



**UNIVERSIDADE DE ÉVORA**  
**ESCOLA DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA**

**Mestrado em Bioquímica**

**Dissertação**

**ESTUDOS DE BIODEGRADAÇÃO DE FUNGICIDAS ACILALANINA POR ESTIRPES SELECIONADAS  
DE ZYGOMYCETES**

Rita Sofia Garcia Ribeiro

**Orientador(es):**

Professora Doutora Maria do Rosário Caeiro Martins  
Professor Doutor Nelson Manuel Viana da Silva Lima

*“Esta Dissertação não inclui as críticas e sugestões feitas pelo Júri”*

20 de Setembro de 2012

Esta Dissertação está escrita de acordo com o novo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa,  
de Janeiro de 2009.

*“Qualquer um que pretenda ter, mais que uma compreensão extremamente superficial da Vida, em todas as suas diversas manifestações, necessita da Bioquímica.”*

**Hans Krebs**

## **Agradecimentos**

A realização desta dissertação marca o fim de uma importante etapa da minha vida. Gostaria de agradecer a todos aqueles que contribuíram para a sua concretização.

À Universidade de Évora, ao Departamento de Química e ao Instituto de Ciências Agrárias e Mediterrânicas manifesto apreço pela excelência da formação prestada, reagentes e equipamentos disponibilizados, essenciais para a elaboração deste trabalho de dissertação.

À minha orientadora Prof. Doutora Maria do Rosário Martins cuja disponibilidade, colaboração, conhecimentos transmitidos e capacidade de estímulo ao longo de todo o trabalho foram indispensáveis.

Ao meu orientador Professor Doutor Nelson Lima e à Micoteca da Universidade do Minho pela forma amável, aberta e atenciosa com que me recebeu nas suas instalações, prestando um valioso auxílio ao planeamento e execução deste trabalho.

Aos professores da Licenciatura e Mestrado em Bioquímica que me inspiraram a alcançar a excelência, Prof. Doutora Ana Costa, Prof. Doutora Ana Teresa Caldeira, Prof. Doutor António Manuel Neto Vaz, Prof. Doutora Célia Maria Antunes, Prof. Doutora Isabel Alves-Ferreira, Professor Doutor José Arteiro, Professor Doutor Júlio Cruz-Morais e Prof. Doutor Rui Ferreira.

A todos os colegas de Licenciatura, Mestrado e Doutoramento em Bioquímica que me acompanharam ao longo destes anos de estudo, pela ajuda e companheirismo sempre demonstrados.

Aos meus amigos pela força e coragem que sempre me deram, em especial às minhas queridas amigas Manuela Strauss, Daniela Anselmo e Telma Ventura que serão sempre lembradas como companheiras de aventura durante estes anos de universidade.

Finalmente, um sentido e profundo reconhecimento à minha família pelo amor e apoio incondicional durante todas as fases da minha vida. A eles, que me ajudaram a ser quem sou, que depositam confiança em mim e para os quais sou uma esperança, resta-me afincadamente não os desiludir.

Muito obrigado...

## **Estudos de biodegradação de fungicidas acilalanina por estirpes selecionadas de Zygomycetes**

---

### **Resumo**

O principal objetivo deste trabalho consistiu em selecionar e avaliar diferentes estirpes de fungos Zygomycetes quanto à capacidade de degradação de fungicidas acilalaninas, nomeadamente o metalaxil e o metalaxil-M. Com vista à seleção dos fungos mais promissores na degradação dos fungicidas procedeu-se a um rastreio em meio sólido e as estirpes que mostraram maior capacidade para tolerar os fungicidas em estudo, foram selecionadas para avaliação do perfil de crescimento da biomassa, taxa de utilização da sacarose e taxa de degradação do metalaxil, em meio de cultura líquido. Foi ainda possível identificar a presença de fenoloxidasas extracelulares nos sobrenadantes das culturas líquidas das estirpes em estudo, potencialmente envolvidas no processo de biodegradação. Em conclusão, os resultados obtidos para as estirpes de Zygomycetes em estudo, propiciam boas perspectivas futuras quanto a estudos de biorremediação de fungicidas acilalanina e dos mecanismos bioquímicos envolvidos na sua degradação.

**Palavras-chave:** Zygomycetes; metalaxil; metalaxil-M; biodegradação; fenoloxidasas; fungos filamentosos.

## Biodegradation studies of acilalanine fungicides by selected strains of Zygomycetes

---

### Abstract

The main goal of this study was to select and evaluate the capability of different fungal strains of Zygomycetes fungi to degrade acilalanine fungicides, including metalaxyl and metalaxyl-M. In order to select the most promising fungicide degraders a solid medium was used to screening the fungi. The strains that showed the greater capability to tolerate the fungicides, were selected for evaluation, in liquid culture medium, the biomass growth profile, sucrose consumption and metalaxyl degradation rates. It was also possible to identify the presence of extracellular phenol oxidases in the supernatants of liquid cultures, wich are potentially involved in the biodegradation process. In conclusion, the results obtained for the Zygomycetes strains in study can provide good knowledge for future works related with bioremediation of acilalanine fungicides and the biochemical mechanisms involved in its degradation.

**Key-words:** Zygomycetes, metalaxyl; metalaxyl-M; biodegradation; phenol oxidases; filamentous fungi.

## Abreviaturas e Convenções

**A** – Absorvância;

**AFLP** – “*Amplified fragment length polymorphism*”;

**ATCC** – Coleção americana de culturas tipo, do inglês “*American Type Culture Collection*”;

**BSA** – Albumina do soro bovino, do inglês “*Bovine Serum Albumine*”;

**CBS** – Coleção de culturas fúngicas tipo “*Centraalbureau voor Schimmelcultures*” (Holanda);

**CCMI** – Coleção de culturas de microrganismos industriais (LNEG e INRB, Portugal);

**DNA** – Ácido desoxirribonucleico, do inglês “*Deoxyribonucleic Acid*”;

**DNS** – Ácido 3,5-dinitrosalicílico, do inglês “*3,5-dinitrosalicylic acid*”;

**dNTPs** – Desoxirribonucleotídeos fosfatados, do inglês “*Deoxynucleotide Triphosphates*”;

**EC<sub>50</sub>** – Concentração efetiva 50% (Concentração efetiva de um composto que provoca um efeito inibitório de 50% no crescimento de uma determinada população microbiana);

**EDTA** – Ácido etilenodiamina tetra-acético, do inglês “*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*”;

**FTIR** –Espectrometria no infravermelho com transformação de Fourier, do inglês “*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*”;

**g** – Aceleração gravítica;

**HPLC** – Cromatografia líquida de elevada eficiência, do inglês “*High Performance Liquid Chromatography*”;

**ITS** – Espaçador transcrito interno, do inglês “*Internal Transcribed Spacer*”;

**IUPAC** – União internacional de química pura e aplicada, do inglês “*Internacional Union of Pure and Applied Chemistry*”;

**LC-MS** – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, do inglês “*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*”;

**LSU rRNA** – Subunidade maior do RNA ribossômico, do inglês “*Large Subunit ribosomal RNA*”;

**MALDI-TOF** - Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz – Tempo de vôo, do inglês “*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight*”;

**MSP-PCR** – “*Microsatellite – Primed PCR*”;

- MIC** – Concentração Mínima Inibitória, do inglês “*Minimum Inhibitory Concentration*”;
- Mw** – Massa molecular, do inglês “*molecular weight*”;
- PCR** – Reação de polimerase em cadeia, do inglês “*Polymerase Chain Reaction*”;
- pb** – par de bases;
- PDA** – Meio de dextrose, batata e ágar, do inglês “*Potato Dextrose Agar*”;
- pH** – Potencial de Hidrogénio;
- RAPD** – “*Random amplification of polymorphic DNA*”;
- RFLP** – “*Restriction fragment length polymorphism*”;
- RNA** – Ácido ribonucleico, do inglês “*Ribonucleic Acid*”;
- RNase** – Ribonuclease;
- R.I** – Índice de refração, do inglês “*Refractive Index*”;
- rpm** – Rotações por minuto;
- SSU rRNA** – subunidade menor do RNA ribossômico, do inglês “*Small Subunit ribosomal RNA*”;
- TBE** – TRIS/Borato/EDTA;
- TRIS** – Tris(hidroximetil)aminometano;
- TWA** – Meio de água da torneira, do inglês “*Tap Water Medium*”
- U** – Unidade de atividade enzimática (Concentração de enzima para a qual ocorre a formação de 1  $\mu\text{mol}$  de substrato por minuto);
- UFC** – Unidade formadora de colónias;
- U.V** – Ultravioleta;
- VIS** – Visível;
- YNB** – Base nitrogenada de levedura, do inglês “*Yeast Nitrogen Base*”;
- YNBS** – Base nitrogenada de levedura com sacarose, do inglês “*Yeast Nitrogen Base Saccharose*”;
- $\mu$  - Taxa específica de crescimento;
- $\lambda$  – Comprimento de onda;



## Unidades Internacionais

**A; mA** - Amperes; miliamperes;

**cm; mm;  $\mu\text{m}$ ; nm** - Centímetro; milímetro; micrómetro; nanómetro;

**g; mg;  $\mu\text{g}$**  - Grama; miligrama; micrograma;

**h; min; s** - Horas; minutos; segundos;

**kDa; Da** - KiloDalton; Dalton;

**L; mL;  $\mu\text{L}$**  - Litro; mililitro; microlitro;

**M; mM;  $\mu\text{M}$**  - Molar; milimolar; micromolar;

**N** - Normal;

**V** - Volts;

**W** - Watts;

**$^{\circ}\text{C}$**  - Graus Celsius;

## Índice Geral

Agradecimentos.....	iv
Resumo.....	v
Abstract.....	vi
Abreviaturas e Convenções .....	vii
Unidades Internacionais .....	ix
Índice Geral .....	x
Índice de Figuras.....	xii
Índice de Tabelas .....	xiii
1. Problemática.....	1
2. Objetivos Científicos .....	3
2.1    Objetivos Gerais.....	3
2.2    Objetivos Específicos.....	3
3. Fundamento Teórico .....	4
3.1    Os Zygomycetes.....	4
3.1.1    Caracterização molecular dos Zygomycetes.....	5
3.1.2    Aplicação industrial dos Zygomycetes.....	7
3.2    Aspetos gerais dos fungicidas.....	8
3.2.1    Propriedades físico-químicas dos fungicidas.....	9
3.2.2    Mecanismos de ação dos fungicidas .....	11
3.3    Metabolismo e toxicidade dos fungicidas.....	13
3.3.1    Metabolismo e toxicidade dos fungicidas nos animais .....	13
3.3.2    Metabolismo e toxicidade dos fungicidas nas plantas.....	16
3.3.3    Metabolismo e toxicidade dos fungicidas nos microrganismos .....	18
3.4    Biodegradação e biorremediação de fungicidas .....	20
3.4.1    Sistemas enzimáticos envolvidos nos processos de biorremediação .....	21
4. Materiais e Métodos.....	22
4.1    Seleção e caracterização de estirpes de Zygomycetes.....	23
4.1.1    Caraterização morfológica, macroscópica e microscópica, das estirpes em estudo .....	23
4.1.2    Caraterização molecular das estirpes isoladas por M13-PCR.....	23

4.1.2.1	Extração do DNA genómico.....	23
4.1.2.2	Análise por M13-PCR fingerprinting.....	24
4.1.2.3	Avaliação dos fragmentos de PCR por eletroforese em gel .....	25
4.2	Ensaio de seleção das estirpes tolerantes aos fungicidas.....	25
4.2.1	Ensaio da degradação dos fungicidas em meio sólido .....	25
4.2.2	Ensaio de degradação do metalaxil em meio líquido.....	26
4.2.2.1	Determinação da taxa específica de crescimento.....	27
4.2.2.2	Determinação da taxa de utilização da sacarose.....	27
4.2.2.3	Quantificação do metalaxil por HPLC .....	28
4.2.3	Ensaio de adsorção do metalaxil à biomassa .....	29
4.3	Identificação dos enzimas extracelulares.....	29
4.3.1	Deteção da atividade das fenoloxidasas – Teste de Schänel.....	29
4.3.2	Teste da clivagem do catecol – Teste de Stanier.....	30
5.	Resultados e Discussão.....	31
5.1	Seleção e identificação de estirpes de Zygomycetes.....	31
5.1.1	Caracterização morfológica, macroscópica e microscópica, das estirpes em estudo .....	31
5.1.2	Caracterização molecular das estirpes isoladas por M13-PCR.....	34
5.2	Ensaio de seleção das estirpes tolerantes aos fungicidas.....	36
5.2.1	Ensaio da degradação dos fungicidas em meio sólido .....	36
5.2.2	Ensaio de degradação do metalaxil em meio líquido.....	39
5.2.3	Ensaio de adsorção do metalaxil à biomassa .....	46
5.3	Identificação dos enzimas extracelulares.....	47
6.	Conclusões e Perspetivas Futuras.....	49
7.	Bibliografia .....	51
8.	Anexos .....	57
	Anexo I: Reagentes e Equipamentos.....	57
	Anexo II: Soluções e Meios de Cultura.....	59
	Anexo III: Curvas de Calibração .....	62
	Anexo IV: Cromatogramas .....	62
	Anexo V: Análise Estatística.....	63

## Índice de Figuras

Figura 1: Estruturas reprodutoras dos Zygomycetes.....	4
Figura 2: Estrutura dos enantiómeros S e R do Metalaxil.....	11
Figura 3: Percurso metabólico proposto pela EPA para a degradação do metalaxil e metalaxil-M em ratos.....	16
Figura 4: Produtos da degradação do metalaxil e do metalaxil-M detetados em plantas.....	18
Figura 5: Possíveis intermediários formados no processo de degradação do metalaxil e do metalaxil-M no solo.....	20
Figura 6: Diagrama esquemático da degradação de compostos fenólicos pelo sistema enzimático extracelular das fenoloxidasas.....	23
Figura 7: Mecanismo de quebra do catecol na posição intra ou extra-diol.....	30
Figura 8: Eletroforetograma obtido após M13-PCR para as estirpes de Zygomycetes em estudo.....	34
Figura 9: Dendograma do perfil de eletroforese obtida após M13-PCR para as estirpes de Zygomycetes em estudo.....	35
Figura 10: Crescimento radial das estirpes de <i>Rhizopus</i> spp., <i>Absidia</i> spp., e <i>Circinella</i> spp. em meio YNB contendo um gradiente de fungicida comercial (0-100 mg.L <sup>-1</sup> ), durante um período de crescimento de 5 dias.....	37
Figura 11: Crescimento radial das estirpes de <i>C. lacrymispora</i> CBS 101.57 e <i>Gongronella</i> spp. em meio YNB contendo um gradiente de fungicida comercial (0-100 mg.L <sup>-1</sup> ), durante um período de crescimento de 7 dias.....	37
Figura 12: Cromatogramas obtidos aos 0 e 21 dias a partir de culturas de <i>Gongronella</i> sp. Rid CCM1 1001 em meio YNB na presença de metalaxil na concentração de 100 mg.L <sup>-1</sup> .....	40
Figura 13: Perfis da degradação da sacarose e do metalaxil remanescentes (%) e de crescimento da biomassa (g.L <sup>-1</sup> ) para as diferentes estirpes em estudo.....	41
Figura 14: Registo das percentagens de metalaxil remanescentes no estudo de degradação do metalaxil na ausência e na presença de biomassa de <i>Rhizopus stolonifer</i> Rid CCM1 1004.....	47
Figura 15: Registo das percentagens de metalaxil remanescentes no estudo de degradação do metalaxil na ausência e na presença de biomassa de <i>Gongronella</i> sp. Rid CCM1 1001.....	47
Figura 16: Resultados obtidos para os testes de Teste de Schänel e de Teste de Stanier.....	48
Figura 17: Curva de calibração da sacarose pelo método do DNS modificado.....	62
Figura 18: Curva de calibração dos padrões de metalaxil obtida por HPLC.....	62
Figura 19: Cromatogramas obtidos aos 0 e 21 dias a partir de culturas de Zygomycetes.....	63

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Características físico-químicas do metalaxil e do metalaxil-M.....	11
Tabela 2: Classificação do potencial carcinogénico dos pesticidas.....	16
Tabela 3: Principais características morfológicas dos Zygomycetes em estudo.....	32
Tabela 4: Registo das taxas específicas de crescimento ( $h^{-1}$ ) e dos valores médios das taxas de utilização da sacarose ( $g.L^{-1}.dia^{-1}$ ) e de degradação do metalaxil ( $mg.L^{-1}.dia^{-1}$ ) para as estirpes selecionadas. ....	42
Tabela 5: Análise da variância (ANOVA) do crescimento radial das estirpes de <i>Rhizopus</i> spp., <i>Absidia</i> spp., <i>Circinella</i> spp. em meio YNB contendo um gradiente de fungicida comercial (0-100 $mg.L^{-1}$ ).....	65
Tabela 6: Análise da variância (ANOVA) do crescimento radial das estirpes de <i>Gongronella</i> spp. em meio YNB contendo um gradiente de fungicida comercial (0-100 $mg.L^{-1}$ ).....	65
Tabela 7: Comparação múltipla de médias (Tukey HSD) do crescimento radial estirpes de <i>Rhizopus</i> spp., <i>Absidia</i> spp., <i>Circinella</i> spp. em meio YNB contendo um gradiente de metalaxil (0-100 $mg.L^{-1}$ ).....	66
Tabela 8: Comparação múltipla de médias (Tukey HSD) do crescimento radial estirpes de <i>Rhizopus</i> spp., <i>Absidia</i> spp., <i>Circinella</i> spp. em meio YNB contendo um gradiente de metalaxil-M (0-100 $mg.L^{-1}$ ).....	66
Tabela 9: Comparação múltipla de médias (Tukey HSD) do crescimento radial estirpes de <i>Gongronella</i> spp. em meio YNB contendo um gradiente de metalaxil (0-100 $mg.L^{-1}$ ).....	67
Tabela 10: Comparação múltipla de médias (Tukey HSD) do crescimento radial estirpes de <i>Gongronella</i> spp. em meio YNB contendo um gradiente de metalaxil-M(0-100 $mg.L^{-1}$ ).....	67
Tabela 11: : Análise da variância (ANOVA) do crescimento da biomassa ( $g.L^{-1}$ ) para as estirpes em estudo no ensaio de degradação do metalaxil em meio líquido.....	68
Tabela 12: Comparação múltipla de médias (Tukey HSD) do crescimento da biomassa ( $g.L^{-1}$ ) para as estirpes em estudo no ensaio de degradação do metalaxil em meio líquido.....	68
Tabela 13: Análise da variância (ANOVA) da taxa de utilização da sacarose ( $g.L^{-1}.dia^{-1}$ ) para as estirpes em estudo no ensaio de degradação do metalaxil em meio líquido.....	69
Tabela 14: Comparação múltipla de médias (Tukey HSD) da taxa de utilização da sacarose ( $g.L^{-1}$ ) para as estirpes em estudo no ensaio de degradação do metalaxil em meio líquido....	69
Tabela 15: Análise da variância (ANOVA) da taxa de degradação do metalaxil ( $mg.L^{-1}.dia^{-1}$ ) para as estirpes em estudo no ensaio de degradação do metalaxil em meio líquido.....	70
Tabela 16: Comparação múltipla de médias (Tukey HSD) da taxa de degradação do metalaxil ( $mg.L^{-1}$ ) para as estirpes em estudo no ensaio de degradação do metalaxil em meio líquido.....	70

Tabela 17: Análise da variância (ANOVA) das percentagens de metalaxil remanescentes no estudo de degradação do metalaxil na ausência e na presença de biomassa de <i>Rhizopus stolonifer</i> Rid CCMI 1004.....	71
Tabela 18: Comparação múltipla de médias (Tukey HSD) das percentagens de metalaxil remanescentes no estudo de degradação do metalaxil na ausência e na presença de biomassa de <i>Rhizopus stolonifer</i> Rid CCMI 1004.....	71
Tabela 19: Análise da variância (ANOVA) das percentagens de metalaxil remanescentes no estudo de degradação do metalaxil na ausência e na presença de biomassa de <i>Gongronella</i> sp. Rid CCMI 1001.....	72
Tabela 20: Comparação múltipla de médias (Tukey HSD) das percentagens de metalaxil remanescentes no estudo de degradação do metalaxil na ausência e na presença de biomassa <i>Gongronella</i> sp. Rid CCMI 1001.....	72

## 1. Problemática

O meio ambiente é continuamente ameaçado por uma vasta gama de compostos químicos antropogênicos, nomeadamente pesticidas, com diferentes estruturas moleculares e diferentes níveis de toxicidade. Estes compostos são potencialmente nefastos para os ecossistemas terrestres e aquáticos, bem como para a saúde humana, devido às propriedades carcinogénicas e mutagénicas que lhes podem estar associadas.

O metalaxil [N-(2,6-dimetilfenil)-N-metoxiacetil-DL-alaninato de metilo] é um importante fungicida da classe das acilalaninas com atividade residual e sistémica no combate aos fungos da classe Oomycetes, especialmente os pertencentes à ordem Peronosporales, patogénios de diversas culturas agrícolas, tais como *Bremia* spp., *Phythium* spp. (trigo, aveia, cana-de-açúcar), *Phytophthora* sp. (batata, tomate e outros vegetais), *Pseudoperonospora cubensis* (melão, pepino e outros), *Peronospora tabacina* (tabaco), *Sclerospora* spp. e *Plasmopara vitícola* (míldio da videira). Do ponto de vista físico-químico o metalaxil é um composto muito solúvel (7,1 g.L<sup>-1</sup> em água a 25°C), moderadamente volátil e fracamente adsorvido aos solos (Sukul e Spiteller, 2000). É também muito estável quando exposto a uma ampla gama de pH, luz e temperatura, podendo persistir nos solos durante vários meses ou anos (Sukul e Spiteller, 2001).

No entanto, existem vários problemas resultantes da aplicação de pesticidas, como o metalaxil, no ambiente. Foi demonstrado que a utilização continuada do metalaxil pode afetar negativamente a biodiversidade do solo e que devido à sua elevada solubilidade pode atingir águas superficiais e lençóis freáticos, tendo já sido detetada a sua presença em águas de consumo humano e em alimentos (Hildebrandt *et al.*, 2008). Para além disso, alguns estudos indicam que o metalaxil apresenta atividade mutagénica, podendo causar alterações cromossómicas em humanos e animais (Hrelia *et al.*, 1996), pelo que se torna cada vez mais importante encontrar novas técnicas eficazes na remediação do metalaxil do meio ambiente.

Mais recentemente, este fungicida tem sido, por vezes substituído pelo metalaxil-M ou mfenoxam [N-(2,6-dimetilfenil)-N-metoxiacetil-D-alaninato de metilo], o qual contém na sua composição apenas o isómero R, enquanto que o metalaxil é composto pela mistura racémica (Monkiedje *et al.*, 2002).

Existem poucos estudos sobre a degradação do metalaxil e do metalaxil-M no solo, nomeadamente sobre as vias de degradação destes xenobióticos. A sua persistência no solo é muito dependente do tipo de solo, da sua composição em biomassa e das condições ambientais, e o processo de degradação nos solos é um processo essencialmente biótico, na maioria dos estudos (Sukul e Spiteller, 2000).

Tendo em conta que o processo de degradação de alguns fungicidas no solo é um processo essencialmente de biodegradação, a utilização de microrganismos, nomeadamente de fungos filamentosos, para a biorremediação de solos poluídos com pesticidas tem despertado um interesse crescente do ponto de vista ambiental.

Em estudos anteriores efetuados pelo nosso grupo de trabalho foram isoladas, de um solo do Alentejo cuja cultura de vinha tinha sido submetida a múltiplos tratamentos anuais com metalaxil, duas estirpes de Zygomycetes, *Gongronella* sp. CCMI 1100 e *Rhizopus stolonifer* CCMI 1104, que apresentaram capacidade para tolerar e degradar metalaxil como fonte de carbono, em culturas líquidas e no solo. No entanto, ainda não se conhece a via de biodegradação do metalaxil no solo.

Assim, o presente estudo tem como objetivos: (i) alargar o estudo a várias estirpes de Zygomycetes, dos géneros *Absidia*, *Circinella*, *Gongronella*, e *Rhizopus* com vista à sua identificação polifásica, (ii) selecionar estirpes que apresentem capacidade para degradar os fungicidas metalaxil e metalaxil-M, (iii) proceder à identificação de enzimas extracelulares potencialmente envolvidas no processo de biodegradação destes compostos.



## 2. Objetivos Científicos

### 2.1 Objetivos Gerais

- ❖ Caracterizar morfológicamente e por técnicas de biologia molecular diferentes estirpes de Zygomycetes, dos géneros *Absidia*, *Circinella*, *Gongronella* e *Rhizopus*;
- ❖ Avaliar a capacidade de crescimento das diferentes estirpes de Zygomycetes na presença e elevadas concentrações dos fungicidas da classe das acilalaninas, Metalaxil e Metalaxil-M, com vista a seleccionar estirpes resistentes, em meio sólido;
- ❖ Avaliar a capacidade de biodegradação do Metalaxil e Metalaxil-M por estirpes seleccionadas, em cultura líquida, na presença de elevadas concentrações de fungicida.

### 2.2 Objetivos Específicos

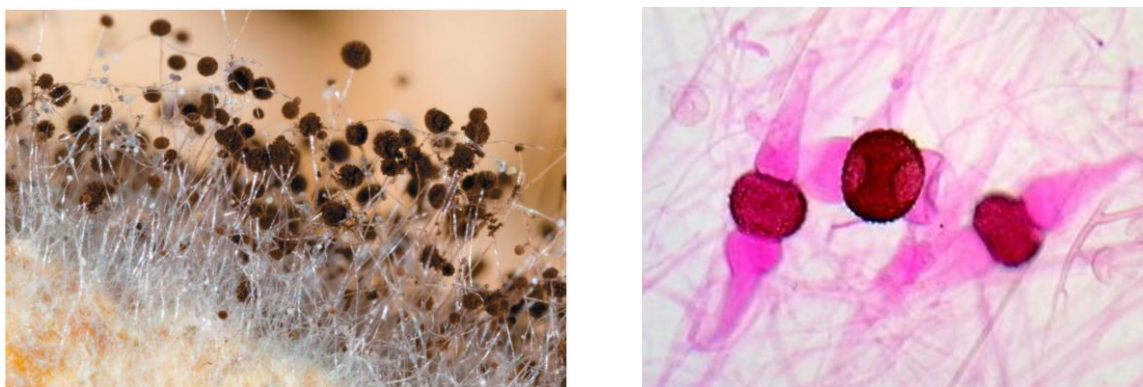
- ❖ Proceder à caracterização morfológica, macroscópica e microscópica das estirpes de Zygomycetes estudo;
- ❖ Caracterizar por técnicas de M13-PCR *fingerprinting*, as diferentes estirpes isoladas;
- ❖ Realizar um rastreio para avaliação do crescimento das estirpes em meio sólido contendo fungicida como fonte de carbono e energia (gradiente de concentração 0 - 100 mg.mL<sup>-1</sup>), com vista à seleção das estirpes tolerantes ao Metalaxil e ao Metalaxil-M;
- ❖ Realizar estudos de degradação do Metalaxil pelas estirpes seleccionadas em meio líquido contendo o fungicida (100 mg.mL<sup>-1</sup>);
- ❖ Determinar as taxas específicas de crescimento dos microrganismos seleccionados e de utilização da sacarose nas culturas;
- ❖ Quantificar por UV-HPLC as concentrações remanescentes de Metalaxil e Metalaxil-M nas culturas;
- ❖ Pesquisar enzimas extracelulares por testes colorimétricos clássicos – Teste de Schänel e Teste de Stanier.

## 3. Fundamento Teórico

### 3.1 Os Zygomycetes

Os **Zygomycetes** (filó Zygomycota) são um grupo de fungos filamentosos muito amplo e bem distribuído na natureza, maioritariamente saprófitas, decompositores da matéria orgânica presente em solos de diversas origens, como por exemplo culturas agroindustriais, onde podem ser frequentemente encontrados e isolados (Abedinifara *et al.*, 2009).

Macroscopicamente, as colónias dos fungos desta ordem são tipicamente de cor branca, bege ou cinza, tornando-se acastanhadas ao longo do tempo devido ao desenvolvimento de esporos. Apresentam um crescimento rápido, entre 5 a 8 dias, e quando inoculadas em meios de cultura adequados podem atingir vários centímetros de altura (Domsch, *et al.*, 1980). Microscopicamente, os Zygomycetes são caracterizados pela formação de esporos assexuados (esporangiósporos) e sexuados (zigósporos) (**Figura 1**), e micélio vegetativo ausente de septos (cenocítico), exceto para delimitar hifas antigas ou danificadas ou estruturas reprodutivas nas famílias *Mucorales* e *Zoopagales* (Benny *et al.*, 2001).



**Figura 1:** Estruturas reprodutoras dos Zygomycetes. a) Esporangiósporos de *Rhizopus* spp.  
b) Zigósporos de *Rhizopus* spp. (Adaptado de: <http://zygomycetes.org>)

A edição mais recente do Dicionário dos Fungos (Kirk *et al.*, 2008) descreve os Zygomycetes consistindo em 8 ordens, 32 famílias, 124 géneros e 870 espécies. Os fungos da ordem **Mucorales** (Schröter, 1893) são os mais representativos e mais bem caracterizados da classe dos Zygomycetes. Esta ordem inclui 12 a 13 famílias, 56 géneros e cerca de 300 espécies, nas quais se incluem microrganismos dos géneros *Absidia*, *Circinella*, *Gongronella* e *Rhizopus* spp. em estudo neste trabalho de dissertação.

### 3.1.1 Caracterização molecular dos Zygomycetes

As tecnologias de análise molecular de variabilidade do DNA permitem determinar zonas de referência no genoma, denominadas marcadores moleculares. A utilização de marcadores moleculares para a diferenciação das espécies permite abordagens alternativas à caracterização morfológica das espécies fúngicas.

Entre as técnicas mais simples de análise da variabilidade genética que não exigem um conhecimento detalhado do genoma, pode distinguir-se a amplificação por PCR de sequências satélites, denominada por **MSP-PCR** (*Microsatellite-Primed PCR*). Nas técnicas de MSP-PCR utilizam-se “primers” dirigidos para sequências satélites do DNA. A aplicação de “primers” dirigidos para sequências satélites em reações de amplificação por PCR permite a determinação de perfis de bandas que refletem o polimorfismo existente nestas regiões de DNA repetido e a distância que as separa entre si (Weising *et al.*, 1995). Para tal utiliza-se apenas um “primer” que pode hibridar em qualquer região do microsatélite.

Um dos “primers” mais utilizado é o **bacteriófago M13** que apresenta uma sequência que já foi detetada em múltiplas cópias espalhadas no genoma humano (Wyman e White, 1980) e ao ser aplicado a outros eucariotas, como por exemplo aos fungos unicelulares e filamentosos, demonstrou ter um elevado poder de diferenciação ao nível da espécie. Uma das grandes vantagens da técnica de **M13-PCR**, relativamente a outras técnicas de análise molecular, é a sua elevada reprodutibilidade que resulta da elevada restringência a que decorre a reação de PCR pois é dirigida para sequências específicas. Para além disso é rápida e fácil de executar e exige quantidades mínimas de DNA molde. A nível taxonómico a técnica de M13-PCR revela graus favoráveis de polimorfismo e parece ter um grande potencial na distinção de espécies e na análise da variabilidade intraespecífica, sendo considerado um dos métodos mais sensíveis para diferenciação de estirpes.

Para além do MSP-PCR existem outras técnicas de uso corrente na avaliação da diversidade genética, tais como o **RAPD** (*Random Amplified Polymorphic DNA*), o **RFLP** (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) e o **AFLP** (*Amplified Fragment Length Polymorphism*). A técnica de RAPD baseia-se na amplificação aleatória por PCR, de sequências desconhecidas de DNA utilizando “primers” de sequências arbitrárias (Williams *et al.*, 1990). A técnica de RFLP consiste na obtenção de cDNA, e tratamento do mesmo com um enzima de restrição, seguido de eletroforese para separação dos fragmentos de acordo com o peso

molecular. A técnica de AFLP é uma combinação de RFLP e RAPD. A técnica envolve a digestão de DNA com enzima de restrição, conforme requer uma análise de RFLP. Neste caso, porém, o DNA é digerido com dois tipos de endonucleases gerando fragmentos de diferentes tamanhos. De seguida adicionam-se “primers” de sequências arbitrárias, como na técnica de RAPD. A reação de *polimerase* em cadeia nestas condições amplifica segmentos de DNA ao acaso no genoma (Zabeau e Vos, 1993).

Uma técnica também muito utilizada para a taxonomia de fungos é a amplificação da região **ITS** (*Internal Transcribed Spacer*) do DNA ribossomal (rDNA). A região ITS está localizada entre os genes 18SrDNA e 28SrDNA e pode ser amplificada por oligonucleotídeos iniciadores específicos (Hillis e Dixon, 1991). O ITS é dividido em ITS1, localizado entre os genes 18S e o 5.8S, e o ITS2, que separa os genes 5.8S e 28S (Hillis e Dixon, 1991; Schlotterer *et al.*, 1994). Enquanto as regiões dos genes ribossomais são altamente conservadas dentro da espécie, as regiões dos espaçadores ITS, por evoluírem mais rapidamente, podem variar intraespecificamente na sequência de bases e no comprimento (Gerbi, 1985), sendo frequentemente usadas para taxonomia de espécies e gêneros (Schlotterer *et al.*, 1994; Antonioli *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2002).

Paralelamente outras regiões do genoma, nomeadamente SSU rRNA (*Small Subunit ribossomal RNA*), LSU rRNA (*Large Subunit ribossomal RNA*, mas também outros genes (fator de alongação 1-alfa,  $\beta$ -tubulina e/ ou calmodulina) têm sido utilizadas para complementar essa informação. Durante a última década estudos sobre a filogenia dos Zygomycetes, baseados principalmente na comparação de SSU rRNA, LSU rRNA, mas também outros genes (fator de alongação 1-alfa [EF-1a]), revelaram as relações entre as oito ordens atualmente aceites nos Zygomycetes (Nagahama *et al.*, 1995; O'Donnell *et al.*, 1998, 2001; Jensen *et al.*, 1999; Tanabe *et al.*, 2000; Voigt *et al.*, 1999; Benny *et al.*, 2001).

### 3.1.2 Aplicação industrial dos Zygomycetes

Como já foi referido anteriormente, os Zygomycetes são maioritariamente saprófitas, capazes de assimilar diferentes tipos de nutrientes e de produzir uma grande variedade de metabolitos secundários. Esta característica constitui uma vantagem económica, uma vez que estes fungos podem ser cultivados numa grande variedade de substratos, incluindo resíduos agroalimentares, e a biomassa produzida pode ser obtida em larga-escala como matéria-prima para aplicações industriais, tais como a produção de etanol. Por exemplo, espécies como *Mucor indicus* e *Rhizopus orizae* podem ser utilizadas no processo de fermentação alcoólica da casca de arroz para a produção de bioetanol (Abedinifara *et al.*, 2009).

Vários estudos, efetuados com diferentes géneros de Zygomycetes, têm sido realizados ao longo dos anos. O crescimento celular destes fungos foi estudado em diferentes substratos, tais como hidrolisados lenhocelulósicos, resíduos agroalimentares (casca de arroz, casca de laranja, melão), águas residuais de indústrias de celulose, entre outros. Estes estudos permitiram concluir que os Zygomycetes são geralmente capazes de metabolizar várias hexoses e pentoses, como a glucose, a manose e a xilose, bem como alguns dímeros e oligodímeros destes glúcidos, por exemplo a celobiose. O ácido láctico, o etanol, o glicerol e algumas enzimas extracelulares tais como celulasas e proteases estão entre os metabolitos secundários maioritariamente produzidos pelos Zygomycetes, dependendo da estirpe e do substrato utilizado (Taherzadeh *et al.*, 2009).

Para além disso, a parede celular destes fungos é rica em quitosano, pelo que a biomassa pode ser processada de modo a separar o citoesqueleto e as proteínas celulares e produzir compostos com aplicação na indústria alimentar, como constituintes da ração para animais, na indústria farmacêutica, como superabsorventes antibacterianos ou na indústria de tratamento de resíduos, para remoção de poluentes de águas residuais (Amorim *et al.*, 2001; Chatterjee *et al.*, 2005).

Alguns estudos indicam também que certos géneros da classe dos Zygomycetes, por exemplo *Absidia* spp., conseguem resistir a concentrações elevadas de determinados **fungicidas** e, simultaneamente, contribuir para a sua degradação (Guirad *et al.*, 2003). Tendo em conta que o processo de degradação de alguns fungicidas no solo é um processo essencialmente de biodegradação, a utilização deste tipo de microrganismos para a bioremediação de solos poluídos constitui um alvo de estudo em desenvolvimento.

### 3.2 Aspectos gerais dos fungicidas

Um **fungicida** é toda a substância ou mistura de substâncias químicas com capacidade de destruir ou inibir o crescimento de fungos, sendo frequentemente utilizados na proteção de culturas agrícolas contra fungos fitopatogênicos (Hassal, 1990).

Os **fungos fitopatogênicos** dividem-se, frequentemente, consoante a sua principal via de infecção (ar, sementes ou solo), sendo considerados três grupos principais: fungos que infetam as partes aéreas das plantas, os que infetam as plantas pela raiz, e ainda aqueles que se reproduzem nas sementes das plantas. Um dos principais problemas associados ao controlo destes microrganismos relaciona-se com a grande facilidade que os micélios possuem para se regenerar a partir de algumas hifas e a resistência devido à formação de estruturas como esporos e clamidósporos (Hassal, 1990; Cremllyn, 1991).

Consoante o seu processo de interação com os agentes fitopatogênicos, os fungicidas podem ser divididos em dois tipos:

- i. **Fungicidas sistêmicos:** aplicados na superfície das plantas, penetram na planta e são translocados no sistema vascular. Distribuem-se nos tecidos onde permanecem durante períodos variáveis e aí atuam sobre certos organismos. Exemplo: produtos à base de metalaxil.
- ii. **Fungicidas não sistêmicos ou de contato:** aplicados na superfície das plantas, têm ação preventiva, impedem a germinação dos esporos ou evitam a contaminação das plantas pelo fungo. Exemplo: produtos à base de cobre, ditiocarbamatos, ftalimidas.

Os **fungicidas sistêmicos** são diretamente absorvidos pelas plantas, quer através das raízes, quer através das folhas, e são transportados pelo xilema e pelo floema até ao local de ação. Como penetram no interior dos tecidos este tipo de fungicidas é muito eficaz na erradicação da doença, no entanto, se não forem muito específicos podem afetar irreparavelmente o crescimento da planta.

Os **fungicidas não sistêmicos** por seu lado, têm predominantemente uma ação por contato, quando depositados na superfície da planta, conferem proteção inibindo o crescimento microbiano, limitando a produção de estruturas reprodutoras e evitando a germinação dos esporos. Esta ação retarda ou previne a doença, no entanto, a maioria destes

compostos são mais eficazes antes do início da infecção da planta. Os fungicidas não sistêmicos devem possuir um certo grau de persistência e a maioria deles são insolúveis em água para evitar que sejam facilmente arrastados pela chuva (Hassal, 1990; Cremlyn, 1991).

Geralmente, obtêm-se melhores resultados quando se associa um fungicida sistêmico a um fungicida de contato, sendo bastante frequente o recurso a associações de compostos. As associações de fungicidas têm a vantagem de alargar o espectro de ação dos fungicidas e, simultaneamente, de diminuir ou até mesmo de evitar a capacidade de adaptação de estirpes fúngicas (Cremlyn, 1991).

### 3.2.1 *Propriedades físico-químicas dos fungicidas*

Com base na sua origem ou grupo químico os fungicidas podem classificar-se em:

- i. **Inorgânicos:** onde se incluem os fungicidas com base em arsênio (arsenito de sódio), cobre (oxicloreto e sulfato de cobre) ou enxofre.
- ii. **Orgânicos ou sintéticos:** agrupados em famílias de acordo com a sua estrutura química. Entre os fungicidas orgânicos sintéticos mais utilizados hoje em dia encontram-se os benzimidazoles, as dicarboximidas, os triazoles, as pirimidinas e as fenilamidas, entre outros.

Os fungicidas da família das **fenilamidas** são comercializados desde 1978 e incluem várias substâncias ativas pertencentes a três classes principais: as acilalaninas (Ex: benalaxil, benalaxil-M, furalaxil, metalaxil e metalaxil-M), as oxazolidinonas (Ex: oxadixil) e as butirolactonas (Ex: ofuracae). Destas substâncias ativas destacam-se os fungicidas **acilalaninas**, metalaxil e metalaxil-M, que serão o objeto de estudo deste trabalho de dissertação.

O **metalaxil** [N-(2,6-dimetilfenil)-N-metoxiacetil-DL-alaninato de metilo] é um importante fungicida acilalanina com atividade residual e sistêmica no combate aos fungos da classe Oomycetes, especialmente os pertencentes à ordem Peronosporales, patógenos de diversas culturas agrícolas, tais como *Bremia* spp., *Phythium* spp. (trigo, aveia, cana-de-açúcar), *Phytophthora* spp. (batata, tomate e outros vegetais), *Pseudoperonospora cubensis* (melão, pepino e outros), *Peronospora tabacina* (tabaco), *Sclerospora* spp. e *Plasmopara vitícola* (míldio da videira).



Do ponto de vista físico-químico o metalaxil é um composto muito solúvel em água, moderadamente volátil e fracamente adsorvido aos solos (Sukul *et al.*, 2000). É também muito estável quando exposto a uma ampla gama de pH, luz e temperatura, podendo persistir nos solos durante vários meses ou anos (Sukul *et al.*, 2000; Sukul *et al.*, 2001).

No entanto, existem vários problemas resultantes da aplicação de pesticidas, como o metalaxil, no ambiente. Foi demonstrado que a utilização continuada do metalaxil pode afetar negativamente a biodiversidade do solo e que devido à sua elevada solubilidade pode atingir águas superficiais e lençóis freáticos, tendo já sido detetada a sua presença em águas de consumo humano e em alimentos (Hildebrandt *et al.*, 2008). Para além disso, alguns estudos indicam que o metalaxil apresenta atividade mutagénica, podendo causar alterações cromossómicas em humanos e animais (Hrelia *et al.*, 1996), pelo que se torna cada vez mais importante encontrar novas técnicas eficazes na remediação do metalaxil do meio ambiente.

Este fungicida é comercializado como uma mistura racémica de enantiómeros R e S (Figura 2) sendo que o enantiómero R, **metalaxil-M** ou Mefenoxam, também pode ser encontrado na forma pura (Sukul *et al.*, 2000; Tomlin, 2009).

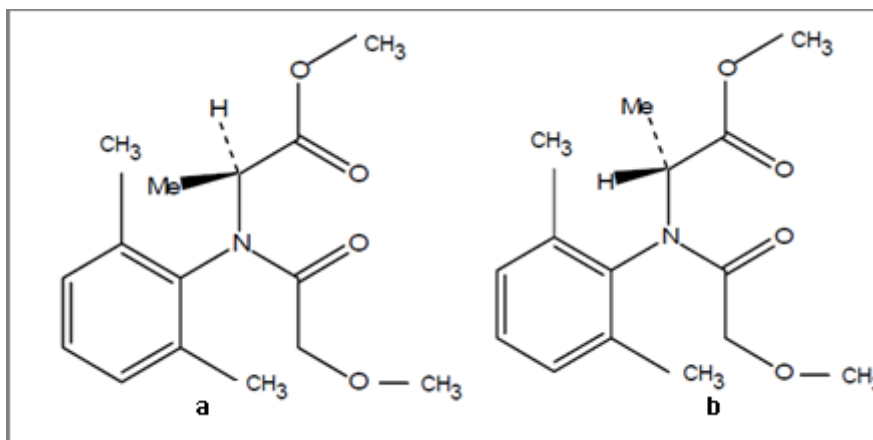


Figura 2: Estrutura dos enantiómeros S (a) e R (b) do Metalaxil. (Adaptado de: Monkiedje *et al.*, 2005)

Alguns autores defendem que o metalaxil-M fornece o mesmo nível de eficácia que o metalaxil para metade da taxa de aplicação, pelo que a substituição pelo isómero R poderia contribuir significativamente para a redução dos riscos ambientais associados à utilização do metalaxil (Nunninger *et al.*, 1996). As características físico-químicas destes compostos estão representadas na **Tabela 1**.



Tabela 1: Características físico-químicas do metalaxil e do metalaxil-M (Adaptado de: FAO, 1996)

		Metalaxil	Metalaxil-M
Nome	IUPAC	Metil N-(metoxiacetil)-N-(2,6-xilil)-DL-alaninato	
	CAS	Metil N-(2,6-dimetilfenil)-N-metoxiacetil-DL-alaninato	
Classe química		Acilalanina	
Fórmula molecular		C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>4</sub>	
Massa molecular		279,34 g.mol <sup>-1</sup>	
Densidade (20 °C)		1,20 g.cm <sup>3</sup>	1,125 g.cm <sup>3</sup>
Ponto de fusão		71-72 °C	*
Ponto de ebulição		295,9 °C	*
Pressão de vapor (25 °C)		75 x 10 <sup>-5</sup> Pa	3,3 x 10 <sup>-3</sup> Pa
Coeficiente de partição octanol-água (25 °C)		1,75	1,71
Solubilidade em água (25 °C)		7,1 g.L <sup>-1</sup>	26 g.L <sup>-1</sup>
* Indeterminado devido a decomposição térmica			

No entanto, existem poucos estudos sobre a degradação do metalaxil e do metalaxil-M no solo, nomeadamente sobre as vias de degradação destes xenobióticos. Para além das suas propriedades físico-químicas, a distribuição e persistência dos fungicidas no ambiente é muito dependente do tipo de solo, da sua composição em biomassa e das condições ambientais, pelo que estudos adicionais são necessários para responder a esta questão.

### 3.2.2 Mecanismos de ação dos fungicidas

O modo de ação diz respeito à atuação fisiológica e bioquímica dos fungicidas no metabolismo celular do fungo patogénico. O conhecimento destes mecanismos é fundamental para compreender fenómenos como a **resistência**. A aplicação excessiva de fungicidas levou à formação de várias estirpes resistentes, pelo que é cada vez mais importante a utilização cuidada destes produtos fitossanitários (Krieger, 2010).

Muitos fungicidas com diferentes mecanismos de ação foram desenvolvidos e comercializados nas últimas décadas. A sua ação contra os agentes fitopatogénicos pode manifestar-se a vários níveis, nomeadamente:

i. Inibição dos **processos bioquímicos** dos fungos, tais como a biossíntese de ácidos nucleicos, aminoácidos ou de proteínas, ou ainda inibição da biossíntese de lípidos, nomeadamente de esteróides e ácidos gordos;

ii. Perturbações do **metabolismo energético**, tais como inibição da glicólise, do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, da cadeia transportadora de eletrões ou da fosforilação oxidativa;

iii. Inibição da **divisão celular** ou destruição das estruturas celulares, nomeadamente por atrofia do crescimento das hifas e inibição da formação de estruturas produtoras de esporos.

Alguns dos fungicidas atualmente mais utilizados são inibidores da biossíntese de esteróides (triazóis e derivados da morfolina), inibidores da síntese proteica (ftalimidas) ou da biossíntese dos ácidos nucleicos, como as acilalaninas que inibem a síntese do RNA e os benzimidazóis que foram inicialmente considerados como inibidores da síntese do DNA e posteriormente, como inibidores da formação dos microtúbulos nas células eucariotas (Kaneko *et al.*, 1995).

O metalaxil e o metalaxil-M possuem propriedades sistémicas e atuam por inibição da biossíntese do RNA ribossomal dos fungos da ordem Perenosporales. A sua eficácia resulta da inibição específica da RNA polímerase-1 e da inibição da ligação da uridina no rRNA por interferência ao nível da transcrição (Brantner e Windels, 1998).

Apesar do modo de ação primário destes fungicidas parecer ser a inibição da síntese do RNA ribossomal, estes também intervêm no processo de esporulação dos fungos fitopatogénicos. Estudos efetuados durante o processo de germinação de *Plasmopara vitícola* mostraram que o metalaxil parece interferir com os processos de formação e maturação dos zoósporos (Madden e Ellis, 2000). Estudos efetuados em *Phytophthora* sp. mostraram que o metalaxil impede o crescimento do micélio com inibição da formação do esporângio e que, por vezes, reduz a duração da mobilidade do zoósporo, reduzindo a dispersão e a sua capacidade de germinação (Matheron e Porchas, 2000).

### 3.3 Metabolismo e toxicidade dos fungicidas

Os fungicidas, tal como a maioria dos xenobióticos aplicados nos ecossistemas, podem ser mais ou menos tóxicos para os seres vivos (animais, plantas e microrganismos) consoante as suas capacidades de absorção, biotransformação e/ou excreção.

#### 3.3.1 *Metabolismo e toxicidade dos fungicidas nos animais*

Os organismos animais possuem um conjunto de processos bioquímicos que permitem a conversão de compostos lipofílicos em compostos mais polares e, portanto mais facilmente excretáveis, sendo estes processos conhecidos como **biotransformação**.

As principais reações de biotransformação dos xenobióticos, nos mamíferos são normalmente divididas em dois grandes grupos:

- i. **Reações de fase I:** convertem, geralmente, os xenobióticos em derivados hidrossolúveis através de reações de oxidação, de redução e de hidrólise. Na fase I atuam, principalmente, dois sistemas oxidativos: o sistema citocromo P-450 (também conhecido por sistema monooxigenase de função mista) e o sistema amina-oxidase de função mista (ou sistema flavina-monooxigenase), que catalisam um grande número de reações importantes para a biotransformação dos fungicidas.
- ii. **Reações de fase II:** são reações biossintéticas onde o xenobiótico e/ou o seu metabolito derivado da fase I é ligado covalentemente a uma molécula endógena (Ex. ácido glucurónico, ião sulfato proveniente de um substrato endógeno, aminoácidos ou glutatióno) formando um conjugado.

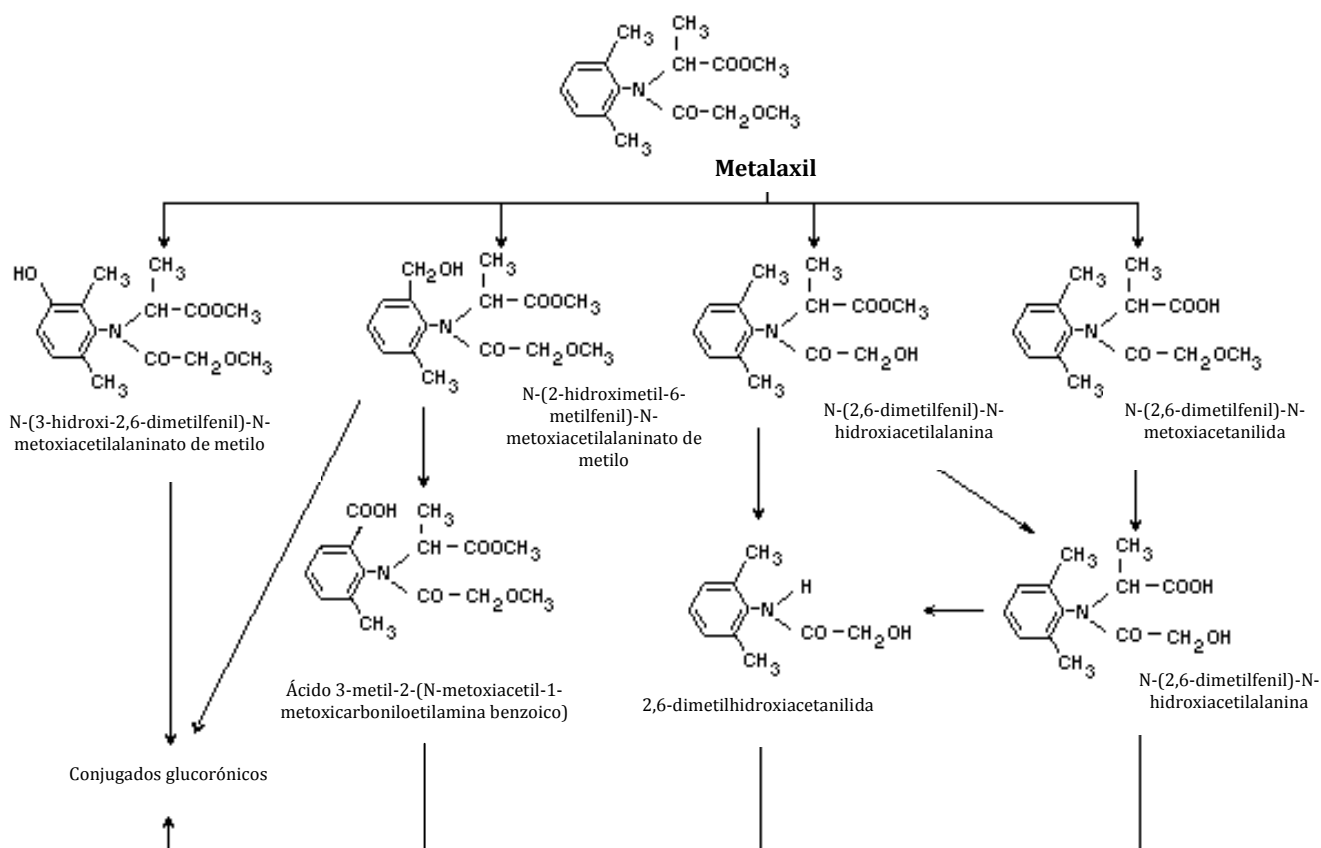
No meio terrestre, os fungicidas podem ser tóxicos para outros animais para além dos mamíferos, nomeadamente, para algumas aves e insetos. Na maioria dos casos, as doses utilizadas para fins agrícolas não afetam diretamente as aves mas podem ser tóxicos para alguns insetos, principalmente na forma de larva, e por esta razão, colocar em risco o fenómeno da polinização (James, 1998). Os organismos aquáticos também podem ser expostos aos resíduos dos fungicidas, embora geralmente por contaminação indireta, por exemplo drenagem a partir de campos agrícolas, escoamentos de efluentes industriais, entre outros (Rand e Petrocelli, 1985).

O metalaxil pode ser biotransformado pelos seres vivos com formação de um grande número de metabolitos. Segundo Kaneko *et al.* (1995), os três percursos principais propostos para a degradação do metalaxil nos animais são os seguintes:

- (1) Hidrólise do grupo metil-éster seguido da oxidação do álcool resultante, hidrólise do grupo metil-éster ou N-desalquilação da cadeia éster.
- (2) Oxidação do grupo metilo do anel benzénico com formação do álcool benzílico ou a hidrólise do éster.
- (3) Hidrólise do éster de metilo, seguida da N-desalquilação e conjugação com o ácido glucorónico.

A **Figura 3** exemplifica o percurso metabólico do metalaxil em ratos, proposto pela Environmental Protection Agency (EPA), pela Food and Agriculture Organization (FAO) e pela World Health Organization (WHO). Estudos farmacocinéticos efetuados em ratos, machos e fêmeas Sprague-Dawley, após a administração de uma dose única por via intravenosa (1 mg.Kg<sup>-1</sup>), de uma dose única baixa por via oral (1 mg.Kg<sup>-1</sup>) de uma dose única elevada por via oral (200 mg.Kg<sup>-1</sup>) ou doses orais repetidas (1 mg.Kg<sup>-1</sup> durante 14 dias), mostraram que a via urinária foi a principal via de eliminação para os ratos fêmeas, e a via fecal para os ratos machos (EPA, 1994). Após a administração de metalaxil marcado (27,8 mg.kg<sup>-1</sup>) por via oral, em ratos fêmeas, verificou-se que ao fim de 48 horas cerca de 58% da reatividade foi excretada pela urina e 32% pelas fezes. Os principais metabolitos excretados por ambos os sistemas foram as formas livres e os conjugados glucorónicos (FAO/WHO, 1996).

Em relação à toxicidade o metalaxil é classificado pela EPA como um composto pouco tóxico para mamíferos, aves e peixes (categoria toxicológica III) quando aplicado dentro das concentrações permitidas (Exttoxnet, 1996). Apesar de apresentar toxicidade aguda moderada em estudos efetuados em ratos por via oral (DL<sub>50</sub> 669 mg.Kg<sup>-1</sup>) e dérmica (DL<sub>50</sub> superior a 3100 mg.Kg<sup>-1</sup>), estudos de toxicidade crónica efetuados em ratos e cães revelaram que o metalaxil pode provocar sérias alterações celulares a nível hepático nestes animais (EPA 1994; Exttoxnet, 1996). Num estudo de toxicidade subcrónica em ratos expostos a doses de 2,5 mg.Kg.dia<sup>-1</sup>, observou-se a redução do apetite e o aumento das células do fígado (Exttoxnet, 1996). Um estudo de toxicidade crónica efetuado em cães mostrou que a administração deste fungicida conduz a um aumento nos níveis de fosfatase alcalina no sangue e a um aumento nas razões de massa entre o fígado e o cérebro dos animais (EPA, 1994).



**Figura 3: Percurso metabólico proposto pela EPA para a degradação do metalaxil e metalaxil-M em ratos. (Adaptado de: <http://www.inchem.org>)**

Apesar de a EPA ter classificado o metalaxil, como pertencendo ao grupo E ou seja um pesticida que não evidencia efeitos carcinogênicos (**Tabela 2**), alguns estudos revelaram que o metalaxil pode provocar efeitos genotóxicos e mutagênicos (Perocco *et al.*, 1995; Hrélia *et al.*, 1996; Paolini *et al.*, 1996). Um estudo *in vitro* efetuado por Perocco *et al.* (1995) sugere que o metalaxil pode ter atividade promotora da carcinogênese. Neste estudo, analisaram-se os efeitos citotóxicos do metalaxil e as propriedades transformantes num teste *in vitro* com células BALB/c 3T3 tendo sido observada a indução da transformação das células em estudo na presença de biocativação pelos sobrenadantes pós-mitocondrial.

Outros estudos mostraram que, apesar de não ter evidenciado efeitos mutagênicos nos testes de genotoxicidade efetuados em ratinho Swiss, o metalaxil apresentou resultados positivos num teste de aberração cromossômica, *in vitro*, em leucócitos humanos, sendo o tipo dominante de aberração a quebra do cromatídeo (Hrélia *et al.*, 1996). As aberrações cromossômicas podem indicar alterações na homeostase celular que são importantes na

instabilidade do genoma (interferência na síntese ou na condensação do DNA), podendo as lesões detetadas resultar da interação electrofílica do metalaxil com o DNA. Noutros estudos, também se verificou que o metalaxil pode induzir lesões no DNA diretamente através da sobreposição de radicais de oxigénio ou indiretamente através do aumento da ativação de compostos pré-carcinogénicos (Paolini *et al.*, 1996).

**Tabela 2: Classificação do potencial carcinogénico dos pesticidas (Adaptado de: EPA, 1994)**

<b>Categoria</b>	<b>Descrição</b>
<b>A</b>	carcinogénico humano
<b>B</b>	provável carcinogénico humano
<b>C</b>	possível carcinogénico humano
<b>D</b>	não classificável
<b>E</b>	não carcinogénico

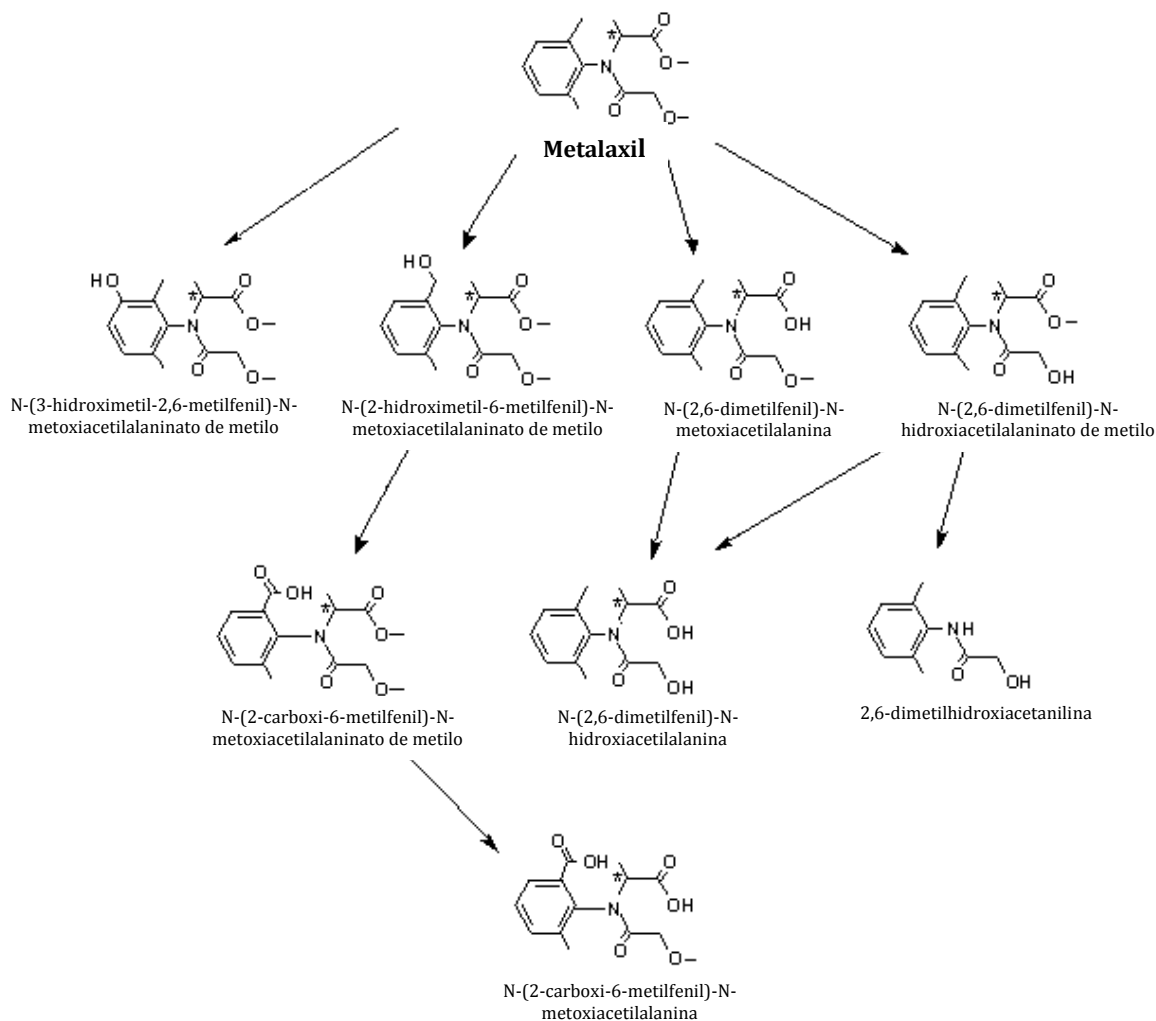
### **3.3.2 *Metabolismo e toxicidade dos fungicidas nas plantas***

Como já foi referido anteriormente, o metalaxil é um fungicida sistémico que é absorvido pelas plantas através das folhas e do caule (aplicação foliar) ou através das raízes e tubérculos (aplicação no solo) e é transportado para vários locais da planta onde possa exercer a sua ação contra o fitopatogénico e erradicar a doença. Estudos efetuados em várias culturas mostraram que o metalaxil é absorvido, sofre translocação e é extensivamente biotransformado pelas plantas (EPA, 1994).

As diferentes reações de transformação do metalaxil nas plantas envolvem:

- (1) Hidrólise das ligações metil-éster e metil-éter e formação do derivado do álcool benzílico.
- (2) Oxidação do grupo metilo ligado ao anel benzénico e formação do álcool benzílico derivado.
- (3) Hidroxilação do anel benzénico e N-desalquilação, com posterior conjugação destes metabolitos com compostos endógenos, como por exemplo a glucose.

Estas reações estão representadas na **Figura 4**.



**Figura 4: Produtos da degradação do metalaxil e do metalaxil-M detetados em plantas.**

(Adaptado de: <http://www.inchem.org>)

A maioria dos derivados do metalaxil foi encontrada em folhas e rebentos de plantas, no entanto, os metabolitos formados parecem variar com o tipo de cultura (Cole e Owen, 1987). Assim, por exemplo, o produto resultante da oxidação do grupo metilo ligado ao anel benzênico com formação de N-(2-hidroxi-6-metilfenil)-N-metoxiacetilalaninato de metilo foi o resíduo predominante detetado em suspensões celulares de culturas de vinha no estudo efetuado por Cole e Owen (1987). Um outro estudo efetuado em uvas refere que cerca de 60% do resíduo dos compostos derivados continha dimetilanilina (FAO, 1996).

Segundo Navarro *et al.*, (2001) após a aplicação de metalaxil, na cultura de vinha, nas doses recomendadas, a dissipação do metalaxil foi de 89% ao fim de 28 dias, tendo sido encontrado resíduos de uvas de 0,1 mg/Kg de metalaxil. É importante salientar que quando o

prazo de tolerância exigido após a aplicação do fungicida não é respeitado, os resíduos dos fungicidas podem passar para os alimentos e seus derivados e causar graves riscos para a saúde pública. O Decreto-Lei 215/2001 de 2 de Agosto baseado na diretiva comunitária 2000/42/EC estabelece que os níveis máximos de resíduos de metalaxil permitidos em Portugal para as culturas de uva, por exemplo, são de 2 mg/Kg nas uvas de mesa e de 1 mg/kg nas uvas para a produção de vinho.

### **3.3.3 Metabolismo e toxicidade dos fungicidas nos microrganismos**

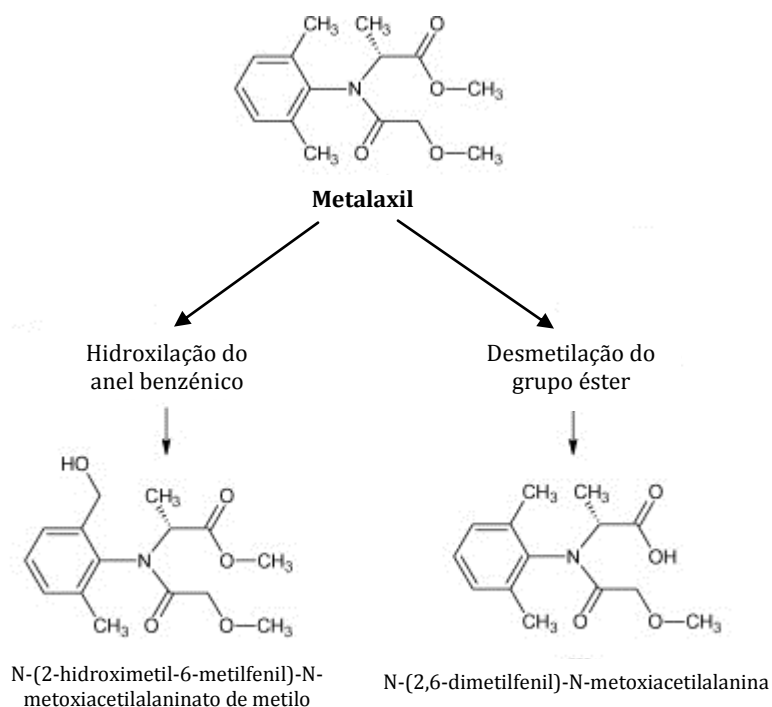
Com o desenvolvimento da indústria dos produtos fitofarmacêuticos, os fungicidas tendem a ser cada vez mais específicos para os agentes patogénicos, no entanto, muitos destes produtos químicos podem ser tóxicos para alguns microrganismos importantes dos ecossistemas terrestres e aquáticos. Apesar de uma parte da população microbiana existente nestes ecossistemas poder desenvolver mecanismos para os biodegradar, em concentrações relativamente elevadas alguns fungicidas poderão inibir o crescimento desses microrganismos aumentando a sua persistência no ambiente (Novak *et al.*, 1995).

Alguns estudos de toxicidade referem que a aplicação de fungicidas sulfurados no solo, como por exemplo o folpete, causam um elevado efeito inibitório na atividade da urease e na nitrificação do azoto nos solos e que alguns fungicidas não sulfurados, como o metalaxil, quando aplicados em doses elevadas também podem provocar estes efeitos (Martens e Bremner, 1997). Segundo Monkiédjé *et al.* (2000), a dose e a frequência de aplicação estão correlacionadas com a toxicidade que os fungicidas poderão exercer sobre os microrganismos. Para estes autores, a aplicação de baixas concentrações de metalaxil estimularam o crescimento de bactérias fixadoras de azoto enquanto que a utilização de altas concentrações inibiram o processo de nitrificação.

Existem poucos estudos sobre a degradação do metalaxil e do metalaxil-M no solo. No entanto, o seu processo de degradação nos solos parecer ser um processo essencialmente **biótico** e dependente do tipo, composição e flora microbiana do solo (Sharon e Edgington, 1982). A exposição prévia ao metalaxil também parece influenciar o processo de biodegradação. Estudos efetuados em solos submetidos a tratamentos anteriores com metalaxil referem que estes apresentaram maior capacidade para o degradar do que solos similares sem exposição prévia ao fungicida, parecendo estar sujeito a um processo de biodegradação facilitada (Bailey e Coffey, 1985).



Todavia, o mecanismo de degradação do metalaxil no solo não está ainda esclarecido. Os possíveis intermediários formados no processo de degradação do metalaxil no solo, descritos na bibliografia, são apresentados na **Figura 5**.



**Figura 5: Possíveis intermediários formados no processo de degradação do metalaxil e do metalaxil-M no solo.**

(Adaptado de: <http://www.inchem.org>)

Alguns estudos referem que o principal composto formado após a aplicação do metalaxil nos solos foi o seu derivado ácido ou N-2,6-dimetilfenil-N-metoxiacetilalanina (percurso **(1)** da **Figura 7**) que pode ser posteriormente mineralizado em CO<sub>2</sub> (Bailey e Coffey, 1986). Um outro estudo de degradação do metalaxil refere que o composto que foi predominantemente encontrado nos solos foi o derivado formado por hidroxilação do grupo metilo ligado ao anel benzênico (percurso **(2)** da **Figura 7**), posteriormente mineralizado em CO<sub>2</sub> (Wang *et al.*, 1995).

Como o processo de degradação do metalaxil nos solos sugere ser um processo essencialmente biótico, a utilização de microrganismos, nomeadamente de fungos filamentosos, para a **biorremediação** de solos poluídos tem despertado um interesse crescente do ponto de vista ambiental.

### 3.4 Biodegradação e biorremediação de fungicidas

As comunidades microbianas desempenham um papel significativo nas transformações dos pesticidas: bactérias e fungos são os principais intervenientes no processo de degradação dos pesticidas no solo e dos seus metabolitos (Chen e Mulchandani, 1998). Alguns trabalhos referem a utilização dos microrganismos para degradar pesticidas em biorreator ou *in situ* (Newcombe e Crowley, 1999). A biodegradação facilitada *in situ* tem sido utilizada para a remediação de locais contaminados com halogenetos alifáticos, pesticidas clorados, compostos nitroaromáticos e aromáticos policíclicos (Bollag e Bollag, 1995).

Os fungos apresentam uma maior capacidade de degradar *in situ* os poluentes orgânicos no solo do que as bactérias devido ao seu tipo de crescimento filamentoso que lhes confere uma maior propagação no solo e aumento da sua biomassa, permitindo aplicá-los com sucesso nos processos de biorremediação do solo (Glaser e Lamar, 1995). Certos fungos são conhecidos pela sua diversidade e capacidade para degradar materiais naturais complexos e persistentes. Os fungos da podridão branca, normalmente denominados “White rot fungi”, pertencentes ao grupo dos Basidiomycetes têm a capacidade para degradar lenhina e possuem um sistema de peroxidases extracelulares que, conjuntamente com o peróxido de hidrogénio produzido pelo fungo, catalisam a degradação de um grande número de compostos orgânicos, incluindo hidrocarbonetos poliaromáticos, pentaclorofenol e muitas classes de pesticidas (Novotný *et al.*, 2004). No entanto, nem sempre há correlação entre a capacidade que alguns destes fungos possuem para degradar a lenhina e a capacidade que apresentam para degradar alguns pesticidas (Bending *et al.*, 2002).

Para além deste grupo de fungos, têm sido referidos na bibliografia, fungos pertencentes a outras classes que apresentam capacidade para degradar poluentes orgânicos, em particular, fungicidas, incluindo alguns fungos pertencentes aos Zygomycetes, como *Cunninghamella elegans* e *Sycephalotrium racemosum* (Zheng *et al.*, 1989). Os Zygomycetes são microrganismos muito atrativos para a biorremediação de solos poluídos por diversos motivos. São organismos ubíquos nos ecossistemas terrestres e podem crescer com recurso a substratos baratos, tais como os resíduos de culturas agrícolas, que podem ser facilmente adicionados como nutrientes no local contaminado (Abedinifara *et al.*, 2009). Sendo fungos filamentosos, podem atingir os poluentes do solo de maneira que as bactérias não podem. Com efeito, estes crescem por extensão das hifas que se disseminam no solo com o crescimento (Glaser e Lamar, 1995). Possuem um sistema de **enzimas extracelulares**

capazes de oxidar vários poluentes ambientais, incluindo pesticidas aromáticos, como por exemplo, o metalaxil (Giafrenda *et al.*, 2004) e os enzimas-chave para o processo de degradação, são principalmente de natureza constitutiva. Este recurso evita que organismos produtores sofram adaptação metabólica ao composto a ser degradado. Para além disso estes enzimas são normalmente expressos sob condições deficientes em nutrientes, muito comuns em solos contaminados (Cameron *et al.*, 2000).

### 3.4.1 *Sistemas enzimáticos envolvidos nos processos de biorremediação*

Os **enzimas extracelulares** medeiam a degradação, a transformação e a mineralização da matéria orgânica do solo. A atividade enzimática de celulasas, fosfatases e outras hidrólases tem recebido um estudo extensivo ao longo dos anos e em muitos casos, as suas relações estequiométricas e respetivos mecanismos bioquímicos estão bem estabelecidos. Em contraste, a atividade enzimática das **fenoloxidasas** e **peroxidases** foram apenas avaliadas num pequeno conjunto de estudos de enzimas do solo (Sannino *et al.*, 2001; Sinsabaugh *et al.*, 2010; Sukul, 2006).

Dentro da literatura da bioquímica do solo, os enzimas que oxidam compostos fenólicos na presença de oxigénio são muitas vezes denominados em relação ao termo genérico **fenoloxidasas** (Baldrian, 2006). A Comissão de Enzimas da IUPAC classifica estes enzimas em duas classes principais:

- i. **Oxidoredutases** (EC 1.10.3): incluem os enzimas que utilizam o oxigénio como aceitador de eletrões. Dentro deste grupo destacam-se as ***o*-difenoil: oxigénio oxidoredutases** (EC 1.10.3.1), que incluem muitos enzimas descritos como tirosinases ou **catecol oxidases**, e as ***p*-difenoil: oxigénio oxidoredutases** (EC 1.10.3.2), que incluem as **lacases**. No entanto, segundo a bibliografia, os Zygomycetes não tem a capacidade de produzir lacases (Sinsabaugh, 2010).
- ii. **Dioxigenases** (EC 1.13.11): incluem os enzimas que incorporam dois átomos de oxigénio no seu substrato, por exemplo as **catecol dioxigenases** (EC 1.13.11.12) que catalisam a adição dos dois átomos de oxigénio molecular diretamente na molécula de catecol e seus derivados com subsequente clivagem do anel aromático. As catecol dioxigenases podem ainda ser classificadas, de acordo com a localização do local de clivagem, em intra-diol, por exemplo a **catecol 1,2-dioxigenase** (EC 1.13.11.12.1) ou extra-diol, por exemplo a **catecol 2,3-dioxigenase** (EC 1.13.11.12.2).



## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Seleção e caracterização de estirpes de Zygomycetes

Os Zygomycetes em estudo neste trabalho de dissertação pertencem à ordem Mucorales e dividem-se entre os géneros *Absidia*, *Circinella*, *Gongronella* e *Rhizopus* spp. As estirpes de *R. stolonifer* CCMI 1005 e *Gongronella* sp. CCMI 1000 foram isoladas do solo e depositadas na coleção de culturas nacional CCMI. À semelhança das anteriores, as estirpes de *Rhizopus stolonifer* Rid. CCMI 1005 e *Gongronella* sp. Rid CCMI 1001, previamente adaptadas ao crescimento em meios enriquecidos com fungicida comercial, também foram depositadas na coleção de culturas nacional CCMI. As estirpes de *G. lacryspora* ATCC 244.12 e *G. butleri* ATCC 8989 foram adquiridas à coleção de culturas americana ATCC. As restantes estirpes em estudo foram gentilmente cedidas pela coleção de culturas europeia CBS.

#### 4.1.1 Caracterização morfológica, macroscópica e microscópica, das estirpes em estudo

As estirpes fúngicas isoladas foram identificadas por observação macroscópica das colónias em PDA e por observação microscópica das estruturas vegetativas e reprodutoras, utilizando-se chaves taxonómicas adequadas. Estas culturas foram posteriormente repicadas para tubos de ensaio contendo meio PDA inclinado e, após incubação a 25 °C durante 5 a 7 dias, conservadas à temperatura de 4 °C, sendo efetuadas repicagens periódicas para manutenção das mesmas.

#### 4.1.2 Caracterização molecular das estirpes isoladas por M13-PCR

##### 4.1.2.1 Extração do DNA genómico

Após o crescimento fúngico em meio sólido PDA, 25 °C, 5 a 7 dias, o micélio foi recolhido e transferido para um almofariz, no qual foi triturado. Recolheu-se aproximadamente 1 g de biomassa e a lise celular foi efetuada por ressuspensão das células em 700 µL de tampão de lise pH 8, num microtubo de 2 mL e adicionando 300 µL de microesferas (425-600 µm de diâmetro). As células foram agitadas no vortex à velocidade máxima, em ciclos de 30 segundos no gelo seguido de 30 segundos no vortex, durante 3 minutos. A suspensão foi incubada a 65 °C durante 1 hora, período após o qual as células foram novamente agitadas no vortex e, posteriormente centrifugadas a 14 000 rpm, durante 10 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi recolhido para outro microtubo de 2 mL e

adicionaram-se 700 µL de solução padrão de TE com RNase na concentração de 50 µg.mL<sup>-1</sup> de modo a solubilizar os ácidos nucleicos da amostra. Os microtubos foram incubados em banho de água a 37 °C, durante 1 hora e, posteriormente, foram adicionados 500 µL da mistura clorofórmio:álcool isoamílico (24:1).

Após a mistura das fases por inversão, procedeu-se a nova centrifugação a 10 000 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante foi recolhido para um novo microtubo de 2 mL e adicionado tampão acetato de sódio 3 M pH 5.2, na proporção de 1:10 do volume obtido e misturado por inversão. Adicionaram-se 2,5 volumes de etanol absoluto frio (-20 °C) e a mistura foi homogeneizada por inversão. A mistura foi centrifugada a 13 000 rpm durante 15 minutos, o sobrenadante foi decantado e o sedimento foi lavado com 1 mL de etanol a 70% (v/v) e centrifugado a 10 000 rpm durante 10 minutos, retirar o máximo de sobrenadante, colocar novamente na centrífuga. Após secagem na estufa, entre 30 e 37 °C, durante 5 a 10 minutos, o DNA foi solubilizado em 0,1 mL de tampão de extração (TE) e guardado a -4 °C. A fim de minimizar os riscos de contaminação do DNA, todas as amostras foram preparadas em ambiente estéril, utilizando material adequado. Todas as amostras foram efetuadas em duplicado (Guimarães *et al.*, 2011).

#### **4.1.2.2 Análise por M13-PCR fingerprinting**

A amplificação das amostras de DNA foi efetuada por MSP-PCR (*Microsatellite Primed* – PCR) tendo sido utilizado como oligonucleótido iniciador um “primer” designado por M13. Este “primer” é um micro satélite específico derivado da sequência do fago M13 com 15 pares de bases (pb): 5'- GAG GGT GGC GGT TCT- 3' (Meyer *et al.*, 1991).

Na reação de amplificação, o DNA genómico a analisar (25 ng.µL<sup>-1</sup>) foi incubado com uma mistura de reação constituída por: 2,5 µL de tampão de reação (10x) contendo 20 mM de MgCl<sub>2</sub>; 2,5 µL da mistura de dNTPs, contendo 2 mM de dATP, dTTP, dCTP, dGTP; 1 µL de “primer” M13, 50 µM; 1 Unidade de *Taq* DNA polimerase; Água ultrapura esterilizada, para um volume total de 25 µL. Todas as amostras e reagentes utilizados neste procedimento foram mantidos em gelo durante a preparação das reações, de modo a reduzir o risco de degradação do DNA, inativação enzimática ou reações de amplificação não-específicas. Simultaneamente às reações de PCR foi preparado um controlo negativo (branco), em que o DNA foi substituído por água ultrapura esterilizada, indicativo de não contaminação.

Procedeu-se à amplificação das amostras e do branco num termociclador (MJ Mini, Bio-Rad). O programa de amplificação compreende, após um período de desnaturação de 5 minutos a 94°C, um conjunto de 40 ciclos de 30 segundos com a seguinte estrutura: a) desnaturação – 1 min. a 94 °C; b) *annealing* – 1 min. a 50 °C; c) extensão – 2 min. a 72 °C, aos quais se segue um período de extensão final de 6 minutos a 72 °C.. Os produtos de PCR foram guardados a 4 °C e visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,2%, a 90 V, durante 3 horas.

#### **4.1.2.3 Avaliação dos fragmentos de PCR por eletroforese em gel**

Os fragmentos amplificados por MSP-PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% em TBE (0,5x), no qual foi incorporado brometo de etídio (10 mg.mL<sup>-1</sup>). Os géis foram carregados com 8 µL de amostra de DNA amplificado adicionada de 2 µL de solução corante stock (6x). Como marcador de peso molecular utilizou-se o padrão de DNA 100 bp Plus (Fermentas) com a concentração de 0,5 mg de DNA por mL diluído de 1/10 com solução corante (1x). O gel foi submetido a uma voltagem de 90 V durante 3 horas. Após a corrida eletroforética o gel foi observado sob luz ultravioleta a 366 nm utilizando uma câmara de U.V Gel Doc™ (Bio-Rad) e a imagem foi integrada com recurso ao sistema Image Lab™ Software acoplado a um computador. A análise das bandas para análise da homologia, através da correlação de Pearson, e a construção de dendrogramas baseada no grau de similaridade, através do método UPMGA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages) foi efetuada recorrendo ao *software* Gel Doc XR (BioRad).

## **4.2 Ensaios de seleção das estirpes tolerantes aos fungicidas**

Os fungicidas utilizados nos ensaios de degradação foram formulações comerciais de Metalaxil e Metalaxil-M: Alister Combi (Makhteshim Agan, Portugal): 10% (p/p) Metalaxil; Ridomil Gold Combi pepite (Syngenta, Portugal): 5% (p/p) Metalaxil-M, respetivamente. O padrão utilizado para a quantificação do metalaxil foi uma solução de elevado grau de pureza (99,6%) de Metalaxil-Pestanal® (Sigma-Aldrich). A lista completa dos reagentes utilizados na execução experimental deste trabalho de dissertação está apresentada no **Anexo I – A**.

### **4.2.1 Ensaio da degradação dos fungicidas em meio sólido**

A capacidade das estirpes fúngicas em estudo para tolerarem concentrações elevadas de fungicida foi avaliada em cultura pura, pela técnica das placas em gradiente (Szybalski,

1952). Este ensaio consiste a solidificação de uma camada de meio mínimo YNB (Yeast Nitrogen Base) suplementado com uma concentração definida de pesticida comercial (100 mg.L<sup>-1</sup>), enquanto a placa de Petri permanece numa posição inclinada. O ângulo de inclinação da placa é tal que se forma um gradiente de concentração do pesticida ao longo da mesma (0 – 100 mg.L<sup>-1</sup>). De seguida, o mesmo volume de meio mínimo YNBS (Yeast Nitrogen Base Saccharose) é adicionado por cima da camada inferior e deixado a solidificar, formando-se duas camadas complementares sobre as quais vão crescer os microrganismos em estudo.

Os fungicidas utilizados foram previamente esterilizados em autoclave e adicionados ao meio de cultura nas quantidades necessárias para obter as concentrações pretendidas (100 mg.L<sup>-1</sup>). O inóculo de cada estirpe fúngica foi preparado a partir de uma cultura crescida a 25 °C numa placa com PDA e com 5 a 7 dias de idade. Desta, foi retirada, com o auxílio de uma ança, uma pequena porção de micélio, com cerca de 5 mm de diâmetro, de uma zona bem esporulada, que se colocou na zona correspondente à concentração de pesticida 0 mg.L<sup>-1</sup> da placa em gradiente a utilizar nos ensaios de seleção. Procedeu-se da mesma forma para cada fungicida e para cada microrganismo a testar neste ensaio. As placas foram colocadas num estufa de incubação a 25 °C e os halos de crescimento radial das colónias foram registados em períodos de tempo regulares, 7 dias de incubação para as estirpes de *Gongronella* sp. e 5 dias de incubação para os restantes fungos em ensaio.

#### **4.2.2 Ensaio de degradação do metalaxil em meio líquido**

Os inóculos de cada uma das estirpes fúngicas selecionadas no ensaio anterior foram preparados a partir de culturas crescidas em placa contendo meio PDA, com 5 a 7 dias de incubação a 25 °C. Destas, foi retirada, com o auxílio de uma ança, uma pequena porção de micélio, com cerca de 8 mm de diâmetro, de uma zona bem esporulada, que se colocou no centro de uma placa de TWA (Tap Water Agar) com uma tira de celulose, utilizada como meio indutor do sistema enzimático do fungo (Martins *et al.*, 2002; Ottoni *et al.*, 2010). As placas foram colocadas numa estufa de incubação a 25 °C durante 7 dias, período após o qual se procedeu à transferência do inóculo da placa de TWA-celulose, para um meio sólido de pré-adaptação constituído por um meio mínimo YNB (Yeast Nitrogen Base) suplementado com uma concentração definida de pesticida comercial (100 mg.L<sup>-1</sup>) e de sacarose (5 g.L<sup>-1</sup>). Para a montagem das culturas líquidas, colocaram-se 100 mL de meio YNB líquido, suplementado com uma concentração definida de pesticida comercial (100 mg.mL<sup>-1</sup>), previamente esterilizado em autoclave a 121 °C durante 20 minutos, e de sacarose (5 g.L<sup>-1</sup>), em frascos



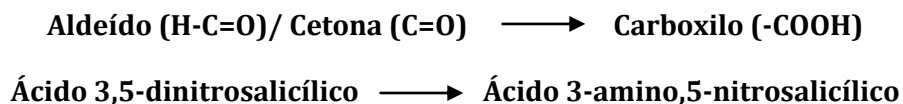
Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, rolhados e previamente esterilizados, aos quais se adicionaram 5 inóculos com cerca de 8 mm de diâmetro retirados do micélio de culturas de Zygomycetes crescidas durante 7 dias no meio de pré-adaptação. As culturas foram incubadas em agitador orbital, a 100 r.p.m e à temperatura ambiente, durante 21 dias, sendo recolhidas amostras por períodos de tempo regulares.

#### **4.2.2.1 Determinação da taxa específica de crescimento**

Para a determinação da taxa específica de crescimento dos microrganismos em estudo, efetuaram-se determinações periódicas da biomassa, através da quantificação do peso seco de cada uma das amostras. O peso seco foi determinado por separação do micélio, sob vácuo, através de uma membrana filtrante de porosidade 0,45  $\mu\text{m}$ , previamente pesada e calibrada a peso constante. Após a filtração, as membranas com a biomassa foram colocadas dentro de uma placa de Petri e secas durante 24 h em estufa a 80  $^{\circ}\text{C}$ , sendo posteriormente colocadas no exsiccador, sob vácuo, durante cerca de 6 horas, de forma a remover toda a humidade. A concentração da biomassa foi então determinada através da diferença do valor do respetivo peso seco após secagem e do peso do conjunto antes da filtração.

#### **4.2.2.2 Determinação da taxa de utilização da sacarose**

A concentração de sacarose presente nos sobrenadantes das culturas líquidas dos microrganismos em estudo foi determinada através de uma adaptação do método do DNS. O método do DNS (Miller, 1959) indica a presença de um grupo carbonilo livre (C=O) numa mistura contendo glúcidos ou outras moléculas redutoras. Este método baseia-se no facto do DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico, IUPAC: ácido 2-hidroxi-3,5-dinitrobenzóico) reagir com o grupo funcional aldeído presente na glucose, ou cetona presente na frutose, com a formação de ácido 3-amino,5-nitrosalicílico, um complexo aromático de cor acastanhada estável com absorção máxima aos 540 nm, de acordo com as seguintes reações acopladas:



Ao contrário da maioria dos glúcidos, a sacarose é um dissacarídeo não-redutor, ou seja ambos os grupos químicos de natureza redutora dos monómeros que a constituem ( $\alpha$ -D-glucose e  $\beta$ -D-frutose) participam na ligação glicosídica, não se encontrando livres para formar

polímeros. Conseqüentemente, a maioria dos ensaios utilizados para a detecção de glúcidos, entre os quais o método do DNS, apresentam resultados negativos para a sacarose. No entanto este método pode continuar a ser aplicado se a amostra for previamente submetida a hidrólise ácida para obtenção dos seus monómeros redutores, a glucose e a frutose, que irão posteriormente reagir com o DNS como anteriormente descrito.

Para a determinação da taxa de utilização da sacarose nas culturas líquidas em estudo, preparou-se, em tubo de ensaio, uma mistura reacional contendo 1 mL da solução de sacarose (amostra ou padrão) e 100  $\mu$ L de uma solução de ácido clorídrico 1M e procedeu-se à sua incubação a 90 °C, durante 5 minutos, de forma a ocorrer a hidrólise da ligação glicosídica. A solução foi neutralizada com 50  $\mu$ L de uma solução de hidróxido de potássio 5 N, verificando-se o desenvolvimento de uma coloração acastanhada indicativa da presença de açúcares redutores (glucose e frutose, respetivamente). Finalmente procedeu-se ao ensaio do DNS propriamente dito, em que à amostra hidrolisada foi adicionado o mesmo volume da solução de DNS. Os tubos de ensaio foram incubados a 90 °C, durante 5 minutos, período após o qual se parou a reação com 5 mL de água destilada. Todas as medições foram efetuadas a um comprimento de onda de 540 nm, utilizando um espectrómetro de UV/Vis (Hitachi 2000) e uma curva de calibração utilizando padrões de sacarose de concentrações compreendidas entre 100 mg.L<sup>-1</sup> e 10 mg.L<sup>-1</sup> (**Anexo III – Figura 17**). Todos os ensaios foram realizados em triplicado e lidos contra um branco cuidadosamente preparado, em que a amostra foi substituída por água destilada.

#### **4.2.2.3 Quantificação do metalaxil por HPLC**

As amostras foram analisadas num cromatógrafo para cromatografia líquidas de elevada eficiência (HPLC) equipado com um injetor Rheodyne de 20  $\mu$ L, uma bomba Merck Hitachi L-7100, uma coluna de fase reversa Merck Superspher 100 RP-18 (250x4,6 mm; 4  $\mu$ M), uma pré-coluna Lichrospher 100 RP-18 e um detetor Isco V<sub>4</sub> de UV/Vis Isco modelo V4R com sistema de aquisição e tratamento automático de dados pelo *software* Star Chromatography Workstation 03-9194401. Para quantificação dos fungicidas procedeu-se previamente à filtração dos sobrenadantes através de membranas filtrantes de 0,45  $\mu$ m de porosidade (Millipore). As amostras e os padrões foram eluídos, em modo isocrático, numa mistura de acetonitrilo e água ultrapura (45:55), durante 20 minutos, com um fluxo de 1 mL.min<sup>-1</sup>, à temperatura de 25 °C, e as leituras foram efetuadas a um comprimento de onda de 210 nm. O metalaxil foi identificado por comparação dos valores dos respetivos tempos de

retenção dos padrões correspondentes quando submetidos às mesmas condições experimentais e foram quantificados, pelo método de calibração por padrão externo, por interpolação gráfica das respectivas áreas de pico obtidas em curvas de calibração dos mesmos padrões (**Anexo III – Figura 18**). O intervalo de concentrações utilizado para o metalaxil foi de 10 a 50 mg.L<sup>-1</sup>. Para cada concentração foram efetuados 4 replicados para construção da curva de calibração. Para as amostras mais concentradas foram preparadas diluições com acetoneitrilo.

#### **4.2.3 Ensaio de adsorção do metalaxil à biomassa**

De modo a avaliar a influência da biomassa no processo de degradação do metalaxil efetuaram-se estudos com a biomassa não viável para observar se ocorreu adsorção do fungicida à biomassa. Para obtenção da biomassa não viável procedeu-se à incubação dos microrganismos em cultura líquida, em meio MEA (*Malt Extract Agar*), durante 5 dias, a 25 °C e a 100 rpm. As culturas foram centrifugadas a 3000 *g*, durante 10 minutos, a 4 °C e a biomassa foi recolhida, ressuspensa em soro fisiológico e esterilizada em autoclave a 121 °C, durante 20 minutos. De seguida adicionou-se 1 g da biomassa não viável a frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade, rolhados e previamente esterilizados, contendo 100 µL de meio YNB líquido suplementado com uma concentração definida de pesticida comercial (100 mg.L<sup>-1</sup>). O metalaxil remanescente foi quantificado aos 0, 1, 3, 5 e 7 dias, tendo as amostras sido colocadas num agitador orbital a 100 rpm e à temperatura ambiente até ao momento da quantificação. As amostras foram quantificadas por HPLC e as condições de ensaios foram as descritas na **secção 4.5.2.3** para análise do metalaxil.

### **4.3 Identificação dos enzimas extracelulares**

#### **4.3.1 Detecção da atividade das fenoloxidasas – Teste de Schänel**

A detecção da atividade das fenoloxidasas (EC 1.10) extracelulares foi baseada na aplicação do teste qualitativo de Schänel (1971) que indica a presença de uma reação de oxidação de difenóis simples na presença de fenoloxidasas. A reação ocorreu a partir da mistura de 1 mL de sobrenadante das amostras recolhidas durante 21 dias, 1 mL de solução de hidroquinona 0,01 M, 1 mL de glicina 0,2 M e 2 mL de solução tampão de ácido cítrico/hidrogenofosfato de sódio a pH 5,6. Depois de agitação vigorosa e obtenção de

coloração rosa intensa, procedeu-se ao registo final dos resultados. Nos casos onde se verificaram ausência ou baixa intensidade de cor, a solução permaneceu a 30 °C, durante 24h.

#### 4.3.2 Teste da clivagem do catecol – Teste de Stanier

O teste da clivagem *meta/orto* do catecol desenvolvido por Stanier e Orston, (1973) baseia-se na deteção do mecanismo de quebra do anel aromático ou dos seus derivados e permite detetar a natureza indutível ou constitutiva dos enzimas envolvidos. A mistura da reação contém 600 µL do sobrenadante das amostras, 200 µL de tolueno, 200 µL de uma solução de catecol 0,1 M e 1 mL de solução tampão de ácido cítrico/hidrogenofosfato de sódio a pH 8,0.

Esta mistura pode apresentar a cor amarela característica da clivagem *meta*. Se não se registar mudança de cor, e após incubação das amostras a 30 °C, a 150 rpm, durante 1h, adiciona-se 0,5 g de sulfato de amónio, 100 µL de uma solução de hidróxido de amónio 5 N e 10 µL de uma solução saturada de nitroprussiato de sódio (IUPAC: pentacianonitrosilferrato(III) de sódio), de forma a visualizar o possível aparecimento de uma cor de tom púrpura característica da clivagem *orto* do catecol. É a quebra do catecol na posição intra- ou extra-diol que determina o composto resultante para cada tipo de clivagem: cis,cis-muconato (clivagem orto) ou semialdeído 2-hidroximucónico (clivagem meta). Estas reações são mediadas por duas dioxigenases, a catecol-1,2-dioxigenase (EC.13.11.12.1) e a catecol-2,3-dioxigenase (EC.13.11.12.2), conforme representado na **Figura 7**.

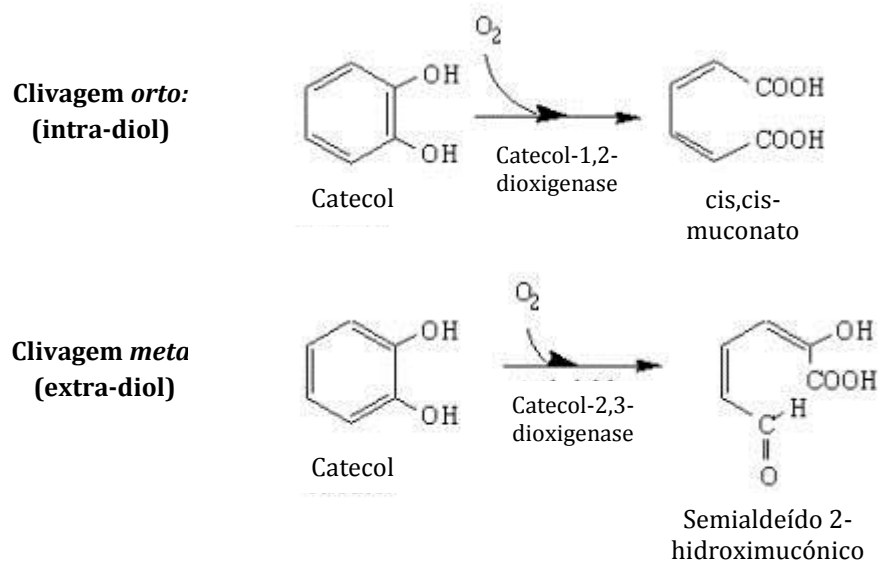


Figura 7: Mecanismo de quebra do catecol na posição intra ou extra-diol (Adaptado de: Anselmo, 1992)

## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Seleção e identificação de estirpes de Zygomycetes

#### 5.1.1 Caracterização morfológica, macroscópica e microscópica, das estirpes em estudo

Os Zygomycetes em estudo neste trabalho de dissertação pertencem, como já foi referido, à ordem Mucorales e dividem-se entre os géneros *Absidia*, *Circinella*, *Gongronella* e *Rhizopus* spp. As estirpes fúngicas isoladas foram identificadas por observação macroscópica das colónias maduras em PDA e por observação microscópica das estruturas vegetativas e reprodutoras, utilizando-se chaves taxonómicas adequadas (Smith, 1969; Domsch *et al.*, 1980). As principais características morfológicas dos microrganismos em estudo são apresentadas na **Tabela 3**.

Os fungos do género *Absidia* (Tieghem, 1878) apresentam, geralmente, colónias acastanhadas e de crescimento relativamente rápido (3 a 5 dias) e são caracterizados pela formação de esporângios relativamente pequenos, com a presença de um septo único na parte antecedente ao esporangióforo e pela produção de rizoides bem diferenciados.

Os fungos do género *Circinella* (Tieghem e Le Monn., 1878) apresentam colónias acinzentadas e de crescimento relativamente rápido (3 a 5 dias) e são caracterizados pela formação de esporângios multi-esporulados, mais ou menos globulosos, com origem em esporangióforos circinados.

Os fungos do género *Gongronella* (Ribaldi, 1952) apresentam, geralmente, colónias brancas com crescimento relativamente lento (7 a 8 dias), estruturas de suporte e rizoides pouco diferenciados, esporangióforos eretos e muitas das vezes ramificados. O esporângio é geralmente globoso e apresenta a columela reduzida.

Os fungos do género *Rhizopus* (Ehrenberg, 1820) apresentam, geralmente, colónias acinzentadas de crescimento relativamente rápido (3 a 5 dias) e são caracterizados pela formação de esporângios multi-esporulados de grandes dimensões. Os esporângios são suportados por uma grande columela apofisada e os esporangióforos surgem entre rizoides distintos.

Tabela 3: Principais características macroscópicas e microscópicas dos Zygomycetes em estudo.

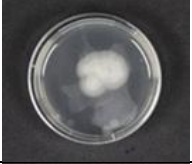
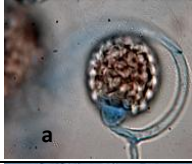






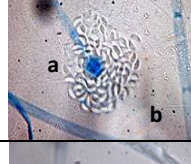
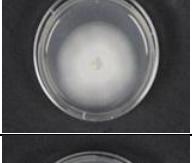
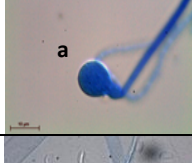
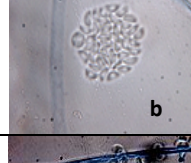
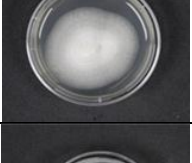
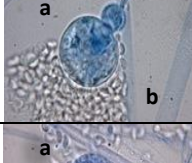
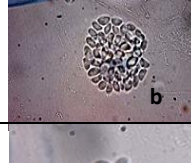
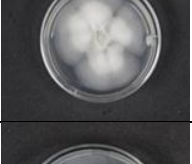
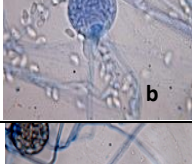
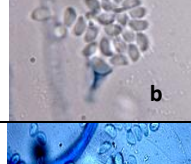


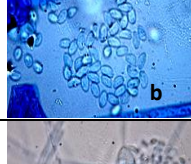
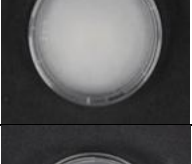

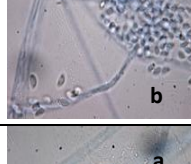
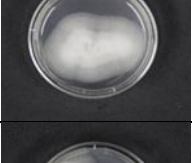
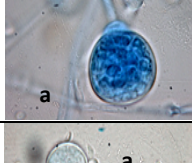
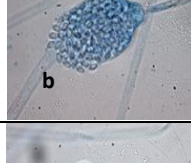


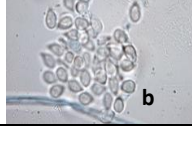
Colónias em PDA, 25°C, 5 a 7 dias. (a) Esporângio; (b) Esporos.

As imagens apresentadas forma obtidas na Micoteca da Universidade do Minho, Braga, Portugal.

Género	Espécie	Estirpe	PDA	Microscópio	
				40 x	100 x
<i>Absidia</i>	<i>glauca</i>	CBS 101.08			
		CCMI 91			
	<i>coeruleae</i>	CBS 104.08			
<i>Circinella</i>	<i>simplex</i>	CCMI 244			
	<i>lacrymispora</i>	CBS 101.57			
<i>Rhizopus</i>	<i>stolonifer</i>	Rid CCMI 1104			
		Solo CCMI 1105			
		Orizae CCMI 900			
		CBS 40351			



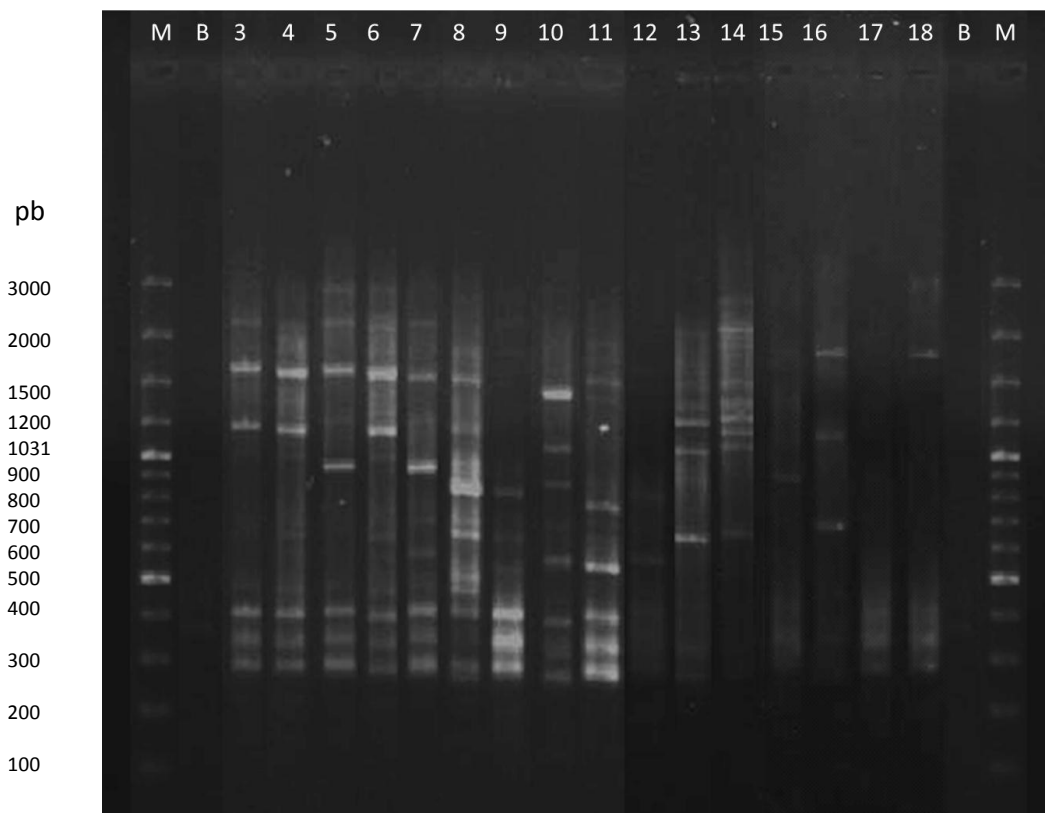
Tabela 3: (Continuação)

<i>Gongronella</i>	<i>lacryspora</i>	CBS 244.62			
	<i>sp. Rid</i>	CCMI 1000			
	<i>sp. Solo</i>	CCMI 1101			
		CBS 157.25			
		CBS 179.28			
		CBS 194.60			
	<i>butleri</i>	CBS 216.58			
		CBS 227.36			
		CBS 228.26			
		CBS 259.52			

### 5.1.2 Caracterização molecular das estirpes isoladas por M13-PCR

A observação macroscópica e microscópica das colónias, utilizando chaves taxonómicas adequadas permite a classificação dos fungos em estudo até à espécie, mas com algumas dificuldades e subjetividades. Como tal, procedeu-se de uma forma preliminar, à comparação dos perfis eletroforéticos das estirpes em estudo por M13-PCR.

Os produtos de PCR resultantes de cada reação de amplificação executadas neste trabalho de dissertação apresentaram um número variável de bandas compreendidas entre os 3000 e os 300 pb. Como se obtiveram vários fragmentos por reação de amplificação, foi possível proceder à avaliação da similaridade entre as estirpes e construir dendogramas utilizando o coeficiente de correlação de Pearson. Os eletroforetogramas e os dendogramas obtidos estão apresentados nas **Figuras 8 e 9**.



**Figura 8: Eletroforetograma obtido após M13-PCR para as estirpes de Zygomycetes em estudo.**

M – Marcador de DNA 100 pb Plus; B – Branco; 3 – *G. butleri* CBS 228.36; 4 – *G. butleri* CBS 157.27; 5 – *G. butleri* CBS 227.36; 6 – *G. butleri* CBS 194.60; 7 – *G. butleri* CBS 216.58; 8 – *Gongronella* sp. CCM1 1000; 9 – *Gongronella* sp. Rid. CCM1 1001; 10 – *G. butleri* CBS 259.52; 11 – *G. lacryspora* CBS 144.62; 12 – *C. lacrymispora* CBS 101.57; 13 – *A. glauca* CBS 101.08; 14 – *A. glauca* CCM1 91; 15 – *R. stolonifer* CCM1 1105; 16 – *R. stolonifer* Rid. CCM1 1104; 17 – *R. stolonifer* CBS 244.62; 18 – *R. orizae* CCM1 900.



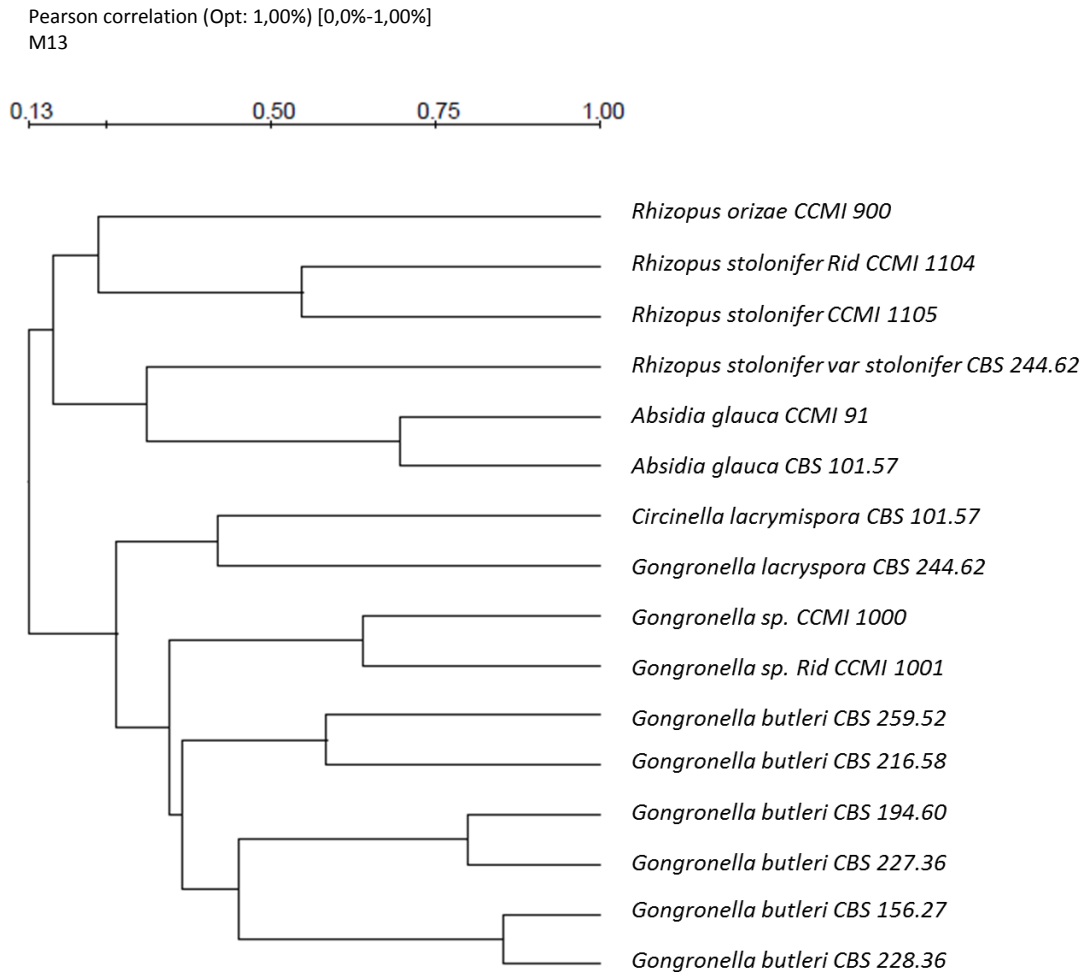


Figura 9: Dendrograma do perfil de eletroforese obtida após M13-PCR para as estirpes de Zygomycetes em estudo.

Por comparação dos perfis moleculares obtidos por amplificação M13-PCR do DNA das estirpes em estudo, observou-se a formação de dois *clusters* principais, um que engloba as estirpes de *Rhizopus* e de *Absidia* com 17% de similaridade entre géneros, e outro que engloba as estirpes de *C. lacrymispora* CBS 101.57 e de *Gongronella* com 27% de similaridade entre géneros.

Não se observou a formação de um *cluster* uniforme entre as estirpes de *Rhizopus* em estudo, ao contrário do que aconteceu com as estirpes de *Absidia* spp. que apresentaram um grau de similaridade de 70% entre si. A análise do perfil molecular para as estirpes de *Rhizopus* mostrou as maiores semelhanças entre as estirpes de *R. stolonifer* CCMI 1005 e de *R. stolonifer* Rid CCMI 1004, com um grau de similaridade de cerca de 55% entre elas.

Dentro do *cluster* formado entre as estirpes de *Circinella lacrymispora* CBS 101.57 e *Gongronella* spp. observaram-se dois *clusters* principais, um deles entre as estirpes de *C. lacrymispora* CBS 101.57 e *G. lacryspora* CBS 244.62 com um grau de similaridade de 42 % entre elas, e outro com as restantes estirpes de *Gongronella* com um grau de similaridade de 36% entre elas. Dentro deste último grupo as estirpes de *Gongronella* sp. CCM1 1000 e *Gongronella* sp. Rid CCM1 1001 formaram um *cluster* independente das estirpes de *Gongronella butleri* com 64% de similaridade entre elas, indicado poder tratar-se de uma nova espécie do género *Gongronella*.

No entanto, para confirmar estes resultados seria necessário efetuar outros estudos, como por exemplo, estudos de confirmação por ITS-ARDRA (Internal Transcribed Spacer-Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis) ou proceder à sequenciação das zonas de ITS destes organismos, comparado com sequências já estabelecidas em bases de dados públicas, como por exemplo a Genbank. Adicionalmente, para uma melhor caracterização das estirpes também poderiam ser efetuados estudos proteómicos e espectroscópicos, com recurso a técnicas de MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight) e de FTIR (Fourier Transform Infrared), respetivamente (Santos *et al.*, 2010).

## 5.2 Ensaios de seleção das estirpes tolerantes aos fungicidas

### 5.2.1 Ensaio da degradação dos fungicidas em meio sólido

Com vista à seleção dos Zygomycetes mais promissores na degradação dos fungicidas procedeu-se a um rastreio dos microrganismos em estudo, em placas de Petri contendo um gradiente de concentrações crescentes (0 – 100 mg.L<sup>-1</sup>) de metalaxil e de metalaxil-M. Os resultados do ensaio de degradação dos fungicidas em meio sólido encontram-se representados na **Figura 10** e na **Figura 11** para 5 e 7 dias de incubação, respetivamente.

Das 21 estirpes isoladas, apenas 4 estirpes, *R. stolonifer* Rid CCM1 1004, *R. stolonifer* CCM1 1005, *R. orizae* CCM1 900 e *A. glauca* CBS 101.08, apresentaram capacidade de tolerar concentrações de fungicida comercial de 100 mg.L<sup>-1</sup>. No entanto, é de referir que o crescimento das estirpes de *Rhizopus* spp., *Absidia* spp. e *Circinella* spp. é muito mais rápido (5 dias) que o crescimento das estirpes de *C. lacrymispora* CBS 101.57 e *Gongronella* spp. (7 dias) pelo que as últimas nunca iriam atingir a concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup>, durante o tempo de vida médio das culturas.

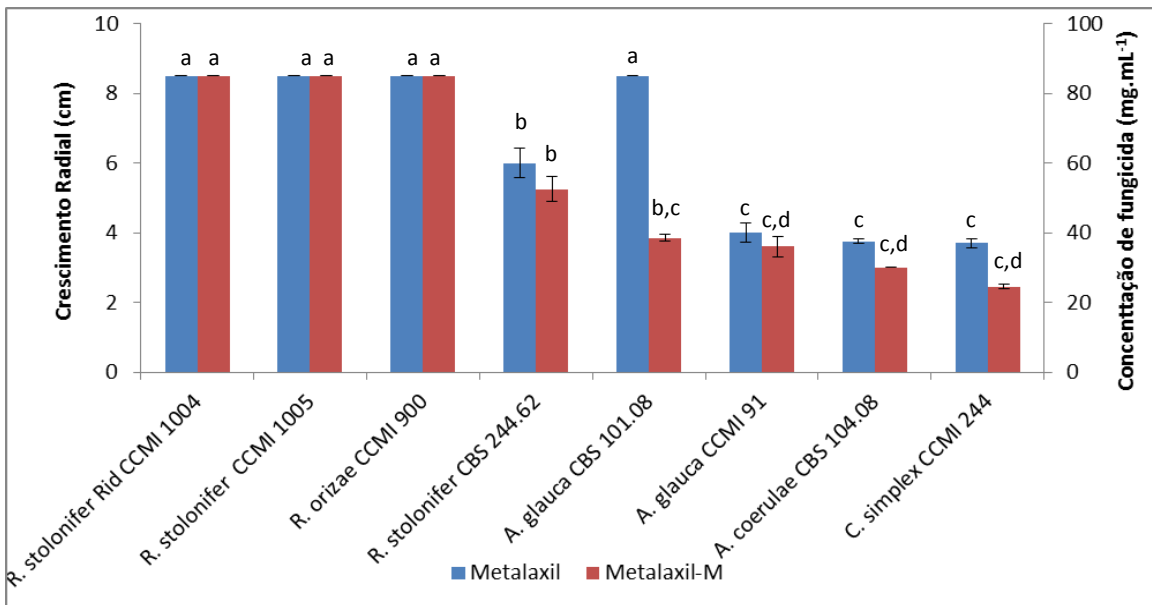


Figura 10: Crescimento radial das estirpes de *Rhizopus* spp., *Absidia* spp., e *Circinella* spp. em meio YNB contendo um gradiente de fungicida comercial (0-100 mg.L<sup>-1</sup>), durante um período de crescimento de 5 dias. Os valores representam a média de 4 replicados ± desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05).

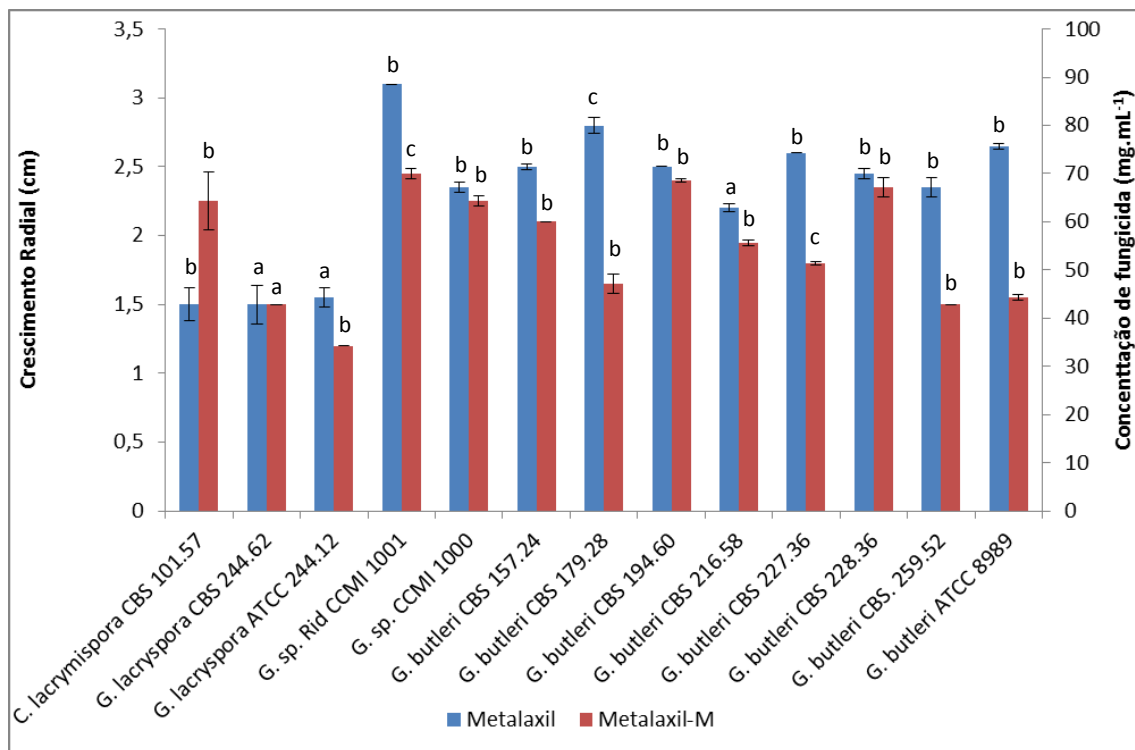


Figura 11: Crescimento radial das estirpes de *C. lacrymispora* CBS 101.57 e *Gongronella* spp. em meio YNB contendo um gradiente de fungicida comercial (0-100 mg.L<sup>-1</sup>), durante um período de crescimento de 7 dias. Os valores representam a média de 4 replicados ± desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas (p < 0,05).

A **Figura 10** mostra que as estirpes de *R. stolonifer* CCM1 1005 e *R. stolonifer* Rid CCM1 1004, isoladas de um solo de vinha previamente exposto a elevadas concentrações de um fungicida comercial contendo metalaxil (Martins, 2003), apresentaram capacidade para tolerar, tanto o metalaxil, como o metalaxil-M, na concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup>. Por seu lado, a estirpe de *R. stolonifer* CBS 244.62, que nunca foi submetida a tratamentos prévios com qualquer tipo de fungicida, apenas conseguiu tolerar cerca de 60% da concentração total de metalaxil e metalaxil-M. No entanto, outras estirpes que também não foram adaptadas previamente ao metalaxil ou metalaxil-M, mostraram capacidade para tolerar estes pesticidas, nomeadamente a estirpe de *R. orizae* CCM1 900 que conseguiu tolerar tanto o metalaxil como o metalaxil-M nas concentrações máximas e a estirpe de *A. glauca* CBS 101.01, que apesar de não conseguir tolerar concentrações elevadas de metalaxil-M (cerca de 40%), apresentou capacidade para tolerar elevadas concentrações de metalaxil.

Na **Figura 11** podemos observar que as estirpes de *G. butleri* possuem, no geral, maior capacidade para tolerar o metalaxil e o metalaxil-M, que as estirpes de *C. lacrymispora* e *G. lacryspora*. Para além disso, as estirpes aqui representadas também parecem mostrar maior capacidade de tolerar o metalaxil que o metalaxil-M, à exceção das estirpes de *G. lacryspora* CBS 244.62, *Gongronella* sp. CCM1 1000, *G. butleri* CBS 194.60 e *G. butleri* CBS 228.36 em que não se observaram diferenças significativas. Finalmente, podemos também observar que apesar de reduzida e ao contrário do que se verificou para os restantes microrganismos em estudo, a estirpe de *Circinella lacrymispora* CBS 101.57 apresentou maior capacidade para degradar o metalaxil-M que o metalaxil.

Os resultados obtidos estão de acordo com estudos anteriores que descreveram a capacidade de outras estirpes de Zygomycetes, como por exemplo *Absidia blakesleeana*, *A. corymbifera*, *A. cylindroespora*, *A. fusca*, *Cunninghamella echinulata*, *C. elegans*, *Mucor hiemalis*, *Rhizopus microsporus* e *R. orizae*, em tolerarem concentrações elevadas de pesticidas, nomeadamente de herbicidas e fungicidas aromáticos (Bordjiba *et al.*, 2001).

Nesta fase, e para o prosseguimento do trabalho foram escolhidas duas estirpes controlo, previamente adaptadas ao crescimento em meios enriquecidos com fungicida comercial, *R. stolonifer* Rid CCM1 1004 e *G. sp.* Rid CCM1 1001, e as quatro estirpes mais resistentes, representativas de cada um dos género em estudo, *A. glauca* CBS 101.08, *C. simplex* CCM1 244, *G. butleri* CBS 179.28 e *R. orizae* CCM1 900, tendo sido efetuados ensaios de degradação em meio líquidos com estas estirpes.

### 5.2.2 Ensaio de degradação do metalaxil em meio líquido

Os fungos selecionados na **secção 5.2.1**, por terem conseguido resistir a concentrações elevadas de um fungicida comercial, foram estudados individualmente em meios de cultura líquidos suplementados com sacarose (5 g.L<sup>-1</sup>) e com metalaxil (100 mg.L<sup>-1</sup>) como principal fonte de carbono, para determinar periodicamente as taxas específicas de crescimento e as percentagens de sacarose e metalaxil remanescentes.

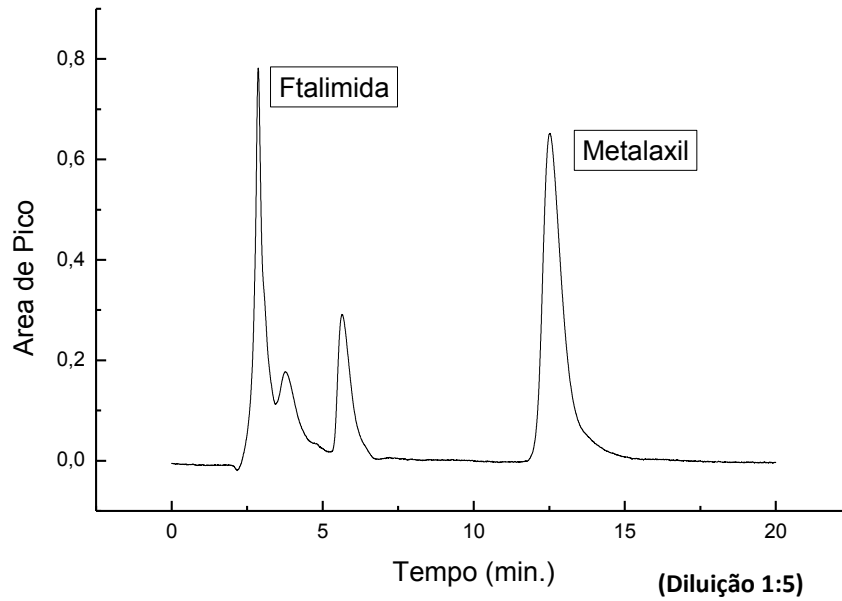
De forma a avaliar a capacidade de degradação do metalaxil pelos organismos em estudo, quantificou-se o metalaxil remanescente por HPLC. O metalaxil foi separado ao tempo de retenção de 12,4 min, por comparação com o tempo de retenção de soluções padrão de metalaxil, nas condições cromatográficas descritas na **secção 4.2.2.3**. As análises quantitativas do metalaxil foram efetuadas por interpolação gráfica das respetivas áreas de pico obtidas na curva de calibração do metalaxil. A equação da reta obtida foi de  $y = 88695x - 683435$  com um valor de  $r^2$  de 0,9992 (**Anexo III – Figura 18**).

Na **Figura 12** apresentam-se, como exemplo, os cromatogramas obtidos aos 0 e aos 21 dias na cultura de *Gongronella* sp. Rid CCMI 1001. Os cromatogramas das restantes culturas em estudo estão apresentados no **Anexo IV**.

Os cromatogramas obtidos apresentaram o mesmo perfil cromatográfico, tendo apenas variado a área de pico do metalaxil com o tempo de incubação. Apesar de terem sido registados outros máximos de absorção ao comprimento de onda utilizado, apenas um foi identificado como um produto de degradação do pesticida comercial, neste caso a ftalimidas separada ao tempo de retenção de 3,3 min. A ftalimida é um dos principais produtos resultantes da degradação do folpete, um fungicida de contacto de largo espectro normalmente utilizado em associação com o metalaxil, estando presente numa proporção de 40% na formulação comercial utilizada. Uma vez que o folpete sofre degradação térmica durante a esterilização, por claro húmido em autoclave (121°C), este degrada-se totalmente em ftalimida sendo possível a sua identificação

A identificação de possíveis metabolitos secundários do metalaxil não foi possível nas condições de estudo efetuadas. Para tal seria necessário efetuar estudos adicionais com recurso a técnicas de espectrometria de massa tais como LC-MS (*Liquid Chromatography Mass Spectrometry*) (Sukul e Spiteller, 2001).

0 dias



21 dias

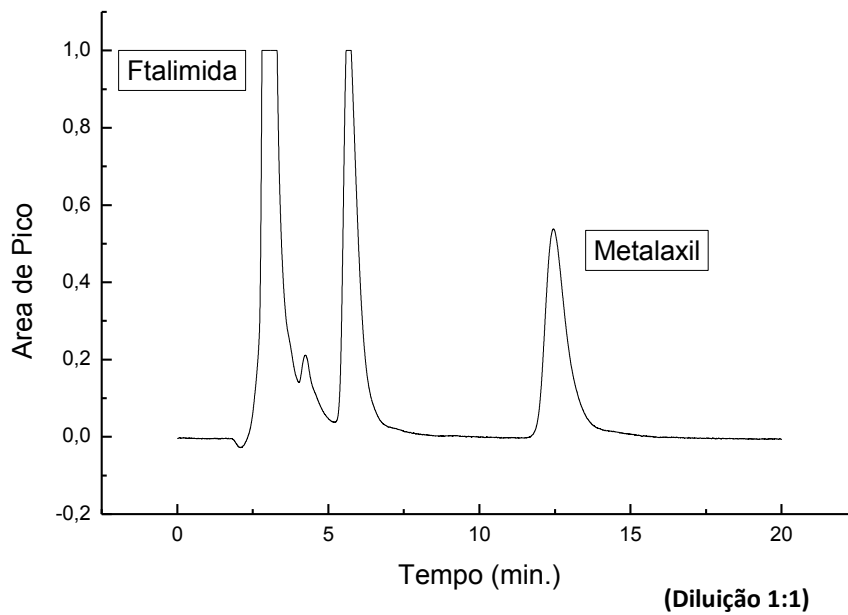
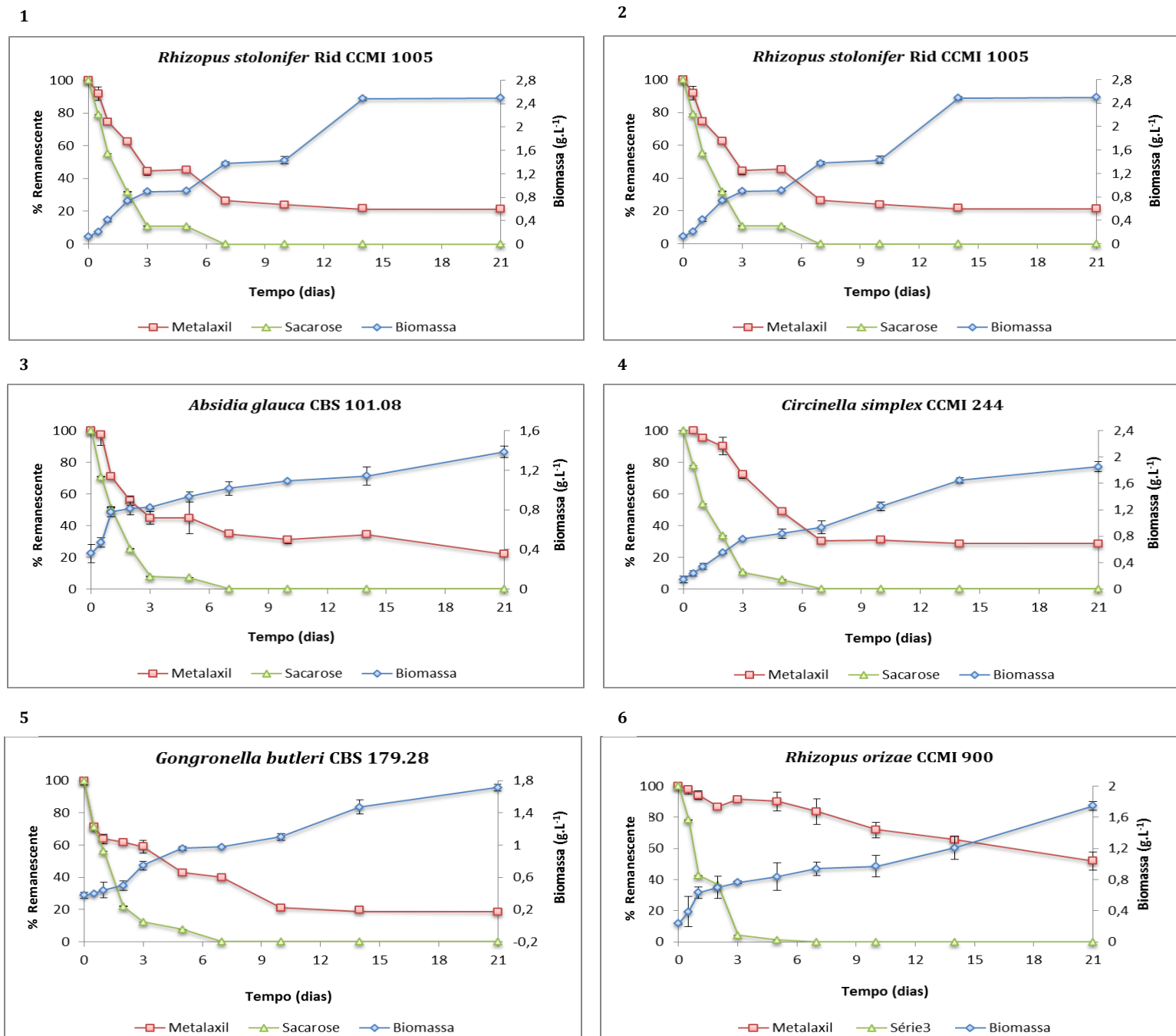


Figura 12: Cromatogramas obtidos aos 0 e 21 dias a partir de culturas de *Gongronella* sp. Rid CCMI 1001 em meio YNB na presença de metalaxil na concentração de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ .

O perfil do aumento da biomassa e da percentagem da sacarose e do metalaxil remanescentes ao longo do tempo, para cada um dos microrganismos, está representado na **Figura 13**.



**Figura 13:** Perfis de sacarose e de metalaxil remanescentes (%) e de crescimento da biomassa (g.L<sup>-1</sup>) para as diferentes estirpes em estudo: (1) – *R. stolonifer* Rid CCM1 1004; (2) – *G. sp.* Rid CCM1 1001; (3) – *A. glauca* CBS 101.08; (4) – *C. simplex* CCM1 244; (5) – *G. butleri* CBS 179.28; (6) – *R. orizae* CCM1 900. Os resultados representam a média de 4 replicados ± o desvio padrão.

As respetivas taxas específicas de crescimento e as taxas de sacarose e de metalaxil remanescentes estão apresentadas na **Tabela 4**.

**Tabela 4: Registo das taxas específicas de crescimento ( $h^{-1}$ ) e dos valores médios das taxas de utilização da sacarose ( $g.L^{-1}.dia^{-1}$ ) e de degradação do metalaxil ( $mg.mL^{-1}.dia^{-1}$ ) para as estirpes selecionadas.** Os valores representam a média de 4 replicados  $\pm$  desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), para cada um dos parâmetros em estudo.

Estirpe	Taxa específica de crescimento ( $h^{-1}$ )	Biomassa Total ( $g.L^{-1}$ )	Taxa de utilização da sacarose ( $g.L^{-1}.dia^{-1}$ )	Sacarose consumida (%)	Taxa de degradação do metalaxil ( $mg.L^{-1}.dia^{-1}$ )	Metalaxil degradado (%)
<i>R. stolonifer</i> Rid CCM1 1004	0-2 dias: 0,884 <sup>a,b</sup>	2,496	0-1 dias: 2,436 <sup>a,b</sup>	89,14	0-1 dias: 23,768 <sup>a</sup>	78,32
	2-14 dias: 0,095 <sup>c,d</sup>		1-3 dias: 1,206 <sup>c</sup>		1-10 dias: 4,311 <sup>b,c,d</sup>	
	14-21 dias: 0,005 <sup>c</sup>		3-5 dias: 0,263 <sup>d</sup>		10-21 dias: 0,388 <sup>b</sup>	
<i>Gongronella</i> sp. Rid CCM1 1001	0-3 dias: 0,449 <sup>a,e</sup>	1,816	0-1 dias: 2,774 <sup>b,e</sup>	92,13	0-3 dias: 52,249 <sup>e</sup>	75,60
	3-14 dias: 0,073 <sup>c,d</sup>		1-3 dias: 0,984 <sup>c</sup>		3-10 dias: 4,670 <sup>b,c,d</sup>	
	14-21 dias: 0,008 <sup>c,d</sup>		3-5 dias: 0,352 <sup>d</sup>		10-21 dias: 0,257 <sup>b</sup>	
<i>A. glauca</i> CBS 101.08	0-2 dias: 0,774 <sup>a,e</sup>	1,385	0-1 dias: 2,814 <sup>a,b,e</sup>	92,87	0-3 dias: 28,568 <sup>f</sup>	81,20
	2-7 dias: 0,047 <sup>c,d</sup>		1-3 dias: 1,216 <sup>c</sup>		3-10 dias: 3,186 <sup>b,c,d</sup>	
	7-21 dias: 0,022 <sup>c</sup>		3-5 dias: 0,203 <sup>d</sup>		10-21 dias: 1,360 <sup>b</sup>	
<i>C. simplex</i> CCMI 244	0-2 dias: 0,536 <sup>a,d,e</sup>	1,853	0-1 dias: 2,580 <sup>a,b</sup>	93,96	0-2 dias: 6,997 <sup>d,f</sup>	71,35
	2-7 dias: 0,073 <sup>c,d</sup>		1-3 dias: 1,191 <sup>c</sup>		2-10 dias: 13,102 <sup>f,g</sup>	
	7-21 dias: 0,008 <sup>c,d</sup>		3-5 dias: 0,275 <sup>d</sup>		10-21 dias: 0,178 <sup>b</sup>	
<i>G. butleri</i> CBS 179.28	0-3 dias: 0,199 <sup>c,d,e</sup>	1,713	0-2 dias: 2,461 <sup>a,f</sup>	92,48	0-3 dias: 54,238 <sup>e</sup>	78,86
	3-14 dias: 0,049 <sup>c,d</sup>		2-3 dias: 1,930 <sup>f</sup>		3-7 dias: 7,192 <sup>c,d</sup>	
	14-21 dias: 0,013 <sup>c</sup>		3-5 dias: 0,382 <sup>a</sup>		7-21 dias: 0,511 <sup>b</sup>	
<i>R. orizae</i> CCMI 900	0-5 dias: 0,992 <sup>b</sup>	1,745	0-1 dias: 3,218 <sup>e</sup>	98,95	0-1 dias: 9,131 <sup>g</sup>	73,67
	5-14 dias: 0,057 <sup>c,d</sup>		1-3 dias: 1,078 <sup>c</sup>		5-10 dias: 3,806 <sup>b,c,d</sup>	
	14-21 dias: 0,053 <sup>c,d</sup>		3-5 dias: 0,135 <sup>d</sup>		14-21 dias: 2,403 <sup>b,c</sup>	



Os perfis de crescimento da biomassa e das taxas de degradação da sacarose e do metalaxil, para os Zygomycetes em estudo, representado na **Figura 13**, permitiu observar um comportamento semelhante para os seis microrganismos estudados:

A estirpe de *R. stolonifer* Rid CCMI 1004 apresentou uma fase de crescimento exponencial da biomassa até ao 2º dia de cultura, com uma taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) de 0,884 h<sup>-1</sup>, acompanhada de uma taxa de degradação do metalaxil de 23,768 mg. L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. Numa segunda fase, entre o 2º e o 14º dia observou-se um crescimento mais lento ( $\mu = 0,095$  h<sup>-1</sup>) possivelmente devido à limitação de nutrientes, neste caso a sacarose, consumida quase na totalidade (89,14 %) ao fim do 5º dia de cultura, embora exista ainda uma correlação entre a degradação do metalaxil remanescente (4,311 mg. L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>), podendo este estar a ser utilizado num processo de metabolismo secundário, provavelmente como substrato de manutenção. Numa terceira fase, a partir do 10º dia, os microrganismos começaram a eliminar muito mais lentamente o metalaxil (0,388 mg. L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>), provavelmente por diminuição da biomassa ativa presente ( $\mu = 0,005$  h<sup>-1</sup>). A concentração máxima de biomassa foi de 2,496 g.L<sup>-1</sup> e a percentagem total de metalaxil degradado foi de 78,32%, tendo sido o fungo que apresentou maior capacidade de crescimento da biomassa.

A estirpe de *Gongronella* sp. Rid CCMI 1001 apresentou uma fase de crescimento exponencial da biomassa até ao 3º dia de cultura, com uma taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) de 0,449 h<sup>-1</sup>, acompanhada de uma taxa de degradação do metalaxil de 52,249 mg. L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. Numa segunda fase, entre o 3º e o 14º dia observou-se um crescimento mais lento ( $\mu = 0,073$  h<sup>-1</sup>) devido à limitação de sacarose, consumida quase na totalidade (92,13%) ao fim do 5º dia de cultura, com uma taxa de degradação do metalaxil remanescente de 4,670 mg. L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. Numa terceira fase, a partir do 10º dia, os microrganismos começaram a eliminar muito mais lentamente o metalaxil (0,257 mg. L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>), por diminuição da biomassa ativa presente ( $\mu = 0,257$  h<sup>-1</sup>). A concentração máxima de biomassa foi de 1,816 g.L<sup>-1</sup> e a percentagem total de metalaxil degradado foi de 75,60%.

A estirpe de *A. glauca* CBS 101.08 apresentou uma fase de crescimento exponencial da biomassa até ao 2º dia de cultura, com uma taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) de 0,774 h<sup>-1</sup>, acompanhada de uma taxa de degradação do metalaxil de 28,568 mg. L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. Numa segunda fase, entre o 2º e o 7º dia observou-se um crescimento mais lento ( $\mu = 0,047$  h<sup>-1</sup>) devido à limitação de sacarose, consumida quase na totalidade (92,87 %) ao fim do 5º dia de cultura, com uma taxa de degradação do metalaxil remanescente de 3,186 mg. L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. Numa terceira

fase, a partir do 10<sup>o</sup> dia, os microrganismos começaram a eliminar mais lentamente o metalaxil (1,360 mg. L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>), por diminuição da biomassa ativa presente ( $\mu = 0,022 \text{ h}^{-1}$ ). A concentração máxima de biomassa foi de 1,385 g.L<sup>-1</sup> e a percentagem total de metalaxil degradado foi de 81,20%, tendo sido o fungo que apresentou maior capacidade de degradação do metalaxil nas condições estudadas, no entanto foi o fungo que apresentou menor capacidade de crescimento da biomassa.

A estirpe de *C. simplex* CCM1 244 apresentou uma fase de crescimento exponencial da biomassa até ao 2<sup>o</sup> dia de cultura, com uma taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) de 0,536 h<sup>-1</sup>, acompanhada de uma taxa de degradação do metalaxil de apenas 6,997 mg. L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. Numa segunda fase, entre o 2<sup>o</sup> e o 7<sup>o</sup> dia observou-se um crescimento mais lento ( $\mu = 0,073 \text{ h}^{-1}$ ) devido à limitação de sacarose, consumida quase na totalidade (93,96%) ao fim do 5<sup>o</sup> dia de cultura, com uma taxa de degradação do metalaxil remanescente de 13,102 mg. L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. Numa terceira fase, a partir dos 7 dias, os microrganismos começaram a eliminar muito mais lentamente o metalaxil (0,257 mg. L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>), provavelmente por diminuição da biomassa ativa presente ( $\mu = 0,257 \text{ h}^{-1}$ ). A concentração máxima de biomassa foi de 1,853 g.L<sup>-1</sup> e a percentagem total de metalaxil degradado foi de 71,35%, tendo sido o fungo que apresentou menor capacidade de degradação do metalaxil nas condições estudadas.

A estirpe de *G. butleri* CBS 179.28 apresentou uma fase de crescimento exponencial da biomassa até ao 3<sup>o</sup> dia de cultura, com uma taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) de 0,199 h<sup>-1</sup>, acompanhada de uma taxa de degradação do metalaxil de 54,238 mg. L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. Numa segunda fase, entre o 3<sup>o</sup> e o 14<sup>o</sup> dia observou-se um crescimento mais lento ( $\mu = 0,049 \text{ h}^{-1}$ ) devido à limitação de sacarose, consumida quase na totalidade (92,48%) ao fim do 5<sup>o</sup> dia de cultura, com uma taxa de degradação do metalaxil remanescente de 7,192 mg. L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. Numa terceira fase, a partir do 7<sup>o</sup> dia, os microrganismos começaram a eliminar muito mais lentamente o metalaxil (0,511 mg. L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>), provavelmente por diminuição da biomassa ativa presente ( $\mu = 0,013 \text{ h}^{-1}$ ). A concentração máxima de biomassa foi de 1,816 g.L<sup>-1</sup> e a percentagem total de metalaxil degradado foi de 75,60%.

A estirpe de *R. orizae* CCM1 900 apresentou uma fase de crescimento exponencial da biomassa até ao 5<sup>o</sup> dia de cultura, com uma taxa específica de crescimento ( $\mu$ ) de 0,992 h<sup>-1</sup>, acompanhada de uma taxa de degradação do metalaxil de 9,131 mg. L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. Numa segunda fase, entre o 5<sup>o</sup> e o 14<sup>o</sup> dia observou-se um crescimento mais lento ( $\mu = 0,057 \text{ h}^{-1}$ ) devido à limitação de sacarose, consumida quase na totalidade (98,95%) ao fim do 5<sup>o</sup> dia de cultura,

com uma taxa de degradação do metalaxil remanescente de 3,806 mg. L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>. Numa terceira fase, a partir do 14<sup>o</sup> dia, os microrganismos começaram a eliminar muito mais lentamente o metalaxil (2,403 mg. L<sup>-1</sup>.dia<sup>-1</sup>), por diminuição da biomassa ativa presente ( $\mu = 0,053 \text{ h}^{-1}$ ). A concentração máxima de biomassa foi de 1,745 g.L<sup>-1</sup> e a percentagem total de metalaxil degradado foi de 73,67%. Apesar de ter apresentado uma taxa de degradação inicial do metalaxil mais baixa, a estirpe de *R. orizae* CCMI 900 apresentou um perfil de degradação do metalaxil mais estável ao longo do tempo, tendo degradado uma percentagem total de metalaxil semelhante aos restantes fungos em estudo.

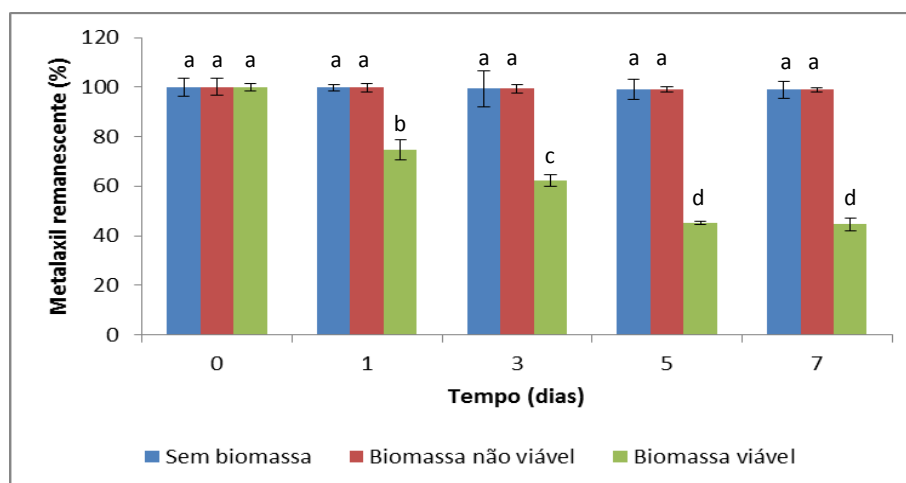
Resumindo, a concentração de biomassa total obtida variou entre 2,496 h<sup>-1</sup> e 1,385 h<sup>-1</sup> para as estirpes de *R. stolonifer* Rid CCMI 1004 e *A. glauca* CBS 101.08, representando estes os microrganismos com maior e menor capacidade de crescer na presença do fungicida metalaxil, respetivamente. As percentagem de utilização iniciais da sacarose variou entre 98,95% e 89,14% ao fim de um período de 5 dias, para as estirpes de *R. orizae* CCMI 900 e *R. stolonifer* Rid CCMI 1004, representando estes os microrganismos com maior e menor capacidade de utilizar a sacarose, respetivamente. Finalmente, as percentagens de degradação do metalaxil variaram entre 71,35% e 81,20% para as estirpes de *A. glauca* CBS 101.08 e *C. simplex* CCMI 244, representando estes os microrganismos com maior e menor capacidade de degradação do fungicida metalaxil, respetivamente.

Os resultados obtidos mostraram que não existe uma relação linear entre a capacidade de crescimento dos fungos e sua capacidade de degradação do fungicida, pelo que um fungo que apresente um crescimento mais baixo, pode ter maior capacidade de degradação do metalaxil, que outro com um crescimento superior, como acontece para a estirpe de *A. glauca* CBS 101.08.

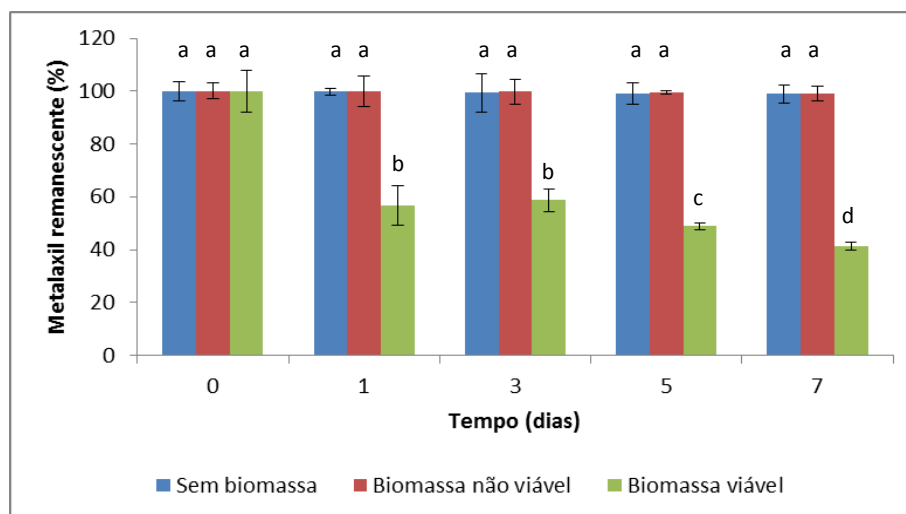
Os resultados obtidos estão de acordo com estudos anteriores que descreveram a capacidade de outras estirpes de Zygomycetes, como por exemplo *Rhizopus orizae* e *Absidia fusca*, para degradarem pesticidas em meio líquido (Bordjiba, 2001). Outros estudos, realizados para a avaliação da capacidade de biorremediação de diferentes classes de xenobióticos por parte de uma estirpe de *Absidia fusca*, mostraram elevadas capacidades de degradação de compostos aromáticos (Guiraud *et al.*, 2003). Estes estudos confirmam que os Zygomycetes podem ser particularmente eficientes na degradação de vários poluentes, com um largo espectro de ação.

### 5.2.3 Ensaio de adsorção do metalaxil à biomassa

De modo a avaliar a influência da biomassa no processo de degradação do metalaxil efetuaram-se estudos com a biomassa não viável para observar se ocorreu adsorção do fungicida à biomassa. Nas **Figura 14** e **15** apresentam-se os perfis de degradação do metalaxil (100 mg.L<sup>-1</sup>) obtidos durante 7 dias na ausência de biomassa, na presença de biomassa não viável e na presença de biomassa viável de duas estirpes controlo, *R. stolonifer* Rid CCMI 1004 e *G. sp.* Rid CCMI 1001, respetivamente.



**Figura 14:** Registo das percentagens de metalaxil remanescentes no estudo de degradação do metalaxil na ausência e na presença de biomassa de *Rhizopus stolonifer* Rid CCMI 1004. Os valores representam a média de 4 replicados  $\pm$  desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ )



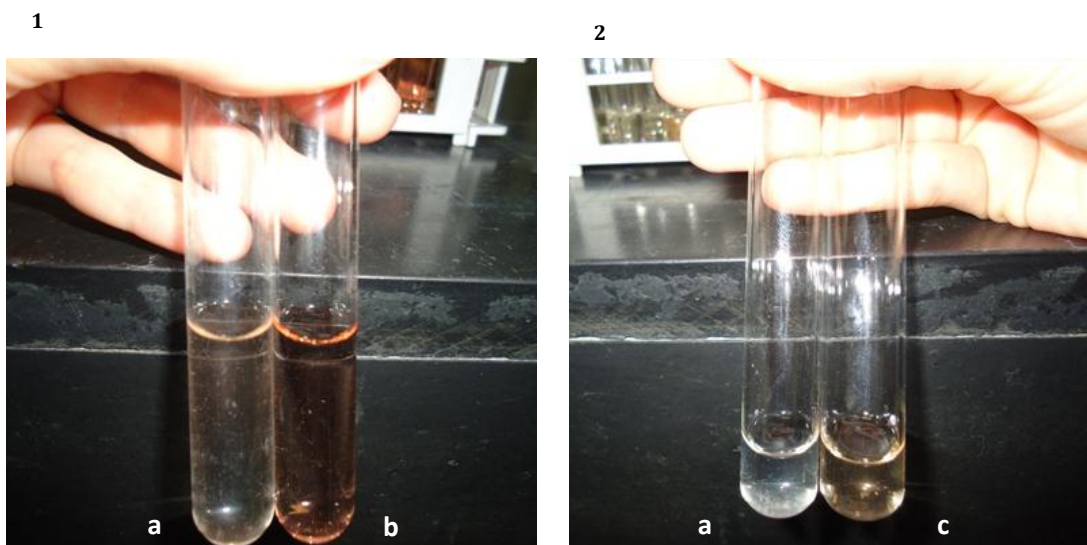
**Figura 15:** Registo das percentagens de metalaxil remanescentes no estudo de degradação do metalaxil na ausência e na presença de biomassa de *Gongronella sp.* Rid CCMI 1001. Os valores representam a média de 4 replicados  $\pm$  desvio-padrão. Letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ )

Como se observa nas **Figura 14 e 15**, os perfis de adsorção apresentaram um comportamento linear ao longo do tempo para ambos os microrganismos, com percentagens de degradação do metalaxil, na ausência de biomassa e na presença de biomassa não viável, de 1,10% ao fim dos 7 dias do ensaio. As biomassas viáveis de *R. stolonifer* Rid CCMI 1004 e *Gongronella* sp. Rid 1001 degradaram por sua vez 55,47% e 58,68% do metalaxil total, respetivamente.

Podemos concluir que o metalaxil não é adsorvido nem sofre qualquer processo de degradação biótica por parte da biomassa não viável dos microrganismos controlo, pelo que o processo de degradação estudado na **secção 5.2.2** deve-se a um processo de degradação ativo dos fungos em estudo, que utilizam mecanismos bioquímicos de modo a incorporar este fungicida no seu metabolismo primário.

### 5.3 Identificação dos enzimas extracelulares

Com vista à identificação dos enzimas extracelulares potencialmente envolvidos no processo de degradação do metalaxil para as estirpes em estudo, recorreu-se a dois testes colorimétricos clássicos, para a deteção de fenoxidases extracelulares – Teste de Schänel (Schänel, 1971), e para a deteção da clivagem do anel benzénico do catecol – Teste de Stanier (Stanier e Orston, 1973). Os resultados obtidos estão representados na **Figura 16**.



**Figura 16: Resultados obtidos para os testes de (1) Teste de Schänel e de (2) Teste de Stanier.**  
(a) – Branco; (b) – Amostra Positiva; (c) – Amostra Negativa.

A **Figura 16.1** apresenta a coloração obtida nos sobrenadantes das culturas líquidas das estirpes em estudo, submetidas ao Teste de Schänel. Esta coloração é indicativa da presença de fenoloxidasas extracelulares presentes no meio reacional, devido a uma reação de oxidação com os grupos difenol do metalaxil. Não se verificaram diferenças de cor entre os microrganismos em estudo ou para os diferentes dias do ensaio.

A **Figura 16.2** apresenta a coloração obtida nos sobrenadantes das culturas líquidas das estirpes em estudo, submetidas aos Teste de Stanier. Esta coloração não é indicativa da clivagem do anel aromático de catecol, mas sugere um fenómeno de oxidação ligeiro das amostras em estudo por parte de enzimas extracelulares, muito provavelmente catecol dioxigenases (EC.13.11.12). Não se verificaram diferenças de cor entre os microrganismos em estudo ou para os diferentes dias do ensaio.

O teste de Stanier permite identificar qual o mecanismo utilizado pelo microrganismo na quebra do anel aromático, conforme descrito na **Secção 4.3.2**. A via *orto* é típica da degradação de fenóis e ácidos aromáticos por fungos (Hofrichter *et al.*, 1993), enquanto que a via *meta* (cor amarela) tem sido detetada exclusivamente em bactérias. Contudo, algumas espécies conseguem utilizar uma ou outra via dependendo do substrato fenólico fornecido (Anselmo, 1992). Este não parece ser o caso para as estirpes em estudo uma vez que não se observou, nem o aparecimento da cor púrpura indicativa da clivagem *orto*, nem da cor amarela característica da clivagem *meta*. No entanto, a coloração adquirida pelos sobrenadantes das culturas das estirpes em estudo parece indicar a ocorrência de oxidação biológica do grupo fenol do metalaxil, com a sua hidroxilação a catecol, provavelmente mediada um enzima mono-oxigenase, a fenol hidroxilase (Neujahr, 1991).

Os resultados obtidos estão de acordo com a bibliografia que referem que os Zygomycetes são maus produtores de enzimas extracelulares e não produzem fenoloxidasas no estado basal, sem indução prévia em meio sólido (Guiraud *et al.*, 1992; Seigle-Murandi *et al.*, 1992). No entanto, os resultados obtidos sugerem que as estirpes de Zygomycetes em estudo possuem sistemas enzimáticos extracelulares não específicos que intervêm no mecanismo de degradação do fungicida metalaxil. Estes estudos tiveram um carácter exploratório e futuramente pretendem-se realizar mais estudos com vista à quantificação destes mesmos enzimas.

## 6. Conclusões e Perspetivas Futuras

A metodologia aplicada e apresentada neste estudo, forneceu novas informações no que diz respeito à seleção e utilização de fungos Zygomycetes na biodegradação de fungicidas da classe das acilalaninas. Foi avaliada a capacidade de 21 estirpes de Zygomycetes (*Rhizopus stolonifer* Rid CCMi 1004, *R. stolonifer* CCMi 1005, *R. orizae* CCMi 900, *R. stolonifer* CBS 244.62, *Absidia glauca* CBS 101.08, *A. glauca* CCMi 91, *A. coerulea* CBS 104.08, *Circinella simplex* CCMi 244, *C. lacrymispora* CBS 101.57, *Gongronella lacryspora* CBS 244.62, *G. lacryspora* ATCC 244.12, *Gongronella* sp. Rid CCMi 1001, *Gongronella* sp. CCMi 1000, *G. butleri* CBS 157.24, *G. butleri* CBS 179.28, *G. butleri* CBS 194.60, *G. butleri* CBS 216.58, *G. butleri* CBS 227.36, *G. butleri* CBS 228.36, *G. butleri* CBS. 259.52 e *G. butleri* ATCC 8989) em degradarem os fungicidas metalaxil e metalaxil-M.

As estirpes em estudo foram identificadas e caracterizadas através de uma abordagem polifásica, com base em características morfológicas (microscopia ótica) e moleculares (M13-PCR). Estas estirpes foram posteriormente isoladas em meios de cultura sólidos contendo um gradiente de concentrações (0 – 100 mg.L<sup>-1</sup>) dos fungicidas em estudo, permitindo selecionar as estirpes mais aptas para tolerar estes fungicidas em elevadas concentrações. As estirpes que mostraram maior capacidade para tolerar o metalaxil e o metalaxil-M em meio sólido foram as estirpes de *R. stolonifer* Rid CCMi 1004, *Gongronella* sp. Rid CCMi 1001, *A. glauca* CBS 101.08, *C. simplex* CCMi 244, *G. butleri* CBS 179.28 e *R. orizae* CCMi 900. A capacidade de degradação do metalaxil pelas estirpes selecionadas foi avaliada em meio de cultura líquido (YNB) suplementado com sacarose (5 g.L<sup>-1</sup>) e metalaxil (100 mg.L<sup>-1</sup>). A estirpe que apresentou maior capacidade de degradação do metalaxil foi a estirpe de *A. glauca* CBS 101.08 com uma percentagem de degradação do metalaxil total de 81,20%.

As estirpes em estudo foram ainda submetidas a um ensaio de adsorção à biomassa em que se efetuaram estudos de degradação do metalaxil na ausência de biomassa e na presença de biomassa não viável, onde se observou uma taxa de degradação do metalaxil de apenas 1,10% em ambos os casos, pelo que podemos sugerir que o metalaxil não é adsorvido por parte da biomassa não viável e que o mecanismo de degradação deste fungicida se deve a um processo de degradação ativo das estirpes em estudo. Tendo em conta estes resultados, e com vista à identificação dos enzimas extracelulares potencialmente envolvidos no processo de degradação do metalaxil recorreu-se a dois testes colorimétricos clássicos, para a pesquisa



de fenoloxidasas extracelulares e para a detecção da clivagem do anel benzénico. Foi possível identificar a presença de fenoloxidasas extracelulares nos sobrenadantes das culturas líquidas das estirpes em estudo, mas não foi possível identificar o mecanismo de quebra do anel benzénico, necessitando-se assim de estudos complementares sobre os parâmetros enzimáticos envolvidos no processo de biodegradação.

Em conclusão, os resultados obtidos para as estirpes de Zygomycetes em estudo, propiciam boas perspectivas futuras quanto a estudos de biorremediação de fungicidas da classe das acilalaninas e dos mecanismos bioquímicos envolvidos na sua degradação.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, os esforços devem agora ser feitos para avaliar a capacidade das estirpes selecionadas para os seguintes pontos:

- Utilização de técnicas de sequenciação (ITS) e de proteómica (MALDI-TOF-MS) para confirmação da filogenia dos fungos em estudo, para comparação com os resultados obtidos com as técnicas moleculares já utilizadas.
- Expandir a avaliação do processo de degradação dos fungicidas em meio líquido ao isómero R, metalaxil-M;
- Utilização de técnicas de espectrometria de massa (LC-MS) para a identificação de possíveis metabolitos intermédios formados durante o processo de degradação do metalaxil;
- Otimização de técnicas de identificação das atividades enzimáticas dos enzimas extracelulares produzidos durante o processo de degradação dos pesticidas.



## 7. Bibliografia

- Abedinifara, S., Karimia, K., Khanahmadic, M., Taherzadehb, M.J.** (2009). Ethanol production by *Mucor indicus* and *Rhizopus oryzae* from rice straw by separate hydrolysis and fermentation. *Biomass and Bioenergy*, 33: 828-833;
- Amorim, R.V.S., de Souza, W., Fukushima, K., de Campos-Takaki, G.M.** (2001). Faster chitosan production by Mucoralean strains in submerged culture. *Brazilian Journal of Microbiology*, 32:20-3;
- Anselmo, A.M., Novais, J.L.** (1992) Degradation of phenol by immobilized mycelium of *Fusarium flocciferum* in continuous culture. *Water Science and Technology*, 25-1:161-168;
- Antoniolli, Z.I., Schachtman, D., Ophelkeller, D., Smith, S.E.** (2000). Variation in ribosomal internal transcribed spacer sequences in *Glomus mosseae* and *Gigaspora margarita* spores from a permanent pasture. *Mycological Research*, 104-1: 708-715;
- Bailey, A.M., Coffey, M.D.** (1985). Biodegradation of metalaxyl in avocado soils. *Disease Control and Pesticide Management*, 75: 135-137;
- Baldrian, P.** (2006). Fungal laccases - occurrence and properties. *FEMS Microbiology Reviews* 30: 215-242.
- Bending, G.D., Friloux, M., Walker, A.** (2002). Degradation of contrasting pesticides by White Rot Fungi and its relationship with lignolytic potential. *FEMS Microbiology Letters*, 212: 59-63;
- Benny, G.L., R.A. Humber, and J.B. Morton.** (2001). The Zygomycota: Zygomycetes, pp. 113-146, in: D.J. McLaughlin, E.G. McLaughlin, and P.A. Lemke (eds.). *The Mycota. Vol. 7A. Systematics and Evolution.* Springer-Verlag, Berlin, Germany;
- Bollag, J.M., Bollag, W.B.** (1995). Soil contamination and the feasibility of Biological Remediation. In: *Bioremediation, Science and Applications*, SSSA, Special Publication n<sup>o</sup> 43, pp. 1-12. Soil Science Society of America, Madison, United States of America;
- Bordjiba, O., Steiman, R., Kadri, M., Semadi, A., Guiraud, P.** (2001). Removal of herbicides from liquid media by fungi isolated from a contaminated soil. *Journal of Environmental Quality*, 30: 418-426;
- Brantner, J.R., Windels, C.E.** (1995). Variability in sensitivity to metalaxyl *in vitro* pathogenicity and control of *Phythium spp.* on sugar beet. *Plant Disease*, 82: 896-899;
- Cameron, M.D., Timofeevski, S., Aust, S.D.** (2000). Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 54: 751-758;
- Chatterjee, S., Adhya, M., Guha, A.K., Chatterjee, B.P.**(2005). Chitosan from *Mucor rouxii*: production and physico-chemical characterization. *Process Biochemistry*, 40:395-400;

- Chen, W. & Mulchandani, A.** (1998). The use of live biocatalysts for pesticide detoxication. *Trends in Biotechnology*, 16: 71-76;
- Cole, D.J., Owen, W.J.** (1987). Metabolism of metalaxyl in cell suspension cultures of *Lactuca sativa* L. and *Vitis vinifera* L. *Pesticide Biochemical Physiology*, 28: 354-361;
- Cremlyn, R.J.** (1991). Agrochemicals. Preparation and mode of action. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, United Kingdom;
- Domsch, K.H., Gams, W., Anderson, T.H.** (1980). Compendium of soil fungi. Volume 1. Academic Press, London, United Kingdom;
- EPA**, (1994). Registration eligibility decision (R.E.D): Metalaxyl. EPA 738-R-94-017. U.S. Environmental Protection Agency, Washington DC, United States of America;
- Exttoxnet**, (1996). Pesticide information profile: Metalaxyl. Extension Toxicology Network. Oregon State University, Oregon, United States of America;
- FAO/WHO** (1996). Metalaxyl – Pesticide residues in food: Toxicology Evaluations. In: *FAO Plant Production and Protection Paper 137*, pp.69-80. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Geneva.
- Giafrenda, L., Rao, M.A.** (2004). Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, 35: 339–354;
- Gerbi, S.A.** (1985). Evolution of ribosomal DNA. In: MCINTYRE, R.E. Molecular evolutionary genetics. Plenum, New York, United States of America;
- Glaser, J.A. & Lamar, R.T.** (1995). Lignin-Degrading Fungi as Degradors of Pentachlorophenol and Creosote in Soil. In: *Bioremediation, Science and Applications*. SSSA, Special Publication n<sup>o</sup>43, pp. 117-233. Soil Science Society of America, Madison, United States of America;
- Gomes, E.A.; Kasuya, M.C.M.; Barros, E.G.; Borges, A.C.** (2002). Polymorphism in the internal transcribed spacer (ITS) of the ribosomal DNA of 26 isolates of ectomycorrhizal fungi. *Genetics and Molecular Biology*, 25-4:477-483;
- Guimarães, J.B., Pereira, P., L. Chambel, R. Tenreiro.** (2011). Assessment of filamentous fungi diversity using classic and molecular approaches: case study – Mediterranean ecosystem. *Fungal Ecology*. 4: 309-321;
- Guiraud, P., Steiman, R., Seigle-Murandi, F., Benoit-Guyod, J.L.** (1992). Metabolism of vanillic acid by Micromycetes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 8: 268-273;
- Guiraud, P., Villemain, D., Kadri, M., Bordjiba, O., Steiman, R.,** (2003). Biodegradation capability of *Absidia fusca* Linnemann towards environmental pollutants. *Chemosphere*, 52: 663-671;
- Hassal, K.A.** (1990). The biochemistry and uses of pesticides, Second edition. VCH Publishers, New York, United States of America;

**Hildebrandt, A., Guillámon, M., Lacorte, S., Tauler, R., Barceló, D.** (2008). Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water Research*, 42(13): 3315-3326;

**Hillis, D.M., Dixon, M.T.** (1991). Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*, 66-4: 411-453;

**Hofrichter, M., Günter, T., Fritsche, W.** (1993). Metabolism of phenol, chloro- and nitrophenols by the *Penicillium* strain Bi 7/2 isolated from a contaminated soil. *Biodegradation*, 3: 415-421, 1993;

**Hrélia, P., Maffei, F., Fimognari, C., Vigagni, F., Cantelli-Forti, G.** (1996). Cytogenetic effects of metalaxyl on human and animal chromosomes. *Mutation Research*, 369: 81-86;

**James, E.T.** (1998). Protecting honey bees from Pesticides. *Alabama Corporative Extension System ANR-1088*. Ohio State University. U.S. Department of Agriculture.

**Jensen, A.B., Gargas, A., Eilenberg, J., Rosendahl, S.** (1998). Relationships of the insect-pathogenic order Entomophthorales (Zygomycota, Fungi) based on phylogenetic analysis of nuclear small subunit ribosomal DNA sequences (SSU rDNA). *Fungal Genetics and Biology*, 24: 325-334;

**Kaneko, H., Isobe, N., Miyamoto, J.** (1995). Metabolism of fungicides in mammals. In: *The Mammalian Metabolism of Agrichemicals*. Hutsons, D.H & Paulson, G.D. (Eds.), Progress in Pesticide Biochemistry and Toxicology, vol. 8, pp. 197-266. John Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom;

**Kirk, P.M., Cannon, P.F., David, J.C., Stalpers, J.A.** (2008). Ainsworth & Bisby's Dictionary of the Fungi. Tenth Edition. CAB International, Wallingford, United Kingdom;

**Krieger, R.** (2010). Haye's Handbook of Pesticide Toxicology. Third Edition, Volume 1, Elsevier, United States of America;

**Madden, L.V., Ellis, M.A.** (2000). Evaluation of a disease warning system for downy mildew grapes. *Plant Disease*, 84: 549-554;

**Martens, D.A., Bremner, J.M.** (1997). Inhibitory effects of fungicides on hydrolysis of urea and nitrification of urea nitrogen in soil. *Pesticide Science*, 49: 344-352;

**Martins, M.R.C.** (2003). Degradação biológica de fungicidas em amostras de solo – Estudo do processo de degradação do metalaxil e do folpete por culturas microbianas mistas em amostras de solo. Dissertação apresentada à Universidade de Évora para obtenção do grau de Doutor em Química, Évora, Portugal.

**Martins, M.A.M., Queiroz, M.J., Silvestre, A.J.D., Lima, N.** (2002). Relationship of chemical structures of textile dyes on the pre-adaptation medium and the potentialities of their biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *Research in Microbiology*, 153: 361-368;

**Matheron, M.E., Porchas, M.** (2000). Impact of azoxystrobin, dimethomorph, fluazinam, fosetyl-al and metalaxyl on growth, sporulation and zoospore cyst germination of the three *Phytophthora* spp., *Plant Disease*, 84: 454-458;

- Meyer, W., Koch A., Niemann, C., Beyermann, B., Epplen, J.T. & Borner, T.** (1991). Differentiation of species and strains among filamentous Fungi by DNA *fingerprntting*. *Current Genetics*, 19: 239-241;
- Miller, G.L.** (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426;
- Monkiedje, A., Ilori, M.O., Spitteller, M.** (2002). Soil quality changes resulting from the application of the fungicides mefenoxam and metalaxyl to a sandy loam soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 34: 1939–1948;
- Nagahama, T., Sato, H., Shimazu, M., Sugiyama, J.,** (1995). Phylogenetic divergence of the entomophthoralean fungi: evidence from nuclear 18S ribosomal RNA gene sequences. *Mycologia*, 87: 203-209;
- Navarro, S., Oliva, J., Navarro G., Barba, A.** (2001). Dissipation of Chlorpyrifos, Fenarimol, Mancozeb, Metalaxyl, Pensconazole and Vinclozolin in grapes. *American Journal of Enology and Viticulture*, 52: 35-40;
- Neujahr, H.Y., Sejlitz, T., Wernstedt, C., Hellman, U.** (1991). The N-terminal amino acid sequence of phenol hydroxylase contains a dinucleotide-binding sequence motif. *Protein Sequence Data Analysis*, 4: 21-23;
- Newcombe, D.A. & Crowley, D.E.** (1999). Bioremediation of atrazine-contaminated soil by repeated applications of atrazine-degrading bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51: 887-882;
- Novack, J.M., Jayachandran, K., Moorman, T.B., Weber, J.B.** (1995). Sorption and biding of organic compounds in soils and their relation to bioavailability. *In: Bioremediation, Science and Applications*. SSSA Special Publication n<sup>o</sup>43, pp. 13-31. Soil Science of America, Madison, United States of America;
- Novotný, C., Svobodová, K., Erbanová, P., Cajthamla, T., Kasinatha, A., Langb, E., Sasek, V.** (2004). Ligninolytic fungi in bioremediation: extracellular enzyme production and degradation rate. *Soil Biology & Biochemistry*, 36: 1545–1551;
- Nunninger, C., Watson, G., Leadbitter, N., Ellgehausen, H.** (1996). Introduction of the enantiomeric form of the fungicide metalaxyl. *Proceedings of the British Crop Protection Conference – Pests and Disease*, 2: 359-366;
- O'Donnell, K., Cigelnik, E., Benny, G.L.,** (1998) . Phylogenetic relationships among the Harpellales and Kickxellales. *Mycologia*; 90: 624-639;
- Otoni, C.A., Santos, C., Lima, N.** (2010). Utilization of *White Rot Fungi* for textile dye decolourisation under alkaline condition and high salt concentration in solid medium. *Semana da Engenharia 2010*, Guimarães, Portugal;
- Paolini, M., Mesirca, R., Pozetti, L., Sapone, A., Cantelli-Forti, G.** (1996). Biomarkers of effect in evaluating metalaxyl cocarcinogenesis. Selective induction of murine CYP 3A isoform. *Mutation Research*, 361: 157-164;

- Perocco, P., Colacci, A., Bonora, B., Grilli, S.** (1995). In vitro transforming effect of the fungicides metalaxyl and zineb. *Teratogenesis, Carcinogenesis, Mutagenesis*, 15: 73-80;
- Rand, G.M; Petrocilli, S.R** (1985). Introduction to the Aquatic Toxicology. *In: Fundamentals of Aquatic Toxicology*. Rand, G.M & Petrocelli, S.R. (Eds., pp 1-28. Emisfere, Washington DC, United States of America;
- Santos, C., Fraga, M.E., Kozakiewicz, Z., Lima, N.** (2010). Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Research in Microbiology*, 161: 168-175;
- Sannino, F., Giafrenda, L.** (2001). Pesticide influence in soil enzymatic activities. *Chemosphere*, 45: 417-425;
- Schänel, L., Esser, K.** (1971). The phenol oxidases of the ascomycete *Podospora anserina*. VIII. Substrate specificity of laccases with different molecular structure. *Arch Mikrobiol*, 77: 111-117;
- Schlotterer, C., Hauser, M.T., Huesler, A., Tautz, D.** (1994). Comparative evolutionary analysis of rDNA ITS regions in Drosophila. *Molecular Biology and Evolution*, 11-3: 513-522;
- Schröter, J.** (1893). Mucorineae, pp. 119-134. *In* A. Engler and K. Prantl, Die natürlichen Pflanzenfamilien. I Teil, 1. Abth. Wilhelm Engelmann, Leipzig.;
- Sharma, D., Awasthi, M.D.** (1997). Adsorption and movement of metalaxyl in soils under unsaturated flow conditions. *Plant and Soil*, 195: 293-298;
- Sharom, M.S., Edigton, L.V.** (1982). Adsorption and mobility of metalaxyl in soils and aqueous system. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 4: 334-340;
- Sinsabaugh, R.L.** (2010). Phenol oxidase, peroxidase and organic matter dynamics of soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 391-404;
- Smith, G.** (1969). An introduction to Industrial Mycology, 6<sup>th</sup>. Edition. Edward Arnold (publishers), Lda., London, United Kingdom;
- Stanier, R.Y., Orston, L.N.** (1973) The  $\beta$ -keto adipate pathway. *Advances in Microbial Physiology*, 9: 89-151;
- Seigle-Murandi, F., Steiman, R., Benoit-Guyod, J.L., Muntalif, B.** (1992). Phenol oxidases production and vanillic acid metabolism by Zygomycetes. *Microbiologica*, 15: 157- 165;
- Sukul, P., Spiteller, M.** (2000). Metalaxyl: persistence, degradation, metabolism, and analytical methods. *Reviews of Environmental Contamination Toxicology*, 164: 1-26;
- Sukul, P., Spiteller, M.** (2001). Influence of biotic and abiotic factors on dissipating metalaxyl in soil. *Chemosphere*, 45: 941-947;
- Sukul, P.** (2006). Enzymatic activities and microbial biomass in soil as influenced by metalaxyl residues. *Soil Biology & Biochemistry*, 38: 320-326;

**Szybalski, W.** (1952). Gradient plate technique for study of bacterial resistance. *Science*, 116:46-48;

**Taherzadeh, M., Edebo, L.** (2009). Exploring Zygomycetes fungi for industrial applications. *New Biotechnology*, 25S: 83;

**Tanabe, Y., O'Donnell, K., Saikawa, M., Sugiyama, J.** (2000). Molecular phylogeny of parasitic Zygomycota (Dimargaritales, Zoopagales) based on nuclear small subunit ribosomal DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16: 253-262;

**Tomlin, C.** (2009). The Pesticide Manual. Fifteenth edition. British Crop Protection Council, Cambridge, United Kingdom;

**Voigt, K., Cigelnik, E., O'Donnell, K.,** (1999). Phylogeny and PCR identification of clinically important Zygomycetes based on nuclear ribosomal-DNA sequence data. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 3957-3964;

**Wang, H.G., Peng, G.Y., Wen & Qi M.W.** (1995). Study on degradation and residues on <sup>14</sup>C-metalaxyl in soil. *Acta Agrícola University of Pekin*, 21: 395-401;

**Weising, K., Nybon, H., Wolff, K & Meyer, W.** (1995). DNA Fingerprinting in Plants and Fungi. CRC Press, London, United Kingdom;

**Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V.** (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535;

**Wyman, A.R., White, R.** (1980). A highly polymorphic locus in human DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(11):6754-6758;

**Zabeau, M., Vos, P.** (1993). Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Office, publication 0 534 858 A1, bulletin 93/13.

**Zheng, Z., Liu, S.Y., Freyer, A.J., Bollag, J.M.** (1989). Transformation of Metalaxyl by the Fungus *Syncephalastrum racemosum*. *Applied Environmental Microbiology*, 55: 66-71;

**Zoberi, M.H.** (1985). Liberation of asexual propagules in the Mucorales. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 91: 167-173;

**Sites consultados:**

<http://zygomycetes.org> (última atualização em 31 de Janeiro de 2009);

<http://www.inchem.org> (última atualização em Fevereiro de 2009);

<http://biocyc.org> (última atualização em 2011);



## 8. Anexos

### Anexo I: Reagentes e Equipamentos

#### A – Lista dos reagentes comerciais utilizados:

Nome	Fórmula Química	Marca
Acetato de sódio	CH <sub>3</sub> COONa	Merck
Acetonitrilo Lichrosolv®	CH <sub>3</sub> CN	Merck
Ácido acético glacial	C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Merck
Ácido bórico	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	Merck
Ácido cítrico	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	Merck
Ácido clorídrico	HCL	Merck
Álcool isoamílico	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> O	Sigma-Aldrich
Azul de bromofenol	C <sub>19</sub> H <sub>9</sub> Br <sub>4</sub> NaO <sub>5</sub> S	Merck
Brometo de etídio	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich
Catecol	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich
Cloreto de sódio	NaCl	Sigma-Aldrich
Clorofórmio	CHCl <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich
EDTA	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> K <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .2H <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich
Etanol absoluto	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	Merck
Glicerol	C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich
Glicina	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	Merck
Glucose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Merck
Hidrogenofosfato de sódio	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
Hidroquinona	C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (OH) <sub>2</sub>	Merck
Hidróxido de amónio	NH <sub>4</sub> OH	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sódio	NaOH	Sigma-Aldrich
Hidróxido de potássio	KOH	Sigma-Aldrich

<b>Metalaxyl Pestanal®</b>	$C_{15}H_{21}NO_4$	Sigma-Aldrich
<b>Metalaxyl-M Pestanal®</b>	$C_{15}H_{21}NO_4$	Sigma-Aldrich
<b>Nitroprussiato de sódio</b>	$Na_2[Fe(CN)_5NO] \cdot 2H_2O$	Sigma-Aldrich
<b>Peróxido de hidrogénio Perhydrol®</b>	$H_2O_2$	Merck
<b>Sacarose</b>	$C_{12}H_{22}O_{11}$	Merck
<b>SDS</b>	$C_{12}H_{25}NaO_4S$	Sigma-Aldrich
<b>Sulfato de amónio</b>	$(NH_4)_2SO_4$	Sigma-Aldrich
<b>Tartarato de sódio e potássio</b>	$KNaC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$	Sigma-Aldrich
<b>Tolueno</b>	$C_6H_5CH_3$	Sigma-Aldrich
<b>TRIS</b>	$C_4H_{11}NO_3$	Sigma-Aldrich
<b>Xilenocianol</b>	$C_{25}H_{27}N_2NaO_6S_2$	Sigma-Aldrich

**B – Lista dos equipamentos utilizados:**

<b>Nome</b>	<b>Marca</b>
Agitador orbital	Optic System
Autoclave	Uniclave 88
Balança analítica	Metler Toledo AG204
Balança digital	Metler Toledo A205
Banho-maria	Memmert
Câmara de UV Gel Doc™	Bio-Rad
Centrífuga	Hermle Z-323-K
Espectrofotómetro	Perkin Elmer Lambda 25
Estufa	Cassel
Leitor de microplacas automático	Biotek Instruments
Medidor de pH	Metrohm 632



## Anexo II: Soluções e Meios de Cultura

### A - Composição química de algumas soluções utilizadas:

<b>▪ Solução de hidroquinona 0,01 M</b>	
Hidroquinona	0,11 g
Água bi-destilada	100 mL
<b>▪ Solução de glicina 0,2 M</b>	
Glicina	1,5 g
Água bi-destilada	100 mL
<b>▪ Solução de ácido cítrico 0,1 M</b>	
Ácido cítrico	2,104 g
Água bi-destilada	100 mL
<b>▪ Solução de hidrogenofosfato de sódio 0,1 M</b>	
Hidrogenofosfato de sódio	177,99 g
Água bi-destilada	100 mL
<b>▪ Solução de tampão de ácido cítrico/ hidrogenofosfato de sódio, pH 5,5</b>	
Solução de ácido cítrico 0,1 M	8,51 mL
Solução de hidrogenofosfato de sódio 0,1 M	11,49 mL
<b>▪ Solução de tampão de ácido cítrico/ hidrogenofosfato de sódio, pH 8,0</b>	
Solução de ácido cítrico 0,1 M	16,73 mL
Solução de hidrogenofosfato de sódio 0,1 M	3,27 mL
<b>▪ Solução de hidróxido de amônio 5N</b>	
Hidróxido de amônio	2 mL
Água bi-destilada	8 mL
<b>▪ Solução saturada de nitroprussiato de sódio</b>	
Nitroprussiato de sódio	40 g
Água bi-destilada	100 mL
<b>▪ Solução de DNS</b>	
NaOH 2M	1,6 g
DNS	1 g
Tartarato de sódio e potássio	30 g
Água destilada	100 mL

**B - Composição química das soluções de biologia molecular utilizadas:**

▪ **Tampão de Lise, pH 8:**

TRIS-HCl 50 mM	0,3030 g
NaCl 250 mM	0,7305 g
EDTA 50 mM	0,9305 g
SDS 0,3%	0,1500 g
Água ultra-pura	50 mL

▪ **Tampão de Extração (TE), pH 8:**

TRIS 10 mM	0,3029 g
EDTA 1 mM	0,0931 g

▪ **Tampão acetato de sódio 3M, pH 5,2:**

Acetato de sódio	24,61 g
Ácido acético glacial	q.b
Água ultra-pura	100 mL

▪ **Solução de TE com RNase (100 µg. mL<sup>-1</sup>):**

Solução stock de RNase 10 mg.mL <sup>-1</sup>	100 µL
Tampão de extracção, pH 8	10 mL

▪ **Solução de corante stock 6 X**

Azul de bromofenol	0,0025 g
Xilenocianol	0,0025 g
Glicerol	300 µL
TBE 1 X	700 µL

**C - Composição química dos meios de cultura utilizados:**

▪ **Potato Dextrose Agar (PDA)**

Potato Dextrose Agar, Merck	32 g
Água bidestilada	1 L

▪ **Tap Water Medium (TWA)**

Agar, Merck	15 g
Água da torneira	1 L

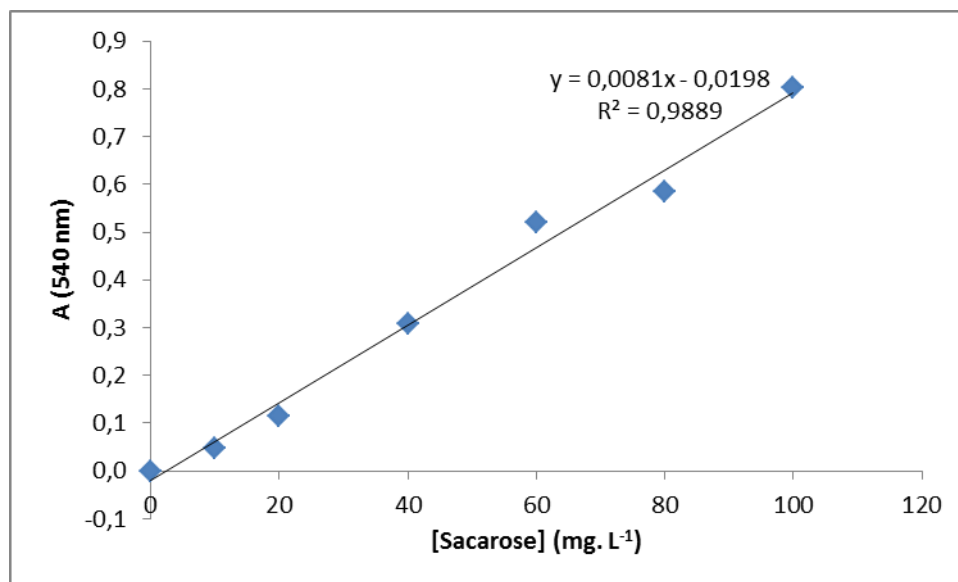
▪ **Yeast Nitrogen Base (YNB)**

Bacto Yeast Nitrogen Base, Hi Média	6,7 g
Água bidestilada	1 L

▪ **Yeast Nitrogen Base com sacarose (YNBS)**

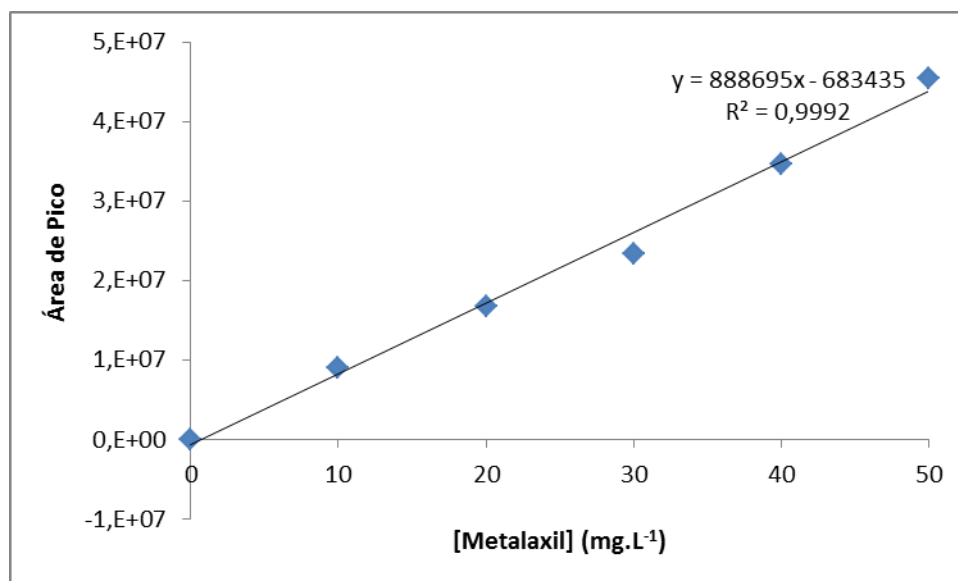
Bacto Yeast Nitrogen Base, Hi Média	6,7 g
Sacarose	5 g
Água bidestilada	1 L

### Anexo III: Curvas de Calibração



**Figura 17: Curva de calibração da sacarose pelo método do DNS modificado.**

Os valores apresentados representam a média  $\pm$  desvio-padrão de 4 réplicas.



**Figura 18: Curva de calibração dos padrões de metalaxil obtida por HPLC.**

Os valores apresentados representam a média  $\pm$  desvio-padrão de 4 réplicas.

### Anexo IV: Cromatogramas

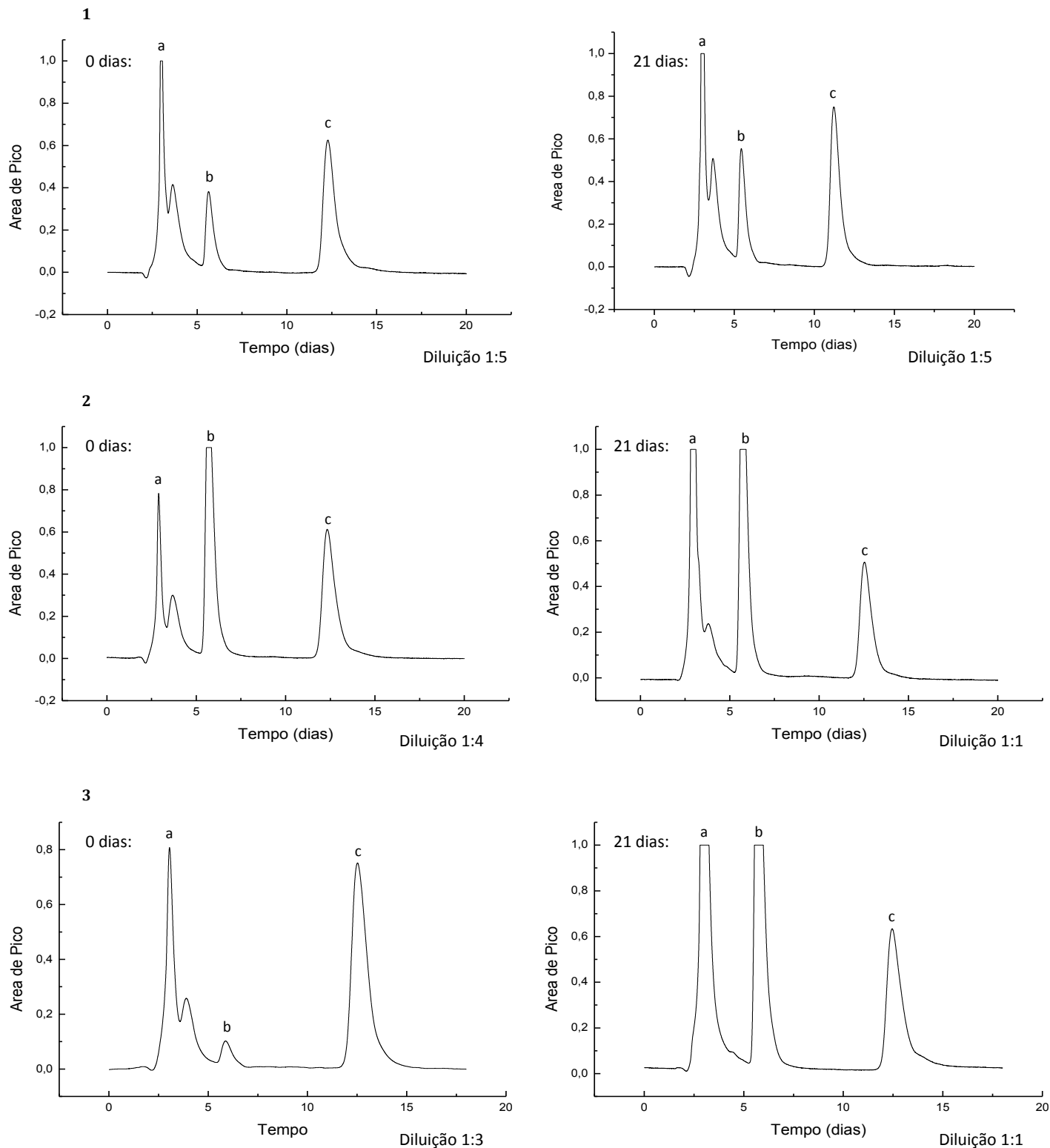


Figura 19: Cromatogramas obtidos aos 0 e 21 dias a partir de culturas de *Zygomycetes*: - (1) – Controlo Abiótico; (2) – *R. Rid. CCM1 1004*; (3) – *A. glauca CBS 101.08*; em meio YNB na presença de metalaxil na concentração de 100 mg.L<sup>-1</sup>.  
a – Ftalimida; b – Metabolito não identificado; c – Metalaxil.

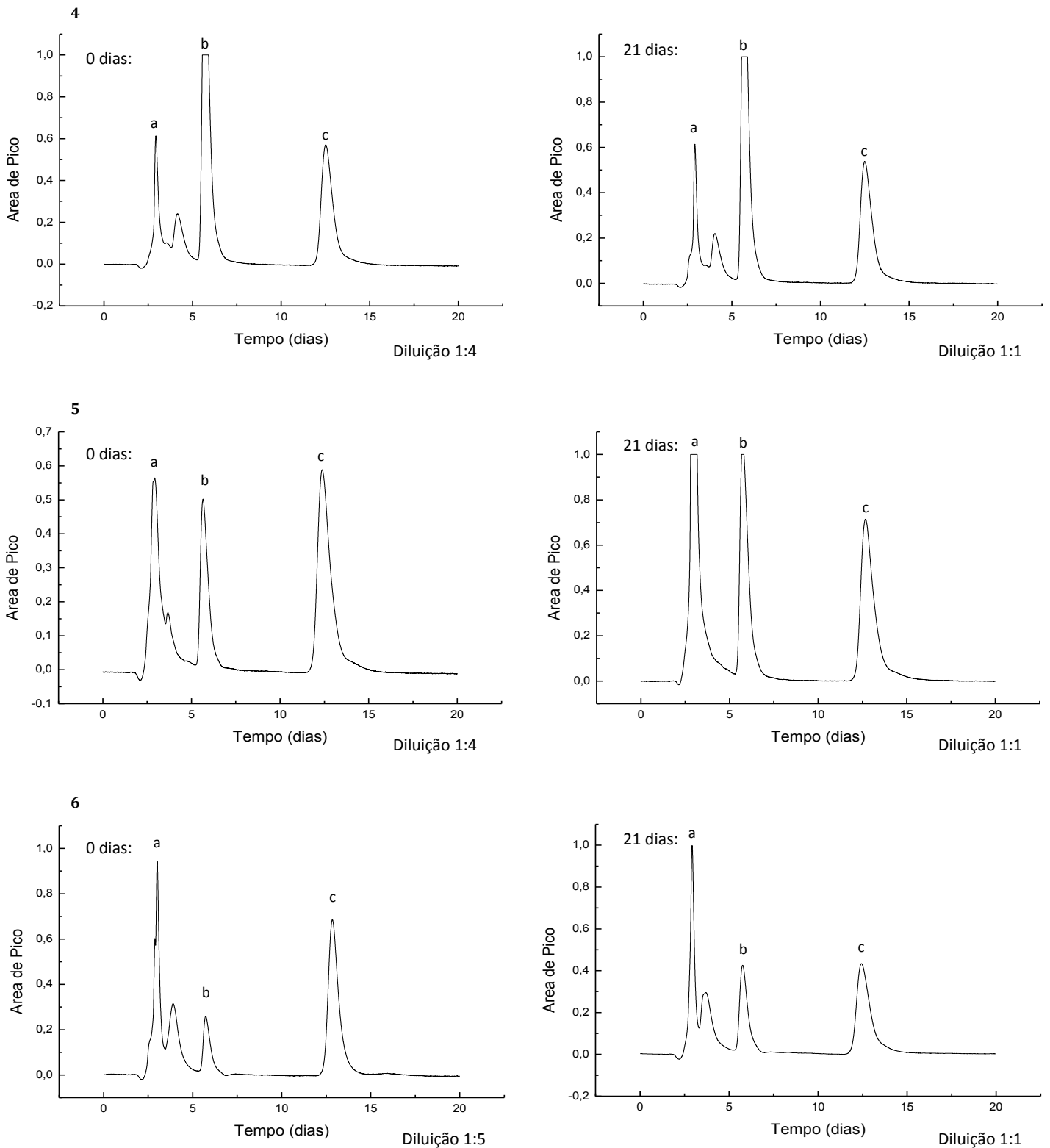


Figura 19: (Continuação) Cromatogramas obtidos aos 0 e 21 dias a partir de culturas de *Zygomycetes*: (4) – *C. simplex* CCMI 244; (5) – *G. butleri* CBS 179.28 e (6) – *R. orizae* CCMI 900, em meio YNB na presença de metalaxil na concentração de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ . a – Ftalimida; b – Metabolito não identificado; c – Metalaxil.

### Anexo V: Análise Estatística

**Tabela 5: Análise da variância (ANOVA) do crescimento radial das estirpes de *Rhizopus spp.*, *Absidia spp.*, *Circinella spp.* em meio YNB contendo um gradiente de fungicida comercial (0-100 mg.L<sup>-1</sup>).**

Fontes de variação		Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p (Sig.)
Metalaxil	Entre grupos	78,008	7	11,144	387,615	0,000
	Dentro dos grupos	0,230	8	0,029		
	Total	78,238	15			
Metalaxil-M	Entre os grupos	100,339	7	14,334	104,725	0,000
	Dentro dos grupos	1,095	8	0,137		
	Total	101,434	15			

**Tabela 6: Análise da variância (ANOVA) do crescimento radial das estirpes de *Gongronella spp.* em meio YNB contendo um gradiente de fungicida comercial (0-100 mg.L<sup>-1</sup>).**

Fontes de variação		Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p (Sig.)
Metalaxil	Dentro dos grupos	5,808	12	0,484	10,733	0,000
	Entre os grupos	0,586	13	0,045		
	Total	6,395	25			
Metalaxil-M	Dentro dos grupos	3,510	12	0,293	10,826	0,000
	Entre os grupos	0,351	13	0,027		
	Total	3,861	25			

Tabela 7: Comparação múltipla de médias (Tukey HSD) do crescimento radial estirpes de *Rhizopus* spp., *Absidia* spp., *Circinella* spp. em meio YNB contendo um gradiente de metalaxil (0-100 mg.L<sup>-1</sup>).

Estirpes	N	Subgrupo para alpha = 0.05		
		1	2	3
<i>C. simplex</i> CCM1 244	4	3,7000		
<i>A. coeruleae</i> CBS 104.08	4	3,7500		
<i>A. glauca</i> CCM1 91	4	4,0000		
<i>R. stolonifer</i> CBS 244.62	4		5,2500	
<i>R. stolonifer</i> Rid CCM1 1004	4			8,5000
<i>R. stolonifer</i> CCM1 1005	4			8,5000
<i>R. orizae</i> CCM1 900	4			8,5000
<i>A. glauca</i> CBS 101.08	4			8,5000
Sig.		0,653	1,000	1,000

Tabela 8: Comparação múltipla de médias (Tukey HSD) do crescimento radial estirpes de *Rhizopus* spp., *Absidia* spp., *Circinella* spp. em meio YNB contendo um gradiente de metalaxil-M (0-100 mg.L<sup>-1</sup>).

Estirpes	N	Subgrupo para alpha = 0.05			
		1	2	3	4
<i>C. simplex</i> CCM1 244	4	2,2500			
<i>A. coeruleae</i> CBS 104.08	4	3,0000	3,0000		
<i>A. glauca</i> CCM1 91	4	3,6000	3,6000		
<i>A. glauca</i> CBS 101.08	4		3,8500	3,8500	
<i>R. stolonifer</i> CBS 244.62	4			5,2500	
<i>R. stolonifer</i> Rid CCM1 1004	4				8,5000
<i>R. stolonifer</i> CCM1 1005	4				8,5000
<i>R. orizae</i> CCM1 900	4				8,5000
Sig.		0,074	0,392	0,062	1,000



**Tabela 9: Comparação múltipla de médias (Tukey HSD) do crescimento radial estirpes de *Gongronella* spp. em meio YNB contendo um gradiente de metalaxil (0-100 mg.L<sup>-1</sup>).**

Estirpe	N	Subgrupo para alpha = 0.05			
		1	2	3	4
<i>G. lacryspora</i> CBS 244.62	4	1,2000			
<i>G. lacryspora</i> ATCC 244.12	4	1,3000			
<i>G. butleri</i> CBS 216.58	4	1,5000			
<i>C. lacrymispora</i> CBS 101.57	4	1,6250	1,6250		
<i>G. butleri</i> CBS 228.36	4	1,9000	1,9000	1,9000	
<i>Gongronella</i> . sp. CCMI 1000	4	1,9500	1,9500	1,9500	1,9500
<i>G. butleri</i> CBS 194.60	4	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000
<i>G. butleri</i> CBS. 259.52	4	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000
<i>G. butleri</i> ATCC 8989	4	2,0000	2,0000	2,0000	2,0000
<i>G. butleri</i> CBS 157.24	4		2,4500	2,4500	2,4500
<i>G. sp. Rid</i> CCMI 1001	4			2,5000	2,5000
<i>G. butleri</i> CBS 227.36	4			2,6000	2,6000
<i>G. butleri</i> CBS 179.28	4				2,7500
Sig.		0,070	0,058	0,148	0,070

**Tabela 10: Comparação múltipla de médias (Tukey HSD) do crescimento radial estirpes de *Gongronella* spp. em meio YNB contendo um gradiente de metalaxil-M(0-100 mg.L<sup>-1</sup>).**

Estirpe	N	Subgrupo para alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
<i>G. lacryspora</i> ATCC 244.12	4	1,2000				
<i>G. lacryspora</i> CBS 244.62	4	1,5000	1,5000			
<i>G. butleri</i> CBS 216.58	4	1,6500	1,6500	1,6500		
<i>G. butleri</i> CBS 179.28	4	1,7000	1,7000	1,7000	1,7000	
<i>G. butleri</i> CBS. 259.52	4	1,8000	1,8000	1,8000	1,8000	1,8000
<i>G. butleri</i> CBS 228.36	4		1,9500	1,9500	1,9500	1,9500
<i>G. butleri</i> CBS 157.24	4		2,1000	2,1000	2,1000	2,1000
<i>G. butleri</i> CBS 194.60	4		2,1000	2,1000	2,1000	2,1000
<i>C. lacrymispora</i> CBS 101.57	4			2,2250	2,2250	2,2250
<i>Gongronella</i> . sp. CCMI 1000	4			2,2500	2,2500	2,2500
<i>G. butleri</i> ATCC 8989	4				2,3500	2,3500
<i>G. butleri</i> CBS 227.36	4					2,4000
<i>G. sp. Rid</i> CCMI 1001	4					2,4500
Sig.		0,085	0,085	0,085	0,052	0,052

**Tabela 11: : Análise da variância (ANOVA) do crescimento da biomassa ( $g.L^{-1}$ ) para as estirpes em estudo no ensaio de degradação do metalaxil em meio líquido.**

Fontes de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p (Sig.)
Entre os grupos	4,960	17	0,292	17,427	0,000
Dentro dos grupos	0,301	18	0,017		
Total	5,261	35			

**Tabela 12: Comparação múltipla de médias (Tukey HSD) do crescimento da biomassa ( $g.L^{-1}$ ) para as estirpes em estudo no ensaio de degradação do metalaxil em meio líquido.**

Grupos	N	Subgrupo para $\alpha = 0.05$				
		1	2	3	4	5
<i>R. stl.</i> Rid [14-21 dias]	4	0,0062				
<i>G. but</i> [14-21 dias]	4	0,0171				
<i>A. glauca</i> [7-21 dias]	4	0,0223				
<i>C. simplex</i> [7-21 dias]	4	0,0298	0,0298			
<i>A. glauca</i> [2-7 dias]	4	0,0474	0,0474			
<i>R. orizae</i> [14-21 dias]	4	0,0508	0,0508			
<i>R. orizae</i> [5-14 dias]	4	0,0573	0,0573			
<i>G. sp.</i> Rid [3-14 dias]	4	0,0703	0,0703			
<i>G. sp.</i> Rid [14-21 dias]	4	0,0880	0,0880			
<i>G. but</i> [3-14 dias]	4	0,0908	0,0908			
<i>C. simplex</i> [2-7 dias]	4	0,1084	0,1084			
<i>R. stl.</i> Rid [2-14 dias]	4	0,1194	0,1194			
<i>G. but</i> [0-3 dias]	4	0,2507	0,2507	0,2507		
<i>C. simplex</i> [0-2 dias]	4		0,5449	0,5449	0,5449	
<i>G. sp.</i> Rid [0-3 dias]	4			0,7103	0,7103	
<i>A. glauca</i> [0-2 dias]	4			0,7527	0,7527	
<i>R. stl.</i> Rid [0-2 dias]	4				0,8791	0,8791
<i>R. orizae</i> [0-5 dias]	4					1,3003
Sig.		0,883	0,054	0,065	0,507	0,196

**Tabela 13: Análise da variância (ANOVA) da taxa de utilização da sacarose ( $\text{g.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ) para as estirpes em estudo no ensaio de degradação do metalaxil em meio líquido.**

Fontes de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p (Sig.)
Entre os grupos	57,744	17	3,397	125,939	0,000
Dentro dos grupos	0,971	36	0,027		
Total	58,715	53			

**Tabela 14: Comparação múltipla de médias (Tukey HSD) da taxa de utilização da sacarose ( $\text{g.L}^{-1}$ ) para as estirpes em estudo no ensaio de degradação do metalaxil em meio líquido.**

Grupos	N	Subgrupo para $\alpha = 0.05$					
		1	2	3	4	5	
<i>R. orizae</i> [3-5 dias]	4	0,1276					
<i>A. glauca</i> [3-5 dias]	4	0,1564					
<i>R. stl. Rid</i> [3-5 dias]	4	0,2634					
<i>C. simplex</i> [3-5 dias]	4	0,2757					
<i>G. but</i> [3-5 dias]	4	0,3348					
<i>G. sp. Rid</i> [3-5 dias]	4	0,3478					
<i>G. sp. Rid</i> [1-3 dias]	4		1,0357				
<i>R. orizae</i> [1-3 dias]	4		1,0844				
<i>C. simplex</i> [1-3 dias]	4		1,1914				
<i>R. stl. Rid</i> [1-3 dias]	4		1,2058				
<i>A. glauca</i> [1-3 dias]	4		1,2160				
<i>G. but</i> [2-3 dias]	4			1,8100			
<i>G. but</i> [0-2 dias]	4			2,2962	2,2962		
<i>R. stl. Rid</i> [0-1 dias]	4				2,4458	2,4458	
<i>C. simplex</i> [0-1 dias]	4				2,5802	2,5802	
<i>A. glauca</i> [0-1 dias]	4				2,7366	2,7366	2,7366
<i>G. sp. Rid</i> [0-1 dias]	4					2,9451	2,9451
<i>R. orizae</i> [0-1 dias]	4						3,2181
Sig.		0,966	0,995	0,067	0,144	0,053	0,073

**Tabela 15: Análise da variância (ANOVA) da taxa de degradação do metalaxil ( $\text{mg.L}^{-1}.\text{dia}^{-1}$ ) para as estirpes em estudo no ensaio de degradação do metalaxil em meio líquido.**

Fontes de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p (Sig.)
Entre os grupos	187,837	17	11,049	260,415	0,000
Dentro dos grupos	2,291	54	,042		
Total	190,128	71			

**Tabela 16: Comparação múltipla de médias (Tukey HSD) da taxa de degradação do metalaxil ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) para as estirpes em estudo no ensaio de degradação do metalaxil em meio líquido.**

Grupos	N	Subgrupo para $\alpha = 0.05$							
		1	2	3	4	5	6	7	8
<i>C. simplex</i> [10-21 dias]	4	0,0172							
<i>G. sp. Rid</i> [10-21 dias]	4	0,0368							
<i>R. stl. Rid</i> [10-21 dias]	4	0,0411							
<i>G. but</i> [10-21 dias]	4	0,0511							
<i>A. glauca</i> [10-21 dias]	4	0,1360							
<i>R. orizae</i> [10-21 dias]	4	0,2403	0,2403						
<i>A. glauca</i> [3-10 dias]	4	0,2866	0,2866	0,2866					
<i>R. orizae</i> [2-10 dias]	4	0,4337	0,4337	0,4337					
<i>G. sp. Rid</i> [3-10 dias]	4	0,4714	0,4714	0,4714					
<i>R. stl. Rid</i> [1-10 dias]	4	0,4989	0,4989	0,4989					
<i>G. but</i> [10-21 dias]	4		0,7017	0,7017					
<i>C. simplex</i> [0-2 dias]	4			0,8110	0,8110				
<i>C. simplex</i> [2-10 dias]	4				1,2967	1,2967			
<i>R. orizae</i> [0-2 dias]	4					1,4352			
<i>R. stl. Rid</i> [0-1 dias]	4						2,3065		
<i>A. glauca</i> [0-3 dias]	4							2,9561	
<i>G. sp. Rid</i> [0-3 dias]	4								5,0168
<i>G. but</i> [0-3 dias]	4								5,4099
Sig.		0,122	0,167	0,059	0,114	1,000	1,000	1,000	0,406

**Tabela 17: Análise da variância (ANOVA) das percentagens de metalaxil remanescentes no estudo de degradação do metalaxil na ausência e na presença de biomassa de *Rhizopus stolonifer* Rid CCM1 1004.**

Fontes de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p (Sig.)
Entre os grupos	12020,360	14	858,597	2701973,681	0,000
Dentro dos grupos	0,005	15	0,000		
Total	12020,365	29			

**Tabela 18: Comparação múltipla de médias (Tukey HSD) das percentagens de metalaxil remanescentes no estudo de degradação do metalaxil na ausência e na presença de biomassa de *Rhizopus stolonifer* Rid CCM1 1004.**

Grupos	N	Subgrupo para alpha = 0.05								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Bio. viável <i>R.sp.Rid.7d</i>	4	44,5284								
Bio. viável <i>R.sp.Rid 5d</i>	4		45,2060							
Bio.viável <i>R.sp.Rid 3d</i>	4			62,3352						
Bio. viável <i>R.sp.Rid 1d</i>	4				74,6108					
Bio. ñ viável <i>R.sp.Rid 7d</i>	4					98,8511				
Sem bio. 7d	4					98,9044				
Bio.ñ viável <i>R.sp.Rid 5d</i>	4						99,0367			
Sem bio. 5d	4						99,0380			
Sem bio. 3d	4							99,3367		
Bio.ñ viável <i>R.sp.Rid 3d</i>	4							99,3545		
Bio.ñ viável <i>R.sp.Rid 1d</i>	4								99,8356	
Sem bio.1d	4								99,8892	
Sem bio. 0d	4									100,0000
Bio.ñ viável <i>R.sp.Rid 0d</i>	4									100,0000
Bio.viável <i>R.sp.Rid 0d</i>	4									100,0000
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	,257	1,000	,999	,251	1,000

**Tabela 19: Análise da variância (ANOVA) das percentagens de metalaxil remanescentes no estudo de degradação do metalaxil na ausência e na presença de biomassa de *Gongronella* sp. Rid CCMI 1001.**

Fontes de variação	Soma de quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p (Sig.)
Entre os grupos	14006,844	14	1000,489	17562707,030	0,000
Dentro dos grupos	0,001	15	0,000		
Total	14006,845	29			

**Tabela 20: Comparação múltipla de médias (Tukey HSD) das percentagens de metalaxil remanescentes no estudo de degradação do metalaxil na ausência e na presença de biomassa *Gongronella* sp. Rid CCMI 1001.**

Grupos	N	Subgrupo para alpha = 0.05											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Bio. viável R.sp.Rid.7d	4	41,32 49											
Bio. viável R.sp.Rid 5d	4		48,86 13										
Bio.viável R.sp.Rid 3d	4			56,60 90									
Bio. viável R.sp.Rid 1d	4				58,71 66								
Bio. ñ viável R.sp.Rid 7d	4					98,9067							
Sem bio. 7d	4					98,9089							
Bio.ñ viável R.sp.Rid 5d	4						99,03 80						
Sem bio. 5d	4							99,33 67					
Sem bio. 3d	4								99,5673				
Bio.ñ viável R.sp.Rid 3d	4									99,7859			
Bio.ñ viável R.sp.Rid 1d	4										99,84 59		
Sem bio.1d	4											99,88 92	
Sem bio. 0d	4												100,00 00
Bio.ñ viável R.sp.Rid 0d	4												100,00 00
Bio.viável R.sp.Rid 0d	4												100,00 00
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

