou H-7	J_{4-3} ou $J_{6-7} = 9,0$ J_{4-5} ou $J_{7-8} = 2,4$
4,14	q	2H	H-2	$J_{2-1} = 7,0$
1,49	t	3H	H-1	$J_{1-2} = 7,0$

RMN ¹³C (DMSO, 50MHz): Figura 13

δ (ppm)	Atribuição
160,95; 155,00; 153,66; 135,68; 128,81; 128,22; 127,29; 125,72; 122,02; 108,21; 103,89	C – aromático e C-F ₃
65,90	C ₂
14,57	C ₁

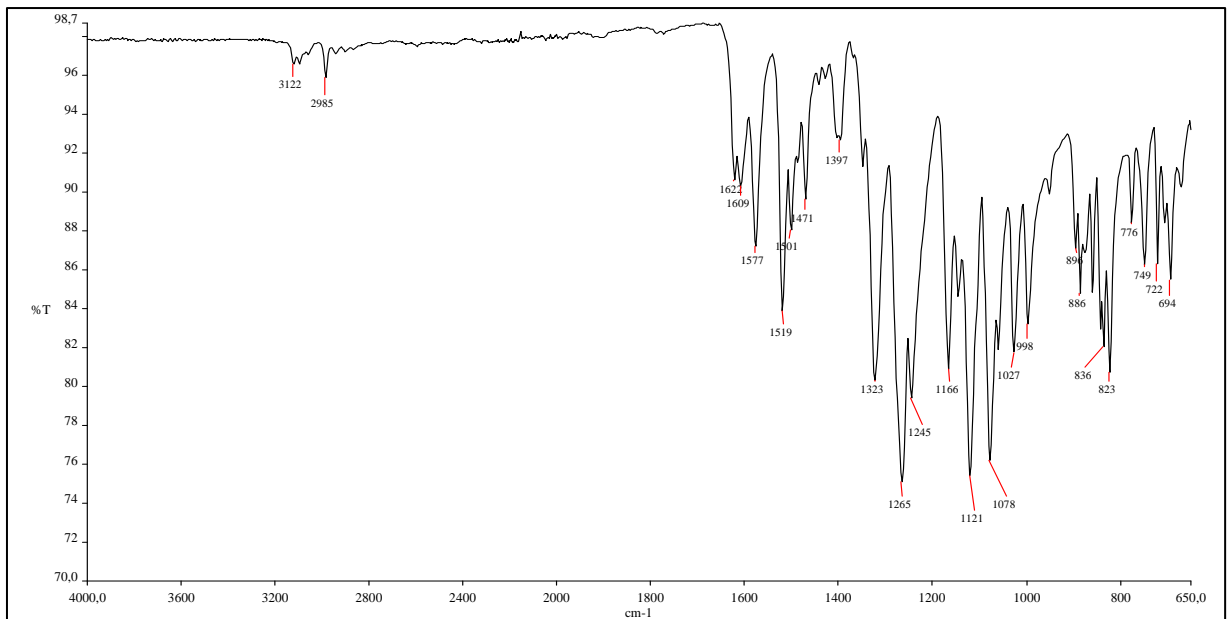


Figura 11 – Espectro no IV do oxifluorfem

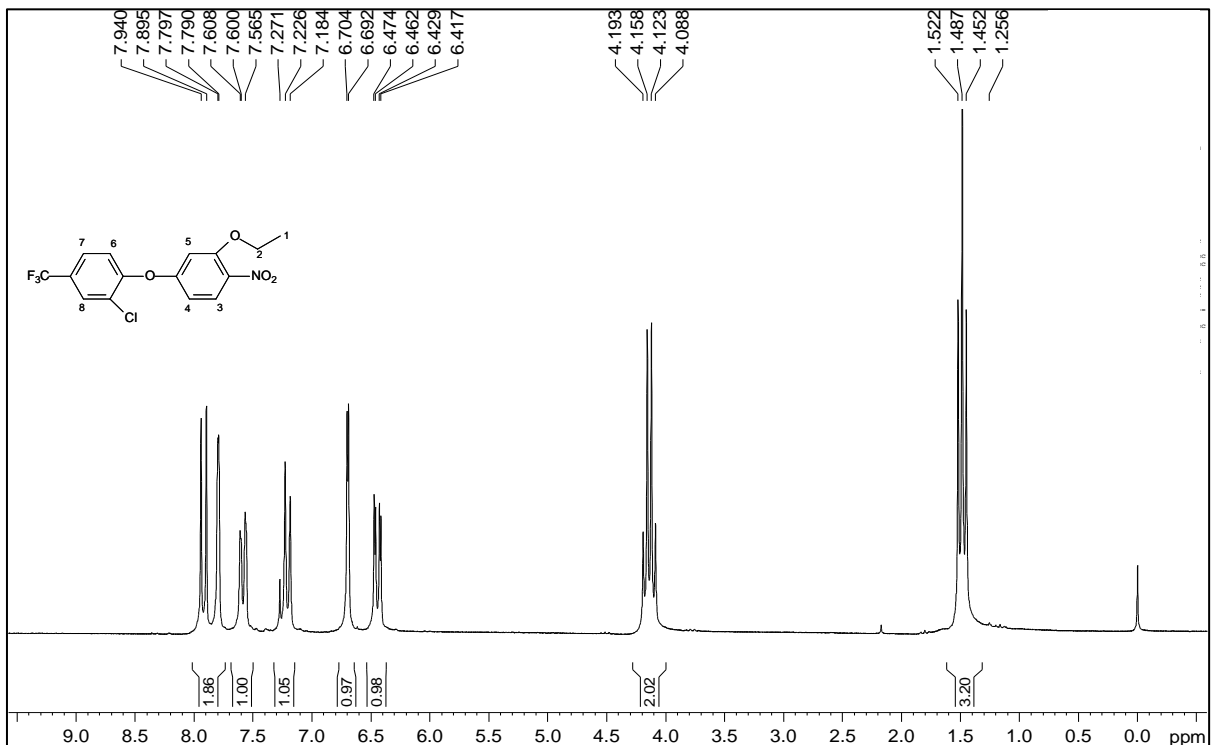


Figura 12 - Espectro de RMN ¹H (DMSO deuterado, 200 MHz) do oxifluorfem

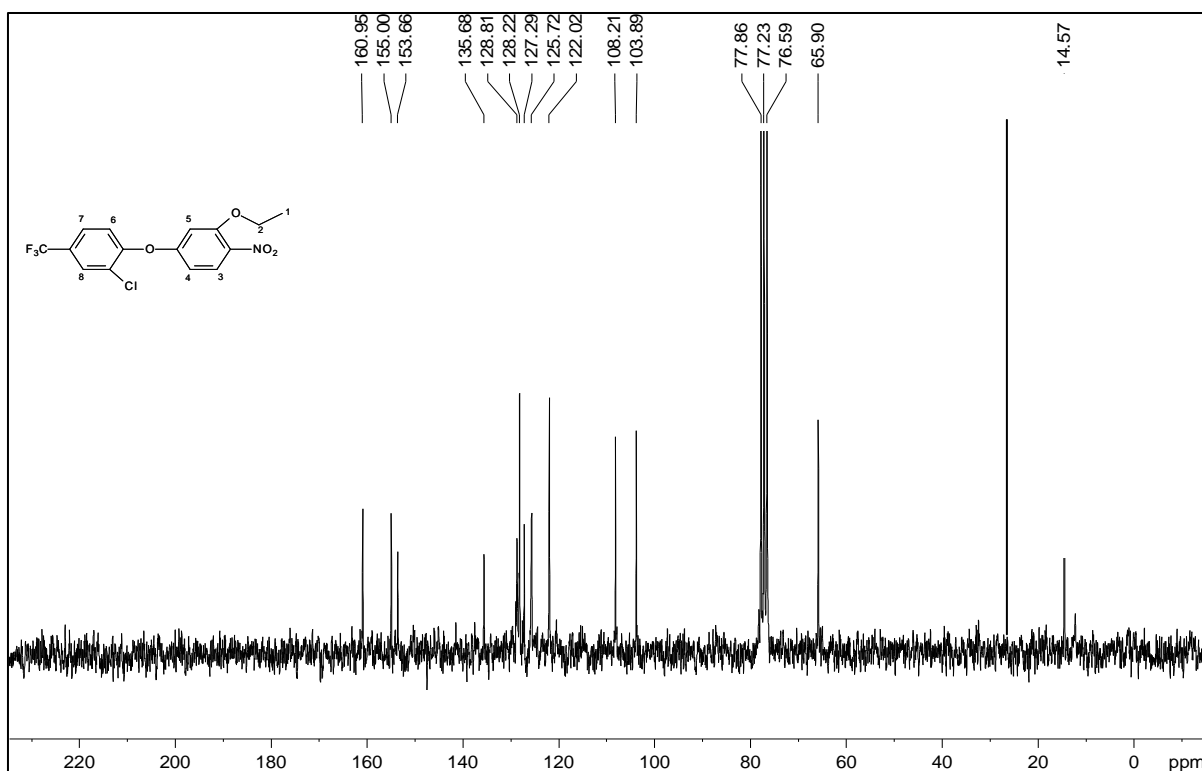


Figura 13 - Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz) do oxifluorfen

Os espectros obtidos são compatíveis com as estruturas químicas dos herbicidas.

A pureza da atrazina e do oxifluorfen, após a recristalização, foi determinada pela injeção em cromatógrafo a gás do padrão de referência e da substância purificada (teste). Foram preparadas soluções de três concentrações do padrão e do teste, em triplicata, em acetato de etila.

Os resultados de pureza da atrazina, determinados por integração da área do pico no tempo de retenção de 14,3 minutos, estão apresentados na Tabela 6.

Na Figura 14 é apresentado um cromatograma da injeção do padrão da atrazina e da substância purificada. Pode-se observar a sobreposição dos picos referentes ao herbicida indicando pureza superior a 99% e a ausência de outros picos.

Tabela 6 – Determinação da pureza da atrazina por injeção no CG juntamente com o padrão cromatográfico

	Concentração (ng/μL)	Padrão (ng/μL)	Teste (ng/μL)	% Pureza
1	2,04	2,07599	2,02637	98,33 %
	2,04	2,05247	2,02462	
	2,04	2,05530	2,02976	
2	3,06	3,01773	3,05595	101,10 %
	3,06	3,02081	3,04945	
	3,06	3,01395	3,04673	
3	4,08	4,10311	4,05103	98,76 %
	4,08	4,10704	4,03410	
	4,08	4,09361	4,06693	
Resultado pureza:				99,40%

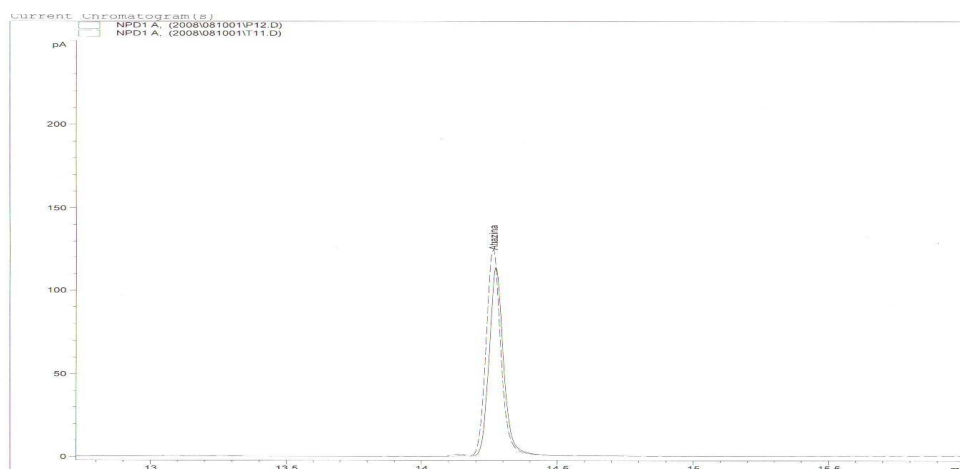


Figura 14 – Cromatograma do padrão de referência e da atrazina purificada.

Na Tabela 7 estão descritos os resultados referentes ao grau de pureza do oxifluorfem.

Na Figura 15 é apresentado um cromatograma da injeção do padrão do oxifluorfem e da substância purificada. Verifica-se a sobreposição dos picos no tempo de retenção de 14,0 minutos e o alto grau de concordância entre eles, além da ausência de outros picos.

Tabela 7 – Determinação da pureza do oxifluorfem por injeção no CG juntamente com o padrão cromatográfico

	Concentração (ng/μL)	Padrão (ng/μL)	Teste (ng/μL)	% Pureza
1	6,24	6,65595	6,56996	
	6,24	6,65296	6,56658	98,75 %
	6,24	6,65498	6,57763	
2	9,36	8,51785	8,68028	
	9,36	8,54478	8,66887	101,71 %
	9,36	8,52958	8,68077	
3	12,48	12,94701	12,79743	
	12,48	12,87837	12,78538	99,43 %
	12,48	12,85852	12,88224	
Resultado pureza:			99,96 %	

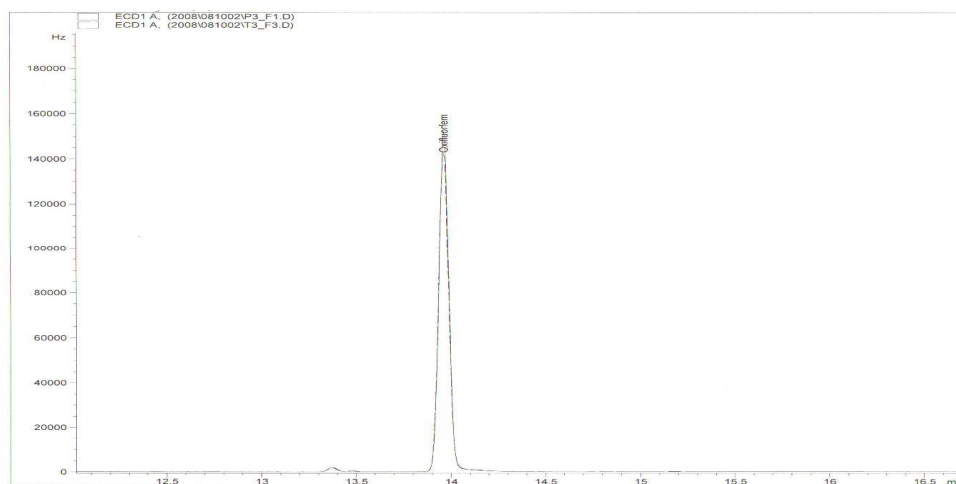


Figura 15 – Cromatograma do padrão de referência e do oxifluorfem purificado.

Os valores médios de pureza foram 99,4% e 99,9% (ambos acima de 95%) para atrazina e oxifluorfem, respectivamente, possibilitando utilização dos mesmos nos experimentos de toxicidade e biodegradação.

5.2 Contagem celular X densidade óptica

A metodologia de contagem celular ao microscópio óptico para obtenção da densidade celular da cultura da cianobactéria é uma técnica tradicional, porém trabalhosa, demorada e que apresenta uma grande variabilidade. Métodos alternativos são propostos na tentativa de estimar, com maior precisão, o crescimento celular.

Vários estudos já foram realizados utilizando a correlação entre contagem celular e a densidade óptica a 680 nm (DO_{680}) para monitoramento do crescimento de algas (MA *et al.*, 2001, MA e CHEN, 2005; DELORENZO, SCOTT e ROSS, 2001; ROJIOKOVÁ-PADRTOVÁ, 1999; TANG, HOAGLAND SIEGFRIED, 1997). O próprio Guia da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), 2006, para o teste de toxicidade de substâncias químicas sobre microalgas e cianobactérias, prevê o uso da densidade óptica como forma de acompanhamento do crescimento desses organismos, desde que exista uma boa correlação entre as medidas realizadas e a contagem celular. O comprimento de onda 680 nm é o mais utilizado para o monitoramento do crescimento de cianobactérias.

O monitoramento do crescimento celular da *Microcystis novacekii* por meio da contagem por microscopia óptica e por densidade óptica a 680 nm apresentou correlação linear de 91%, sendo possível a utilização da densidade óptica para estimar rapidamente o crescimento celular da espécie. A curva de correlação é apresentada na Figura 16.

A correlação entre absorvância e contagem celular também foi avaliada para a cianobactéria na presença dos pesticidas, já que a exposição aos mesmos poderia interferir no espectro de absorção, comprometendo a correlação entre os dois parâmetros de contagem.

Na presença de atrazina (100 $\mu\text{g/L}$) a correlação se manteve ($r^2 = 0,89$), indicando que na faixa de concentração avaliada a exposição ao pesticida não altera significativamente a relação entre as duas variáveis (Figura 17).

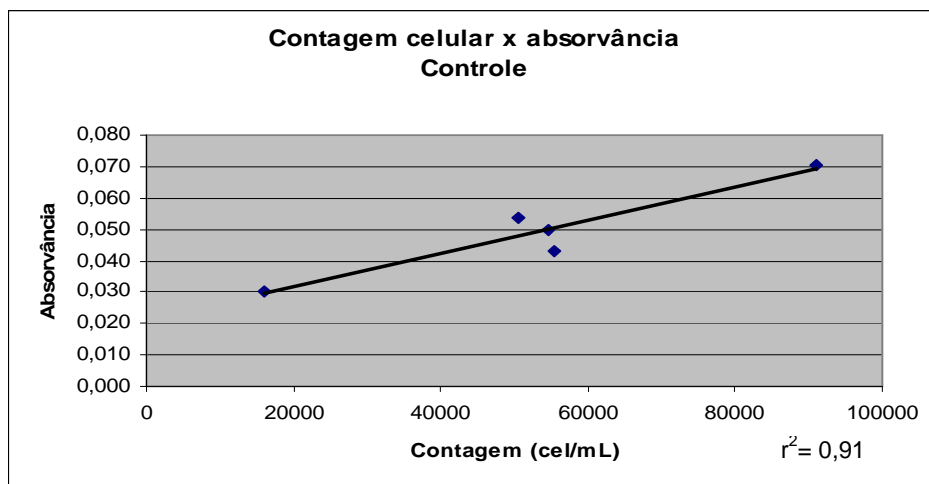


Figura 16 – Correlação entre absorvância a 680 nm e contagem celular para *Microcystis novacekii*.

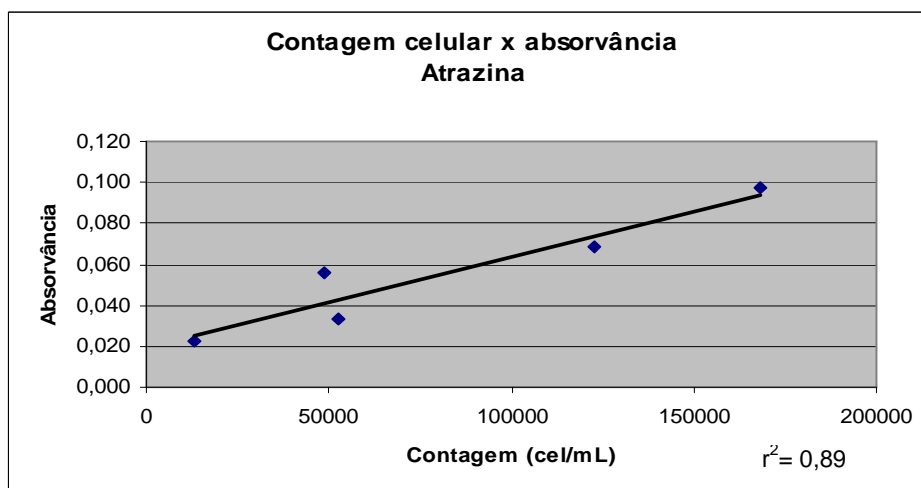


Figura 17 – Correlação entre absorvância a 680 nm e contagem celular para *Microcystis novacekii* na presença de atrazina (100 µg/L).

O mesmo foi observado com relação ao oxifluorfem. Na Figura 18 é apresentada a curva de correlação entre a contagem ao microscópio óptico e a densidade celular da *Microcystis novacekii* na presença de oxifluorfem (1000 µg/L). O coeficiente de correlação linear foi de 0,84.

Embora o coeficiente de correlação seja menor que o observado para a cultura não exposta aos pesticidas, a grande variabilidade no método de contagem ao

microscópio óptico e o pequeno número de observações podem ser responsáveis por essas variações.

Em ambos os casos as correlações observadas foram consideradas aceitáveis para a avaliação do crescimento da espécie frente aos pesticidas, permitindo a utilização da densidade óptica para estimar o crescimento da *Microcystis novacekii* nos testes de toxicidade e biodegradação.

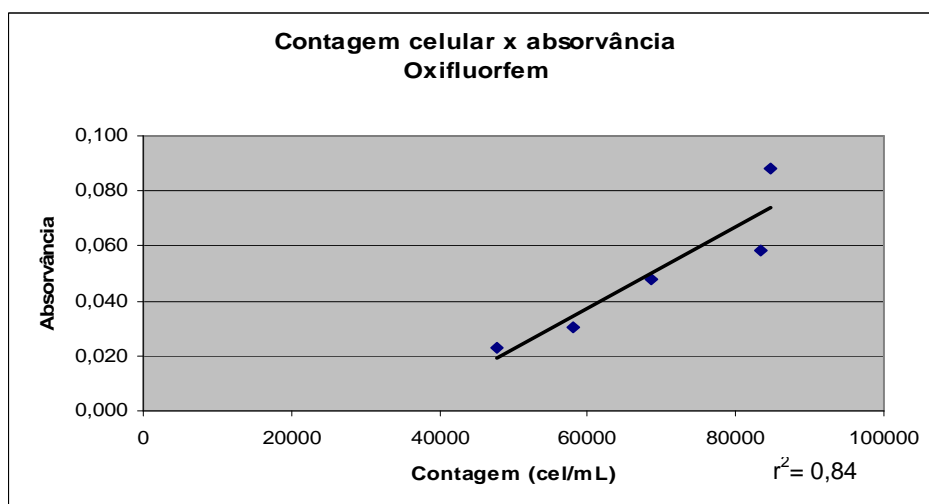


Figura 18 - Correlação entre absorvância a 680 nm e contagem celular para *Microcystis novacekii* na presença de oxifluorfem (1000 µg/L).

5.3 Ensaio de biodegradação

Segundo a OECD (2003), a necessidade de avaliação da biodegradação de pesticidas deve-se ao fato de que a degradação de compostos orgânicos no ambiente influencia a exposição das várias espécies aos mesmos, sendo, portanto, um parâmetro importante para a estimativa dos riscos e efeitos adversos às espécies. Além de fornecer informações e subsidiar decisões a respeito das aplicações biotecnológicas.

Este método padrão de avaliação de biodegradação de xenobióticos estabelece uma variação na concentração do xenobiótico de forma a obter-se estimativas de biodegradação em diferentes concentrações. Baixas concentrações das substâncias

devem ser testadas, garantindo que a cinética de biodegradação obtida nos ensaios reflita àquela esperada no ambiente que está sendo simulado.

Para os estudos da biodegradação da atrazina e do oxifluorfem foram estabelecidas inicialmente concentrações a serem testadas supondo que a degradação do pesticida teria uma cinética linear com relação a concentração de exposição. Ao mesmo tempo, as concentrações deveriam permanecer em uma faixa compatível com as observadas para os pesticidas nos programas de monitoramento.

5.3.1 Biodegradação atrazina

A quantificação da atrazina nos testes de biodegradação foi obtida por integração da área do pico referente ao pesticida, comparada com a curva de calibração apresentada na Figura 19.

Embora a extração em fase sólida seja um procedimento bem estabelecido, com resultados sistemáticos, a padronização do método de extração foi avaliada para ambos os pesticidas. Nas condições padronizadas (item 4.11) a taxa de recuperação média da atrazina foi de 96,4%.

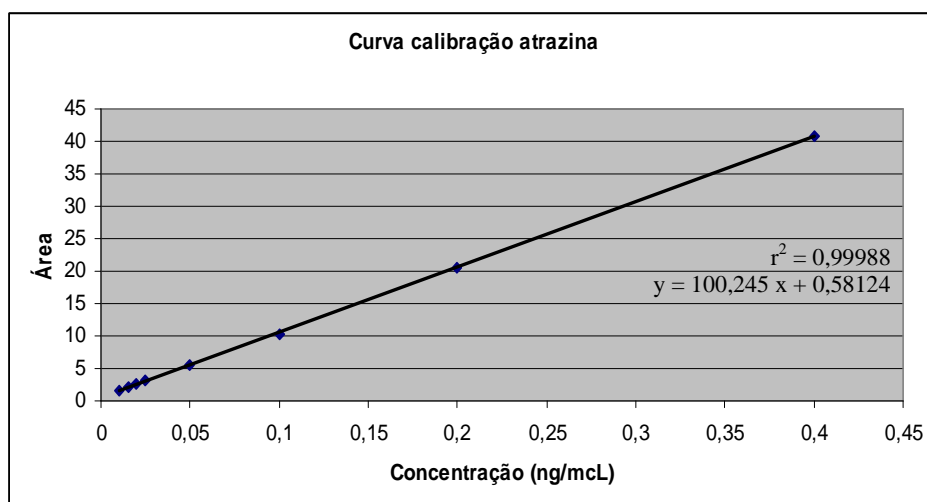


Figura 19 – Curva de calibração para quantificação atrazina

Os ensaios de biodegradação foram realizados durante quatro dias. A inoculação do pesticida no meio de cultura não promoveu alterações visíveis sobre o crescimento

da cultura. Não foi observado descolorimento, aglutinação ou qualquer outro comportamento atípico.

Os resultados referentes à remoção da atrazina pela *Microcystis novacekii*, durante 96 horas de experimento, são apresentados na Tabela 8. Na Figura 20 pode-se observar a variação da densidade óptica com o tempo de monitoramento.

Tabela 8 – Resultados da biodegradação da atrazina pela cianobactéria *Microcystis novacekii*

Concentração Avaliada (µg/L)	Início Experimento (µg/L) A	Final Experimento (µg/L) B	Porcentagem Degradação A - B
<i>Controles (sem Microcystis novacekii)</i>			
25	23,22	22,87	1,51
50	55,89	57,03	1,02*
100	107,12	88,49	17,39
250	224,67	232,04	1,03*
500	602,28	548,38	8,95
<i>Testes (com Microcystis novacekii)</i>			
25	24,51	22,88	6,65
50	46,54	34,41	26,06
100	120,10	79,20	34,05
250	258,35	196,21	24,05
500	580,74	397,89	31,49
<i>Varição entre as taxas de biodegradação e degradação espontânea (%) (Testes – Controles)</i>			
	25		5,14
	50		26,06
	100		16,66
	250		24,05
	500		22,54

*Variações das condições analíticas sem significado experimental.

Os maiores valores de remoção, em relação à degradação espontânea do pesticida, foram encontrados nas concentrações 50, 250 e 500 µg/L e a média de degradação obtida foi de 22,2%, considerando as concentrações de 50 a 500 µg/L.

Nas concentrações do pesticida menores que 50 µg/L a degradação foi pouco significativa com relação ao controle (5,1%).

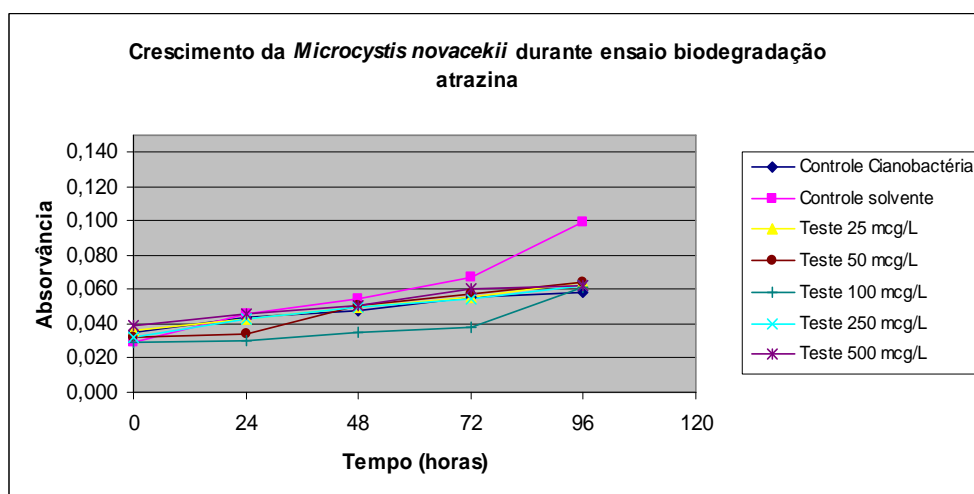


Figura 20 – Monitorização por DO_{680} do crescimento da *Microcystis novacekii* durante ensaio de biodegradação da atrazina

Estes resultados são concordantes com alguns estudos descritos na literatura para a degradação da atrazina por outros micro-organismos. No trabalho de Mandelbaum, Allan e Wackett (1995) é relatada a degradação de 17% do herbicida por uma cepa de *Pseudomonas* em amostras de solo contaminadas com 1,5 µg/g do pesticida.

Resultados semelhantes são descritos por Iuv e El (1975) para degradação e acumulação de outro herbicida da classe das triazinas, bastante semelhante à atrazina, a simazina, pela cianobactéria *Anabaena variabilis*. A taxa de degradação máxima do herbicida no meio foi de 18%.

Estes dados podem ser justificados pela grande estabilidade desse pesticida no meio aquoso. Nos estudos de monitoramento ambiental a atrazina é um dos pesticidas mais encontrados. Sua estabilidade em meio aquoso neutro, aliada a

baixa taxa de biodegradação pelas espécies aquáticas são responsáveis pela sua grande persistência ambiental.

É conhecido, entretanto, que existe grande variabilidade entre os micro-organismos na efetividade de degradação da atrazina. González-Barreiro *et al.* (2006) em estudo avaliando a capacidade de remoção de herbicidas triazínicos do meio de cultura pela cianobactéria *Synechococcus elongatus* verificou que a mesma foi capaz de remover até 80% da atrazina do meio em 24 horas.

A biodegradação é dependente basicamente dos fenômenos de captação, fortemente relacionados à lipofilia, dos mecanismos de transporte transmembrana e da capacidade dos sistemas metabólicos da espécie de utilizar o xenobiótico (compostos químicos estranhos a um organismo ou sistema biológico) como substrato, promovendo alterações estruturais que visam, em última análise, a detoxificação celular.

Quando se consideram diferentes espécies, a capacidade metabólica pode sofrer grandes variações e as vias enzimáticas podem atuar de forma diferenciada frente ao xenobiótico. A *Microcystis novacekii*, aparentemente, apresenta capacidade metabólica limitada para degradação da atrazina, ao contrário do observado para a espécie *Synechococcus elongatus*. A espécie, *Microcystis novacekii*, portanto, pode apresentar uma forma de remoção ou uma via de degradação diferente para a atrazina.

Struthers, Jayachandran e Moorman (1998) verificaram que a incorporação celular e a mineralização da atrazina era dependente da presença de fontes de carbono adicionais ao meio de cultura de espécies bacterianas não fotossintetizantes. Nas condições experimentais, onde a atrazina era a única fonte de carbono, a taxa de degradação da mesma foi menor do que 10%. A adição de sacarose ao meio fez com que esses valores atingissem quase 60%.

Considerando que nos experimentos realizados a atrazina era a única fonte de carbono presente no meio WC e o período relativamente curto da duração do ensaio (96 horas), novos estudos devem ser conduzidos alterando-se as condições de

cultivo e o tempo de exposição, buscando aumentar as taxas de biodegradação da atrazina pela *Microcystis novacekii*.

A existência de concentrações limítrofes de pesticidas para desencadear o processo de biodegradação recebe pouca atenção na literatura, mas é relevante quando o micro-organismo é exposto a concentrações extremamente baixas de um xenobiótico. Por exemplo, apesar das taxas de biodegradação do fenol, benzoato, benzilamina e 4-nitrofenol em ambientes aquáticos serem lineares por uma ampla faixa de concentração dos substratos, que se estende entre ng/L e µg/L, foi verificado que as taxas de biodegradação do 2,4-D em concentrações da ordem de µg/L foram extremamente baixas (BOETHLING e ALEXANDER, 1979). Esta observação foi em seguida confirmada para outros compostos por Hoover *et al.* (1986).

Estes dados podem ser interpretados como suporte ao conceito da existência de uma concentração limiar, abaixo da qual a biodegradação não ocorre, ou acontece em taxas insignificantes. Embora as razões para a existência dessa concentração limiar não estejam completamente elucidadas, duas hipóteses podem ser apresentadas. Primeiro: as concentrações do substrato podem ser muito baixas para um efetivo transporte para dentro da célula. Segundo: pode haver uma concentração limitante (mínima) do substrato necessária para a indução do sistema enzimático. Em concentrações muito baixas as enzimas necessárias podem não ser ativadas, e isto poderia ser um fator limitante para a biodegradação (NEILSON e ALLARD, 2007).

Nos cromatogramas obtidos não foi verificada a presença de outros picos significativos que pudessem representar a formação de metabólitos de degradação da atrazina. O ocorrido pode estar relacionado com o método analítico utilizado. No entanto, este fato pode sugerir também acumulação do pesticida pela *Microcystis novacekii* e não uma degradação. Geller (1980) avaliando o potencial de biodegradação da atrazina por bactérias isoladas de solo, verificou que o herbicida não era degradado pelos micro-organismos, mas se ligava às células bacterianas, sendo removido do meio.

Megharaj *et al.* (1994) observaram que algas verdes e cianobactérias foram capazes de metabolizar o metilparation, convertendo-o ao produto de hidrólise e, em seguida, utilizar o p-nitrofenol como fonte de carbono fazendo sua completa remoção do meio.

Trabalhando-se com concentrações residuais, a possível formação de metabólitos no meio de cultivo pode ocorrer em concentrações muito baixas, dificultando sua recuperação durante o procedimento analítico.

De acordo com OECD (2003), baixas concentrações das substâncias teste devem ser utilizadas nos ensaios para determinar as taxas de biodegradação. As concentrações não devem ser elevadas de forma a garantir que a cinética obtida no teste reflita aquela esperada para as condições ambientais. Altas concentrações são geralmente utilizadas em testes com objetivo de identificação e quantificação dos produtos de transformação.

De toda forma, a remoção média de 22,2% da atrazina pela *Microcystis novacekii* em condições de cultivo em laboratório sugere que a cianobactéria pode desempenhar um papel considerável na recuperação de ambientes aquáticos contaminados por este herbicida; particularmente quando se trata de um tempo de monitoramento de apenas 96 horas. No entanto, podem ser consideradas alterações nas condições experimentais para os próximos estudos, a fim de otimizar os resultados obtidos.

5.3.2 Biodegradação oxifluorfem

A quantificação do oxifluorfem foi obtida por integração da área do pico referente ao pesticida, comparada com a curva de calibração do mesmo (Figura 21).

A taxa de recuperação média do oxifluorfem pela metodologia de SPE, seguindo as condições padronizadas pelo item 4.11, foi de 81,7%.

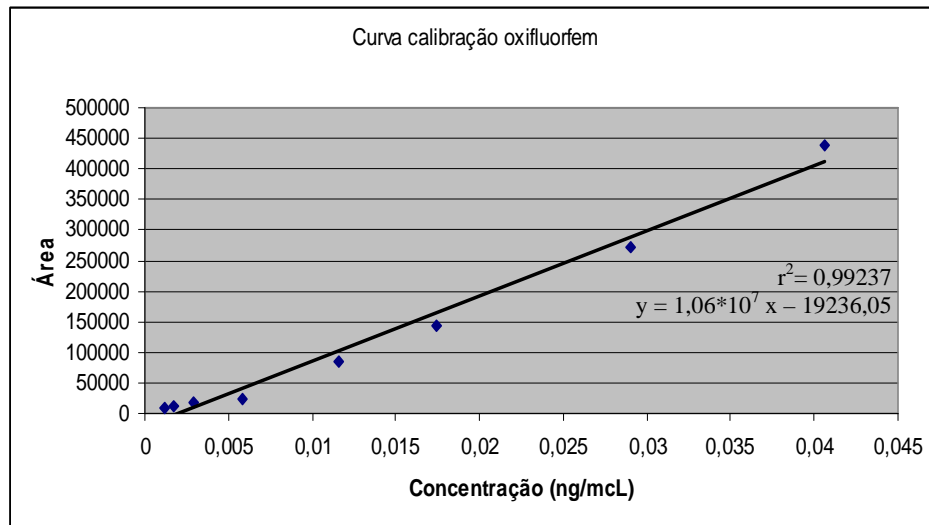


Figura 21 – Curva de calibração para quantificação do oxifluorfen

Os resultados referentes ao teste de biodegradação do oxifluorfen pela *Microcystis novacekii*, após 96 horas de experimento, são apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados da biodegradação do oxifluorfen pela cianobactéria *Microcystis novacekii*

Concentração Avaliada (µg/L)	Início Experimento (µg/L) A	Final Experimento (µg/L) B	Porcentagem Remoção A – B
Controles (sem <i>Microcystis novacekii</i>)			
25	26,08	24,77	5,0
50	42,63	30,47	28,5
100	98,08	79,77	18,7
250	276,48	111,18	59,8
500	418,80	58,50	86,0
Testes (com <i>Microcystis novacekii</i>)			
25	15,12	9,62	36,4
50	10,92	10,48	4,0
100	12,88	10,90	15,4
250	21,00	12,47	40,6
500	36,17	13,42	62,9

Na Figura 22 pode-se observar a curva de crescimento da cultura da *Microcystis novacekii* estimada por DO₆₈₀ durante as 96 horas de monitoramento.

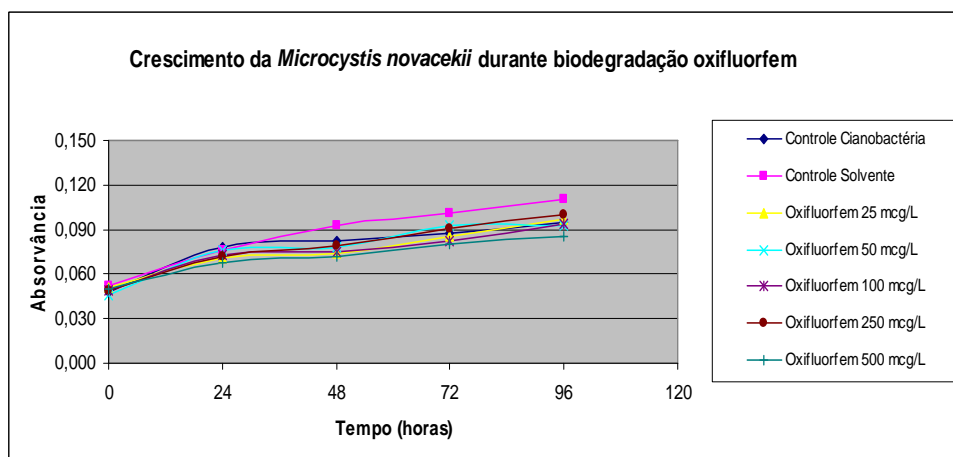


Figura 22 – Monitorização por DO₆₈₀ do crescimento da *Microcystis novacekii* durante ensaio de biodegradação do oxifluorfem

Os resultados em termos de remoção do herbicida do meio de cultivo apresentaram difícil sistematização. Verificou-se logo no início do experimento uma diferença entre os valores encontrados para os grupos controle e teste. As concentrações de oxifluorfem nos testes foram bem menores do que no grupo controle.

Considerando o curto período de contato entre a cianobactéria e o pesticida, descartou-se a possibilidade de biodegradação do mesmo. As evidências podem sugerir tratar-se de adsorção do oxifluorfem pelas células da *Microcystis novacekii*.

É descrito na literatura a capacidade das algas e cianobactérias em apresentar na superfície celular sítios de adsorção de metais pesados e de uma série de substâncias dissolvidas no meio aquoso; particularmente quando estas apresentam na sua superfície grupos catiônicos. Essas propriedades fazem desses organismos potenciais adsorventes de uma grande variedade de xenobióticos do ambiente. No entanto, os mecanismos bioquímicos responsáveis por essa remoção e assimilação são pouco conhecidos (HUNTLEY, 1989).

Alguns autores afirmam que o primeiro passo na biodegradação de um pesticida é decorrente de um processo passivo envolvendo a partição do composto entre o meio

externo aquoso e a porção hidrofóbica da célula. Segundo Cáceres, Megharaj e Naidu (2008), a bioacumulação de substâncias químicas em ambientes aquáticos ocorre quando a taxa de captação excede a taxa de eliminação e parece estar relacionada ao coeficiente de partição octanol /água (K_{ow}). Substâncias químicas e seus metabólitos com K_{ow} maior que 3 tendem a um maior potencial de bioacumulação. Considerando que o K_{ow} do oxifluorfem é 4,47 (EXTOXNET, 2002), ele se encaixa neste perfil.

Os compostos orgânicos hidrofóbicos, como o oxifluorfem, não se associam com todas as partículas de uma forma semelhante, preferindo se ligar a superfícies lipídicas ou com alto teor de carbono orgânico. O equilíbrio de concentração entre um composto orgânico hidrofóbico e as algas e cianobactérias, por exemplo, é descrito como fator de bioacumulação (BAF – *Bioaccumulation Factor*). O fator de bioacumulação pode apresentar diferentes valores para compostos e espécies diferentes. O tipo de lipídeo que constitui a parede celular dos micro-organismos também pode alterar o fator de bioacumulação (SWACKHAMER e SKOGLUND, 1991).

Encontram-se descritos na literatura para o gênero *Microcystis* sp valores para o fator de bioacumulação para bifenilas policloradas de 1.000 a 1.000.000; tais valores são considerados muito elevados, indicando o grande potencial do gênero na remoção destes compostos do meio (SWACKHAMER e SKOGLUND, 1991).

A remoção de compostos orgânicos hidrofóbicos pode ser por simples sorção na superfície ou por ligantes presentes na parede celular seguido de transporte ativo. O equilíbrio pode ser atingido em poucas horas a até três dias. No entanto, os relatos na literatura de trabalhos realizados que elucidem os mecanismos são escassos (SWACKHAMER e SKOGLUND, 1991).

González-Barreiro *et al.* (2006) verificaram que pesticidas mais lipofílicos e conseqüentemente com maior coeficiente de partição (K_{ow}) apresentam tendência de serem removidos do meio de cultura mais rapidamente através de adsorção pelas células das algas e cianobactérias.

Dhanaraj, Kumar e Lal (1989) verificaram a capacidade de duas cianobactérias, *Anabaena* sp e *Aulosira fertilissima* em bioconcentrar os pesticidas aldrin e forato. A remoção dos compostos do meio de cultivo foi diretamente proporcional à concentração dos inseticidas e inversamente proporcional à solubilidade dos mesmos em água. A bioconcentração do aldrin pela *Anabaena* sp e pela *A. fertilissima* foi de 3,9 a 247,5 µg/g respectivamente e foi alcançada entre 8 e 16 horas.

Navarro *et al.* (2009) compararam a habilidade de duas algas marinhas *Macrocystis integrifolia* e *Lessonia migrescens* e dois adsorventes abióticos na remoção de fenóis de soluções aquosas. As algas apresentaram maior potencial de adsorção. Os autores afirmam que a diferença na composição da parede celular altera a capacidade de adsorção de xenobióticos do meio e que o coeficiente de partição octanol/água desempenha um importante papel na adsorção de compostos orgânicos.

Em estudo conduzido por Jonsson *et al.* (2001) verificou-se que a alga *Chlorella sacchrophila* é capaz de acumular o pesticida piridafention do meio aquoso e que a taxa de remoção do mesmo diminui enormemente depois que se atinge um alto nível de concentração. A espécie apresentou alta capacidade de remoção no início do experimento, mas com o decorrer do tempo cessou a remoção do composto – apesar do decaimento da concentração do pesticida e da taxa de crescimento da cianobactéria.

O fato sugere a ativação de mecanismos celular de detoxificação com provável saturação ou inibição por altas concentrações do pesticida. Modelos similares de remoção de DDT pelas cianobactérias *Anabaena* sp e *Aulosira fertilissima* também foram observados (HUNTLEY, 1989).

Em um primeiro momento, no início do teste, a alteração da concentração do herbicida no meio de cultivo pode ter sido referente à presença da cianobactéria, mas os resultados do grupo controle evidenciaram, ao final do experimento, uma elevada remoção do pesticida, principalmente para a concentração 500 µg/L, na qual a taxa de remoção foi de 86,0% nas 96 horas de experimento.

Essa remoção pronunciada do herbicida nos frascos controles pode indicar que outros processos de remoção não biológica ocorreram, não permitindo, portanto, a afirmação da ocorrência de bioacumulação do mesmo pela *Microcystis novacekii*.

Duas hipóteses podem ser colocadas com relação à remoção do oxifluorfem do meio de cultivo nos frascos controle.

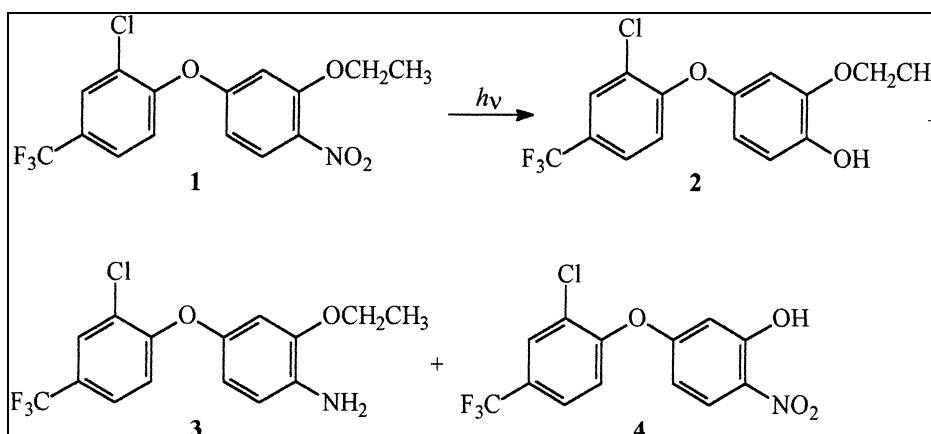
Primeiro: embora nenhum pico adicional tenha sido identificado nos cromatogramas dos testes de biodegradação, pode-se considerar a possibilidade de uma alta taxa de degradação espontânea. Nesse caso, as condições experimentais de extração podem não ter permitido a detecção dos produtos de degradação.

Uma segunda hipótese é de que a alta lipofilia do oxifluorfem e conseqüentemente baixa solubilidade em meio aquoso tenha propiciado a adesão do pesticida às paredes do frasco. No início do experimento adicionou-se o pesticida, fez-se rápida homogeneização e retirou-se amostra para análise. Com o decorrer do tempo do experimento e a agitação contínua propiciou-se o contato do herbicida com as paredes do frasco. O mesmo pode ter ocorrido com os frascos teste. No primeiro momento, o contato do herbicida com as células foi maior, sendo em grande parte removido. O restante ficou disponível para interação com o recipiente durante o experimento.

Considerando a hipótese de degradação espontânea, deve-se ponderar que o oxifluorfem é estável à hidrólise, sendo a fotólise a forma de degradação mais provável do mesmo. Essa transformação é descrita e ocorre principalmente quando o herbicida se encontra em águas límpidas (SCRANO *et al.*, 1999; USEPA, 2002). Na Figura 23 é apresentado esquema de fotólise do oxifluorfem e seus produtos de degradação.

Salienta-se, entretanto, que em ambientes naturais a água é rica em matéria orgânica e dependendo do tipo de solo, a água pode conter elevada turbidez, limitando a penetração da luz, o que dificulta a degradação por via fotolítica. O oxifluorfem, pode, assim, persistir no ambiente. Não se pode, portanto, afirmar que a

cianobactéria não exerça um papel na degradação do oxifluorfem em condições ambientais.



1. oxifluorfem
 2. 2-cloro-1-(3-etoxi-4-hidroxifenoxi)-4-(trifluormetil)benzeno
 3. 2-cloro-1-(3-etoxi-4-aminofenoxi)-4-(trifluormetil)benzeno
 4. 2-cloro-1-(3-hidroxí-4-nitrofenoxi)-4-(trifluormetil)benzeno
- Fonte: Scrano *et al.*, 1999.

Figura 23 – Fotólise do oxifluorfem e a formação de metabólitos

O meio de cultura utilizado nos experimentos é límpido e com baixo teor de compostos orgânicos (não há partículas visíveis em suspensão) os quais poderiam funcionar como protetores da molécula do herbicida em relação à radiação.

Considerando que estudos de monitoramento comprovam a existência do oxifluorfem como contaminante dos corpos d'água (USDA, 2005; SCRANO *et al.*, 2004; YEN, SHEU e WANG, 2003; LAGANA *et al.*, 2000), presume-se que no meio ambiente a fotodegradação do mesmo não ocorra com tanta intensidade.

Dessa forma, os resultados de remoção encontrados ao final do experimento representam uma possibilidade de remoção do oxifluorfem do meio pela cianobactéria, associado a degradação abiótica do mesmo ou sua deposição nas paredes do frasco.

Deve-se considerar que a etapa de filtração do meio de cultivo para a obtenção das alíquotas para o procedimento analítico pode ter sido um fator colaborador para a

diminuição da concentração do oxifluorfem nos testes, pois, com a filtração, a conseqüente concentração celular na membrana pode ter favorecido a retenção do pesticida na biomassa algal.

De qualquer forma, os possíveis produtos de fotólise ou a adsorção do pesticida pela *Microcystis novacekii* não apresentaram toxicidade para a cianobactéria durante o experimento, haja vista Figura 20 referente ao crescimento da *Microcystis novacekii* durante o ensaio de biodegradação do oxifluorfem. Aparentemente esses processos não comprometeram o desenvolvimento da espécie.

Os resultados dos testes de biodegradação indicaram potencial da cianobactéria *Microcystis novacekii* na remoção dos pesticidas atrazina e oxifluorfem do meio de cultivo. Para o oxifluorfem a elucidação dos mecanismos de remoção devem ser melhor investigados. Futura aplicação biotecnológica da cianobactéria no tratamento de corpos d'água e efluentes contaminados por esses herbicidas deve ser considerada.

5.4 Toxicidade

O Protocolo OECD (2006) padroniza as condições experimentais para a determinação dos efeitos de uma substância no crescimento de microalgas e cianobactérias, com objetivo de avaliar o efeito de substâncias químicas tóxicas sobre organismos representativos do ecossistema aquático. Mas, devido à complexidade do ambiente aquático e ao grande número de processos aos quais está sujeito um contaminante neste ambiente, existem limitações na extrapolação para escala ambiental as informações provenientes dos testes de toxicidade realizados em laboratório. No entanto, estes testes são imprescindíveis para predizer possíveis efeitos tóxicos dos contaminantes sobre espécies aquáticas.

Foram realizados ensaios preliminares com o objetivo de estabelecer o intervalo de concentrações a ser utilizado no planejamento dos ensaios de toxicidade. A partir dos resultados obtidos nestes ensaios, preparou-se uma série de cinco concentrações para cada pesticida, que constituíram as soluções-teste para o ensaio de toxicidade, conforme apresentado anteriormente na Tabela 3.

Gherardi-Goldstein *et al.* (1990) alertam para o fato dos resultados dos ensaios de toxicidade e sua confiabilidade dependem do controle adequado das condições de ensaio. No presente trabalho, todos os testes foram realizados com pH ajustado para $7,0 \pm 0,5$, temperatura de $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, fotoperíodo 12 horas claro/escuro com intensidade luminosa de 3500 lux e agitação contínua de aproximadamente 100 rpm.

5.4.1 Toxicidade atrazina

Os resultados para o teste de toxicidade da atrazina para a *Microcystis novacekii* são apresentados na Tabela 10 e na Figuras 24 e 25.

Tabela 10 – Inibição do crescimento da *Microcystis novacekii* pelo herbicida atrazina

Concentração Teste ($\mu\text{g/L}$)	ln (x)	% Inibição (y)
1000	6,9077	24,66
2000	7,6009	37,42
4000	8,2940	45,53
8000	8,9872	58,49
10000	9,2103	70,74

Valores do gráfico apresentado na Figura 23

r^2 : 0,9618

Equação da reta: $y = -103.12 + 18.35 x$

EC₅₀ (96 horas): 4202,6 $\mu\text{g/L}$

A interpolação do valor de 50% de inibição do crescimento na curva de toxicidade permite a obtenção da EC₅₀ (96 horas) da atrazina para a *Microcystis novacekii*. Esse valor corresponde a concentração que promove 50 % de inibição do crescimento da espécie. Para a atrazina a EC₅₀ foi de 4,2 mg/L.

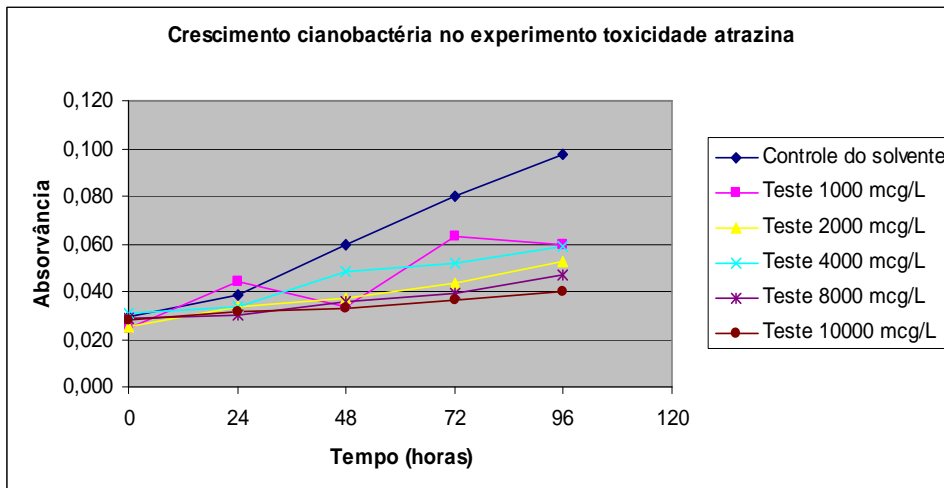


Figura 24 – Crescimento da *Microcystis novacekii* estimado por DO_{680} durante 96 horas de monitoramento do ensaio de toxicidade atrazina

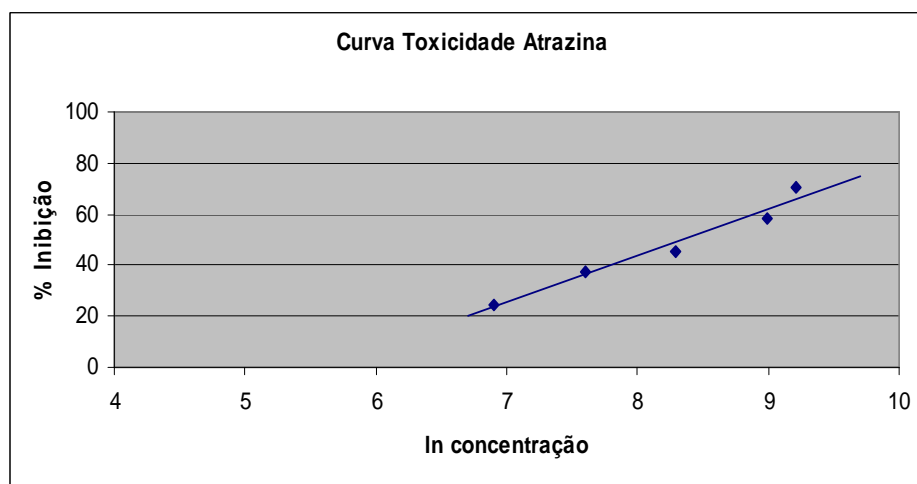


Figura 25 – Porcentagem de inibição do crescimento da *Microcystis novacekii* exposta à atrazina por 96 horas

5.4.2 Toxicidade oxifluorfem

Os resultados para o teste de toxicidade do oxifluorfem para a *Microcystis novacekii* são apresentados na Tabela 11 e nas Figuras 26 e 27.

Tabela 11 – Inibição do crescimento da *Microcystis novacekii*
 pelo herbicida oxifluorfem

Concentração Teste ($\mu\text{g/L}$)	$\ln(x)$	% Inibição (y)
2000	7.6009	23.28
4000	8.2940	36.32
8000	8.9872	39.23
16000	9.6803	46.27
20000	9.9035	53.73

Valores do gráfico apresentado na Figura 25

r^2 : 0,9442

Equação da reta: $y = -63.1051 + 11.567 x$

EC₅₀ (96 horas): 17639,9 $\mu\text{g/L}$

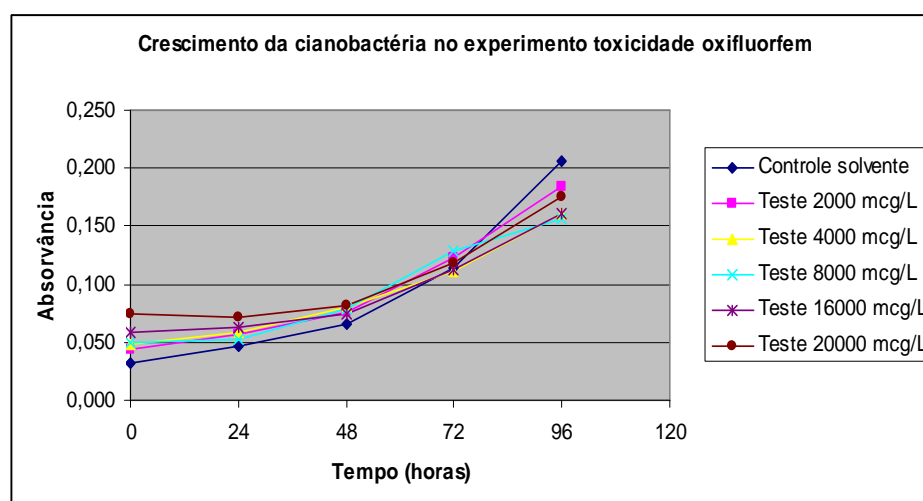


Figura 26 – Crescimento da *Microcystis novacekii* estimado por DO₆₈₀ durante 96 horas de monitoramento do ensaio de toxicidade do oxifluorfem

O valor da EC₅₀ (72 horas) obtido para oxifluorfem foi de 10,9 mg/L. Já a EC₅₀ (96 horas), calculada a partir da equação da reta (Tabela 11), para a espécie foi de 17,6 mg/L de oxifluorfem.

Esses resultados evidenciam um potencial da espécie de tolerar altas concentrações do pesticida. Os dados são condizentes com o fato das cianobactérias serem resistentes à exposição a vários xenobióticos, inclusive pesticidas (VIDOTTI e ROLLEMBERG, 2004).

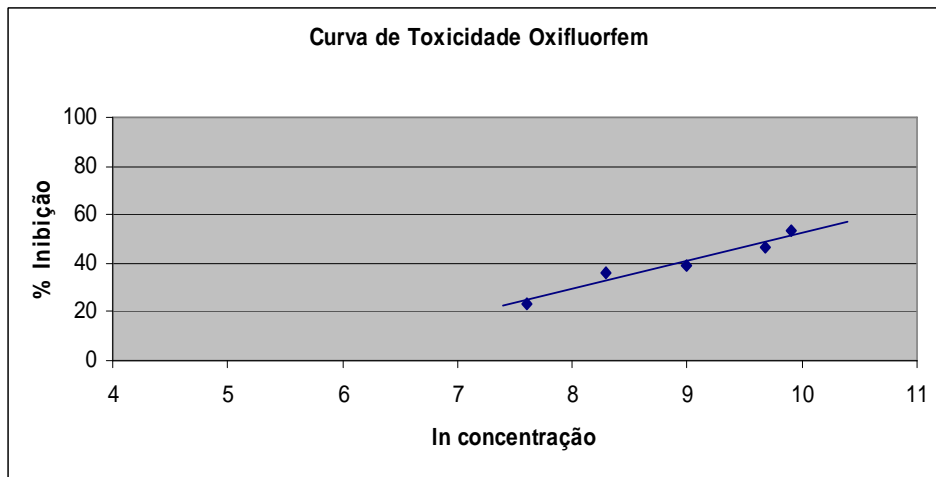


Figura 27 – Porcentagem de inibição do crescimento da *Microcystis novacekii* exposta ao oxifluorfem por 96 horas

A Portaria nº 518/2004 do Ministério da Saúde define como concentração máxima permitida de atrazina em água potável 2 µg/L e a legislação CONAMA nº 357/2005, que estabelece concentrações máximas permitidas de agentes tóxicos nos corpos d'água, adota o mesmo valor. Ambas as referências não contemplam limites para oxifluorfem. Contudo, pode-se observar que os dois pesticidas apresentaram EC_{50} elevada para a *Microcystis novacekii*, no caso da atrazina muito superior à tolerada pela legislação.

A comparação dos resultados obtidos neste trabalho com os encontrados na literatura nem sempre foi possível devido às diferenças das condições de ensaio, tais como o tempo de exposição à substância de referência, a espécie testada, a natureza da substância-teste e o tipo de resposta que se pretende obter.

Apesar do rápido desaparecimento do oxifluorfem do meio, apresentado nos testes de biodegradação, observou-se inibição do crescimento da *Microcystis novacekii* durante o teste de toxicidade. Independente do mecanismo envolvido neste processo, seja fotólise do herbicida com a possível formação de metabólitos ativos ou acumulação desse pela cianobactéria, existe correlação entre o aumento da concentração do pesticida e a inibição do crescimento da espécie. Ressalta-se que a toxicidade de um pesticida pode estar relacionada com a capacidade de remoção e bioacumulação do xenobiótico do meio pelas espécies de algas (TANG,

HOAGLAND e SIEGFRIED, 1998). Novas propostas de trabalho devem ser conduzidas com o intuito de elucidar os mecanismos de toxicidade envolvidos.

Conforme Delorenzo, Scott e Ross (2001), os mecanismos de toxicidade variam dependendo do tipo e das características do pesticida e da espécie exposta. De toda forma, verificou-se a inibição do crescimento da *Microcystis novacekii*, mesmo com a diminuição da concentração do pesticida no meio, que foi observado para o oxifluorfem.

A EC₅₀ de 4,2 mg/L da atrazina para *Microcystis novacekii* mostrou que esta espécie é mais tolerante a este herbicida do que outras cianobactérias. Como exemplo o trabalho realizado por Delorenzo, Scott e Ross (2001) obteve EC₅₀ da atrazina para a cianobactéria *Anabaena flos-aquae* 0,47 mg/L.

Como já era descrito na literatura para células superiores, o oxifluorfem mostrou-se menos tóxico que a atrazina para a cianobactéria. As concentrações que inibem o crescimento da espécie em 50% (EC₅₀) do oxifluorfem e da atrazina para a *Microcystis novacekii* são muito superiores às concentrações ambientais encontradas normalmente nos corpos d'água pelos estudos de monitoramento.

O fato das cianobactérias encontrarem-se na base da cadeia alimentar é um fator de preocupação quanto à toxicidade de xenobióticos para essas espécies. No caso dos pesticidas atrazina e oxifluorfem, ambos parecem não comprometer o crescimento da espécie estudada nas concentrações normalmente observadas em corpos d'água naturais.

Os dados de toxicidade são fundamentais para que se possa dar continuidade aos estudos de biodegradação. Substâncias altamente tóxicas para a espécie em estudo limitam sua utilização nos ensaios de biodegradação. A resistência da cianobactéria *Microcystis novacekii* a concentrações relativamente altas de pesticidas reforçam os relatos da literatura da grande capacidade dessas espécies de adaptação a ambientes hostis, indicando que o potencial metabolizador da cianobactéria *Microcystis novacekii* pode ser de grande importância na preservação da qualidade das águas.

5.4.3 O efeito do metanol sobre o crescimento da *Microcystis novacekii*

Foi observado durante os experimentos que o grupo controle do solvente (meio WC + cianobactéria + solvente) apresentou sistematicamente maior crescimento que a cultura controle.

A concentração de metanol utilizada foi a mesma para todos os testes e para os controles do solvente (0,05%) e não apresentou efeito de toxicidade para a cianobactéria. Pelo contrário, observou-se uma indução de crescimento da mesma.

Considerando os testes de biodegradação e toxicidade da atrazina e oxifluorfem (ver Figuras 20, 22, 24 e 26), a taxa média de indução de crescimento da *Microcystis novacekii* pelo metanol na concentração de 0,05%, nos controles, foi de 76,7% (utilizando as fórmulas n. 1 e 2, do item 4.12.1).

O Guia OECD preconiza que quando solventes orgânicos são utilizados como veículo para a substância teste, o grupo controle do solvente deve ser utilizado para o cálculo da porcentagem de inibição e não o grupo controle de crescimento da cianobactéria sem solvente. Ressalta-se que no presente estudo, para os testes de toxicidade, foi utilizado o grupo controle com 0,05% do solvente para os cálculos da EC₅₀ a fim de eliminar a interferência do mesmo no teste.

É possível também que a presença do solvente interfira nos testes de biodegradação, já que a cianobactéria pode preferir utilizá-lo como fonte de carbono a biodegradar a substância teste.

Evento semelhante é observado na biorremediação de áreas contaminadas por combustíveis. No Brasil, a gasolina apresenta de 20 a 24% de etanol e existe uma tendência dos micro-organismos em utilizar primeiro os alcoóis primários, como etanol e metanol, como fonte de carbono, retardando a decomposição dos compostos aromáticos. Os alcoóis primários apresentam-se como substratos preferenciais (MARIANO, 2006). Como exemplo, Hubbard e colaboradores (1994) verificaram que na presença de metanol a degradação microbiana da gasolina foi de 69%, ao passo que no grupo controle a taxa foi de 93%.

O uso de solventes orgânicos em ensaios ecotoxicológicos é imprescindível já que muitos poluentes orgânicos, como os pesticidas, apresentam baixa solubilidade em água e necessitam ser solubilizados primeiro em solventes orgânicos para depois serem adicionados aos sistemas experimentais (MA e CHEN, 2005). Portanto, considerar os efeitos dos mesmos sobre as espécies é muito importante para não comprometer os resultados observados e não mascarar efeitos da substância a ser testada.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que uma cepa de *Microcystis novacekii* não tóxica apresentou considerável potencial de biodegradação da atrazina em concentrações iguais ou superiores a 50 µg/L. Na concentração de 25 µg/L o herbicida parece não sofrer alteração no meio. Novos estudos devem ser conduzidos aumentando o tempo dos testes e alterando condições de cultivo a fim de verificar o aumento da taxa de degradação da atrazina e aprofundar na elucidação da formação de metabólitos.

A pronunciada remoção do oxifluorfem no grupo controle ao final do experimento sugere a ocorrência de mecanismo de degradação abiótica, como fotólise, ou sua deposição na parede dos frascos. A grande diminuição das concentrações do pesticida nos testes logo no início do experimento pode indicar que a cianobactéria pode exercer papel importante na remoção do pesticida possivelmente por mecanismos de bioabsorção ou bioacumulação do mesmo. Ressalta-se, contudo, a possibilidade da interferência do processo experimental como a filtração na quantificação dos extratos.

A *Microcystis novacekii* se mostrou resistente à presença de altas concentrações de ambos os pesticidas nos testes de toxicidade. As EC_{50} (96 horas) determinadas para atrazina (4,2 mg/L) e oxifluorfem (17,6 mg/L) são concentrações bem acima das concentrações desses herbicidas normalmente encontradas no ambiente. Este é um resultado muito positivo, visto que confirma a resistência da espécie e incentiva novos estudos de possíveis utilizações biotecnológicas.

O metanol, enquanto veículo para os pesticidas, não apresentou toxicidade para a cianobactéria. Na concentração utilizada nos experimentos este apresentou efeito estimulador do crescimento e sua utilização parece não interferir nos resultados obtidos. As correções utilizadas permitiram a realização dos ensaios sem interferência do solvente no resultado dos testes de toxicidade.

Os testes de ecotoxicidade são importantes para avaliar o potencial de risco ambiental dos contaminantes, uma vez que somente as análises químicas não possibilitam esse tipo de avaliação. Apesar de ser difícil extrapolar para o ambiente as informações obtidas com esses testes, já que no ambiente aquático os contaminantes estão sujeitos a diversos processos bióticos e abióticos que não são reproduzidos no laboratório, eles são imprescindíveis para predizer possíveis efeitos tóxicos dos contaminantes.

Sendo o presente trabalho de caráter exploratório e preliminar, espera-se que os resultados obtidos, em conjunto com os demais resultados do grupo de pesquisa do projeto “Estudo da Biodegradação de Pesticidas Utilizando Cianobactérias Isoladas de Lagos Naturais do Parque Estadual do Rio Doce-MG”, possam contribuir no entendimento do papel da cianobactéria *Microcystis novacekii* nos ambientes naturais, abrindo perspectivas na sua utilização em processos de biorremediação.

REFERENCIAS

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Monografias de Produtos Agrotóxicos. A14 Atrazina**. Brasília, 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>>. Acesso em: 15 jun. 2007 (a).

_____. **Monografias de Produtos Agrotóxicos. O10 Oxifluorfem**. Brasília, 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/toxicologia/monografias/index.htm>>. Acesso em: 15 jun. 2007 (b).

BAIRD, C. **Química Ambiental**. Porto Alegre: Bookman, 2002. 2. ed. 622 p.

BARBOSA, F. (Org.) **Ângulos da água: desafios da integração**. Belo Horizonte: Ed. UFMG, 2008. 366 p.

BOETHLING, R. S.; ALEXANDER, M. Effect of concentration of organic chemicals on their biodegradation by natural microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 37, n. 6, p. 1211-1216, June 1979.

BONAVENTURA, C.; JOHNSON, F. M. Healthy Environments for Healthy People: Bioremediation Today and Tomorrow. **Environmental Health Perspectives**, v. 105, suppl. 1, p. 5-20, Feb. 1997.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, Essex, v. 74, n. 1, p. 63-67, Aug. 2000.

BOTELHO, G. Brasil supera EUA no uso de agroquímicos. **Gazeta Mercantil**, São Paulo, 20 jan. 2009. Caderno Finanças & Mercados, p. 9.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Legislação Federal de Agrotóxicos e Afins. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 12 jul, 1989, p. 011459.

_____. Ministério da Saúde. Portaria nº 518 de 25 de março de 2004. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 26 mar. 2004. Seção 1, p. 266-270.

CÁCERES, T. P.; MEGHARAJ, M.; NAIDU, R. Biodegradation of the pesticide fenamiphos by tem different species of green algae and cyanobacteria. **Current Microbiology**, New York, v. 57, n. 6, p. 643-646, Dec. 2008.

CARMICHAEL, W. W. The toxins of cyanobacteria. **Scientific American**, New York, v. 270, n. 1, p. 78-86, Jan. 1994.

CHORUS, I.; BARTRAM, J. **Toxic cyanobacteria in water**. A guide to their public health consequences, monitoring and management. London: Taylor & Francis, 1999. 416 p.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL - CETESB. **Identificação e Contagem de Algas Fitoplanctônicas com Ênfase em Cianobactérias**: noções básicas. São Paulo: CETESB, 2004. 47 p. (Série Cursos e Treinamentos).

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE – CONAMA. **Resolução CONAMA n. 357, de 17 de mar. de 2005**. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Brasília, 2005. 23 p.

COSTA, C. R. *et al.* A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, dez. 2008.

DELORENZO, M. E.; SCOTT, G. I. ROSS, P. E. Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 20, n. 1, p. 84-98, Jan. 2001.

DHANARAJ, P. S.; KUMAR, S.; LAL, R. Bioconcentration and metabolism of aldrin and phorate by the blue-green algae *Anabaena* (ARM 310) and *Aulosira fertilissima* (ARM 68). **Agriculture, Ecosystems & Environment**, Amsterdam, v. 25, n. 2-3, p. 187-193, Mar. 1989.

EL-BESTAWY, E. Treatment of mixed domestic-industrial wastewater using cyanobacteria. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 35, n. 11, p. 1503-1516, Nov. 2008.

EI-BESTAWY, E. A.; Ab EI-SALAM, A. L.; MANSY, A. E. R. Potencial use of environmental cyanobacterial species in bioremediation of lindane-contaminated effluents. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 59, p. 180-192, Apr. 2007.

EXTENSION TOXICOLOGY NETWORK - EXTTOXNET. **Pesticide information profiles – Oxyfluorfen**. 2002. Disponível em: <<http://ace.ace.orst.edu/info/exttoxnet/pips/oxyfluor.htm>>. Acesso em: 13 set. 2007.

FERNANDES NETO, M. L.; SARCINELLI, P. N. Agrotóxicos em água para consumo humano: uma abordagem de avaliação de risco e contribuição ao processo de atualização da legislação brasileira. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, Rio de Janeiro, v. 14, n. 1, p. 69 – 78, jan./mar. 2009.

GELLER, A. Studies on the degradation of atrazina by bacterial communities enriched from various biotopes. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 9, n. 3, p. 289-305, May 1980.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E. *et al.* **Procedimentos para a utilização de ensaios de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo: CETESB, 1990. 17 p.

GONZÁLEZ-BARREIRO, O. *et al.* Removal of triazine herbicides from freshwater systems using photosynthetic microorganisms. **Environmental Pollution**, Barking, v. 144, n. 1, p. 266-271, Nov. 2006.

GRAYMORE, M.; STAGNITTI, F.; ALLINSON, G. Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. **Environment International**, New York, v. 26, n. 7-8, p. 483-495, June 2001.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide C^{1,2}. **Journal of Phycology**, Lawrence, Kan, v. 8, n.1, p. 10-14, Mar. 1972.

HALL, J. C. *et al.* Enzyme immunoassay based survey of precipitation and surface water for the presence of atrazine, metolachlor and 2,4D. **Journal of Environmental Science and Health**, Part B, New York, v. 28, n. 5, p. 577-598, 1993.

HENNION, M. C. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 856, n. 1, p. 3-54, Sept. 1999.

HINDÁK, F. Three planktonic cyanophytes producing waters blooms in Western Slovakia. **Czech Phycology**, Olomouc, v. 6, p. 59-67. 2006.

HOOVER, D.G. *et al.* Anomalies in mineralization of low concentrations of organic compounds in lake water and sewage. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, US, v. 51, n. 2, p. 226-232, Feb. 1986.

HUBBARD, C. E. *et al.* **Transport and Fate of Dissolved Methanol, Methyl-Tertiary-Butyl-Ether, and Monoaromatic Hydrocarbons in a shallow Sand Aquifer**, API Publication Number 4601, American Petroleum Institute, Washington, DC, 1994.

HUNTLEY, M.E. **Biotreatment of agricultural wastewater**. Boca Raton: CRC Press, 1989. 176 p.

INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS (IEF). **Parque Estadual do Rio Doce**. Disponível em <<http://www.ief.mg.gov.br>>. Acesso em: 25 abr. 2009.

IUV, K.; EL, M. Decomposition of simazine herbicide in algal cultures. **Mikrobiologija**, v. 44, n. 4, p. 732-735, July/Aug. 1975.

JINNO, H. *et al.* Cytotoxic and porphyrinogenic effects of diphenyl ethers in cultured rat hepatocytes: chlornitrofen (CNP), CNP-amino, chlomethoxyfen and bifenox. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 37, n. 1, p. 69-74, Jan. 1999.

JONSSON, C.M. *et al.* Bioconcentration of the insecticide pyridaphenthion by the green algae *Chlorella saccharophila*. **Chemosphere**, Oxford, v. 43, n. 3, p. 321-325. Apr. 2001.

KADIAN, N. *et al.* Biodegradation of herbicide (atrazine) in contaminated soil using various bioprocessed materials. **Bioresource Technology**, Essex, v. 99, n. 11, p. 4642-4647, July 2007.

KURITZ, T.; WOLK, C.P. Use of filamentous cyanobacteria for biodegradation of organic pollutants. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 61, n. 1, p. 234-238, Jan. 1995.

LABORATÓRIO CENTRAL DE SAÚDE PÚBLICA DE PERNAMBUCO. **Curso de Revisão de Métodos Analíticos em Cianobactérias**. Recife, 2008. 27 p.

LAGANA, A. *et al.* Determination of diphenyl-ether herbicides and metabolites in natural waters using high-performance liquid chromatography with diode array tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 414, n. 1-2, p. 79-94, June 2000.

LANÇAS, F. M. **Extração em Fase Sólida (SPE)**. São Carlos: Rima, 2004, 96 p.

MA, J. *et al.* Differential responses of eight cyanobacterial and green algal species to carbamate insecticides. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 63, n. 2, p. 268-274, Feb. 2005.

MA, J.; CHEN, J. How to accurately assay the algal toxicity of pesticides with low water solubility. **Environmental Pollution**, Barking, v. 136, n. 2, p. 267-273, July 2005.

MA, J.; LIANG, W. Acute toxicity of 12 herbicides to the green algae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 67, n. 3, p. 347-351, Sept. 2001.

MANDELBAUM, R. T.; ALLAN, D. L.; WACKETT, P. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazina. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, US, v. 61, n. 4, p. 1451-1457, Apr. 1995.

MANSY, A. E.; EI-BESTAWY, E. Toxicity and biodegradation of fluometuron by selected cyanobacterial species. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 125-131, Mar. 2002.

MARASCHIN, L. **Avaliação do grau de contaminação por pesticidas na água dos principais rios formadores do pantanal mato-grossense**. 2003. 88 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente)-Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, 2003.

MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 2006. 162 f. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente)-Universidade Estadual Paulista, Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2006.

MCALICE, B. J. Phytoplankton sampling with the Sedgwick-Rafter cell. **Limnology and Oceanography**, Baltimore, v. 16, n. 1, p. 19-28, Jan. 1971.

MEGHARAJ, M. *et al.* Biodegradation of methyl parathion by soil isolates of microalgae and cianobactéria. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 53, p. 292-297, Aug. 1994.

MIRANDA, A.C. *et al.* Neoliberalismo, uso de agrotóxicos e a crise da soberania alimentar no Brasil. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 12, n.1, p. 7-14, jan-mar. 2007.

MOFFAT, A. C.; OSSELTON, M. D.; WIDDOP, B. **Clarke's Analysis of drugs and Poisons**. 3 rd. London: Pharmaceutical Press, 2004.

NATIONAL REGISTRATION AUTHORITY FOR AGRICULTURAL AND VETERINARY CHEMICALS - NRA. **The NRA Review of Atrazine**. Australia, 1997. 259 p.

NAVARRO, A. E. *et al.* Comparative study of the removal of phenolic compounds by biological and non-biological adsorbents. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 164, n. 2-3, p. 1439-1446, May 2009.

NEILSON, A. H.; ALLARD, A. S. **Environmental degradation and transformation of organic chemicals**. Boca Raton: CRC Press, 2007. 710 p.

ÖLLERS, S. *et al.* Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 911, n. 2, p. 225-234, Mar. 2001.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **Guidelines for testing chemicals. Freshwater alga and cyanobacteria growth inhibition test**. 201. Mar. 2006.

_____. **Principles and strategies related to the testing of degradation of organic chemicals**. Part 1. July 2003.

POOLE, C. F.; GUNATILLEKA, A. D.; SETHURAMAN, R. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 885, n. 1-2, p. 17-39, July 2000.

RALEBITSO, T. K.; SENIOR, K.; VanVERSEVELD, H. W. Microbial aspects of atrazine degradation in natural environments. **Biodegradation**, Dordrecht, v. 13, n. 1, p. 11-19, jan. 2002.

RIBEIRO, M. L. Contaminação de águas subterrâneas por pesticidas: avaliação preliminar. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 688-694, maio/jun. 2007.

RIBO, J. M. Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay. **Environmental Toxicology and Water Quality**, New York, v. 12, n. 4, p. 283-294, 1997.

RODRIGUES, L. H. R. *et al.* Avaliação da sensibilidade de *Raphidocelis subcapitata* (Chlorococcales, Chlorophyta) ao sulfato de cobre e sulfato de zinco através de ensaios de toxicidade crônica. **Biociências** (Porto Alegre), Porto Alegre, v. 11, n. 2, p. 137-144, 2003.

SANCHES, S.M. *et al.* Pesticidas e seus respectivos riscos associados à contaminação da água. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, Curitiba, v. 13, p. 53-58, 2003.

SCRANO, L. *et al.* Photochemical behaviour of oxyfluorfen: a diphenyl-ether herbicide. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, Lausanne, v. 129, n. 1-2, p. 65-70, Dec. 1999.

SCRANO, L. *et al.* Surface retention and photochemical reactivity of the diphenylether herbicide oxyfluorfen. **Journal of Environmental Quality**, Madison, v. 33, p. 605-611, Mar./Apr. 2004.

SEECH, A. *et al.* *In situ* bioremediation of pesticides in soil and ground water. **Remediation Journal**, v. 19, n. 1, p. 87-98, Dec. 2008.

SHEU, H. *et al.* Determination of diphenylether herbicides in water samples by solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 29, p. 2647-2652, Nov. 2006.

STRUTHERS, J. K.; JAYACHANDRAN, K.; MOORMAN, T. B. Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14A and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, US, v. 64, p. 3368-3375, Sept. 1998.

SWACKHAMER, D. L.; SKOGLUND, R. S. The role of phytoplankton in the partitioning of hydrophobic organic contaminants in water. In: BAKER, R. A. **Organic substances and sediments in water: processes and analytical**. Ann Arbor: CRC Press, 1991. p. 91-105.

TANG, J. X.; HOAGLAND, K. D.; SIEGFRIED, B. D. Differential toxicity of atrazine to selected freshwater algae. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 59, n. 4, p. 631-637, Oct. 1997.

TANG, J.; HOAGLAND, K. D.; SIEGFRIED, B. D. Uptake and bioconcentration of atrazine by selected freshwater algae. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 17, n. 6, p. 1085-1090, June 1998.

TUNDISI, J. G.; SAIJO, Y. **Limnological studies on the rio Doce Valley lakes, Brazil**. Rio de Janeiro, Academia Brasileira de Ciências, p. 199-225, 1997.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE - USDA. **Oxyfluorfen – Human Health and Ecological Risk Assessment**: final report. 2005. Disponível em: <<http://www.sera-inc.com>> Acesso em: 13 set. 2007.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - USEPA. **About Pesticides**. Pesticides Home. 2009. Disponível em: < <http://www.epa.gov/pesticides/about/index.htm>.> Acesso em: 11 mar. 2009.

_____. **Overview of oxyfluorfen**. Risk assessment. January, 2002. Disponível em: <http://www.fluoridealert.org/pesticides/oxyfluorfen_red.overview.02.pdf>. Acesso em: 11 de março de 2009.

_____. **Oxyfluorfen – Human Health and Ecological Risk Assessment**. Final Report. 2005. Disponível em: <<http://www.sera-inc.com>>. Acesso em 13 de setembro de 2007.

VIDALI, M. Bioremediation. An overview. **Pure Applied Chemistry**, v. 73, n. 7, p. 1163-1172, 2001.

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 139-145, jan./fev. 2004.

WAUCHOPE, R.D. *et al.* The SCS/ARS/CES pesticide properties data base for environmental decision making. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 123, p. 1 155, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Chemical safety of drinking water: assessing priorities for risk management**. Geneva: World Health Organization, 2007. 160 p. Disponível em : <http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/dwchem_safety/en/index.html>. Acesso em: 15 mar. 2009.

_____. **International Programme on Chemical Safety the Who Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2000-2002**. 2002. Disponível em: < <http://whqlibdoc.who.int/hq/2002/a76526.pdf>.>. Acesso em: 13 set. 2007.

YEN, J. H.; SHEU, W. S.; WANG, Y. S. Dissipation of the herbicide oxyfluorfen in subtropical soils and its potential to contaminate groundwater. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, New York, v. 54, n. 2, p. 151-156, Feb. 2003.