



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



# BIOTRANSFORMAÇÃO DE AMINAS AROMÁTICAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO CERRADO SUL-MATO-GROSSENSE

**Angela Akimi Shimabukuro**

Orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Edson dos Anjos dos Santos

Co-orientador: Prof<sup>o</sup> Dr. Dênis Pires de Lima

Campo Grande – 2018



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
**Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul**



# BIOTRANSFORMAÇÃO DE AMINAS AROMÁTICAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO CERRADO SUL-MATO-GROSSENSE

**Angela Akimi Shimabukuro**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de mestre em Química (área de concentração: Química).

Orientador: Prof. Dr. Edson dos Anjos dos Santos

Co-orientador: Prof. Dr. Dênis Pires de Lima



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO**

**TERMO DE DEFESA**

( X ) – Dissertação ( ) – Tese ( ) – Qualificação

<b>ALUNA</b>
<b>ANGELA AKIMI SHIMABUKURO</b>

<b>TÍTULO DO TRABALHO</b>
<b>BIOTRANSFORMAÇÃO DE AMINAS AROMÁTICAS POR FUNGOS FILAMENTOSOS ISOLADOS DO CERRADO SUL-MATO-GROSSENSE</b>

Defesa de Dissertação de Mestrado submetida à Comissão Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado e Doutorado (Resolução nº 91/2018) da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos necessário para titulação no curso.

<b>COMISSÃO EXAMINADORA</b>		
<b>NOME</b>	<b>INSTITUIÇÃO DE ENSINO</b>	<b>ASSINATURA</b>
Edson dos Anjos dos Santos	UFMS	
Maria Rita Marques	UFMS	
Adilson Beatriz	UFMS	
Douglas Chodi Masui	UFMS	

**Campo Grande, 27 de julho de 2018.**

Dedico este trabalho a minha mãe, Luiza,  
por todo apoio, cuidado, amor e compreensão.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela oportunidade de chegar até aqui e por estar a cada dia me ensinando a ter fé e acreditar que tudo dá certo.

Aos meus familiares, especialmente, minha mãe que não teve muito estudo, mas que sempre ensinou-nos o valor da educação; minhas irmãs Adriana e Andréia e meu sobrinho, Lenrri que sempre torceram por mim e compreenderam as vezes que não pude estar presente. Ao meu marido, Émerson pelo apoio, pela compreensão, por sempre me acalmar nos momentos de desespero e também quero agradecê-lo por me auxiliar com os gráficos.

Ao meu orientador, prof<sup>o</sup> Dr. Edson dos Anjos dos Santos, primeiramente, por me incentivar, no início de tudo, indicando as disciplinas a fazer como aluna especial e depois por me orientar com paciência e sabedoria durante esse trajeto. Obrigada por toda ajuda!

Ao meu co-orientador, prof<sup>o</sup> Dênis Pires de Lima, por todo auxílio e apoio.

Ao Arthur que mesmo sendo o aluno de iniciação científica foi quem me mostrou os passos da biotransformação, aliás, que também esteve comigo com suas risadas, que ia aos fins de semana me ajudar, que me fazia companhia. E que, com todo seu trabalho e esforço agora já é um mestrando! Obrigada, Arthur!

A Clarice que me indicou o caminho a seguir com suas importantes opiniões. Ao Murilo que sempre está disposto a ensinar qualquer aluno que lhe peça e que me auxiliou com suas dicas valiosas.

A todo o nosso grupo de trabalho e a todos do Lab. de Bioquímica que me acolheram.

A Rejane pela ajuda com os espectros, ao Carlos pelas dicas com as fotos.

Aos meus colegas de trabalho, Márcia, Eiva, André, Rafael, Jaque, Sr. Ademar, Lu, Joaquim, Luiz Leonardo, Leopoldo, prof<sup>o</sup> Lincoln, Ronaldo, Alexey, Mislandi, Vanessa; ao pessoal do LP-4 e a todos do INQUI por terem me auxiliado em algum momento.

A Tati, Simone, Suély, João, Dhébora, Marcela, Ellen pela amizade e companheirismo!

Aos professores das disciplinas que realizei, pela qualidade das aulas.

A UFMS por me dar a oportunidade de participar do Programa de Pós-Graduação em Química!

Falar sem aspas, amar sem interrogação,  
sonhar com reticências, viver sem ponto final.

*(Charles Chaplin)*

SHIMABUKURO, Angela Akimi. **Biotransformação de aminas aromáticas por fungos filamentosos isolados do cerrado sul-mato-grossense**. Campo Grande: UFMS, 2018. Dissertação de Mestrado em Química.

## RESUMO

A utilização da biotransformação para a diminuição da toxicidade de compostos químicos pode ser usada como um processo de biorremediação, uma tecnologia onde se utilizam plantas, microrganismos ou suas enzimas para tratar ambientes poluídos. Uma classe importante de poluentes ambientais são as aminas aromáticas (AA), muitas possuem propriedades tóxicas e/ou genotóxicas e algumas são resíduos de herbicidas em água e solos. Desse modo, o presente trabalho propôs estudar a capacidade de biorremediação de AA, incluindo um resíduo de pesticida, por fungos filamentosos isolados de plantas e solos do cerrado sul-mato-grossense. Inicialmente, foi realizada uma triagem com 12 cepas dos quais 7 foram selecionadas: *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niveus* (43), *Aspergillus terreus* (31), *Aspergillus terreus* (CM6), *Aspergillus flavus* (SM6), *Aspergillus flavus* (SM3) e *Aspergillus niger*. Elas foram utilizadas para realizar um ensaio de biotransformação com 0,406 mmol das AA: *p*-anisidina, anilina, *o*-toluidina, *p*-bromoanilina, *p*-nitroanilina. Dentre as AA testadas somente a *p*-bromoanilina e a *p*-nitroanilina não foram acetiladas. Os melhores rendimentos das AA acetiladas foram: 82% para a acetanilida com *C. cladosporioides*; 75% para a *N*-(4-metoxifenil)acetamida com *A. niveus* (43); 55% para a *N*-(2-metilfenil)acetamida com *C. cladosporioides*. Ensaio de tolerância à toxicidade da 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA), um resíduo do herbicida diuron, e seu produto acetilado foram realizadas, sendo a concentração de 500 µM a maior tolerada pelo fungo *C. cladosporioides*, *A. niveus* (43) e *A. terreus* (31). Também foi observado um maior crescimento dos fungos com a amina 3,4-DCA do que com seu derivado acetilado. O ensaio da biotransformação da 3,4-DCA foi realizado com *C. cladosporioides*, *A. niveus* (43) e *A. terreus* (31) na concentração de 500 µM, obtendo-se rendimentos do produto acetilado de 26, 29,4 e 43,5%, respectivamente. Esses resultados são muito promissores para a aplicação destes fungos em processos de biorremediação de AA, principalmente da 3,4-DCA, devido à alta concentração tolerada pelos fungos.

**Palavras-chave:** Biorremediação. Fungos Filamentosos. Arilaminas

## ABSTRACT

The use of biotransformation to reduce the toxicity of chemical compounds can be used as a bioremediation process, a technology where plants, microorganisms or their enzymes are used to treat polluted environments. An important class of environmental pollutants are aromatic amines (AA), many have toxic and/or genotoxic properties and some are herbicide residues in water and soils. Thus, the present work proposed to study the bioremediation capacity of AA, including a pesticide residue, by filamentous fungi isolated from plants and soils of the cerrado sul-mato-grossense. Initially, 12 strains were selected: *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niveus* (43), *Aspergillus terreus* (31), *Aspergillus terreus* (CM6), *Aspergillus flavus* (SM6), *Aspergillus flavus* (SM3) and *Aspergillus Niger*. They were used to perform a biotransformation assay with 0.406 mmol AA: *p*-anisidine, aniline, *o*-toluidine, *p*-bromoaniline, *p*-nitroaniline. Among the AA tested only *p*-bromoaniline and *p*-nitroaniline were not acetylated. The best yields of acetylated AAs were: 82% for acetanilide with *C. cladosporioides*; 75% for *N*-(4-methoxyphenyl)acetamide with *A. niveus* (43); 55% for *N*-(2-methylphenyl)acetamide with *C. cladosporioides*. Toxicity tolerance tests of 3,4-dichloroaniline (3,4-DCA), a residue a residue of diuron, and its acetylated product were performed, the concentration of 500  $\mu$ M being the highest tolerated by the fungus *C. cladosporioides*, *A. niveus* (43) e *A. terreus* (31). A higher growth of fungi with amine 3,4-DCA than with its acetylated derivative. The assay of 3,4-DCA biotransformation was performed with *C. cladosporioides*, *A. niveus* (43) and *A. terreus* (31) at 500  $\mu$ M, yielding the acetylated product yields of 26, 29.4 and 43.5%, respectively. These results are very promising for the application of these fungi in AA bioremediation processes, mainly 3,4-DCA, due to the high concentration tolerated by fungi.

**Keywords:** Bioremediation. Filamentous fungi. Arylamine

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Exemplos de AA que provocam câncer na bexiga urinária. ....	4
<b>Figura 2</b> – Herbicidas clorados preparados a partir da 2-toluidina. ....	5
<b>Figura 3</b> – Composto que interage com DNA podendo formar adutos em células uroletais.....	5
<b>Figura 4</b> – Comparação entre limite máximo permitido em alimentos no Brasil e na União Européia. Fonte: <a href="http://reporterbrasil.org.br">http://reporterbrasil.org.br</a> . ....	11
<b>Figura 5</b> – Estrutura química de dois herbicidas da classe das AA. ....	11
<b>Figura 6</b> - Estrutura das AA testadas inicialmente.....	13
<b>Figura 7</b> - Curva padrão da concentração da <i>p</i> -anisidina.....	16
<b>Figura 8</b> – Ensaio de incubação de diferentes fungos com <i>p</i> -anisidina (mM) por 5 dias. Letras diferentes denotam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p \leq 0,05$ ). ....	19
<b>Figura 9</b> - Estrutura da acetanilida.....	20
<b>Figura 10</b> - Estrutura da <i>p</i> -metoxiacetanilida.....	23
<b>Figura 11</b> - Estrutura da <i>N</i> -(2-metilfenil)acetamida.....	26
<b>Figura 12</b> – Estrutura da <i>N</i> -(3,4-diclorofenil)acetamida. ....	32
<b>Figura 13</b> – Teste de interferência do EtOH no teste de toxicidade com <i>C. cladosporioides</i> . Teste realizado em placa de petri (9 cm de diâmetro), em meio BDA, nas concentrações finais de 0,4%, 1,2%, 1,6% e 6,4% (v/v). Foto do 10º dia.	34
<b>Figura 14</b> – Crescimento (em mm de diâmetro) do <i>C. cladosporioides</i> . Letras diferentes denotam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p \leq 0,05$ ). ....	35

<b>Figura 15</b> - Teste de tolerância da 3,4-DCA e da 3,4-DCA-Ac (ou 3,4-DCA-Acetilada) ao <i>C. cladosporioides</i> . Foto do 15º dia.....	36
<b>Figura 16</b> – Crescimento do <i>C. cladosporioides</i> no controle, em 3,4-DCA 50 µM, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 µM (A) e 3,4-DCA-Ac (3,4-DCA-Acetilada) (B) nas mesmas concentrações. Letras diferentes denotam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p \leq 0,05$ ).....	37
<b>Figura 17</b> – Comparação do crescimento do <i>C. cladosporioides</i> nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 µM de 3,4-DCA e 3,4-DCA-Ac (3,4-DCA-Acetilado). Letras diferentes denotam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p \leq 0,05$ ).....	38
<b>Figura 18</b> - Teste de tolerância de <i>A. niveus</i> 43 à 3,4-DCA e à 3,4-DCA-Ac (3,4-DCA-Acetilado). Foto do 14º dia. ....	39
<b>Figura 19</b> – Crescimento do <i>A. niveus</i> 43 no controle, em 3,4-DCA 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 µM (A) e 3,4-DCA-Ac (B) nas mesmas concentrações. Letras diferentes denotam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p \leq 0,05$ ).....	40
<b>Figura 20</b> - Comparação do crescimento do <i>A. niveus</i> (43) nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 µM de 3,4-DCA e 3,4-DCA-Ac (3,4-DCA-Acetilado). Letras diferentes denotam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p \leq 0,05$ ).....	41
<b>Figura 21</b> - Teste de tolerância da 3,4-DCA e da 3,4-DCA-Ac ao <i>A. terreus</i> (31). Foto do 8º dia. ....	42
<b>Figura 22</b> – Crescimento do <i>A. terreus</i> (31) no controle, em 3,4-DCA 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 µM (A) e 3,4-DCA-Ac (3,4-DCA-Acetilado) (B) nas mesmas concentrações. Letras diferentes denotam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p \leq 0,05$ ).....	43
<b>Figura 23</b> - Comparação do crescimento do <i>A. terreus</i> 31 nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 µM de 3,4-DCA e 3,4-DCA-Ac. Letras diferentes denotam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA, $p \leq 0,05$ ).....	44

**Figura 24** – Comparação do crescimento dos fungos *C. cladosporioides*, *A. niveus* (43), *A. terreus* (31) na presença de 3,4-DCA e 3,4-DCA-Ac (3,4-DCA-Acetilado) na concentração de 400 µM. Comparação até o 8º dia de crescimento. Letras diferentes denotam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA,  $p \leq 0,05$ ).....45

**Figura 25** - Comparação do crescimento dos fungos *C. cladosporioides*, *A. niveus* (43), *A. terreus* (31) na presença de 3,4-DCA e 3,4-DCA-Ac (3,4-DCA-Acetilado) na concentração de 500 µM. Comparação até o 8º dia de crescimento. Letras diferentes denotam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA,  $p \leq 0,05$ ).....45

**Figura 26** - Estrutura da *N*-(3,4-diclorolfenil)acetamida. ....48

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1</b> - Reação geral da conversão de arilaminas por NATs (BROOKE et al., 2002). .....	6
<b>Esquema 2</b> – Síntese enzimática do <i>p</i> -acetoaminofenol (KO et al., 2012).....	8
<b>Esquema 3</b> - Biotransformação por <i>Arthrobacter</i> sp. N2 de três herbicidas derivados de feniluréia: diuron (1), clorotoluron (2) e isoproturon (3). (TIXIER et al., 2002).....	12
<b>Esquema 4</b> - Acetilação da anilina pelos fungos selecionados. ....	19
<b>Esquema 5</b> – Acetilação da <i>p</i> -anisidina pelos fungos selecionados.....	23
<b>Esquema 6</b> - Acetilação da <i>o</i> -toluidina pelos fungos selecionados. ....	26
<b>Esquema 7</b> - Acetilação da <i>p</i> -nitroanilina pelos fungos selecionados. ....	29
<b>Esquema 8</b> - Acetilação da <i>p</i> -bromoanilina pelos fungos selecionados. ....	29
<b>Esquema 9</b> – Biotransformação do metabromuron por fungo. (EERD et al., 2003) .	31
<b>Esquema 10</b> – Reação de acetilação da 3,4-dicloroanilina. ....	31
<b>Esquema 11</b> - Acetilação da 3,4-dicloroanilina pelos fungos selecionados.....	47
<b>Esquema 12</b> – Desacetilação da <i>N</i> -(3,4-diclorofenil)acetamida por <i>A. niveus</i> (43). .	50

## LISTA DE ESPECTROS

<b>Espectro 1</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da acetanilida ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz). ....	21
<b>Espectro 1-A</b> - Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da acetanilida ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	22
<b>Espectro 2</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da acetanilida ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz). ....	22
<b>Espectro 3</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da <i>p</i> -metoxiacetanilida ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz). ...	24
<b>Espectro 3-A</b> - Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da <i>p</i> -metoxiacetanilida ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	25
<b>Espectro 4</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da <i>p</i> -metoxiacetanilida ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz). ....	25
<b>Espectro 5</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da <i>N</i> -(2-metilfenil)acetamida ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	27
<b>Espectro 5-A</b> - Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da <i>N</i> -(2-metilfenil)acetamida ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).....	28
<b>Espectro 6</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da <i>N</i> -(2-metilfenil)acetamida ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	28
<b>Espectro 7</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da <i>N</i> -(3,4-diclorofenil)acetamida ( $\text{DMSO-d}_6$ , 300 MHz) e ampliações.....	33
<b>Espectro 8</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da <i>N</i> -(3,4-diclorofenil)acetamida ( $\text{DMSO-d}_6$ , 75 MHz).....	34
<b>Espectro 9</b> - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da <i>N</i> -(3,4-diclorofenil)acetamida ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) e ampliações.....	49
<b>Espectro 10</b> - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da <i>N</i> -(2-metilfenil)acetamida ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).....	49

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Rendimento da acetanilida com os fungos testados .....	20
<b>Tabela 2</b> - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm, para a acetanilida obtidas dos experimentos de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ , em $\text{CDCl}_3$ .....	21
<b>Tabela 3</b> – Rendimento da <i>p</i> -metoxiacetanilida com os fungos testados .....	23
<b>Tabela 4</b> - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm, para a <i>p</i> -metoxiacetanilida obtidas dos experimentos de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ , em $\text{CDCl}_3$ .....	24
<b>Tabela 5</b> – Rendimento da <i>N</i> -(2-metilfenil)acetamida com os fungos acima citados	26
<b>Tabela 6</b> - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm, para a <i>N</i> -(2-metilfenil)acetamida obtidas dos experimentos de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ , em $\text{CDCl}_3$ .	27
<b>Tabela 7</b> - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm, para a <i>N</i> -(3,4-diclorofenil)acetamida obtidas dos experimentos de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ , em $\text{DMSO-d}_6$ e $\text{CDCl}_3$ , respectivamente.....	32
<b>Tabela 8</b> – Rendimento da <i>N</i> -(3,4-diclorofenil)acetamida com os fungos acima citados.....	47
<b>Tabela 9</b> - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm, para a <i>N</i> -(3,4-diclorofenil)acetamida obtidas dos experimentos de RMN de $^1\text{H}$ e de $^{13}\text{C}$ , em $\text{CDCl}_3$ . .....	48
<b>Tabela 10</b> – Origem das cepas dos fungos isolados do Cerrado sul-mato-grossense .....	52

## LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SÍMBOLOS

2-NA: 2-naftilfamina

3,4-DCA: 3,4-dicloroanilina

3,4-DCA-Ac: N-(3,4-diclorofenil)acetamida

AA: amina (s) aromáticas (s)

AAA: arilacilamidase

AcCoA: acetilcoenzima A

BDA: batata, dextrose e ágar

CCD: Cromatografia em camada delgada

CDCl<sub>3</sub>: clorofórmio deuterado

d: Duplete

δ: deslocamento químico

DMAB: 4-(dimetilamino)benzaldeído

DMSO-d<sub>6</sub>: Dimetil sulfóxido deuterado

DNA: ácido desoxirribonucleico

EC<sub>50</sub>: concentração na qual a substância provoca efeito adverso observado em 50% dos indivíduos observados

EtOH: etanol

GPS: Sistema de Posicionamento Global

Hz: Hertz

IARC: Internacional Agency Research Cancer

*J*: Constante de acoplamento, multiplicidade

m: multiplete

PA: grau puro

MHz: Mega Hertz

NAT: (enzima) *N*-acetiltransferase

ppm: partes por milhão

R<sup>2</sup>: coeficiente de determinação

RMN: ressonância magnética nuclear

rpm: rotação por minuto

s: simpleto

sl: simpleto largo

t: tripleto

TCA: ácido tricloroacético

TMS: trimetilsilano

UE: União Européia

XME: enzima metabolizadora de xenobióticos

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 Biorremediação .....	1
1.2 Aminas Aromáticas .....	3
1.3 Enzimas.....	6
1.4 Biotransformação .....	7
1.5 Fungos .....	8
1.5. Pesticidas .....	10
2 Objetivos .....	14
2.1 Objetivo Geral .....	14
2.2 Objetivos Específicos .....	14
3 Resultados e Discussões .....	15
3.1 Pré-seleção dos fungos.....	15
3.2 Seleção dos fungos capazes de biotransformar a <i>p</i> -anisidina .....	15
3.2.1 Obtenção da curva padrão de concentração da <i>p</i> -anisidina .....	15
3.2.2 Triagem dos fungos capazes de biotransformar a <i>p</i> -anisidina .....	16
3.3 Biotransformação da anilina, <i>p</i> -anisidina, <i>o</i> -toluidina, <i>p</i> -nitroanilina e <i>p</i> -bromoanilina.....	19
3.3.1 Biotransformação da anilina .....	19
3.3.2 Biotransformação da <i>p</i> -anisidina .....	22
3.3.3 Biotransformação da <i>o</i> -toluidina.....	25

3.3.4 Biotransformação da <i>p</i> -nitroanilina.....	29
3.3.5 Biotransformação da <i>p</i> -bromoanilina.....	29
3.8 Acetilação da 3,4-DCA.....	31
3.9 Teste de interferência do solvente (etanol).....	34
3.10 Teste de tolerância a 3,4-DCA.....	35
3.10.1 <i>Cladosporium cladosporioides</i> .....	36
3.10.2 <i>Aspergillus niveus</i> 43.....	38
3.10.3 <i>Aspergillus terreus</i> (31).....	41
3.11 Biotransformação da 3,4-DCA.....	47
3.12 Ensaio de biotransformação da <i>N</i> -(3,4-diclorofenil)acetamida.....	50
4 Parte Experimental.....	51
4.1 Material e métodos.....	51
4.2 Microrganismos.....	51
4.3 Obtenção da curva padrão de concentração da <i>p</i> -anisidina.....	53
4.4 Preparo do meio de cultura e inóculo do fungo.....	53
4.5 Triagem das cepas dos fungos analisados.....	54
4.6 Ensaio de biotransformação das AA.....	54
4.7 Processo de extração e purificação de produtos da biotransformação das aminas aromáticas.....	55
4.8 Teste de interferência do solvente (etanol).....	55
4.9 Reação de acetilação da 3,4-dicloroanilina.....	55
4.10 Teste de tolerância à 3,4-DCA e à 3,4-DCA-Ac.....	56

4.11 Ensaio de biotransformação da 3,4-DCA .....	56
4.12 Processo de extração e purificação de produtos da biotransformação da 3,4-DCA.....	56
4.13 Teste de biotransformação da 3,4-DCA-Ac.....	57
4.14 Análises Estatísticas .....	57
5 Conclusões.....	58
Referências .....	59

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Biorremediação

O desenvolvimento humano, desde as épocas mais antigas, veio acompanhado de alterações ambientais que foram agravadas no final do século XVIII, após a Revolução Industrial com os processos de liberação de poluentes que contaminam o meio ambiente de modo geral, como o mar, rios, ar e solo (PEARSON, 1995 apud OLIVEIRA, 2008). Essa contaminação é um risco ao meio ambiente e à saúde do homem, tornando-se uma preocupação mundial e que nos leva a um grande desafio para que ambientes degradados voltem a ser propícios ao desenvolvimento da vida (LIM, LEE e WU, 2016). Uma proposta para a descontaminação é a biorremediação, um processo que utiliza plantas, microrganismos ou suas enzimas para tratar os ambientes poluídos (GLAZER e NIKAIDO, 1995) e restabelecer a composição e a frequência das espécies encontradas originalmente no local (GRIFFITH apud TAVARES, 2015).

Este método oferece a possibilidade de degradar ou tornar inofensivos vários contaminantes usando a atividade biológica natural de microrganismos e/ou plantas (VIDALI, 2001). Neste processo, os microrganismos, as plantas e a interação planta/micróbio usam os contaminantes como nutrientes ou fontes de energia (NITI et al., 2013). Assim, a biorremediação é a tecnologia mais promissora, sendo relativamente eficiente e econômica em relação a outras técnicas, pois pode utilizar os microrganismos do próprio ambiente com a opção de tratá-los sem remoção do material (solo ou água) (MEGHARAJ et al., 2011). Mas, para que seja segura e eficiente essa tecnologia precisa atender a alguns critérios: os microrganismos devem ter a capacidade de degradar os contaminantes a um grau razoável e a um nível de regulação satisfatório; os produtos da biodegradação também não podem ser mais persistentes ou tóxicos do que o composto original (NITI et al., 2013).

As técnicas de biorremediação podem ser classificadas segundo a aplicação do tratamento, em: biorremediação *in situ* ou *ex situ*. A escolha entre um tratamento ou outro dependerá do tipo de poluente, do custo do processo e, principalmente, da concentração final do contaminante ao fim de todo o tratamento (OLIVEIRA et al., 2008). A biorremediação *in situ* é aquela em que o tratamento é feito no próprio local

contaminado e inclui as técnicas de *bioventing* (injeção de ar em zonas de solo insaturada), *biosparging* (injeção de ar em zonas de solo saturada) e *bioslurping* (injeção de ar combinada com a extração de vapor de solo).

*Bioventing* é uma técnica na qual o oxigênio e nutrientes (como nitrogênio e fósforo) são injetados no solo para manter a biorremediação. É adequado para solos bem drenados (insaturados de água), de textura média e grossa (NITI et al. 2013). *Biosparging*: tecnologia semelhante ao *bioventing*, porém o ar é introduzido na zona saturada, isto é, no lençol freático. A intenção é não somente suprir as necessidades de oxigênio, mas, também, transferir os poluentes voláteis para a zona insaturada na qual se encontram os microrganismos capazes de degradá-los (RIZZO et al., 2006). *Bioslurping* é uma tecnologia que associa elementos de *bioventing* e bombeamento à vácuo para remover contaminantes livres de águas (vapor) e solos subterrâneos promovendo a biorremediação aeróbia de hidrocarbonetos (DOS SANTOS, 2007).

Na biorremediação *ex situ*, por exemplo, o solo é escavado e tratado em outros lugares; as técnicas usadas são: *landfarming* (preparo da terra para agricultura), *biopiling* (o solo contaminado é removido e empilhado para ser implementado em sistemas de aeração e irrigação), compostagem, biorreatores, precipitação ou floculação, microfiltração e eletro diálise (NITI et al., 2013).

*Landfarming* é um processo no qual o solo contaminado é escavado e distribuído na superfície do solo de um local em tratamento através de aração, gradagem ou moagem para oxigenação. Nutrientes e umidade também podem ser adicionados para auxiliar o processo de remediação. O pH do solo também é regulado (próximo de 7,0) usando calcário triturado ou calcário agrícola (NITI et al., 2013). *Biopiling* é uma tecnologia variante do *landfarming*, baseando-se, no entanto, em um sistema mais complexo que permite o controle da perda de compostos voláteis durante a fase operacional e a introdução de água, nutrientes e oxigênio. Porém, esse tipo de sistema não permite a frequente mistura do solo para suprir limitações referentes à heterogeneidade e à disponibilização de nutrientes e contaminantes (RIZZO et al., 2006). Compostagem é um processo no qual os resíduos orgânicos são degradados por microrganismos em temperaturas elevadas, geralmente na faixa de 55 °C a 65 °C. Essa faixa de temperatura resulta em maior solubilidade dos contaminantes, provável aumento de diversidade e número de microrganismos gerando maior atividade metabólica (NITI et al., 2013). Biorreatores: neste método, o solo contaminado é misturado com água e nutrientes e a mistura é agitada por um

biorreator mecânico para estimular a ação de microrganismos. Este método é mais adequado para solos argilosos do que outros métodos e é geralmente um processo rápido (RISER-ROBERTS, 1998 apud NITI et al., 2013). Precipitação ou floculação é um método utilizado para tratar águas residuais de indústria carregadas de metais e mais recentemente, está sendo escolhida para tratar águas residuais contaminadas com metais pesados, incluindo seus isótopos radioativos. No processo, ocorre a conversão de sais de metais pesados solúveis a sais insolúveis que precipitados, poderão ser removidos da água por métodos físicos como clarificação ou filtração. O método, geralmente, passa pelo ajuste de pH, adição de precipitadores químicos e a floculação (NITI et al, 2013). Microfiltração: membranas com um poro de 0,1 a 10 µm realizam a microfiltração. Membranas de microfiltração são usadas a uma constante pressão para remover sólidos dissolvidos em águas residuais. Mais de 90% das águas residuais podem ser recuperadas e reutilizadas (NITI et al., 2013). Eletro diálise é uma técnica que emprega corrente elétrica e membranas especiais que são semi-permeáveis para íons baseada em suas cargas. Membranas que permeiam cátions e membranas que permeiam ânions são colocadas alternadamente com canais de fluxo entre eles e eletrodos são colocados em cada lado da membrana. Os eletrodos retiram seus contra-íons através das membranas, para que sejam removidos da água (NITI et al, 2013).

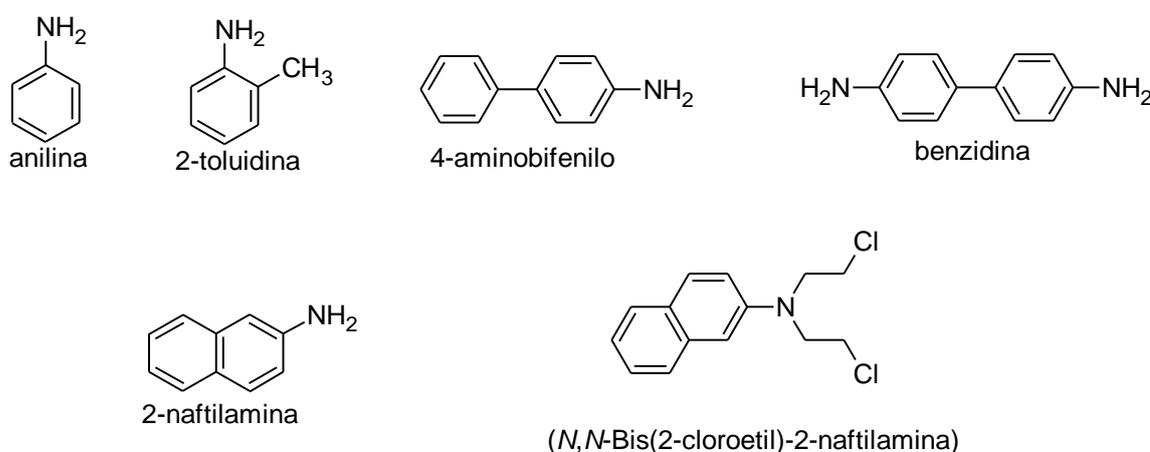
## 1.2 Aminas Aromáticas

Uma das mais importantes classes de poluentes ambientais é representada por aminas aromáticas (AA) (COCAIGN et al., 2013). Suas principais fontes compreendem setores industriais distintos, como corantes, refino de petróleo, cosméticos, medicamentos, borracha, agroquímicos, têxteis, produtos químicos intermediários para a preparação de polímeros sintéticos, adesivos, produtos farmacêuticos, pesticidas e explosivos (DE LIMA et al., 2018). No entanto, a exposição frequente às AA pode provocar uma alteração do DNA e levar a indução de carcinomas em tecidos humanos principalmente na bexiga e fígado (KIM e GUENGERICH, 2004). Além disso, elas são potenciais indutores da formação de metaemoglobinemia ou metemoglobinemia em animais e humanos, podendo causar anemia ou, nos casos mais graves levar à morte (OHTA et al., 1983 apud ARORA,

2015). A hemoglobina ferrosa pode ser oxidada a forma férrica formando a metaemoglobina (incapaz de ligar-se ao oxigênio), que em excesso leva a metaemoglobinemia (OLIVEIRA et al., 2014). AA são tóxicas para a maioria dos seres vivos e estão presentes no solo, resultantes da degradação de pesticidas agrícolas (SILAR et al., 2011). Infelizmente, dos 415 produtos químicos conhecidos como cancerígenos, 12% são AA (National Toxicology Program, 2005).

Observações epidemiológicas da toxicidade das AA foram relatadas primeiramente em fábricas de tintas a partir da anilina (Figura 1) por Rehn em 1895, com a informação de que trabalhadores alemães e suíços sofreram com o aparecimento de tumores da bexiga (KIM e GUENGERICH, 2005). Durante algum tempo, esses tumores foram atribuídos à anilina, pois era o produto químico mais comum nessas fábricas (RADOMSKI, 1979).

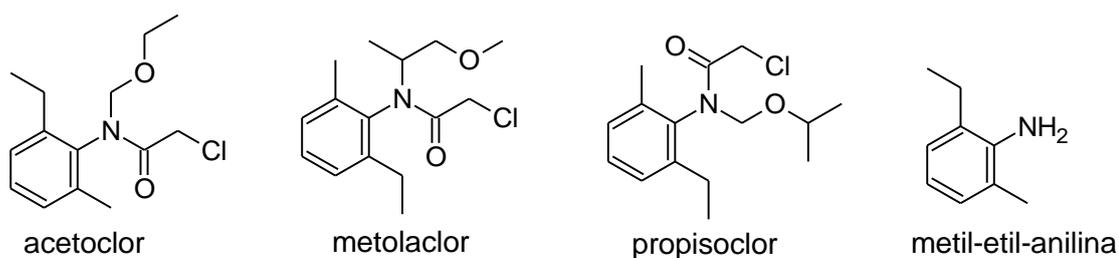
Outra AA tóxica é a 2-naftilamina (2-NA) (Figura 1), onde estudos confirmaram que a 2-NA é um dos carcinógenos responsável pelo câncer de bexiga (RADOMSKI, 1979). Essa suspeita surgiu por conta da clornafazina (*N,N*-Bis(2-cloroetil)-2-naftilamina) (Figura 1), um agente quimioterapêutico utilizado anteriormente para o tratamento da policitemia, que no organismo de um paciente tratado com o fármaco acaba por ser metabolizado em 2-NA (RADOMSKI, 1979). Segundo Doll e Peto (1981 apud, WINDMILL et al., 1997) outros estudos epidemiológicos estabeleceram claramente que a 2-NA e outras AA como a benzidina e 4-aminobifenilo (Figura 1) são carcinógenos da bexiga humana.



**Figura 1** - Exemplos de AA que provocam câncer na bexiga urinária.

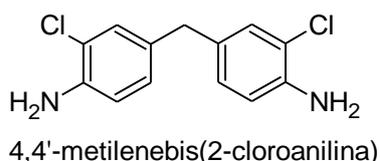
Um grande número de mortes também foi observado em um grupo de 664 trabalhadores de fábrica de corantes que foram fortemente expostos a AA entre os

anos de 1922 e 1972 na Itália, aonde 49 vieram a óbito por câncer de bexiga, e mesmo depois de 20 anos após a interrupção de exposição dos demais trabalhadores, o risco de câncer ainda continuava elevado (RUBINO et al., 1982; DECARLI et al., 1985; PIOLATTO et al., 1991 apud PIRA et al., 2010). Segundo Pira e colaboradores (2010), o estudo deste grupo conjuntamente com outros dois estudos, um nos Estados Unidos e um no País de Gales estão entre os poucos a fornecerem informações sobre o risco de câncer de bexiga após a exposição especificamente à AA, principalmente à 2-toluidina (Figura 1). O principal uso da 2-toluidina é na preparação da metil-etil-anilina (Figura 2), um intermediário no preparo de certos herbicidas clorados como acetoclor, metolaclor e propisoclor (Figura 2); também é usado como intermediário na síntese de produtos químicos da borracha, corante e pigmentos, medicamentos e no tratamento de resinas de epóxidos (ENGLISH et al., 2012).



**Figura 2** – Herbicidas clorados preparados a partir da 2-toluidina.

Além disso, outra AA, a 4,4'-metilenebis(2-cloroanilina) (Figura 3) possui perfis toxicológicos semelhantes como a 2-toluidina (*o*-toluidina), ou seja, demonstram um modo de ação comum, tendo como consequência a interação com o DNA para formar adutos nas células uroteliais (IARC, 2009 apud ENGLISH et al., 2012), o aparecimento destes adutos de DNA está associado com o surgimento da carcinogênese na bexiga (ARORA, 2015).



**Figura 3** – Composto que interage com DNA podendo formar adutos em células uroteliais.

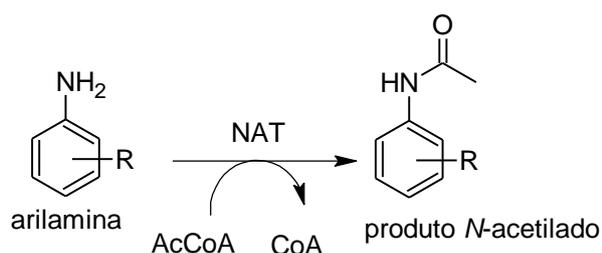
Uma vez no corpo animal, as AA carcinogênicas são metabolizadas para produtos de desintoxicação, que podem ser relativamente inócuos, sendo assim,

excretados pelo organismo, ou podem ser ativadas, resultando em diversas alterações metabólicas, incluindo o aparecimento de tumores (FANG et al., 1997).

### 1.3 Enzimas

A enzima arilamina *N*-acetiltransferase (NAT) é uma enzima envolvida em várias etapas de ativação e desintoxicação de arilamina, sendo encontrada em muitos tecidos de animais, de seres humanos, nos fungos e em bactérias (WEBER, 1987 apud FANG, 1997; WESTWOOD, 2005). No entanto, a eficiência catalítica dos fungos em relação a 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA), um resíduo tóxico de pesticida, pelas enzimas NATs foi maior do que a observada em estudos realizados com a bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (WESTWOOD, 2005) e maior ainda do que a observada para a bactéria *Mesorhizobium loti* (RODRIGUES-LIMA, 2006).

Martins et al. (2009) demonstraram que uma NAT foi capaz de acetilar eficientemente AA tóxicas utilizando o fungo *Podospora anserina*. As NATs são enzimas metabolizadoras de xenobióticos (XME) que catalisam a transferência de um grupo acetil da Acetilcoenzima A (AcCoA) para substratos de arilamina, hidrazina e arilidroxilamina formando a Coenzima A (CoA) e o produto *N*-acetilado, como mostrado no Esquema 1 (BROOKE et al., 2002).



**Esquema 1** - Reação geral da conversão de arilaminas por NATs (BROOKE et al., 2002).

O estudo de Martins e colaboradores (2009) mostrou que o rompimento dirigido do gene responsável pela expressão da NAT no fungo levou à perda de tolerância a AA, confirmando assim que esta enzima permite que o fungo desintoxique a AA através do processo de *N*-acetilação. Essas descobertas auxiliam no entendimento dos mecanismos enzimáticos que contribuem para a adaptação dos organismos vivos ao seu ambiente e provam que em solos contaminados com resíduos altamente

tóxicos de pesticida como a 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA), a via de desintoxicação dependente de NAT dos fungos pode representar um novo modelo com custo razoável e baixo impacto ambiental para o biorremediação de ambientes contaminados por AA (MARTINS et al., 2009).

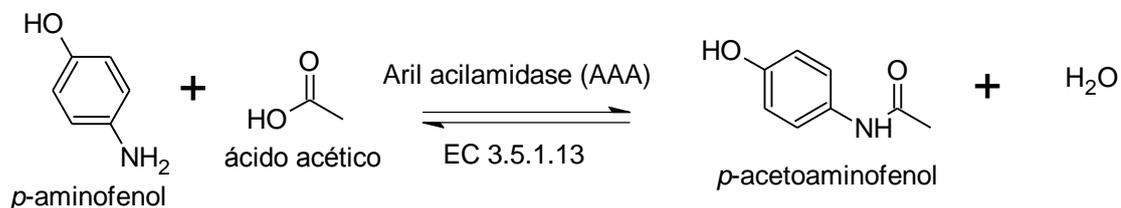
Por vários séculos, o homem tem feito uso de microrganismos e de enzimas para o preparo de alimentos e bebidas, como a quimosina para preparar o queijo, a levedura no preparo da cerveja, onde ao longo do tempo a utilização se intensificou, pois o desenvolvimento da tecnologia proporcionou a descoberta de novas enzimas integrantes das vias metabólicas (LERESCHE e MEYER, 2006). Os microrganismos são os principais produtores de enzimas industriais (SILVA et al., 2013), como amilases, lipases e proteases (BASTOS e FERNANDES, 2015). Tratar a poluição ambiental através de microrganismos também é uma tecnologia promissora que conta com várias abordagens genéticas que são elaboradas e usadas para otimizar as enzimas, as vias metabólicas e os organismos relevantes para a biodegradação (CANCELADO, 2017).

#### 1.4 Biotransformação

A biotransformação é definida como reação enzimática catalisada por células microbianas (FENG et al., 2013). Essa técnica é considerada uma ferramenta com grande potencial, especialmente para o desenvolvimento de tecnologias sustentáveis para a produção de produtos químicos e fármacos, uma vez que pode diminuir os processos e conseqüentemente os custos (BORGES et al., 2009). A síntese de algumas classes de produtos químicos podem exigir etapas sintéticas com controle quimiosseletivo. Muitas vezes os catalizadores químicos utilizados nestas etapas não são eficientes, no entanto, a quimiosseletividade nestas etapas pode ser facilmente obtida por ação de enzimas microbianas (STEWART, 2000 e ZHANG et al., 2008 apud FENG et al., 2013). Além da quimiosseletividade, as reações de biotransformação também apresentam alta regio- e estereosseletividade, produzindo uma ampla variedade de produtos químicos finos (BORGES et al., 2009).

Um exemplo de quimiosseletividade é a produção do *p*-acetaminofenol (Esquema 2) pela enzima arilacilamidase (AAA) encontrada na bactéria *Escherichia coli*, onde a AAA direciona a acetilação apenas do grupo NH<sub>2</sub>. Essa ação enzimática

possui várias vantagens, dentre elas boa especificidade reacional para o grupo amino em aminas bifuncionais envolvendo OH e grupos COOH (KO et al., 2012).



**Esquema 2** – Síntese enzimática do *p*-acetoaminofenol (KO et al., 2012).

Os seres humanos observaram as biotransformações bem antes de identificarem e entenderem que eram os microrganismos os responsáveis pelo processo e, ao longo do tempo, algumas dessas biotransformações foram temidas, como por exemplo, o apodrecimento dos alimentos, e outras foram apreciadas, como os processos fermentativos que passaram a ser utilizados na obtenção de bebidas alcoólicas e outros produtos (PARALES et al., 2002). Como em 1858, onde Louis Pasteur estudando os microrganismos que conduzem às fermentações no suco de uva, verificou que as reações podem levar a produção do vinho ou a produção do vinagre (PARALES et al., 2002).

Atualmente, os estudos de biotransformação focados na descontaminação do ambiente envolvem vários tipos de poluentes: petrolíferos, resíduos de pesticidas, farmacêuticos e resíduos de metais que biodegradados podem levar ao processo de biorremediação depois de estudados e testados (DE LIMA et al., 2018).

## 1.5 Fungos

Os fungos são conhecidos por tolerar uma ampla variedade de compostos químicos naturais e antropogênicos (DE LIMA et al., 2017). Podemos citar como exemplos: o fungo *Phanerochaete chrysosporium* (conhecido como fungo da podridão branca) que foi capaz de mineralizar cloroanilinas tóxicas (ARJMAND e SANDERMANN, 1985); *Aspergillus niger* e *Aspergillus fumigatus* também se mostraram como candidatos promissores na remoção de hidrocarbonetos do petróleo (AI-JAWHARI, 2014).

Uma ampla variedade de enzimas é liberada no ambiente por microrganismos que constituem grande parte da biomassa do solo (MEGHARAJ et al., 2011; COCAIGN et al., 2013). Os fungos constituem uma grande parte dessa biomassa e eles superam as bactérias em muitos processos de degradação ou sinergia de suas atividades (COCAIGN et al., 2013). Os fungos secretam de forma eficiente várias enzimas envolvidas na degradação da celulose/lignina, além disso, produzem também enzimas com potencial para metabolizar xenobióticos (DURRIEU, 1993 e BROOKE, 2013 apud COCAIGN et al., 2013).

O processo de biorremediação de AA através de fungos, ainda é pouco explorado no meio científico (DE LIMA et al., 2018). São encontrados, em sua maioria, trabalhos que relatam este processo através de bactérias. Porém, há uma limitação das bactérias, pois precisam de pré-exposição ao poluente específico que irão degradar para estimular a expressão de enzimas e o nível de concentração de poluentes pode limitar a expressão de enzimas bacterianas (RHODES, 2014 apud DE LIMA et al., 2018). Contudo, fungos filamentosos são promissores nesse processo pois possuem uma extensa rede de hifas que proporcionam muitas vantagens como viverem em ambientes bastante heterogêneos (HARMS; SCHLOSSER; WICK, 2011). Alguns fungos toleram condições ambientais extremas como temperaturas de -5 a +60 °C, pH de 1 a 9 e crescem em uma baixa atividade de água e pouco oxigênio (HARMS; SCHLOSSER; WICK, 2011).

As bactérias são mais fáceis de cultivar, pois possuem taxas de crescimento mais rápidas e são mais convenientes à manipulação genética. Porém, apesar das bactérias apresentarem essas facilidades nos experimentos laboratoriais, os fungos oferecem eficiência para a biorremediação de uma ampla gama de moléculas orgânicas, incluindo antibióticos que são uma classe emergente de poluentes da indústria farmacêutica (DE LIMA et al., 2018).

Os fungos estudados neste trabalho ainda não foram estudados quanto à biorremediação de AA, sendo estritamente, fungos filamentosos isolados do solo e de plantas da região do cerrado sul-mato-grossense.

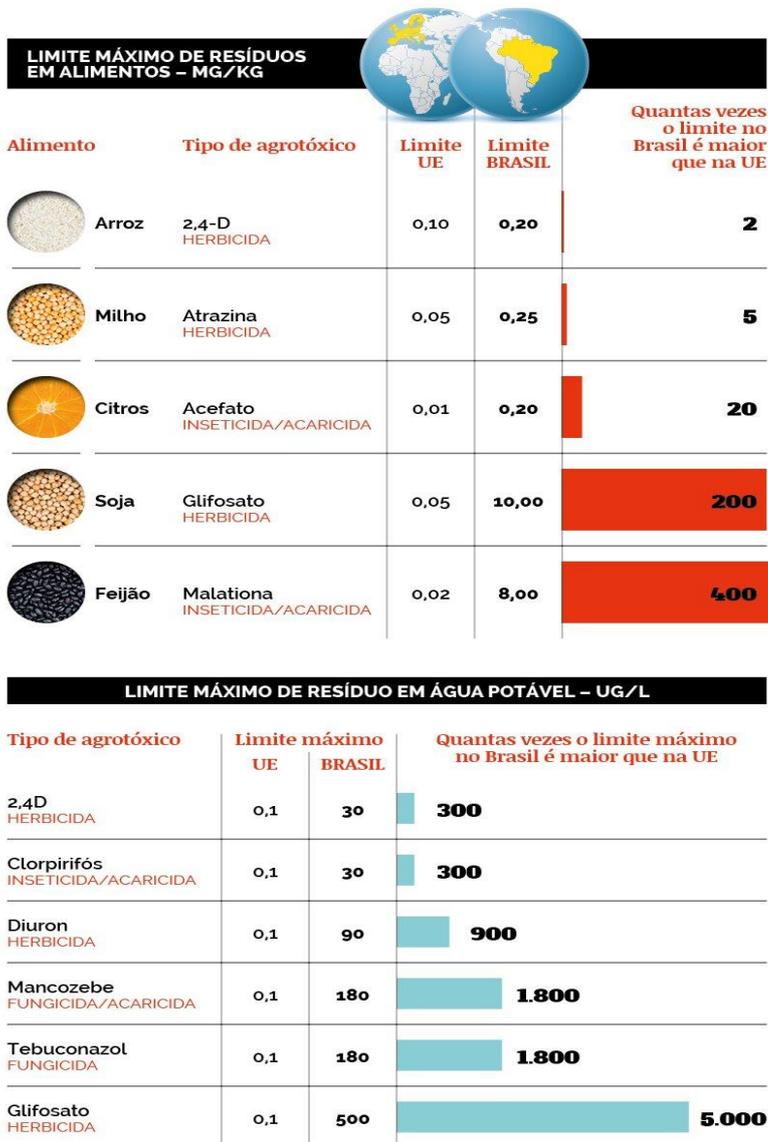
## 1.5. Pesticidas

Os contaminantes mais suscetíveis ao processo de biorremediação são os hidrocarbonetos de petróleo, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, hidrocarbonetos halogenados, pesticidas, solventes e metais (NITI et al., 2013). Entre esses contaminantes, destacamos os pesticidas, pois são amplamente utilizados na agricultura para proteção de pragas e potenciais perdas de rendimento (DAMALAS, 2009). Mas o uso excessivo e a persistência de pesticidas levam à deterioração do meio ambiente (FREITAS et al., 2016).

Pesticidas englobam os inseticidas, os herbicidas, os nematicidas e os fungicidas que são usados para controlar ou inibir doenças em plantas (NITI et al., 2013). Em uma reportagem de Lazzeri e Vergoti (2017) sobre a pesquisa realizada por Bombardi (2016) é mostrada a grande diferença de limite aceitável de resíduos na água e nos alimentos entre o Brasil e a União Europeia (Figura 4). O Brasil permite limites máximos de resíduos de agrotóxicos superiores ao da União Europeia, tanto de alimentos quanto em água potável (que chega a ser 5 mil vezes maior a permissão para o glifosato). Duas AA também estão presentes na figura: a atrazina e o diuron (Figura 5), com os limites entre 5 e 900 vezes maior que o permitido na EU, respectivamente.

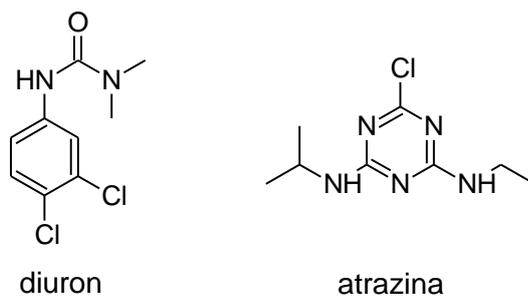
## AGROTÓXICOS ALÉM DO LIMITE

Em alguns casos, o limite máximo de resíduos em alimentos e na água potável aceito no Brasil é centenas de vezes maior



Fonte: Dados do Brasil são de 2017; os da União Europeia, de 2015

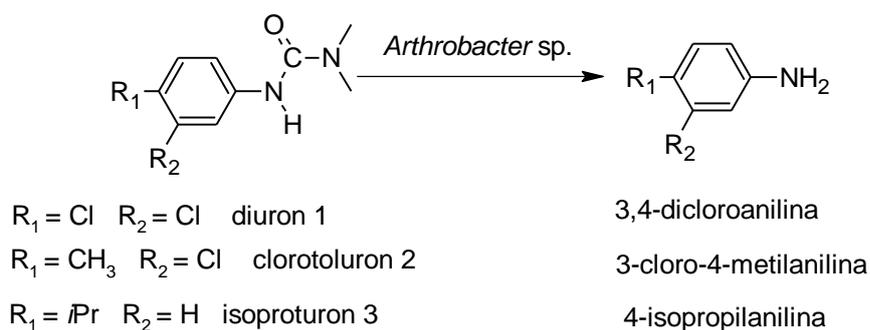
**Figura 4** – Comparação entre limite máximo permitido em alimentos no Brasil e na União Européia. Fonte: <http://reporterbrasil.org.br>.



**Figura 5** – Estrutura química de dois herbicidas da classe das AA.

Existem 504 agrotóxicos permitidos no Brasil, desses 30% são proibidos na União Européia (alguns, há mais de 10 anos) e esses itens estão entre os mais vendidos aqui, conseqüentemente, estima-se que entre 2014 a 2017 mais de um milhão de brasileiros foram intoxicados, em diferentes graus, por agrotóxicos (LAZZERI e VERGOTI, 2017).

Segundo Ducruet (1991, apud TIXIER et al., 2002) os derivados de feniluréia são amplamente utilizados como herbicidas, substâncias bem conhecidas por inibirem a fotossíntese ao entrar na planta através das raízes. Esses herbicidas podem ser degradados por microrganismos como bactérias, por exemplo, *Arthrobacter* sp. N2, em reações de *N*-desmetilação (Esquema 3) ou pela conversão em anilinas (Hägglom, 1992 apud TIXIER et al., 2002). O diuron, um derivado da feniluréia, tem como principal metabólito um produto de desmetilação a 3,4-dicloroanilina (3,4-DCA), como observados em experimentos realizados com *Arthrobacter* sp. N2 (Esquema 3) (TIXIER et al., 2002).

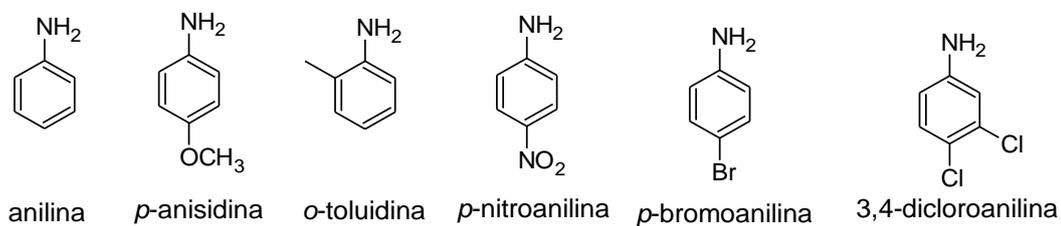


**Esquema 3** - Biotransformação por *Arthrobacter* sp. N2 de três herbicidas derivados de feniluréia: diuron (1), clorotoluron (2) e isoproturon (3). (TIXIER et al., 2002).

O diuron também é muito utilizado para o controle total de ervas daninhas em áreas não cultivadas (manutenção de estradas, ferrovias e parques) e pode sofrer degradação natural no ambiente e gerar como um dos principais produtos a 3,4-DCA (Figura 6) (TIXIER et al., 2002).

Tomlin (1997, apud TIXIER et al., 2002) relata que a aplicação no solo desses herbicidas derivados da feniluréia pode ter uma grande persistência: de dois meses a mais de um ano, sendo prejudiciais a uma ampla variedade de organismos vivos, tornando-se um problema para regiões agrícolas. Além disso, essa classe de herbicida é considerada muito prejudicial ao ambiente e à saúde da população, devido ao seu potencial de contaminação do solo e águas subterrâneas (TIXIER et al., 2002).

Neste contexto, este trabalho visa o estudo de fungos filamentosos, isolados do cerrado do Estado de Mato Grosso do Sul, quanto às suas capacidades de biotransformação de AA (Figura 6), incluindo um derivado de defensivo agrícola.



**Figura 6** - Estrutura das AA testadas inicialmente.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade de fungos filamentosos, isolados do cerrado sul-mato-grossense, quanto à biotransformação de AA.

### 2.2 Objetivos Específicos

Realizar uma seleção dos fungos filamentosos, isolados do cerrado sul-mato-grossense, capazes de biotransformar a *p*-anisidina;

Avaliar a capacidade dos fungos selecionados previamente, na acetilação de diferentes AA, incluindo um resíduo de pesticida;

Realizar ensaios de tolerância dos fungos às AA tóxicas submetidas nos ensaios de biotransformação.

Identificar os produtos *N*-acetilados formados durante o processo de biotransformação de AA.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

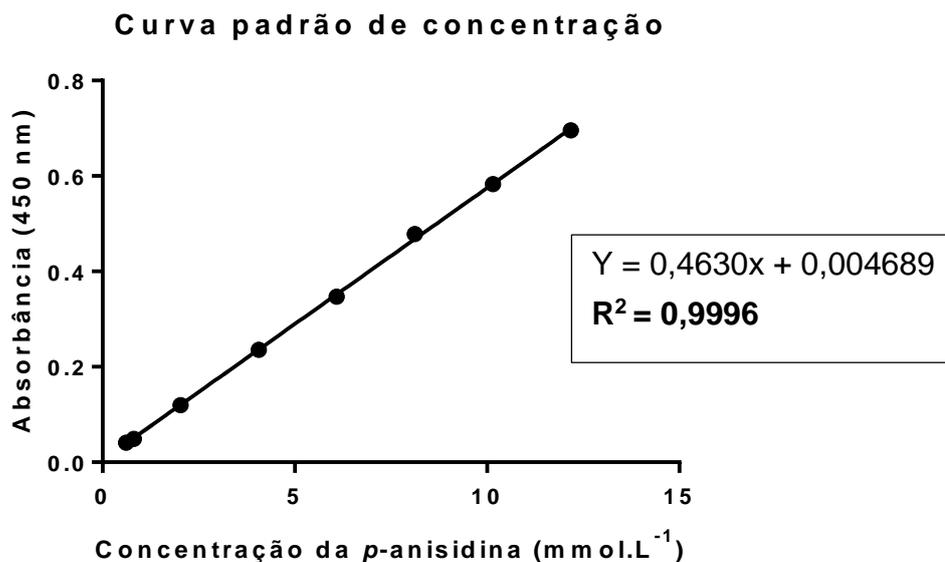
#### 3.1 Pré-seleção dos fungos

Foi realizada uma pré-seleção de 12 cepas de fungos isolados de plantas e solo do Cerrado Sul-Mato-Grossense, com intuito de verificar a capacidade de acetilação de AA. As cepas de fungos utilizadas foram selecionadas da coleção da Micoteca-UFMS: *Aspergillus flavus*, *Aspergillus flavus* (SM3), *Aspergillus flavus* (SM6), *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* (43), *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus terreus* (31), *Aspergillus terreus* (CM6), *Chaetomium sp.*, *Cladosporium cladosporioides*, *Cunninghamella elegance*, *Mucor sp.* Essa pré-seleção se baseou em pesquisas da literatura que já relataram a biotransformação de AA por alguns gêneros de fungos, como *Aspergillus sp.* (DE LIMA et al., 2018), *Chaetomium sp.* (MARTINS et al., 2009) e *Cunninghamella sp.* (TIXIER et al., 2002).

#### 3.2 Seleção dos fungos capazes de biotransformar a *p*-anisidina

##### 3.2.1 Obtenção da curva padrão de concentração da *p*-anisidina

Foi realizada uma curva padrão de concentração da *p*-anisidina (Figura 7) para determinar a concentração exata de substrato durante os 5 dias de incubação em experimento realizado conforme descrito no item **4.3**.



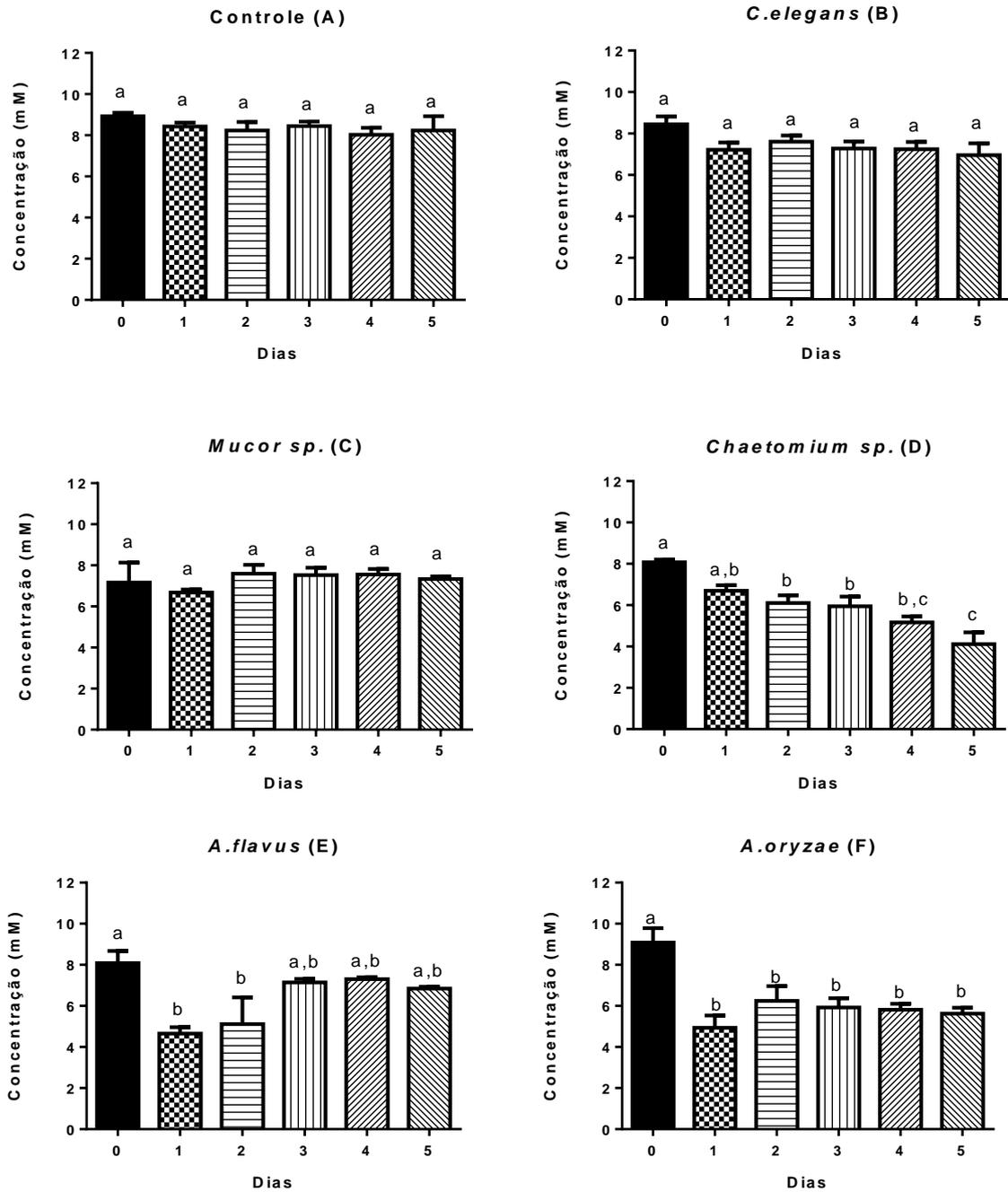
**Figura 7** - Curva padrão da concentração da *p*-anisidina.

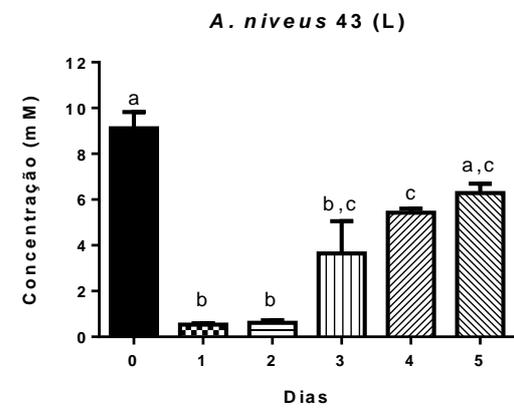
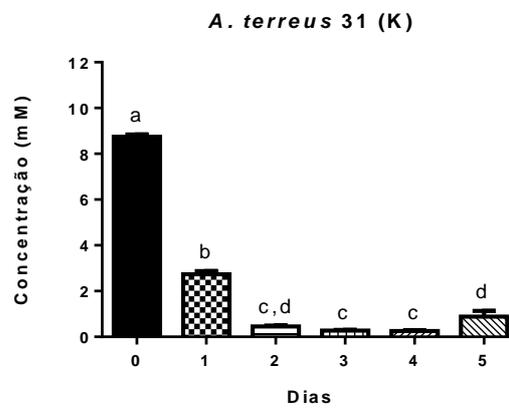
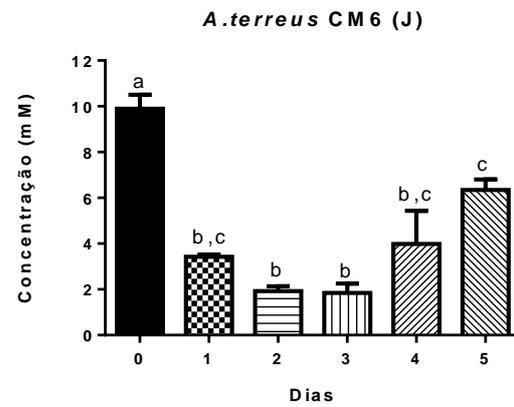
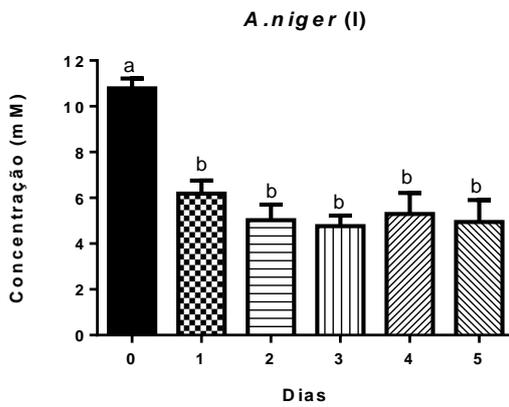
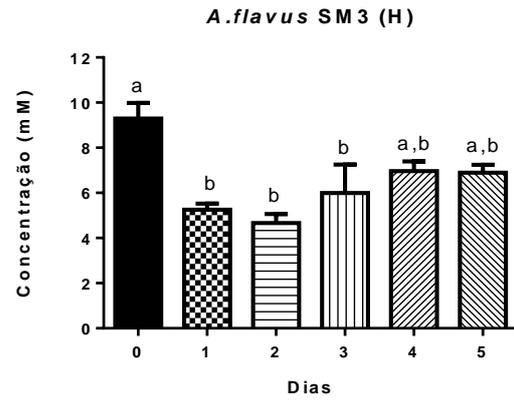
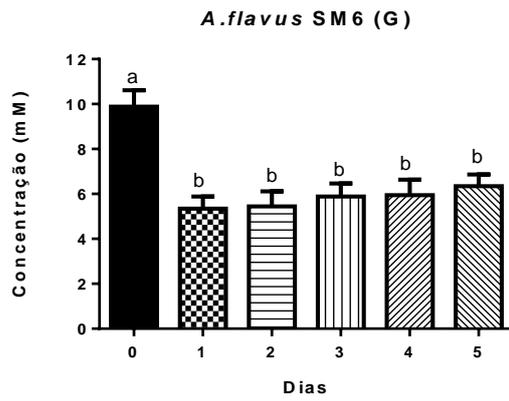
A equação obtida através do coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,9996 (Figura 7) apresentou uma ótima linearidade e foi utilizada para a conversão das absorbâncias mensuradas em concentração em  $\text{mmol.L}^{-1}$  da *p*-anisidina. Essa AA foi utilizada como padrão no experimento de triagem dos fungos verificando o consumo da mesma (item 3.2.2).

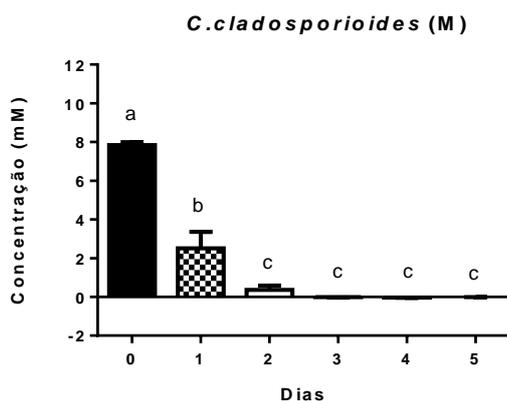
### 3.2.2 Triagem dos fungos capazes de biotransformar a *p*-anisidina

Analisando os resultados obtidos nos ensaios de biotransformação com *p*-anisidina (Figura 8 de A-M), foi possível observar que *A. niveus* (43), *A. terreus* (CM6), *A. terreus* (31) e *C. cladosporioides* forneceram os melhores resultados no segundo dia de biotransformação, seguidos por *A. niger*, *A. flavus* (SM3), *A. flavus* (SM6), *A. flavus* e *A. oryzae* que também apresentaram resultados promissores no mesmo período de tempo. O fungo *Chaetomium sp.* também foi capaz de acetilar a AA, no entanto, levou um maior tempo para a biotransformação da *p*-anisidina. *Mucor sp.* e *C. elegans* não se mostraram capazes de realizar a biotransformação. Todos os resultados foram comparados a um experimento controle realizado durante 5 dias (Figura 8A), onde não houve o consumo de *p*-anisidina. Todas as análises dos experimentos foram realizadas em triplicata e os dados obtidos foram submetidos ao

teste de Tukey (ANOVA), onde letras diferentes denotam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA,  $p \leq 0,05$ ).







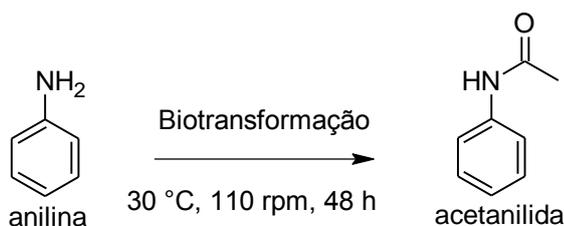
**Figura 8** – Ensaio de incubação de diferentes fungos com *p*-anisidina (mM) por 5 dias. Letras diferentes denotam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA,  $p \leq 0,05$ ).

Desta forma, com base nos resultados obtidos, foram selecionados os fungos que mostraram os melhores desempenho em dois dias de experimento, ou seja, 48 h de biotransformação, mesmo tempo adotado para a biotransformação das outras AA. Assim, os fungos selecionados foram: *A. terreus* (31), *A. terreus* (CM6), *A. niger*, *A. niveus* (43) e *C. cladosporioides*.

### 3.3 Biotransformação da anilina, *p*-anisidina, *o*-toluidina, *p*-nitroanilina e *p*-bromoanilina

As acetilações da anilina, da *p*-anisidina, *o*-toluidina, *p*-nitroanilina e *p*-bromoanilina foram realizadas na concentração de 8,12 mM, através de experimentos com *A. terreus* (31), *A. terreus* (CM6), *A. niger*, *A. niveus* (43), *C. cladosporioides* utilizando um meio líquido King's B modificado (SILVA et al., 2004).

#### 3.3.1 Biotransformação da anilina



**Esquema 4** - Acetilação da anilina pelos fungos selecionados.

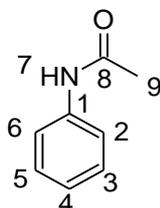
O produto foi purificado por cromatografia em placa preparativa de sílica gel-60 e os rendimentos obtidos são mostrados na Tabela 1.

**Tabela 1 –** Rendimento da acetanilida com os fungos testados

<b>Cepas dos fungos</b>	<b>Acetanilida (%)</b>
<i>Aspergillus terreus</i> (31)	31
<i>Aspergillus terreus</i> (CM6)	23
<i>Aspergillus niger</i>	3
<i>Aspergillus niveus</i> (43)	28
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	82

O melhor rendimento ocorreu com o fungo *C. cladosporioides* com 82%; *A. terreus* (31) e *A. niveus* (43) também apresentaram bons resultados.

A estrutura da acetanilida foi confirmada através das análises espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , onde valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são mostrados na Tabela 2, segundo a numeração da Figura 9.

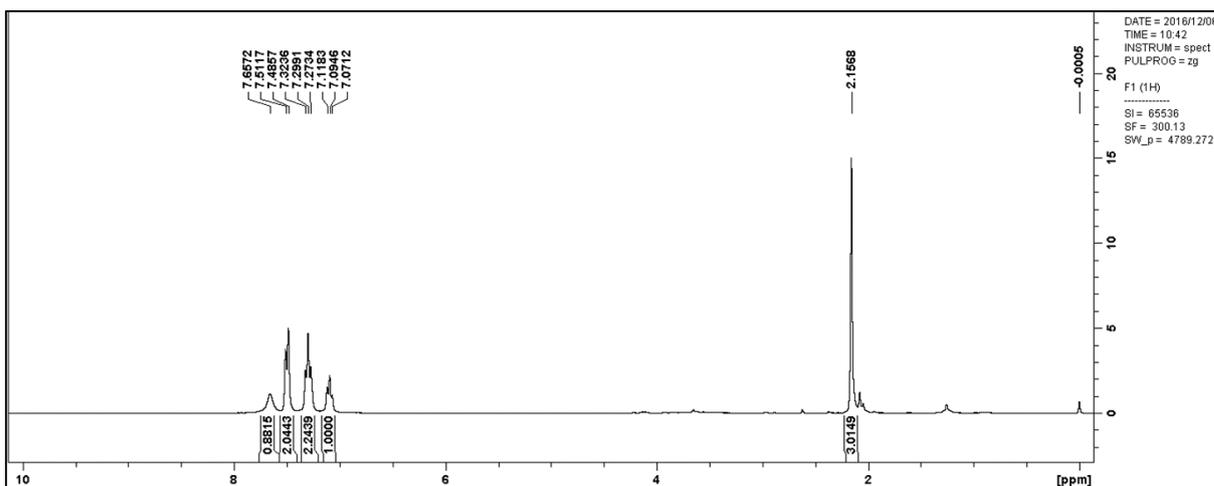


**Figura 9 -** Estrutura da acetanilida.

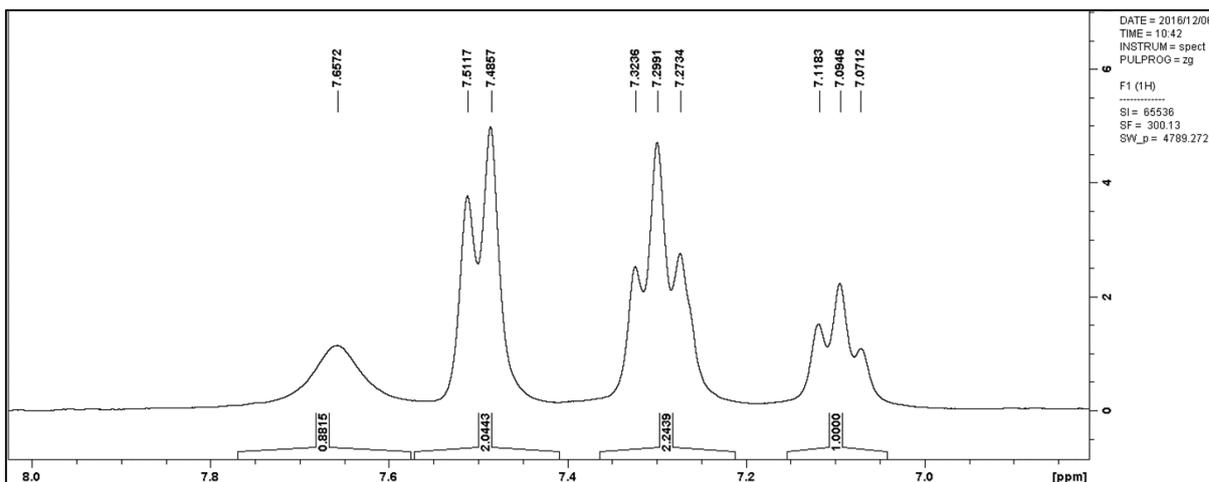
O Espectro (1) de RMN  $^1\text{H}$  mostra o aparecimento de um simpleto (s) em 2,15 ppm correspondente a um grupo metila ( $\text{CH}_3$ )  $\alpha$ -carbonila que evidencia a acetilação da anilina. Além disso, foi observada também a presença de um simpleto largo (sl) em 7,65 ppm com integral para apenas 1H, referente a amida do produto acetilado.

**Tabela 2** - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm, para a acetanilida obtidas dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , em  $\text{CDCl}_3$ .

Posição	RMN $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), multiplicidade, $J$	RMN $^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)
1	-	137,8
2	7,50, d, $J = 7,8$ Hz	119,9
3	7,29, m	128,9
4	7,09, m	124,4
5	7,29, m	128,9
6	7,50, d, $J = 7,8$ Hz	119,9
7	7,65, sl	-
8	-	168,6
9	2,15, s	24,4

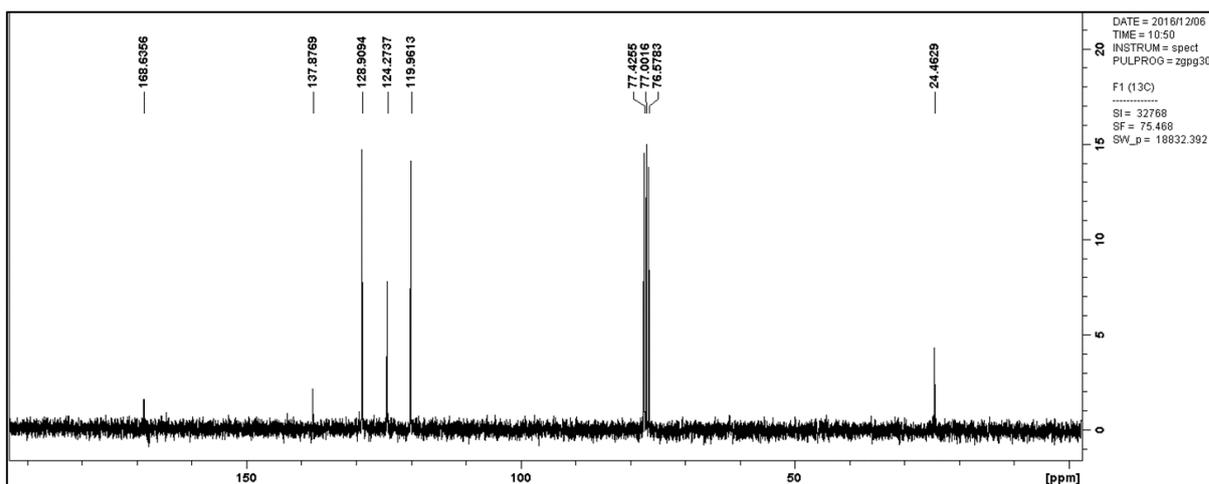


**Espectro 1** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da acetanilida ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



**Espectro 1-A** - Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da acetanilida ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

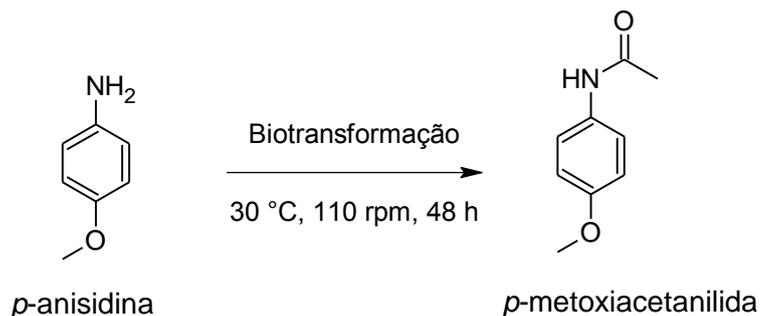
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , mostra um sinal em 24,4 ppm correspondente a um grupo metila ( $\text{CH}_3$ ), confirmando a acetilação da anilina. Além disso, foi observado também a presença de um sinal em 168,6 ppm correspondente a carbonila ( $\text{CO}$ ).



**Espectro 2** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da acetanilida ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).

### 3.3.2 Biotransformação da *p*-anisidina

O produto foi purificado por cromatografia em placa preparativa de sílica gel-60 e os rendimentos obtidos são mostrados na Tabela 3.



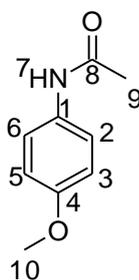
**Esquema 5** – Acetilação da *p*-anisidina pelos fungos selecionados.

O melhor rendimento da biotransformação da *p*-anisidina ocorreu com o *A. niveus* (43) com 75% seguido de *A. terreus* (31), *A. terreus* (CM6) e *C. cladosporioides*.

**Tabela 3** – Rendimento da *p*-metoxiacetanilida com os fungos testados

Cepas dos fungos	<i>p</i> -metoxiacetanilida (%)
<i>Aspergillus terreus</i> (31)	67
<i>Aspergillus terreus</i> (CM6)	62
<i>Aspergillus niger</i>	28
<i>Aspergillus niveus</i> (43)	75
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	62

A estrutura da *p*-metoxiacetanilida foi confirmada através das análises espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , onde valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são mostrados na Tabela 4, segundo a numeração da Figura 10.



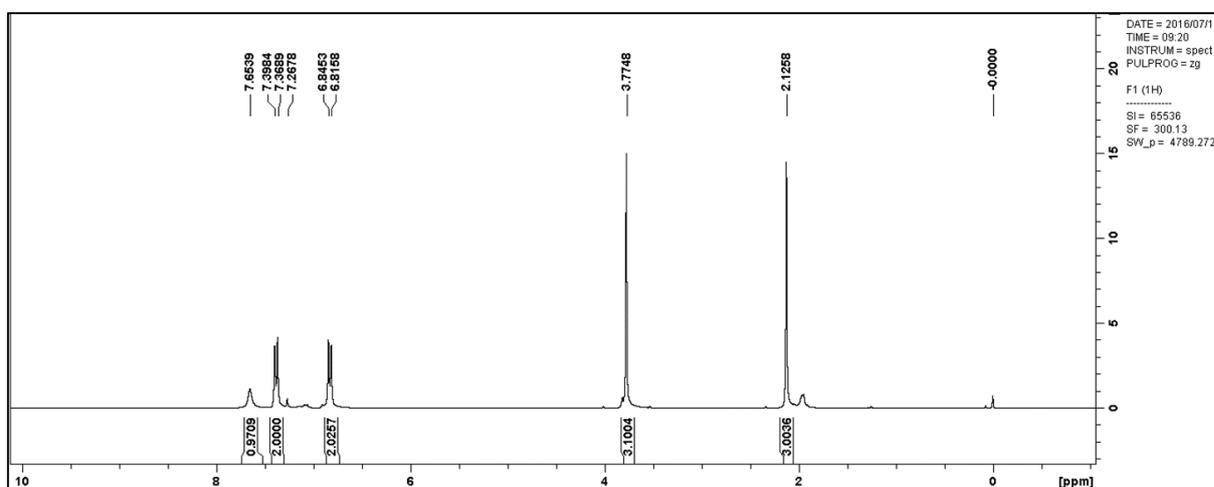
**Figura 10** - Estrutura da *p*-metoxiacetanilida.

**Tabela 4** - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm, para a *p*-metoxiacetanilida obtidas dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , em  $\text{CDCl}_3$

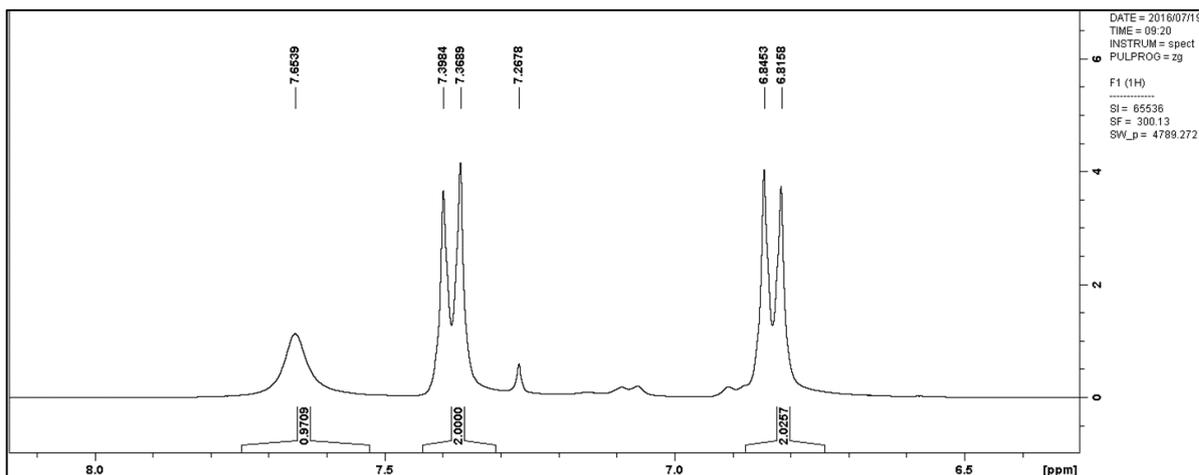
Posição	RMN $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), multiplicidade, $J$	RMN $^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)
1	-	130,9
2	7,38 d, $J = 8,9$ Hz	114,0
3	6,83 d, $J = 8,9$ Hz	121,9
4	-	156,3
5	6,83 d, $J = 8,9$ Hz	121,9
6	7,38 d, $J = 8,9$ Hz	114,0
7	7,65 sl	-
8	-	168,5
9	2,12 s	24,1
10	3,77 s	55,4

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  mostra o aparecimento de um simpleto (s) em 2,12 ppm correspondente a um grupo metila ( $\text{CH}_3$ )  $\alpha$ -carbonila que evidencia a acetilação da *p*-anisidina.

E para confirmar a estrutura da *p*-metoxiacetanilida há um simpleto em 3,77 ppm correspondente a metila do grupo metóxi. Foi observada também a presença de um sl em 7,65 ppm com integral para apenas 1H, referente a amida do produto acetilado.

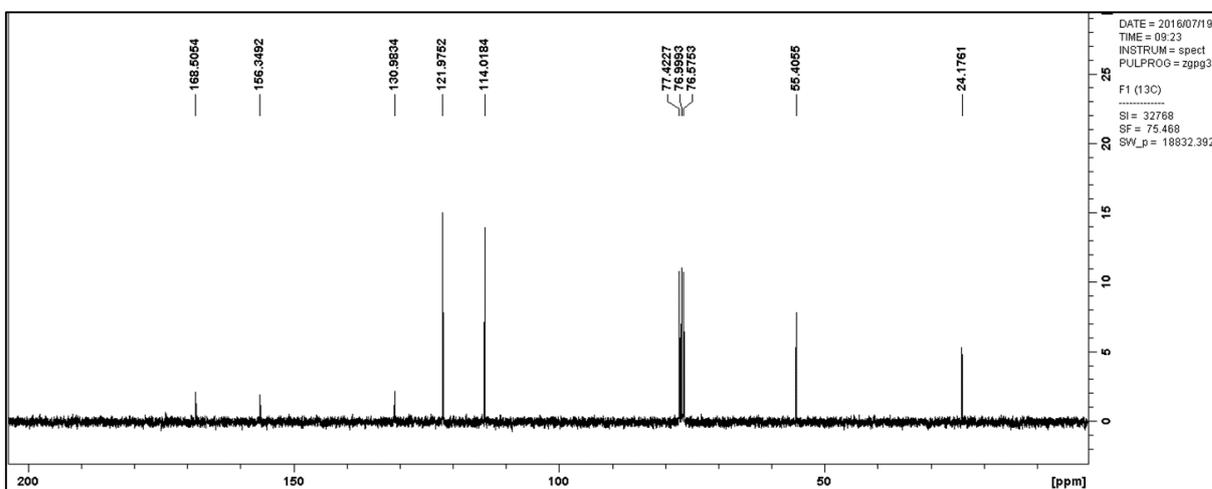


**Espectro 3** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da *p*-metoxiacetanilida ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



**Espectro 3-A** - Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da *p*-metoxiacetanilida ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

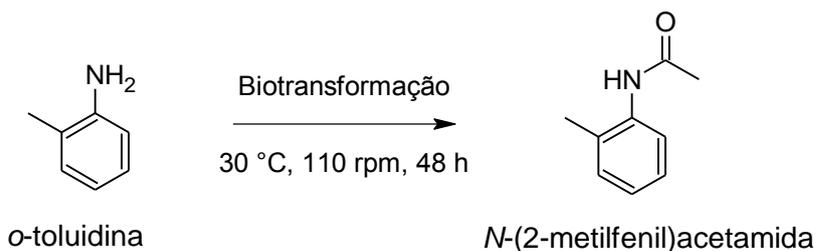
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , mostra um sinal em 24,1 ppm correspondente a um grupo metil ( $\text{CH}_3$ ), confirmando a acetilação da *p*-anisidina. Além disso, foi observada também a presença de um sinal em 168,5 ppm correspondente a carbonila ( $\text{CO}$ ) e um sinal em 55,4 ppm da metila do grupo metóxi.



**Espectro 4** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da *p*-metoxiacetanilida ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).

### 3.3.3 Biotransformação da *o*-toluidina

O produto foi purificado por cromatografia em placa preparativa de sílica gel-60 e os rendimentos obtidos são mostrados na Tabela 5.



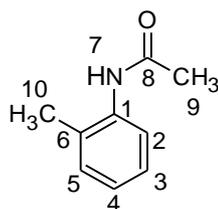
**Esquema 6** - Acetilação da *o*-toluidina pelos fungos selecionados.

O melhor rendimento foi obtido com o *C. cladosporioides* com 55%, seguido por *A. terreus* (31) e *A. niveus* (43).

**Tabela 5** – Rendimento da *N*-(2-metilfenil)acetamida com os fungos acima citados

Cepas dos fungos	<i>N</i> -(2-metilfenil)acetamida (%)
<i>Aspergillus terreus</i> (31)	21
<i>Aspergillus terreus</i> (CM6)	10
<i>Aspergillus niger</i>	2
<i>Aspergillus niveus</i> (43)	15
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	55

A estrutura da *N*-(2-metilfenil)acetamida foi confirmada através das análises espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , onde valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são mostrados na Tabela 6, segundo a numeração da Figura 11.



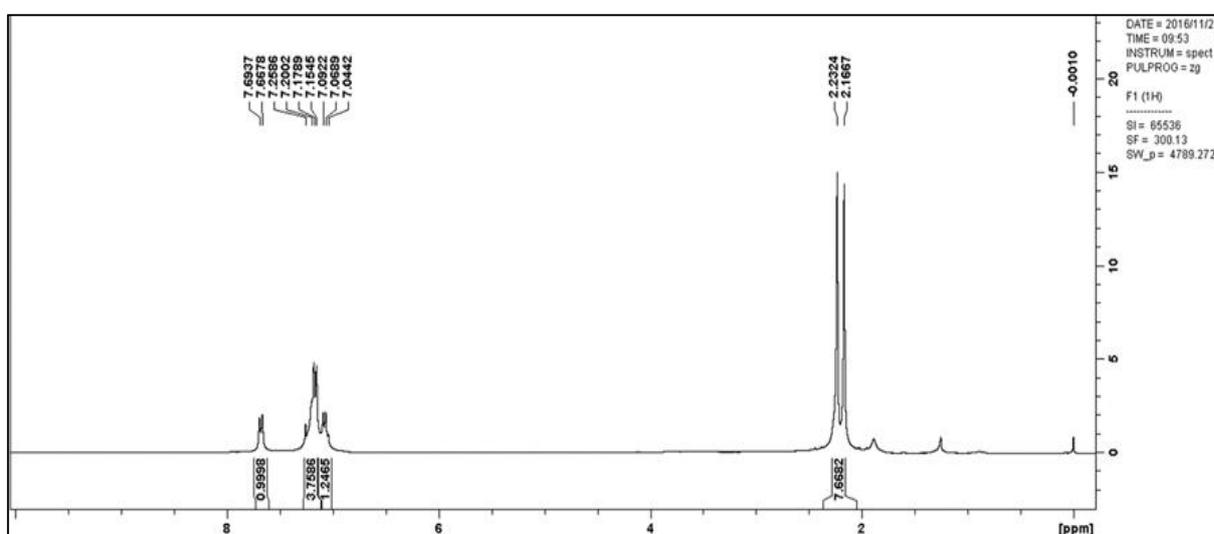
**Figura 11** - Estrutura da *N*-(2-metilfenil)acetamida.

**Tabela 6** - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm, para a *N*-(2-metilfenil)acetamida obtidas dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , em  $\text{CDCl}_3$

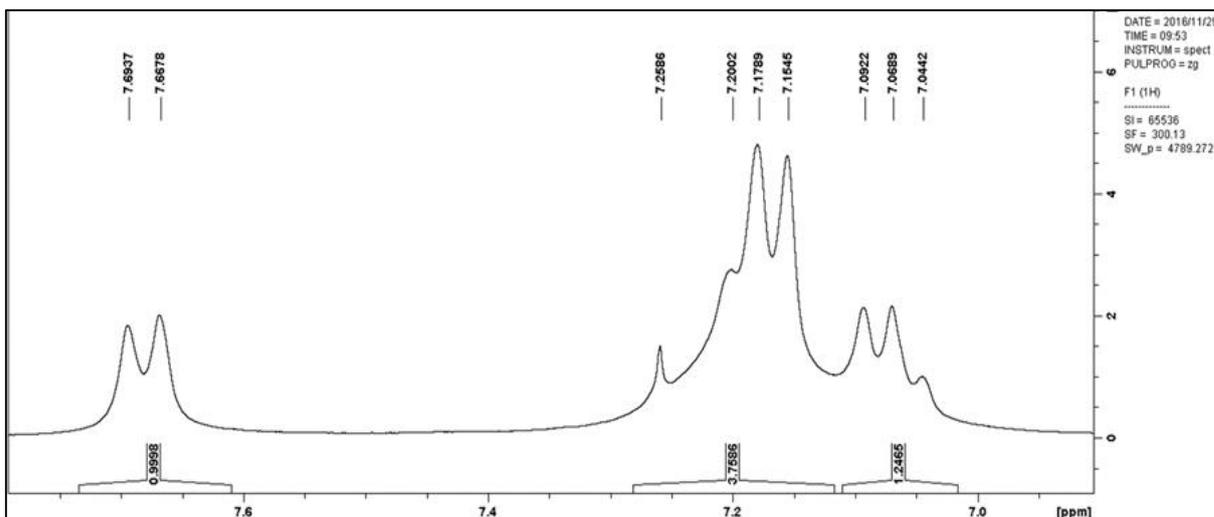
Posição	RMN $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), multiplicidade, <i>J</i>	RMN $^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)
1	-	135,5
2	7,68 d, <i>J</i> = 7,77 Hz	123,6
3	7,17 m	126,6
4	7,17 m	125,3
5	7,06 m	130,4
6	-	129,6
7	-	-
8	-	168,4
9	2,16 s	24,0
10	2,23 s	17,7

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostra o aparecimento de um simpleto (s) em 2,16 ppm correspondente a um grupo metila ( $\text{CH}_3$ )  $\alpha$ -carbonila que evidencia a acetilação da *N*-(2-metilfenil)acetamida.

Foi observado também um simpleto em 2,23 ppm correspondente a metila (H10) e um duplete em 7,68 ppm relativo ao hidrogênio aromático H2.

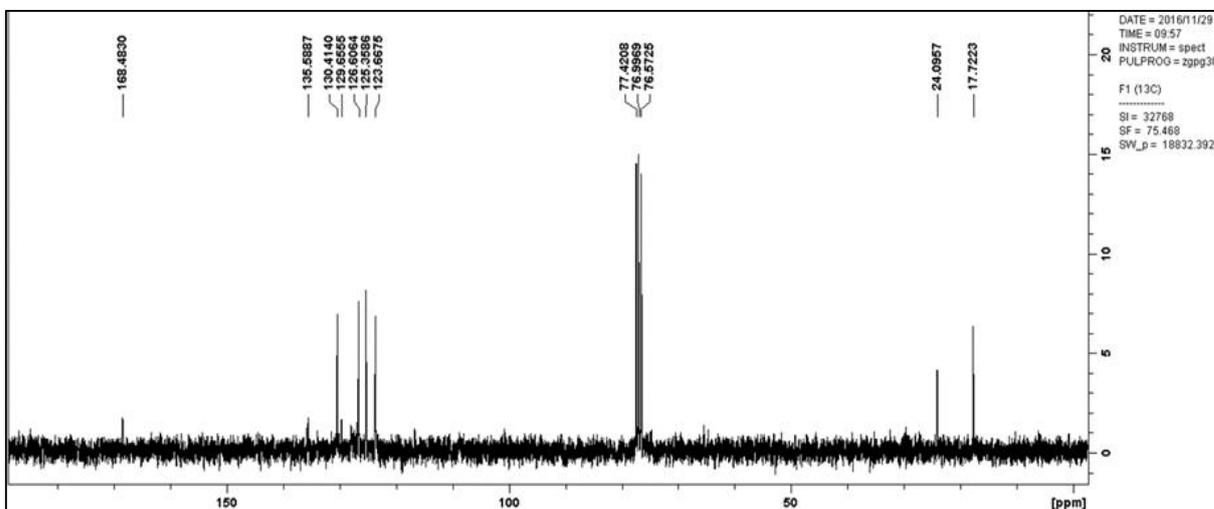


**Espectro 5** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da *N*-(2-metilfenil)acetamida ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).



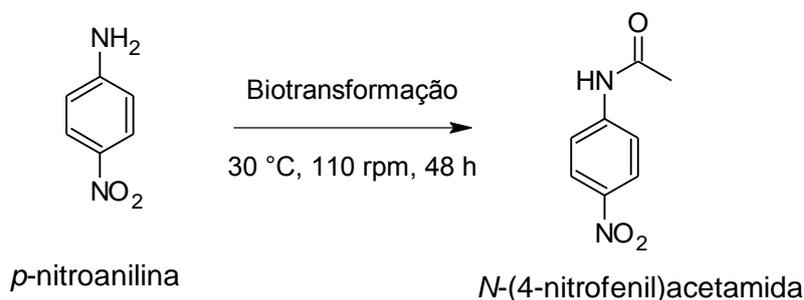
**Espectro 5-A** - Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da *N*-(2-metilfenil)acetamida ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz).

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , mostra um sinal em 24,0 ppm correspondente ao carbono C9 da metila do grupo acetila, confirmando a acetilação da *o*-toluidina. Além disso, foi observada a presença de um sinal em 168,4 ppm correspondente a carbonila (CO) e um sinal em 17,7 ppm proveniente ao carbono C10 da metila.



**Espectro 6** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da *N*-(2-metilfenil)acetamida ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).

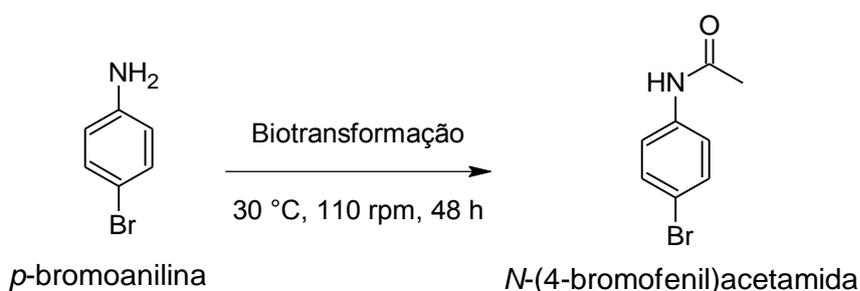
### 3.3.4 Biotransformação da *p*-nitroanilina



**Esquema 7** - Acetilação da *p*-nitroanilina pelos fungos selecionados.

Através do monitoramento da biotransformação da *p*-nitroanilina por CCD não foi possível observar a formação do produto *N*-acetilado. Três fatores podem estar influenciando na não-acetilação. Primeiro, há um grupo retirador de elétrons ( $\text{NO}_2$ ), onde estaria deixando o N do grupo amina menos nucleofílico através do processo de ressonância, deixando seu par de elétrons menos disponível para a reagir com a carbonila (CLAYDEN, GREEVES e WARREN, 2012). Segundo, a *p*-nitroanilina foi solúvel em acetona e não em etanol, como no caso das outras AA, e Brooke (2002) sugere que a lipofilicidade do substrato possa ser um fator que contribui para a taxa de acetilação. E o terceiro fator é que os fungos testados podem não estar tolerando a *p*-nitroanilina e sua toxicidade impeça que ocorra a acetilação como relatado por Martins et al. (2009), Dupret et al., (2011) e Cocaign et al. (2013).

### 3.3.5 Biotransformação da *p*-bromoanilina



**Esquema 8** - Acetilação da *p*-bromoanilina pelos fungos selecionados.

Através do monitoramento da biotransformação da *p*-bromoanilina por CCD não foi possível observar a formação do produto *N*-acetilado. No caso da *p*-

bromoanilina, também há um grupo retirador de elétrons (Br) e este pode influenciar a nucleofilicidade do grupo amina (NH<sub>2</sub>) para o ataque à carbonila (CLAYDEN, GREEVES e WARREN, 2012).

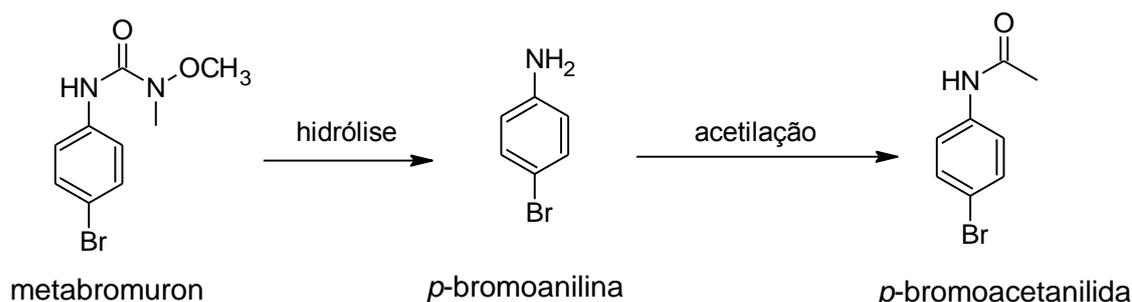
As biotransformações das AA anilina, *p*-anisidina e *o*-toluidina com as cepas dos fungos selecionados resultaram em produtos *N*-acetilados. De modo geral, os experimentos com a *p*-anisidina apresentaram os melhores rendimentos, seguido pela anilina e *o*-toluidina. A *p*-anisidina é uma AA que proporciona rendimentos altos com fungos filamentosos como descrito aqui no processo de biotransformação e também relatado por De Lima e colaboradores (2017), que obtiveram um rendimento de 76,1% em 24 h.

O fungo que apresentou os melhores resultados foi o *Cladosporium cladosporioides*, sendo observado os maiores rendimentos nos experimentos com a anilina (82%) e com a *o*-toluidina (55%), mas também não deixou de apresentar um bom resultado com a *p*-anisidina, com um rendimento de 62%, ficando atrás apenas do *A. niveus* (43), que apresentou um rendimento de 75%.

As biotransformações com as outras cepas dos fungos mostraram rendimentos variados em relação a obtenção dos produtos *N*-acetilados, onde *A. terreus* (31) apresentou resultados de 21-67%, seguido por *A. niveus* (43) 15-75% e *A. terreus* (CM6) 10-62%. Já a biotransformação com a cepa do fungo *A. niger* apresentou os menores rendimentos que variaram de 2 a 28%.

Lopo (2012) em seu trabalho também obteve amidas através da biotransformação de AA com fungo filamentoso, inclusive entre as AA utilizadas por ele estão a anilina (rendimento de 54,6%) e a *p*-toluidina (rendimento de 20,6%), sendo os produtos obtidos após 24 h de biotransformação.

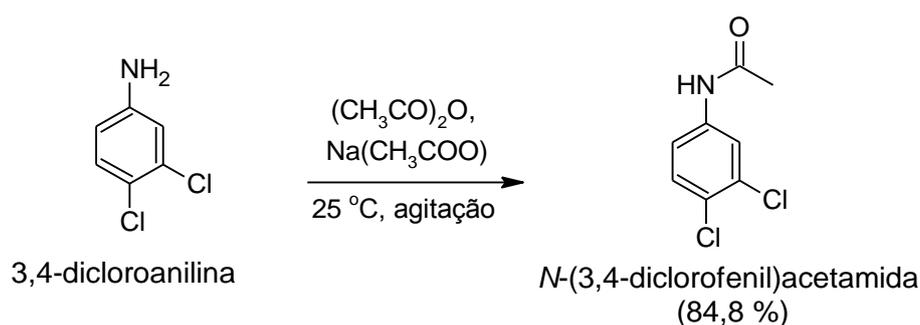
A biotransformação das AA, *p*-nitroanilina e *p*-bromoanilina, como já mencionado anteriormente, talvez não tenham ocorrido devido à influência dos grupos retiradores de elétrons (CLAYDEN, GREEVES e WARREN, 2012) ou os fungos testados não toleraram a toxicidade dessas AA como relatado em testes semelhantes por Martins et al. (2009), Dupret et al., (2011) e Cocaign et al. (2013). Tweedy, Loeppky e Ross (1970) conseguiram biotransformar 5% do herbicida metabromuron através do fungo *Talaromyces wortmanii*, sendo inicialmente convertido para *p*-bromoanilina e em seguida, para *p*-bromoacetanilida (Esquema 9).



**Esquema 9** – Biotransformação do metabromuron por fungo. (EERD et al., 2003)

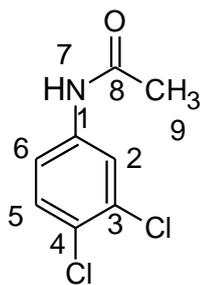
### 3.8 Acetilação da 3,4-DCA

Com a intenção de analisar melhor a concentração tolerada pelo fungo para os ensaios de biotransformação, uma vez que tentativas já tinham sido feitas, foi realizado um teste de tolerância a AA observada por outros autores como Martins et al. (2009) e Cocaign et al. (2013) com a cepa do fungo *C. cladosporioides*, *A. niveus* (43), *A. terreus* (31). Antes, porém, foi realizada uma reação de acetilação (Esquema 10) da 3,4-DCA com anidrido acético e acetato de sódio para realizar ensaios de toxicidade tanto da AA e do seu derivado *N*-acetilado, e assim determinar a maior concentração tolerada pelo fungo para a realização dos experimentos de biotransformação.



**Esquema 10** – Reação de acetilação da 3,4-dicloroanilina.

A acetilação da 3,4-DCA resultou em 84,8% da *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida. A estrutura da *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida foi confirmada através das análises espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , onde valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são mostrados na Tabela 7, segundo a numeração da Figura 12.

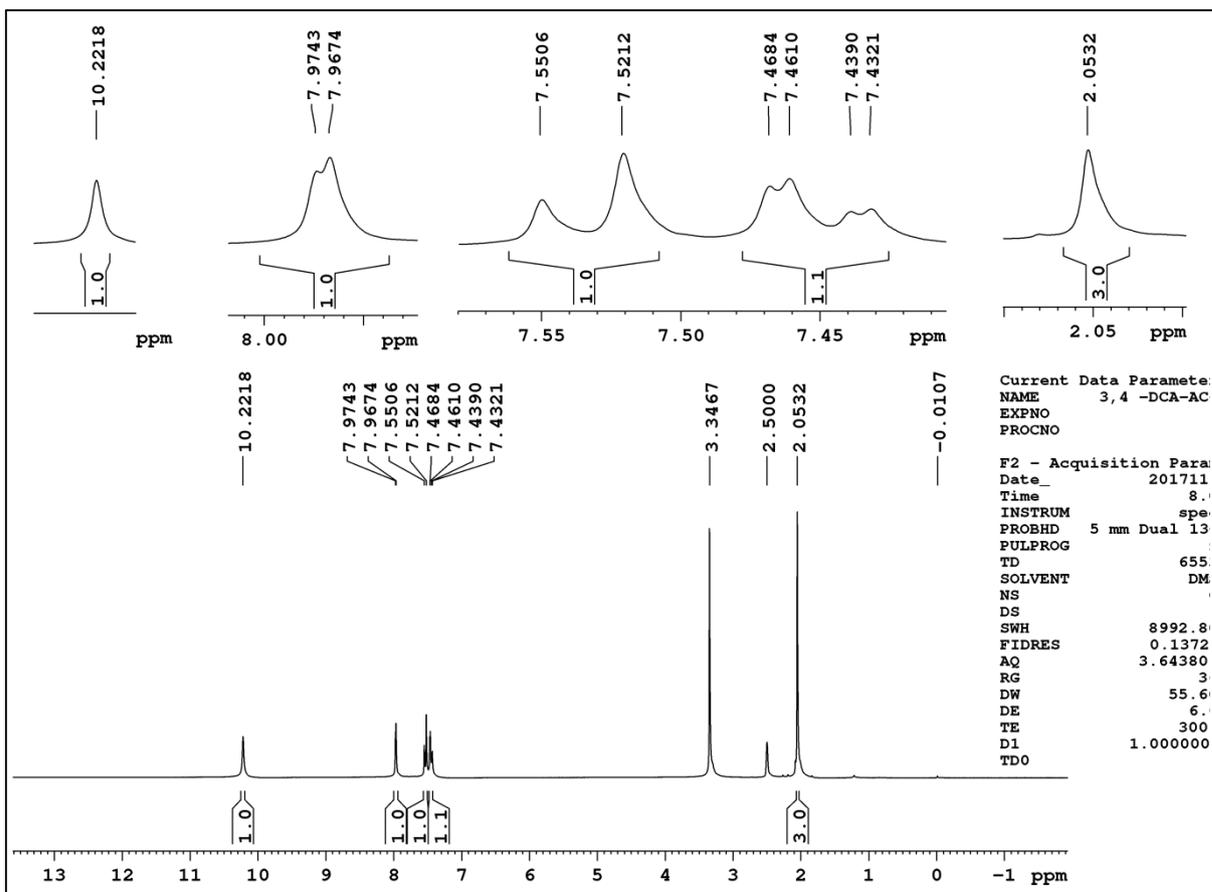


**Figura 12** – Estrutura da *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida.

**Tabela 7** - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm, para a *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida obtidas dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , em  $\text{DMSO-d}_6$  e  $\text{CDCl}_3$ , respectivamente

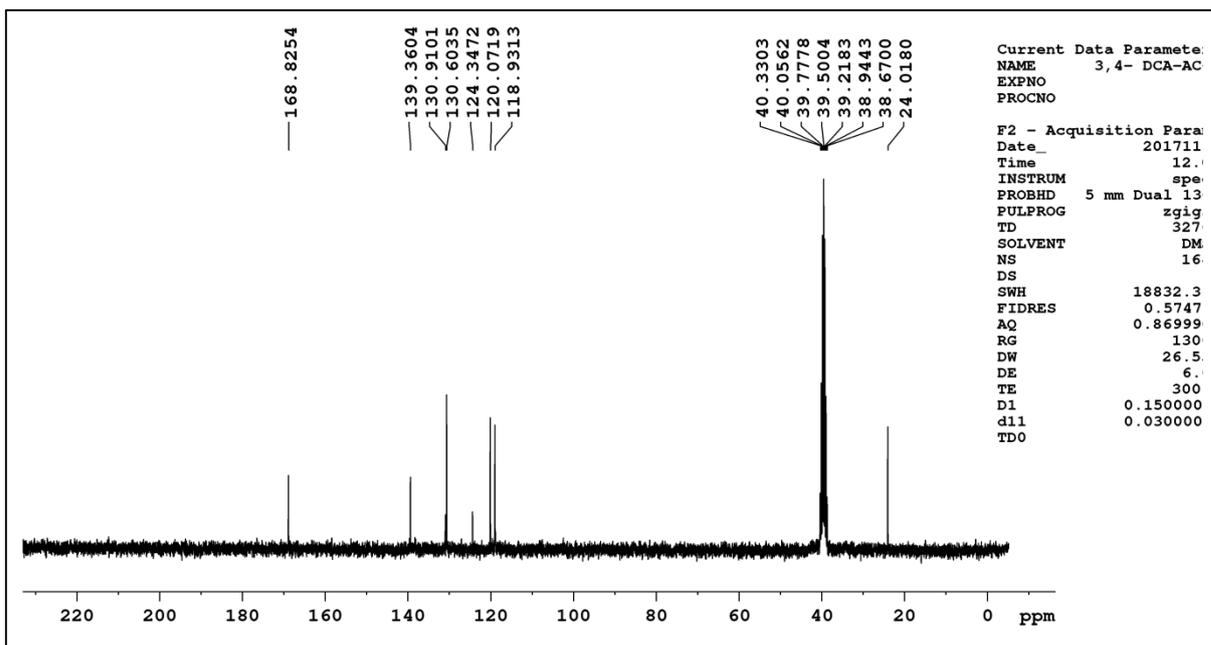
Posição	RMN $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), multiplicidade, $J$	RMN $^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)
1	-	137,3
2	7,96 d, $J = 2,1$ Hz	121,6
3	-	132,6
4	-	127,6
5	7,53 d, $J = 8,8$ Hz	130,4
6	7,45 m	119,1
7	10,22 s	-
8	-	168,8
9	2,05 s	24,4

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostra o aparecimento de um simpleto (s) em 2,05 ppm correspondente a um grupo metila ( $\text{CH}_3$ )  $\alpha$ -carbonila que evidencia a acetilação da *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida.



**Espectro 7** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida (DMSO- $d_6$ , 300 MHz) e ampliações.

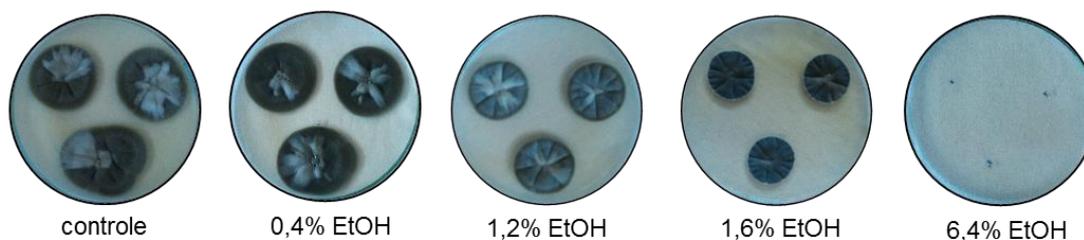
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , mostra um sinal em 24,4 ppm correspondente a um grupo metila ( $\text{CH}_3$ ), confirmando a acetilação da anilina. Além disso, foi observada também a presença de um sinal em 168,8 ppm correspondente a carbonila (CO).



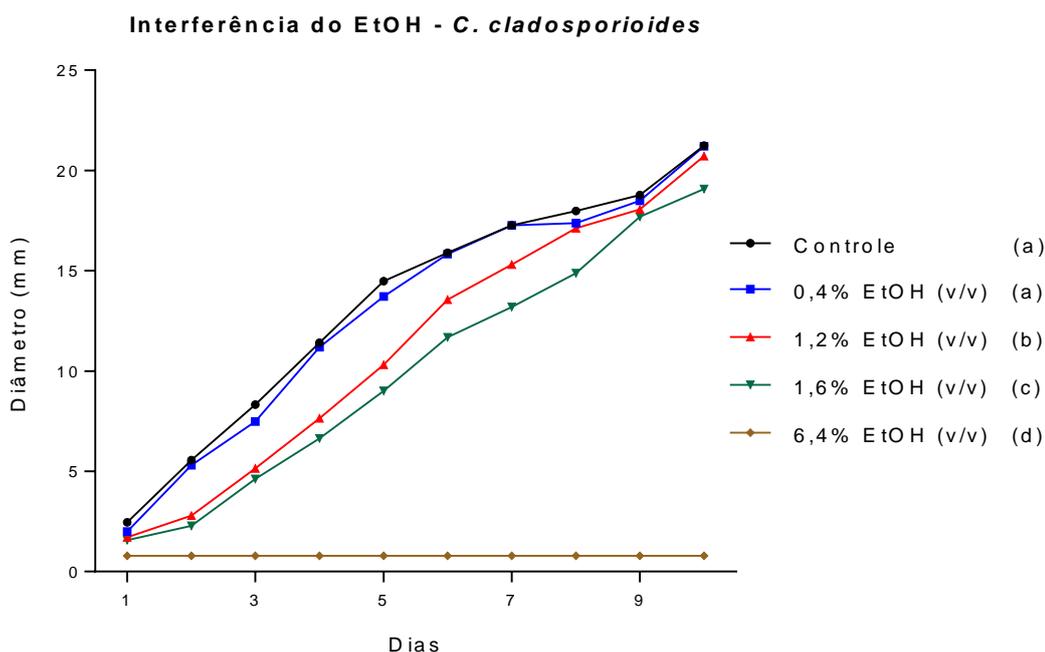
**Espectro 8** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida (DMSO- $d_6$ , 75 MHz).

### 3.9 Teste de interferência do solvente (etanol)

Para realizar o teste de toxicidade da 3,4-DCA, inicialmente, verificou-se a concentração de etanol ideal a ser utilizada na diluição desta AA para que não houvesse interferência no resultado do experimento. Foi realizado um ensaio com a cepa do fungo que se obteve os melhores resultados na acetilação das AA, ou seja, *C. cladosporioides*. Quantidades crescentes de etanol (concentrações finais de 0,4%, 1,2%, 1,6% e 6,4% (v/v)) foram adicionados em placas de petri com o meio BDA (Batata-dextrose-ágar) para verificar a interferência do etanol no crescimento do fungo.



**Figura 13** – Teste de interferência do EtOH no teste de toxicidade com *C. cladosporioides*. Teste realizado em placa de petri (9 cm de diâmetro), em meio BDA, nas concentrações finais de 0,4%, 1,2%, 1,6% e 6,4% (v/v). Foto do 10<sup>o</sup> dia.



**Figura 14** – Crescimento (em mm de diâmetro) do *C. cladosporioides*. Letras diferentes denotam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA,  $p \leq 0,05$ ).

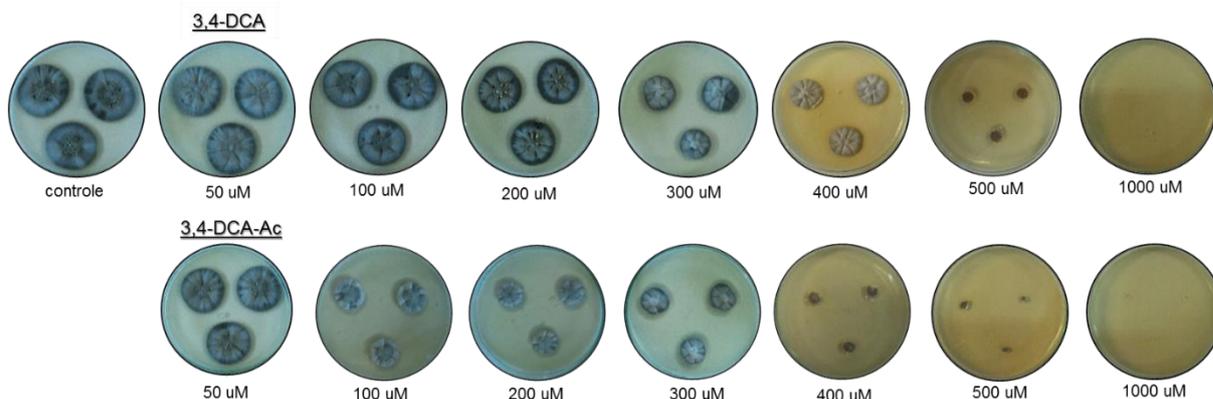
Observando as imagens das placas (Fig. 13) e a Figura 14 foi possível notar que na concentração final de 0,4% (v/v) de etanol não ocorreu a interferência do solvente no crescimento do fungo, pois nessa concentração o fungo cresceu de modo semelhante ao controle sem observar diferença estatística significativa.

### 3.10 Teste de tolerância a 3,4-DCA

Os testes de tolerância foram realizados para avaliar a melhor concentração de 3,4-DCA a ser utilizada para os experimentos de biotransformação, uma vez que esse experimento já havia sido realizado em concentrações iguais às outras AA anteriormente biotransformadas e não houve a formação do produto *N*-acetilado. O teste também serviu para comparar a toxicidade tanto da 3,4-DCA quanto do seu derivado *N*-acetilado, obtido de modo sintético (Item 3.8). Assim, as concentrações testadas foram: 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000  $\mu\text{M}$  da 3,4-DCA e da 3,4-DCA-acetilada (3,4-DCA-Ac).

### 3.10.1 *Cladosporium cladosporioides*

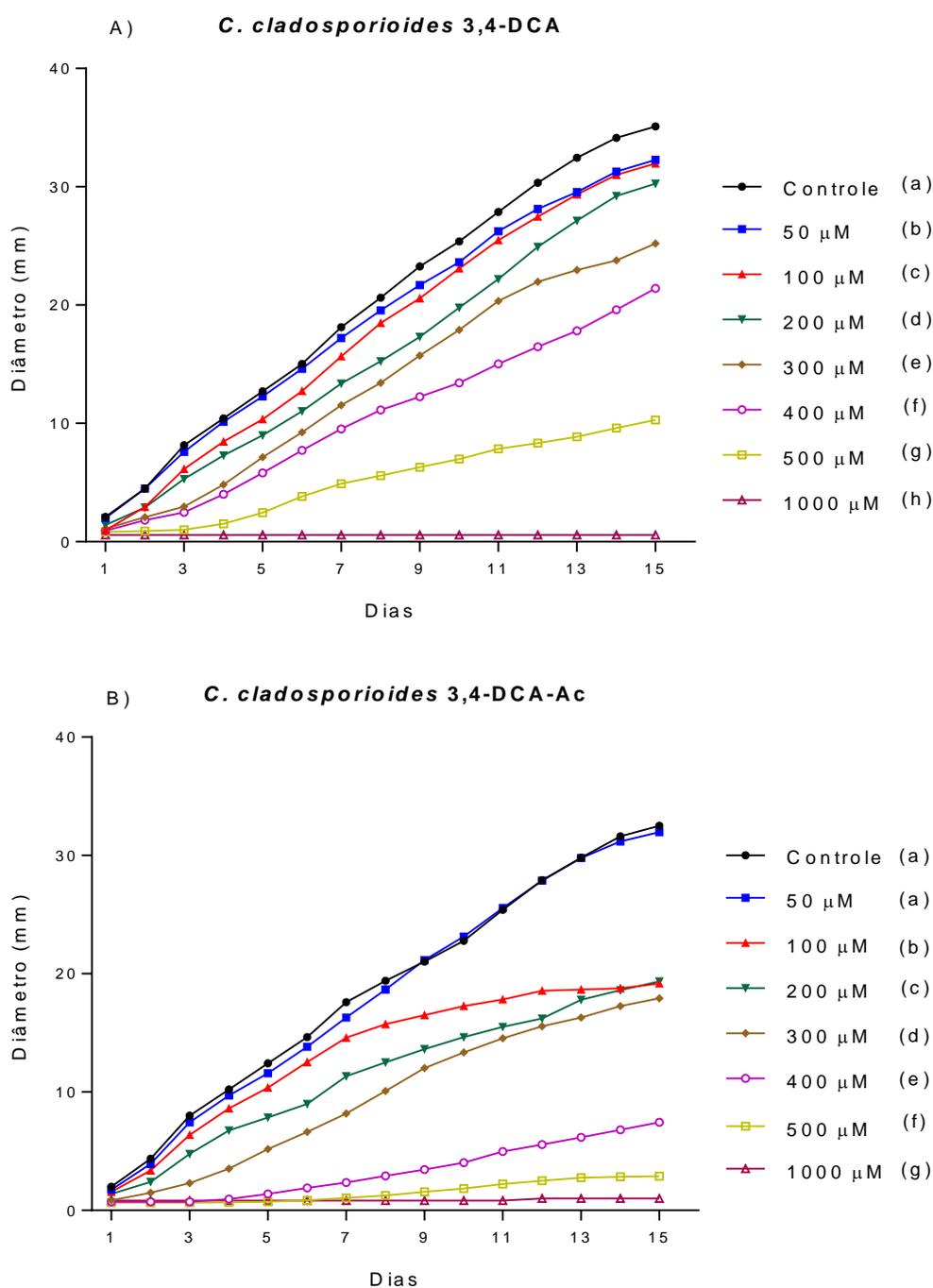
O teste de tolerância com o fungo *C. cladosporioides* foi realizado em placa de petri em meio BDA por 15 dias. Os resultados são mostrados na Figura 15.



**Figura 15** - Teste de tolerância da 3,4-DCA e da 3,4-DCA-Ac (ou 3,4-DCA-Acetilada) ao *C. cladosporioides*. Foto do 15º dia.

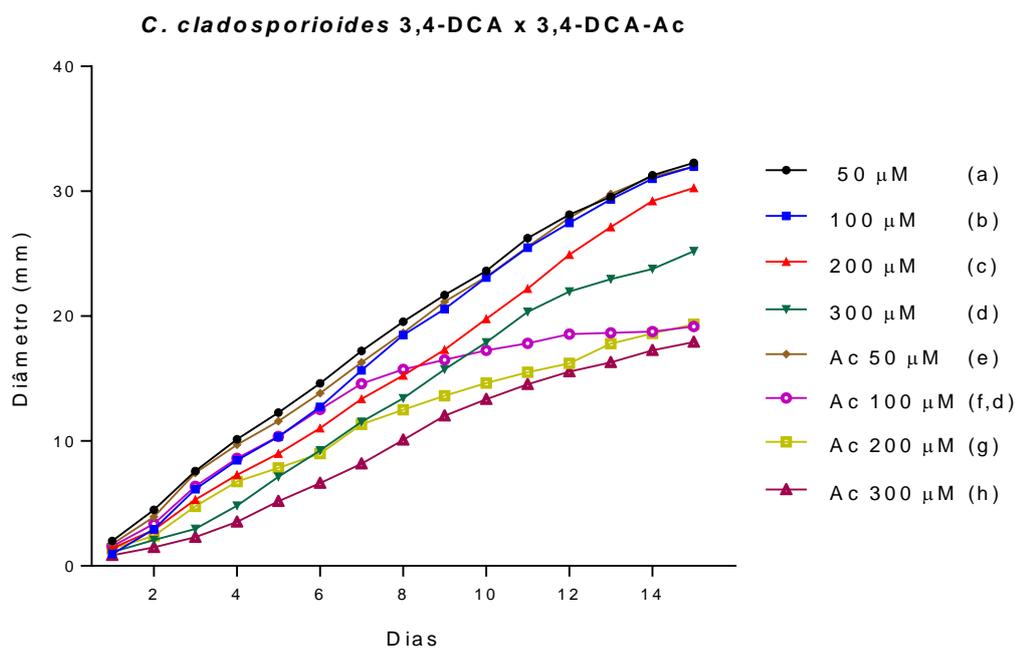
O resultado do teste de tolerância de *C. cladosporioides* à 3,4-DCA (Figura 16A) nas menores concentrações (50, 100 e 200 µM) demonstraram semelhança de crescimento, no entanto, apresentam diferenças significativas entre si. Já nas concentrações de 300, 400 e 500 µM o crescimento do fungo sofreu uma maior interferência no decorrer dos dias. E na maior concentração testada (1000 µM), não houve crescimento do fungo. Assim, para o ensaio de biotransformação da 3,4-DCA com *C. cladosporioides* selecionou-se a maior concentração testada em que houve o crescimento do fungo, ou seja, a de 500 µM, pois para esse ensaio é necessária uma maior quantidade da AA para a detecção e isolamento do produto *N*-acetilado.

Na Figura 16B, o teste de tolerância de *C. cladosporioides* à 3,4-DCA-Ac mostrou que a concentração de 50 µM não apresentou diferença significativa em relação ao controle, sendo esta a concentração de 3,4-DCA-Ac que não apresenta toxicidade para o fungo, nos testes realizados. Já nas concentrações de 100, 200 e 300 µM, apesar do fungo apresentar semelhanças de crescimento nos últimos dias, apresentaram diferenças significativas, principalmente, devido aos primeiros dias de crescimento. Nas concentrações de 400 e 500 µM, houve apenas um pequeno crescimento de modo gradual dos fungos e na concentração de 1000 µM não ocorreu o crescimento.



**Figura 16** – Crescimento do *C. cladosporioides* no controle, em 3,4-DCA 50 μM, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 μM (A) e 3,4-DCA-Ac (3,4-DCA-Acetilada) (B) nas mesmas concentrações. Letras diferentes denotam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA,  $p \leq 0,05$ ).

Foi realizada uma projeção gráfica (Figura 17) das concentrações de 3,4-DCA e 3,4-DCA-Ac mais toleradas (50, 100, 200 e 300 μM) pelo fungo *C. cladosporioides* para analisar a existência de diferenças de toxicidade da amina em relação ao produto *N*-acetilado para o fungo testado.

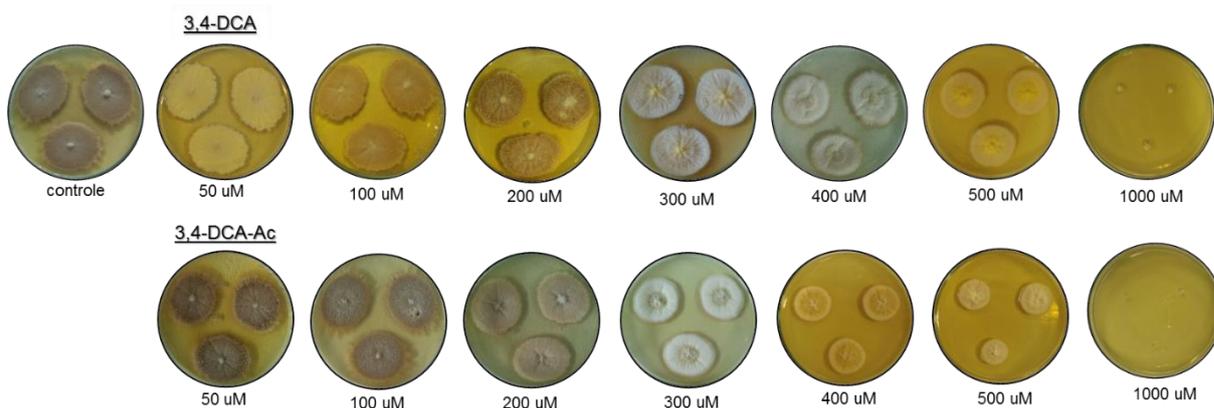


**Figura 17** – Comparação do crescimento do *C. cladosporioides* nas concentrações de 50, 100, 200 e 300 µM de 3,4-DCA e 3,4-DCA-Ac (3,4-DCA-Acetilado). Letras diferentes denotam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA,  $p \leq 0,05$ ).

Analisando a Figura 17 pode-se concluir que, apesar do crescimento de *C. cladosporioides* em 50 e 100 µM de 3,4-DCA e 50 µM de 3,4-DCA-Ac serem muito semelhantes, estatisticamente são diferentes. Contudo, o crescimento do fungo nas concentrações de 300 µM de 3,4-DCA e 100 µM de 3,4-DCA-Ac, apresentaram semelhanças na análise estatística. O crescimento do fungo nas outras concentrações (3,4-DCA 300 µM e 3,4-DCA-Ac 200 e 300 µM) resultaram em resultados de crescimentos diferentes entre si. De uma forma geral, esta comparação evidenciou que o produto *N*-acetilado se mostrou mais tóxico do que a AA.

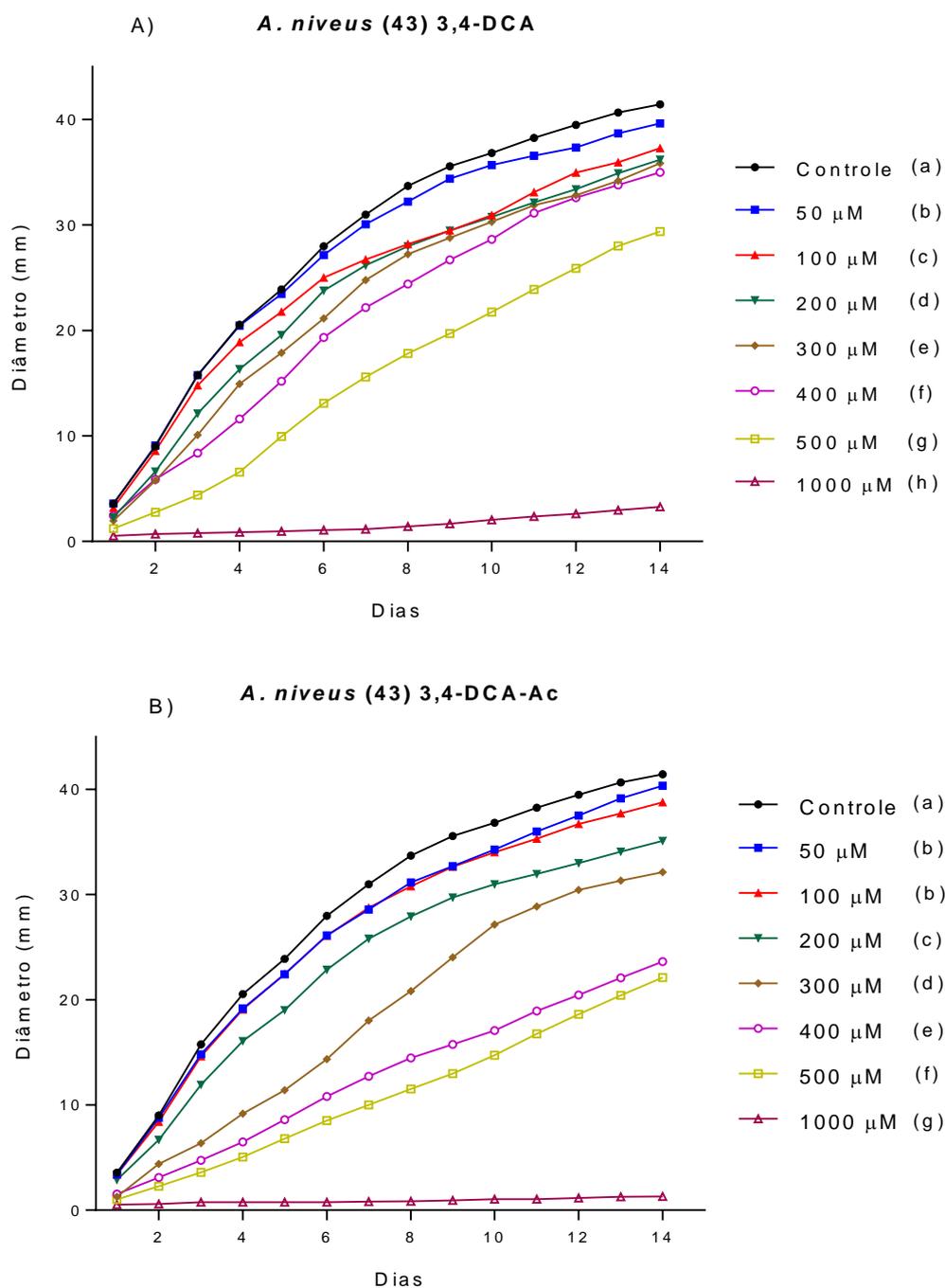
### 3.10.2 *Aspergillus niveus* 43

O teste de tolerância com o fungo *A. niveus* 43 foi realizado em placa de petri em meio BDA por 14 dias. A Figura 18 mostra os resultados obtidos.



**Figura 18** - Teste de tolerância de *A. niveus* 43 à 3,4-DCA e à 3,4-DCA-Ac (3,4-DCA-Acetilado). Foto do 14<sup>o</sup> dia.

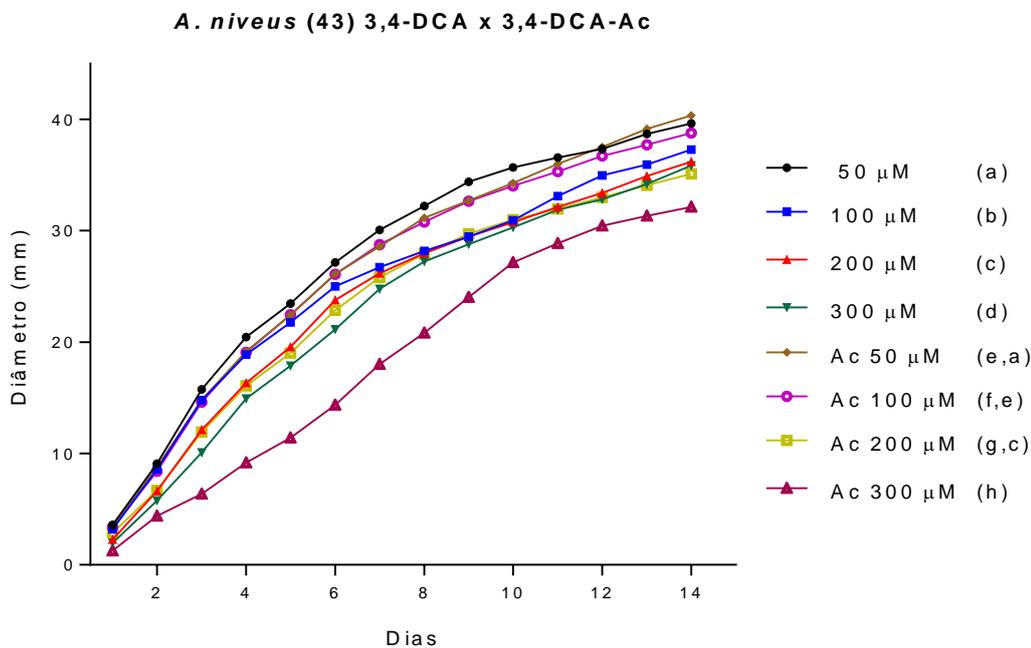
As Figuras 19A e 19B mostram o crescimento do fungo *A. niveus* (43) durante 14 dias na presença de 3,4-DCA e 3,4-DCA-Ac, respectivamente. A análise estatística realizada com os dados obtidos mostrou que o crescimento do fungo foi diferente em todas as concentrações testadas. No entanto, podemos observar que a maior concentração tolerada de 3,4-DCA pelo fungo foi a de 500  $\mu\text{M}$  (Figura 19A) e a mesma para 3,4-DCA-Ac (Figura 19B) e a que apresentou a maior toxicidade para o fungo foi a de 1000  $\mu\text{M}$  para ambos os substratos. A concentração de 500  $\mu\text{M}$  de 3,4-DCA foi escolhida para os ensaios de biotransformação com o fungo *A. niveus* (43).



**Figura 19** – Crescimento do *A. niveus* 43 no controle, em 3,4-DCA 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000 µM (A) e 3,4-DCA-Ac (B) nas mesmas concentrações. Letras diferentes denotam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA,  $p \leq 0,05$ ).

Também realizou-se a comparação das concentrações mais toleradas (50, 100, 200 e 300 µM) pelo fungo *A. niveus* (43) na presença de 3,4-DCA e 3,4-DCA-Ac (Figura 20). Algumas concentrações entre os substratos não apresentaram diferenças significativas, como nas concentrações de 50 e 200 µM de 3,4-DCA e 3,4-DCA-Ac. E ainda, o crescimento do fungo na concentração de 100 µM de 3,4-DCA-Ac foi

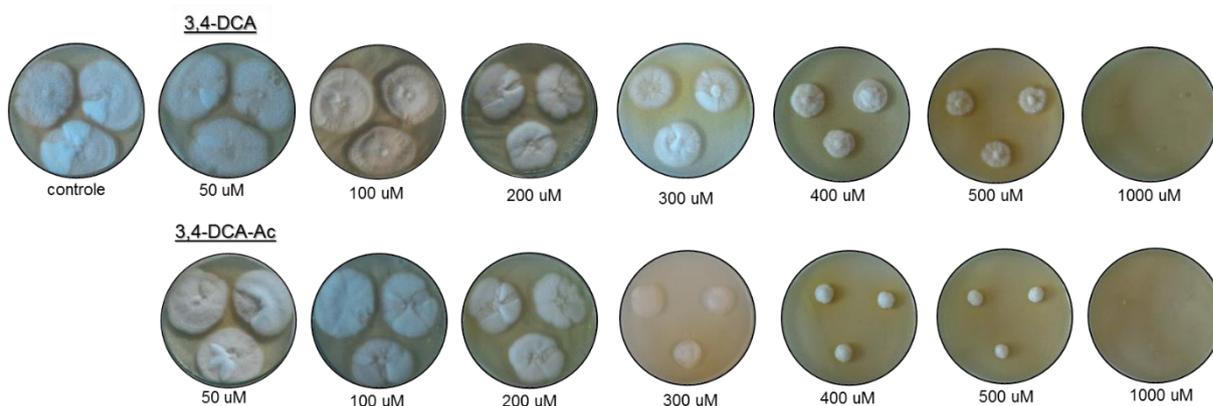
semelhante à de 50  $\mu\text{M}$  do mesmo substrato. Contudo, foi possível observar que o produto acetilado foi mais tóxico na concentração de 300  $\mu\text{M}$  em relação a AA.



**Figura 20** - Comparação do crescimento do *A. niveus* (43) nas concentrações de 50, 100, 200 e 300  $\mu\text{M}$  de 3,4-DCA e 3,4-DCA-Ac (3,4-DCA-Acetilado). Letras diferentes denotam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA,  $p \leq 0,05$ ).

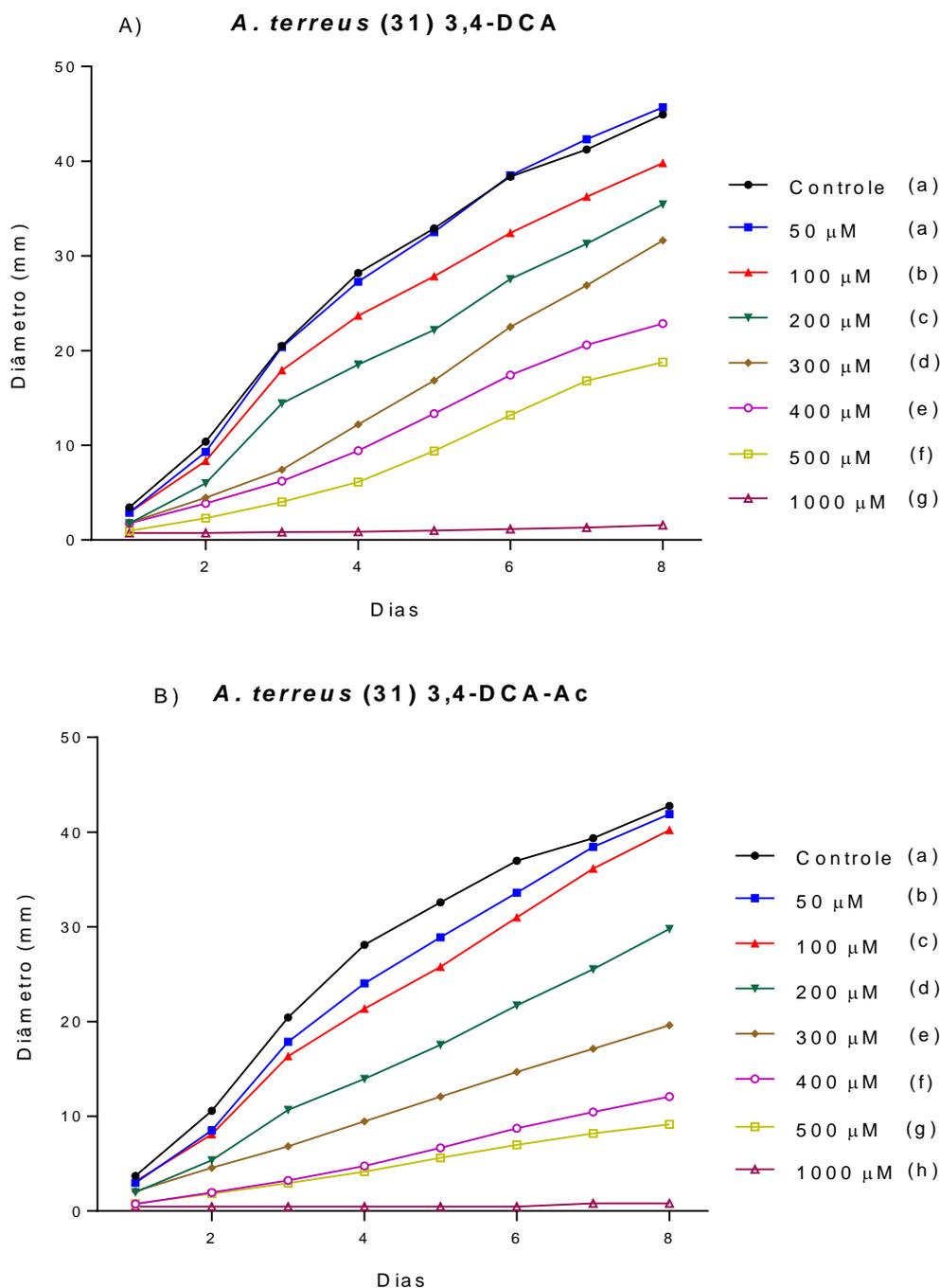
### 3.10.3 *Aspergillus terreus* (31)

O teste de tolerância com o fungo *A. terreus* (31) foi realizado em placa de petri em meio BDA por apenas 8 dias, pois este fungo possui uma alta taxa de crescimento. A Figura 21 mostra os resultados obtidos.



**Figura 21** - Teste de tolerância da 3,4-DCA e da 3,4-DCA-Ac ao *A. terreus* (31). Foto do 8º dia.

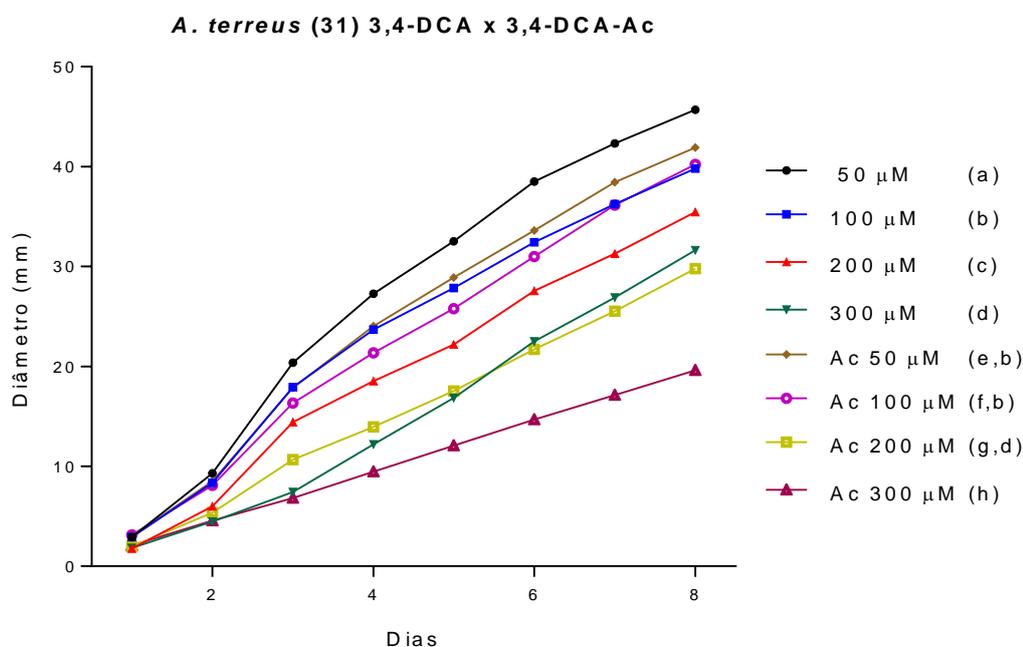
As Figuras 22A e 22B mostram o crescimento do fungo *A. terreus* (31) durante 8 dias na presença de 3,4-DCA e 3,4-DCA-Ac, respectivamente. A análise estatística realizada com os dados obtidos mostrou que o crescimento do fungo foi semelhante apenas na concentração de 50  $\mu\text{M}$  de 3,4-DCA em relação ao controle (Figura 22A). Já no ensaio com 3,4-DCA-Ac, todas as concentrações testadas apresentaram diferenças significativas. A maior concentração tolerada pelo fungo foi semelhante para ambos os substratos, ou seja, a de 500  $\mu\text{M}$ , sendo a concentração utilizada para os experimentos de biotransformação da 3,4-DCA pelo fungo *A. terreus* (31). A concentração de 1000  $\mu\text{M}$  foi a que apresentou a maior toxicidade para o fungo para ambos os substratos.



**Figura 22** – Crescimento do *A. terreus* (31) no controle, em 3,4-DCA 50, 100, 200, 300, 400, 500, 1000 µM (A) e 3,4-DCA-Ac (3,4-DCA-Acetilado) (B) nas mesmas concentrações. Letras diferentes denotam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA,  $p \leq 0,05$ ).

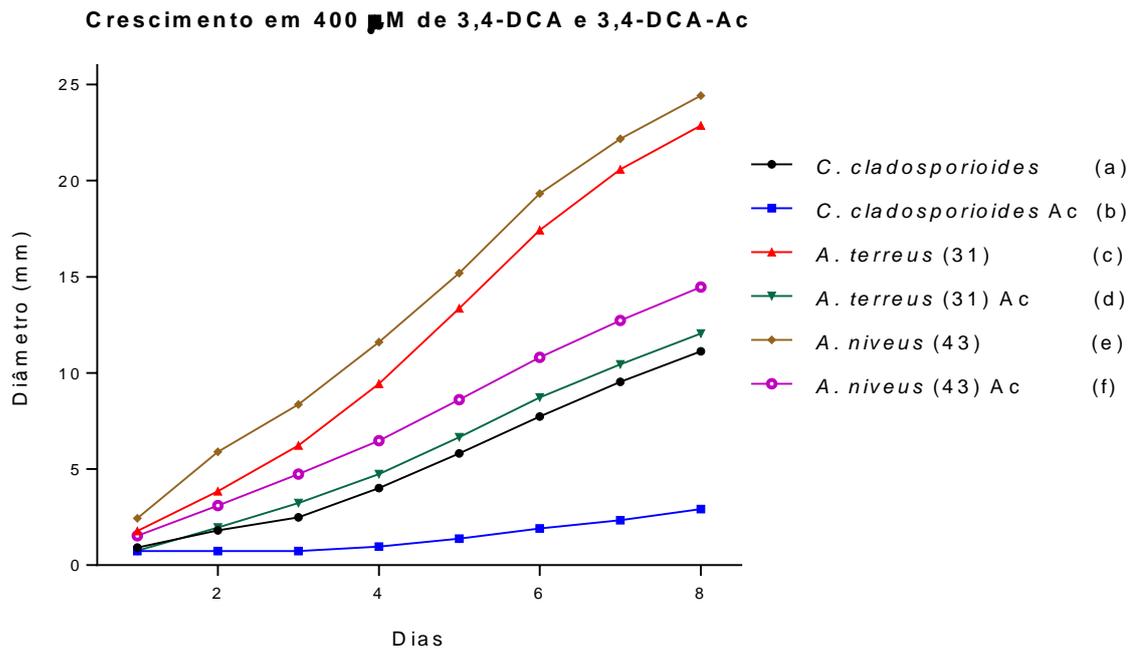
A Figura 23 mostra a comparação entre as concentrações mais toleradas (50, 100, 200 e 300 µM) de 3,4-DCA e 4,3-DCA-Ac pelo fungo *A. terreus* (31). Onde na concentração de 100 µM de 3,4-DCA o fungo apresentou crescimento semelhante as concentrações de 50 e 100 µM de 3,4-DCA-Ac. Ainda, a concentração de 300 µM de 3,4-DCA apresentou resultado semelhante a concentração de 200 µM de 3,4-DCA-

Ac. No entanto, foi possível observar que a concentração de 300  $\mu\text{M}$  de 3,4-DCA-Ac causou uma maior interferência no crescimento do que 3,4-DCA na mesma concentração.

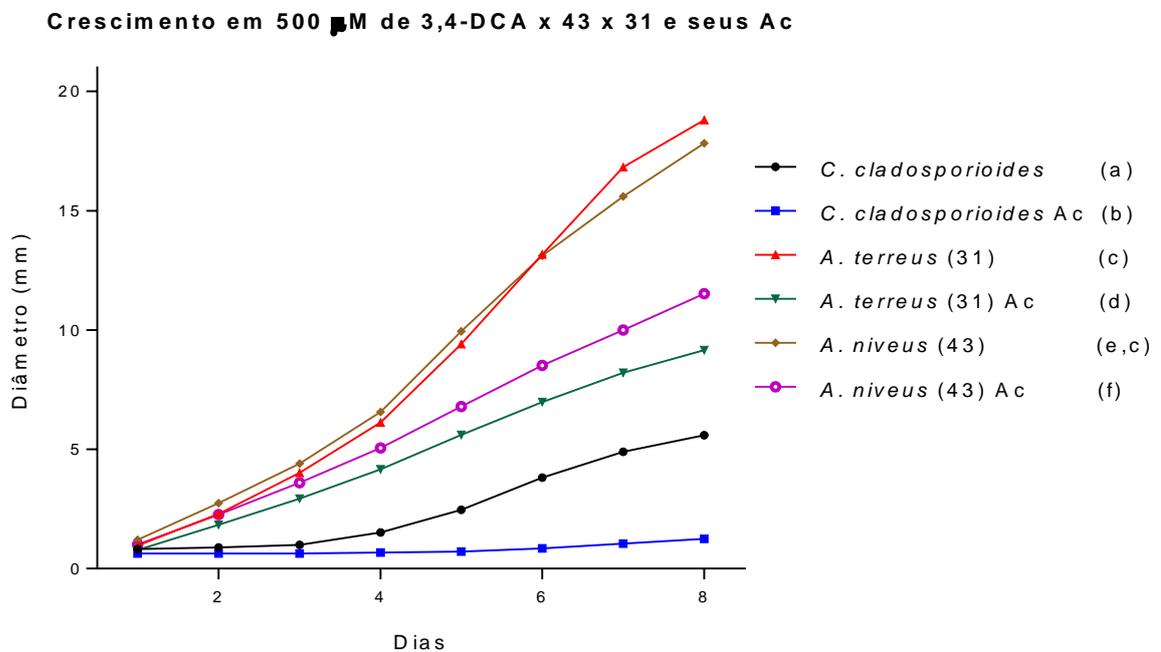


**Figura 23** - Comparação do crescimento do *A. terreus* 31 nas concentrações de 50, 100, 200 e 300  $\mu\text{M}$  de 3,4-DCA e 3,4-DCA-Ac. Letras diferentes denotam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA,  $p \leq 0,05$ ).

Foi realizado também a comparação entre o crescimento dos fungos *C. cladosporioides*, *A. terreus* (31) e *A. niveus* (43) na presença de 3,4-DCA e 3,4-DCA-Ac nas concentrações de 400  $\mu\text{M}$  (Figura 24) e 500  $\mu\text{M}$  (Figura 25). Onde foi possível notar que o crescimento desses fungos em 3,4-DCA e 3,4-DCA-Ac na concentração de 400  $\mu\text{M}$  apresentaram perfis de crescimento diferentes entre os substratos e também entre as espécies testadas (Figura 24). E somente na concentração de 500  $\mu\text{M}$  (Figura 25) houve uma semelhança no crescimento de *A. terreus* (31) e *A. niveus* (43) na presença de 3,4-DCA. Em ambas as figuras foi possível notar que os fungos *A. niveus* (43) e *A. terreus* (31) foram os que mais cresceram na presença de 3,4-DCA e também de 3,4-DCA-Ac nas concentrações de 400 e 500  $\mu\text{M}$ . Já o fungo *C. cladosporioides* apresentou o menor crescimento dentre os fungos analisados tanto na presença de 3,4-DCA e 3,4-DCA-Ac, no entanto, com uma menor tolerância ao derivado acetilado do que a AA.



**Figura 24** – Comparação do crescimento dos fungos *C. cladosporioides*, *A. niveus* (43), *A. terreus* (31) na presença de 3,4-DCA e 3,4-DCA-Ac (3,4-DCA-Acetilado) na concentração de 400  $\mu$ M. Comparação até o 8<sup>o</sup> dia de crescimento. Letras diferentes denotam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA,  $p \leq 0,05$ ).



**Figura 25** - Comparação do crescimento dos fungos *C. cladosporioides*, *A. niveus* (43), *A. terreus* (31) na presença de 3,4-DCA e 3,4-DCA-Ac (3,4-DCA-Acetilado) na concentração de 500  $\mu$ M. Comparação até o 8<sup>o</sup> dia de crescimento. Letras diferentes denotam uma diferença significativa entre os tratamentos (ANOVA,  $p \leq 0,05$ ).

Como discutido anteriormente, a concentração de 500  $\mu\text{M}$  foi a escolhida para a biotransformação da 3,4-DCA com os fungos *C. cladosporioides*, *A. niveus* (43) e *A. terreus* (31). Porém, uma outra observação interessante é que o crescimento, de modo geral, dos fungos testados em 3,4-DCA se apresenta maior do que em 3,4-DCA-Ac, o que leva a acreditar que a AA acetilada apresenta uma maior toxicidade para os fungos, sendo menos tolerada por eles. Dupret et al. (2011) realizou teste de tolerância dos fungos: *Fusarium graminearum*, *Chaetomium globosum*, *Podospora anserina*, *Rhizopus oryzae* e *Phycomyces blakesleeianus* a 250  $\mu\text{M}$  de 3,4-DCA e 3,4-DCA-Ac e obteve crescimento maior no composto acetilado. Cocaign (2013) testou a tolerância dos fungos: *P. anserina*, *Trichoderma reesei* e *Trichoderma virens* a 200  $\mu\text{M}$  de 3,4-DCA e seu acetilado chegando ao mesmo resultado. Assim, talvez seja possível afirmar que as enzimas ou o metabolismo dos fungos que foram testados neste trabalho ocorram de modo diferente dos citados na literatura acima, que descreve a *N*-acetiltransferase como a responsável pelo processo.

Para os seres humanos as AA são consideradas mais tóxicas do que seus produtos *N*-acetilados, pois apresentam atividade mutagênica (IARC, 2009 apud ENGLISH et al., 2012).

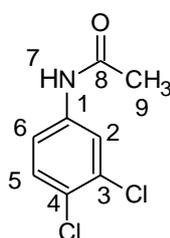
AA são relatadas na literatura como potenciais indutores da formação de metemoglobinemia em animais e humanos, podendo causar anemia ou, nos casos mais graves, levar à morte (OHTA et al., 1983 apud ARORA, 2015). Também há muitos trabalhos que relatam que a exposição a AA é um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de bexiga (RADOMSKI, 1979; KING et al., 1997, KIM e GUENGERICH, 2005; YOON et al., 2015). Contudo, as AA podem ser desintoxicadas através da *N*-acetilação (POUPKO; HEARN; RADOMSKI, 1979; ORZECOWSKI, 1994; CHOU, LANG, KADLUBAR, 1995 apud YOON et al. 2015). English et al. (2012) descreve em seu trabalho vários estudos de casos humanos e estudos epidemiológicos que sugeriram que a exposição ocupacional a AA está associada a um risco maior de câncer de bexiga.

Uma observação interessante de Lakshmi et al. (1995) apud IARC (2010), é que os cães desenvolvem mais prontamente tumores de bexiga com benzidina do que várias outras espécies pois os cães são “não-acetiladores”, então não conseguem atingir uma das etapas metabólicas de inativação da genotoxicidade.



Cepas dos fungos	<i>N</i> -(2-metilfenil)acetamida (%)
<i>Aspergillus terreus</i> (31)	43,5
<i>Aspergillus niveus</i> (43)	29,4
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	26

A estrutura da *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida foi confirmada pelas análises espectroscópicas de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , onde valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) são mostrados na Tabela 9, seguindo a numeração da Figura 26.

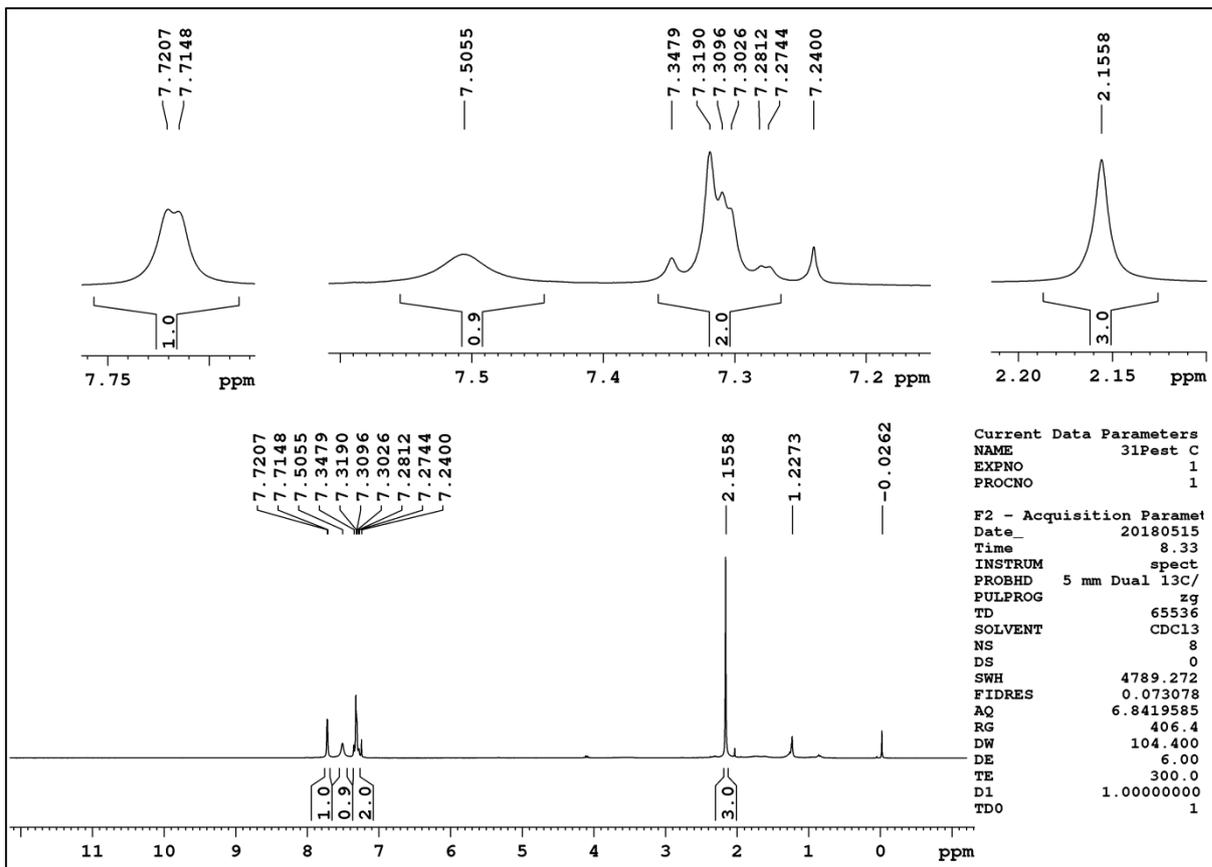


**Figura 26** - Estrutura da *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida.

**Tabela 9** - Valores de deslocamentos químicos ( $\delta$ ) expressos em ppm, para a *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida obtidas dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ , em  $\text{CDCl}_3$ .

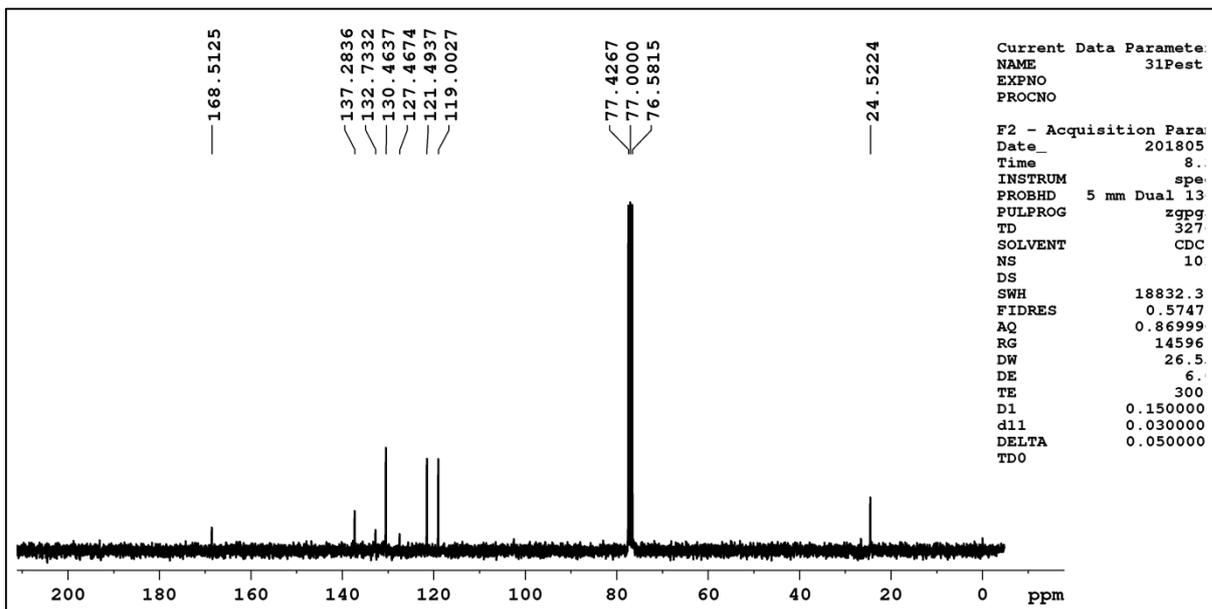
Posição	RMN $^1\text{H}$ $\delta$ (ppm), multiplicidade, <i>J</i>	RMN $^{13}\text{C}$ $\delta$ (ppm)
1	-	137,2
2	7,71 d, <i>J</i> = 1,8 Hz	121,4
3	-	132,7
4	-	127,4
5	7,33 d, <i>J</i> = 8,7 Hz	130,4
6	7,30 m	119,0
7	7,50 sl	-
8	-	168,5
9	2,15 s	24,5

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostra o aparecimento de um simpleto em 2,15 ppm correspondente a um grupo metila ( $\text{CH}_3$ )  $\alpha$ -carbonila que evidencia a acetilação da *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida.



**Espectro 9** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida ( $\text{CDCl}_3$ , 300 MHz) e ampliações.

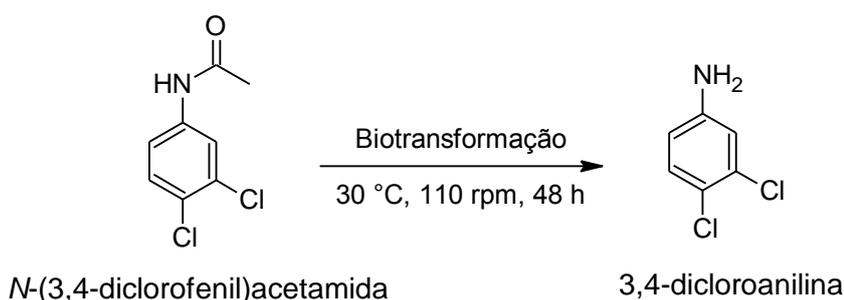
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , mostra um sinal em 24,5 ppm correspondente a um grupo metila ( $\text{CH}_3$ ) e outro em 168,1 ppm correspondente a carbonila ( $\text{CO}$ ), confirmando a acetilação da 3,4-dicloroanilina.



**Espectro 10** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da *N*-(2-metilfenil)acetamida ( $\text{CDCl}_3$ , 75 MHz).

### 3.12 Ensaio de biotransformação da *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida

O ensaio de biotransformação da 3,4-DCA-Ac foi realizado na mesma concentração feita no ensaio para 3,4-DCA, ou seja, 500  $\mu$ M. Os fungos utilizados foram: *C. cladosporioides*, *A. niveus* (43), *A. terreus* (31).



**Esquema 12** – Desacetilação da *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida por *A. niveus* (43).

Os três fungos foram testados, porém, através de monitoramento por CCD, não foi observada nenhuma biotransformação com *C. cladosporioides*. Já com *A. terreus* (31) a reversão ocorreu somente no 5<sup>o</sup> dia e com *A. niveus* (43) observou-se a formação do produto a partir do 4<sup>o</sup> dia. Logo, repetiu-se o experimento com uma maior quantidade de 3,4-DCA-Ac com *A. niveus* (43), onde o rendimento da biotransformação foi de 18,9% (96 h). Esse resultado mostrou que, apesar de ocorrer a desacetilação, a taxa de reconversão ainda é menor, quando comparada a acetilação da 3,4-DCA (Tabela 8), que mostrou um rendimento de 29,4% em 48 h. Isso é importante, pois mostra uma tendência de equilíbrio da biotransformação deslocado para o composto *N*-acetilado, considerado um derivado de menor toxicidade para os humanos (TIXIER, 2002).

A biotransformação da *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida em 3,4-DCA demonstra a reversão da reação, através de enzimas do fungo. Tixier e colaboradores (2002) observaram que *Beauveria bassiana* também foi capaz de realizar essa reversão. Quanto ao nível de toxicidade com relação ao herbicida, amina e amida, Tixier e colaboradores (2002) verificaram que a amina 3,4-DCA é a mais tóxica com EC<sub>50</sub> de 3  $\mu$ M, seguida da amida 3,4-DCA-Ac com EC<sub>50</sub> de 60  $\mu$ M e bem menos tóxico, do que

o próprio herbicida diuron com  $EC_{50}$  de 290  $\mu\text{M}$ , sendo o teste foi realizado com a bactéria marinha *Vibrio fischeri*.

## 4 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1 Material e métodos

As análises cromatográficas em camada delgada (CCD) foram realizadas utilizando-se cromatofolhas de alumínio de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (Macherey-Nagel), para a visualização dos componentes nas análises em CCD utilizando lâmpada ultravioleta (254 nm). As purificações dos produtos foram realizadas por cromatografia em placa preparativa de sílica gel 60 F<sub>254</sub> (0,063-0,2 mm). Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C foram obtidos em 300 MHz e 75 MHz, respectivamente, usando um aparelho Bruker® AVANCE DPX-300 do Laboratório de Pesquisa de Ressonância Magnética Nuclear do Instituto de Química – UFMS. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram registrados em ppm e as constantes de acoplamento em Hertz (Hz). O tetrametilsilano (TMS) foi usado como padrão de referência interno para deslocamento químico ( $\delta$ ) em solução de CDCl<sub>3</sub> e de DMSO-d<sub>6</sub>. As análises de absorvâncias foram realizadas no Espectrofotômetro Ultravioleta (Thermo Scientific® - Modelo: Genesys 10S UV-Vis) em 450 nm. Os solventes utilizados nos processos de extração e síntese foram de grau PA e quando necessário foram tratados conforme metodologia descrita por Perrin e Armarego, (1988).

### 4.2 Microrganismos

A Tabela 10 contém as informações sobre as 12 cepas de fungos isolados do cerrado Sul-Mato-Grossense, como o nome científico, o habitat, o local de coleta e dados do GPS.

Todos os fungos são saprofíticos, com exceção do *Aspergillus niveus* (43), *Aspergillus niveus* (31) e *Chaetomium sp.*, que são endofíticos, provenientes da planta *Memora peregrina*.

**Tabela 10** – Origem das cepas dos fungos isolados do Cerrado sul-mato-grossense

<b>Fungo</b>	<b>Habitat</b>	<b>Local de coleta</b>	<b>Dados GPS</b>
<i>Aspergillus flavus</i>	Saprofítico	Reserva Particular do patrimônio Natural RPPN– UFMS, Campo Grande, MS, Brasil	20°30'37"S 54°36'58"W
<i>Aspergillus flavus</i> (SM3)	Saprofítico	Centro de Pesquisa em Gado de Corte-CNPGC/EMBRAPA, Campo Grande, MS, Brasil	20°26'33"S 54°43'16"W
<i>Aspergillus flavus</i> (SM6)	Saprofítico	Centro de Pesquisa em Gado de Corte-CNPGC/EMBRAPA, Campo Grande, MS, Brasil	20°26'33"S 54°43'16"W
<i>Aspergillus niger</i>	Saprofítico	Reserva Particular do patrimônio Natural RPPN– UFMS, Campo Grande, MS, Brasil	20°30'37"S 54°36'58"W
<i>Aspergillus niveus</i> (43)	Endofítico	Centro de Pesquisa em Gado de Corte-CNPGC/EMBRAPA, Campo Grande, MS, Brasil	20°26'48.5"S 54°43'48"W
<i>Aspergillus oryzae</i>	Saprofítico	Centro de Pesquisa em Gado de Corte-CNPGC/EMBRAPA, Campo Grande, MS, Brasil	20°26'33"S 54°43'16"W
<i>Aspergillus terreus</i> (CM6)	Saprofítico	Centro de Pesquisa em Gado de Corte-CNPGC/EMBRAPA, Campo Grande, MS, Brasil	20°26'33"S 54°43'16"W
<i>Aspergillus terreus</i> (31)	Endofítico	Centro de Pesquisa em Gado de Corte-CNPGC/EMBRAPA, Campo Grande, MS, Brasil	20°26'48.5"S 54°43'48"W
<i>Cunninghamella elegans</i>	Saprofítico	Reserva Particular do patrimônio Natural RPPN– UFMS, Campo Grande, MS, Brasil	20°30'37"S 54°36'58"W
<i>Chaetomium sp.</i>	Endofítico	Centro de Pesquisa em Gado de Corte-CNPGC/EMBRAPA, Campo Grande, MS, Brasil	20°26'48.5"S 54°43'48"W
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	Saprofítico	Reserva Particular do patrimônio Natural RPPN– UFMS, Campo Grande, MS, Brasil	20°30'37"S 54°36'58"W
<i>Mucor sp.</i>	Saprofítico	Reserva Particular do patrimônio Natural RPPN– UFMS, Campo Grande, MS, Brasil	20°30'37"S 54°36'58"W

As 12 cepas de 12 fungos filamentosos (Tabela 10) estão depositados na Micoteca (InBio) da UFMS. Estas cepas de fungos foram mantidas em tubos de ensaios inclinados contendo BDA (100 g de batata; 7,5 g de glicose; 9,1 g de ágar; 500 mL de água) e foram repicados periodicamente para a manutenção das culturas. Estas cepas foram incubadas por um período de 4 a 5 dias a 30 °C e após esse período foram estocados à 4 °C até o momento do uso.

### 4.3 Obtenção da curva padrão de concentração da *p*-anisidina

Foram preparadas 2 soluções estoques de *p*-anisidina (solução 1: 0,05 mg.mL<sup>-1</sup>; solução 2: 1 µg.mL<sup>-1</sup>). Essas soluções foram diluídas para obtenção das seguintes concentrações: 0,000 µg.mL<sup>-1</sup>; 0,001 µg.mL<sup>-1</sup>; 0,010 µg.mL<sup>-1</sup>; 0,100 µg.mL<sup>-1</sup>; 1,000 µg.mL<sup>-1</sup>; e 10,000 µg.mL<sup>-1</sup>). Essas soluções foram transferidas para um tubo de ensaio, onde foi acrescentado um pouco de água (aproximadamente 5 mL), 400 µL de ácido tricloroacético (TCA) aquoso 20% e de 1.200 µL de 4-(dimetilamino)benzaldeído (DMAB) aquoso 5%. O DMAB<sub>(aq)</sub> 5% reage com a *p*-anisidina e produz um reagente de cor, uma imina, que poderá ser lida em espectrofotômetro em comprimento de onda a 450 nm. A análise foi realizada em triplicata.

### 4.4 Preparo do meio de cultura e inóculo do fungo

A metodologia utilizada para preparação dos meios foi adaptada de Silva e colaboradores (2004), utilizando o meio líquido King's B modificado, contendo K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,075 g), MgSO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O (0,075 g), peptona ou proteose peptona (0,500 g), glicose (0,609 g) e água deionizada (50 mL). A adaptação do meio foi testada em trabalho prévio, de conclusão de curso, por Ebbing (2016).

Os esporos obtidos através de culturas estoques foram raspados com palito de madeira e suspensos em 10 mL de água deionizada autoclavada (estéril). Um volume de 200 µL da suspensão de esporos foi inoculado no meio de cultura (50 mL) contido em erlenmeyer de 250 mL a 30 °C, sob agitação constante (110 rpm) por 48 h.

#### 4.5 Triagem das cepas dos fungos analisados

As 12 cepas dos fungos pré-selecionadas (Tabela 11) foram cultivadas como descrito no item 4.3. Após 48 h de incubação foi retirada uma alíquota de cada erlenmeyer para ser utilizada como branco. A seguir, foram adicionados 50 mg de *p*-anisidina (substrato), que foram dissolvidos em 200  $\mu$ L de etanol, a cada cultura em estudo. Alíquotas de 200  $\mu$ L foram retiradas de cada frasco a cada 24 h durante 5 dias.

Foi utilizada a CCD para monitoramento do experimento e os cromatogramas foram desenvolvidos em cromatofolhas de alumínio de sílica gel com indicador de fluorescência 60 F<sub>254</sub>. A placa de CCD foi eluída em uma mistura de Acetato de Etila:Hexano (1:1 v/v) e posteriormente foi revelada em lâmpada de luz ultravioleta a 254 nm.

A detecção do consumo da *p*-anisidina foi verificada utilizando amostras do meio de cultura retiradas durante 5 dias de biotransformação. As alíquotas foram diluídas em água destilada às quais foram adicionados TCA<sub>(aq)</sub> 20% para cessar a reação de biotransformação (pela desnaturação das enzimas) e 1200  $\mu$ L de DMAB<sub>(aq)</sub> a 5%, que reage com a *p*-anisidina produzindo uma imina, um reagente de cor. Leituras foram realizadas no espectrofotômetro a 450 nm (SINCLAIR et al., 1998). A mesma metodologia foi realizada para o branco e o controle. O branco continha somente o TCA<sub>(aq)</sub> 20% e o DMAB<sub>(aq)</sub> a 5%. E o controle continha o TCA<sub>(aq)</sub> 20%, o DMAB<sub>(aq)</sub> a 5% e *p*-anisidina.

#### 4.6 Ensaio de biotransformação das AA

Após a triagem, os fungos escolhidos foram inoculados como descrito no item 4.3. Em seguida, foram adicionados 0,406 mmol de cada AA (anilina, *p*-anisidina, *o*-toluidina, *p*-nitroanilina e *p*-bromoanilina) em cada cultura em estudo. Essas AA foram dissolvidas em 200  $\mu$ L de etanol, exceto *p*-nitroanilina que foi solubilizada em 200  $\mu$ L de acetona. As biotransformações foram realizadas durante 48 h e depois extraídas.

#### **4.7 Processo de extração e purificação de produtos da biotransformação das aminas aromáticas**

Após a realização do método 4.5 o meio de cultura e os micélios foram separados por filtração à vácuo. Uma extração com acetato de etila foi realizada com o filtrado. O solvente foi rotaevaporado e o produto foi purificado por cromatografia em placa preparativa de sílica gel-60. A mistura de eluentes foi hexano/acetato de etila (7:3 v/v). Posteriormente o produto obtido foi submetido à análise espectroscópica de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .

#### **4.8 Teste de interferência do solvente (etanol)**

O etanol (EtOH) é o solvente que se utilizou para diluir a 3,4-DCA no ensaio de toxicidade dessa AA aos fungos. O ensaio de interferência do EtOH foi realizado em placa de petri com 20 mL de meio BDA (batata, dextrose e ágar) e diferentes concentrações de EtOH: 0,4%, 1,2%, 1,6%, 6,4%. Em cada placa foram adicionadas 3 discos de 3 mm de meio de cultura sólido contendo esporos dos fungos. As placas foram incubadas a 27 °C e os diâmetros dos halos de crescimento dos fungos foram medidos com auxílio de um paquímetro durante 10 dias.

#### **4.9 Reação de acetilação da 3,4-dicloroanilina**

Para realizar o teste de tolerância com a *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida (3,4-DCA-Ac) a acetilação química da 3,4-DCA foi realizada. Para a reação foi utilizado 0,61 mmol (100 mg) de 3,4-DCA em 2,5 mL de anidrido acético e 0,73 mmol (100 mg) de acetato de sódio. A reação prosseguiu sob agitação a 25 °C, durante 2 h (KATHIRAVAN e NICHOLL, 2017). A mistura reacional foi transferida para um funil de separação e extraída com acetato de etila (5 mL) por 2 vezes, em seguida, a fase orgânica foi lavada com 5 mL de água destilada e depois seca com  $\text{MgSO}_4$  anidro. O solvente foi rotaevaporado e a amostra foi seca a pressão reduzida. O produto foi obtido com 84,8% de rendimento e a estrutura foi confirmada através da análise espectroscópica de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .

#### 4.10 Teste de tolerância à 3,4-DCA e à 3,4-DCA-Ac

O teste de tolerância foi realizado inicialmente com os fungos *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus niveus* (43) e *Aspergillus terreus* (31) com a 3,4-DCA e 3,4-DCA-Ac, nas concentrações de 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 1000  $\mu\text{M}$  (solubilizada em 100  $\mu\text{L}$  de EtOH 80%, concentração final de 0,4% v/v). O ensaio foi realizado em placa de petri (de 9 cm de diâmetro) em meio BDA (20 mL), e em cada placa foram adicionadas 3 discos de 3 mm de meio de cultura sólido contendo esporos dos fungos. As placas foram incubadas a 27 °C e os diâmetros dos halos de crescimento dos fungos foram medidos com auxílio de um paquímetro, durante 15 dias para *Cladosporium cladosporioides*, 14 dias para *Aspergillus niveus* (43) e 10 dias para *Aspergillus terreus* (31), de acordo com o crescimento de cada fungo.

#### 4.11 Ensaio de biotransformação da 3,4-DCA

Após o teste de tolerância, foi verificado que a concentração de 500  $\mu\text{M}$  de 3,4-DCA era ideal para a biotransformação. Os fungos escolhidos para essa biotransformação foram cultivados como descrito no item 4.3. Então, depois das 48 h de incubação foi adicionado 0,025 mmol de 3,4-DCA, solubilizada em 200  $\mu\text{L}$  de EtOH. A biotransformação prosseguiu por 48 h nas mesmas condições de temperatura e rotação orbitalar e depois foi extraída.

#### 4.12 Processo de extração e purificação de produtos da biotransformação da 3,4-DCA

Após a realização do método 4.11 a extração e purificação foram realizadas como no item 4.6 com a diferença de que a mistura de eluente utilizada na purificação foi hexano/acetato de etila (2:8 v/v). Posteriormente o produto obtido foi submetido à análise espectroscópica de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$ .

#### 4.13 Teste de biotransformação da 3,4-DCA-Ac

A biotransformação da *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida (3,4-DCA-Ac) foi realizada para analisar a possibilidade de reversão do composto acetilado na AA (3,4-DCA). Esse ensaio foi realizado como descrito em 4.11, alterando apenas o substrato em estudo, ou seja, a *N*-(3,4-diclorofenil)acetamida na concentração de 500  $\mu$ M. A extração e purificação também seguiu o procedimento descrito no item 4.12.

#### 4.14 Análises Estatísticas

As análises foram realizadas pelo GraphPad Prism através da análise de variância de duas vias (*two-way* ANOVA) seguida pelo teste de Tukey, ou testes não paramétricos equivalentes. Os resultados serão considerados significativos quando  $p \leq 0,05$ .

## 5 CONCLUSÕES

A biotransformação da anilina, *p*-anisidina e *o*-toluidina foram as obtidas em maior concentração (8,12 mM) e com bons rendimentos, principalmente com o *C. cladosporioides*, *A. niveus* (43) e *A. terreus* (31). Porém, o mesmo não ocorreu com a *p*-nitroanilina, *p*-bromoanilina e 3,4-DCA na concentração de 8,12 mM. É possível que os grupos retiradores de elétrons da *p*-nitroanilina e a *p*-bromoanilina possam ter influenciado no resultado e isso pode realmente se confirmar se considerarmos os maiores rendimentos com a *p*-anisidina, que tem um grupo doador de elétrons. O teste de tolerância com o resíduo de herbicida, o 3,4-DCA, realizado com os fungos *C. cladosporioides*, *A. niveus* (43) e *A. terreus* (31) demonstrou que a concentração de 500 µM de 3,4-DCA foi o limite tolerado pelos fungos, sendo utilizada nos experimentos de biotransformação com a referida AA.

Os experimentos de tolerância apresentaram um maior crescimento dos fungos no meio contendo a 3,4-DCA do que a 3,4-DCA-Ac, ou seja, existe uma maior tolerância dos fungos a esta AA do que ao seu produto acetilado. No entanto, o experimento de biotransformação de 3,4-DCA-Ac pelo fungo *A. niveus* (43) apresentou um baixo rendimento do processo reverso (de desacetilação). Acreditamos que a 3,4-DCA-Ac apresenta maior toxicidade para os fungos do que a 3,4-DCA, mas mesmo assim, eles foram capazes de realizar a *N*-acetilação. Experimentos de toxicidade *in vitro* em células de mamíferos serão realizados para a comparação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos das AA e de seus produtos *N*-acetilados, para demonstrar a finalidade deste processo de biorremediação na diminuição dos efeitos tóxicos das AA testadas.

Contudo, os resultados obtidos com fungos *C. cladosporioides*, *A. niveus* (43) e *A. terreus* (31) na *N*-acetilação de AA são promissores para a aplicação destes em processos que envolvam a biorremediação de solos e águas contaminados com AA, principalmente a 3,4-DCA, devido à alta concentração tolerada pelos fungos.

## REFERÊNCIAS

Al- Jawhari I. F. H. Ability of Some Soil Fungi in Biodegradation of Petroleum Hydrocarbon. *Journal of Applied & Environmental Microbiology*, **2**, No. 2, 46-52- (2014).

Arjmand, M.; Sandermann, H. Jr. Mineralization of Chloroaniline/Lignin Conjugates and of Free Chloroanilines by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Agric. Food Chem*, **33**,1055-1060 (1985).

Arora, P. K. Bacterial degradation of monocyclic aromatic amines. *Front. in Microbiol.* **6**, 820 (2015).

Bamforth, S.; Singleton, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. *Journal of chemical technology and biotechnology*, **80** n. 7, 723-736 (2005).

Bastos, A.; Fernandes, L. Enzimas: a chave da biotecnologia. *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMPRAPA)*, XXI, ed. 11 (2015).

Beland, F. A.; Kadlubar, F. F. Metabolic Activation and DNA adducts of Aromatic Amines and Nitroaromatic Hydrocarbons. *Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis*. Springer. Berlin-Heidelberg, **8**, 267-325 (1990).

Bombardi, L M. Pequeno ensaio cartográfico sobre o uso de agrotóxicos no Brasil. *Laboratório de Geografia Agrária – USP*, 1ª ed. (2016)

Borges, K.B.; Borges, W.S.; Duran-Patrón, R.; Pupo, M.T.; Bonato, P.S.; Collado, I.G. Stereoselective biotransformations using fungi as biocatalysts. *Tetrahedron: Asymmetry*, **20**, 385–397 (2009)

Brooke, E. W.; Davies, S. G.; Mulvaney, A. W. An approach to identifying novel substrates of bacterial arylamine N-acetyltransferases. *Bioorganic & medicinal chemistry*, UK, **11**, 1227-1234 (2002).

Cancelado, S. V. Metagenoma para prospecção de enzimas e produtos de interesse no biocontrole de fitopatógenos- UNESP, Jaboticabal, (2017).

cancer-code-europe.iarc.fr. France: International Agency for Research on cancer (IARC) – World Health Organization. (atualizada em 23 de novembro de 2016). Disponível em <https://cancer-code-europe.iarc.fr>.

Chakraborty, R.; Wu, C. H.; Hazen, T. C. Systems biology approach to bioremediation. *Current opinion in biotechnology*, **23**, 483-490 (2012).

Clayden, J.; Greeves, N.; Warren, S. *Organic chemistry*. Oxford University Press, 2<sup>a</sup> ed., **21**, 471-497 (2012).

Cocaign, A.; Bui, L.; Silar, P.; Tong, L. C. H.; Busi, F.; Lamouri A.; Mougin, C.; Rodrigues-Lima, F.; Dupret, J.; Dairou, J. Biotransformation of *Trichoderma* spp. and their tolerance to aromatic amines, a major class of pollutants. *Applied and environmental microbiology*, **79**, n. 15, 4719-4726 (2013).

Dalamos, C.A. Understanding benefits and risks of pesticide use. *Scientific Research and Essay*, **4**,10, 945-949 (2009).

De Lima, D. P.; Giannesi, G. C.; Santos, E. A.; Freitas, T. S. E.; Lopes, R. S, Lôpo, M. N.; Beatriz, A.; Marques, M. R.; Marchetti, C. R. *N*-Acetylation of Aromatic Amines by the Soil Fungus *Aspergillus japonicus* (UFMS 48.136). *Letters in Organic Chemistry*, **14**, No. 3, 1-4 (2017).

De Lima, D. P.; Santos, E. A.; Marques, M. R.; Giannesi, G. C.; Beatriz, A.; Yonekawa, M. K.; Montanhali, A. S. Fungal Bioremediation of Pollutant Aromatic Amines. *Current Opinion Green and Sustainable Amines*, doi: 10.1016/j.cogsc.2018.03.012 (2018).

Dos Santos, R.M. Avaliação da adição do pó da casca de coco verde, como material estruturante, na biorremediação de solo contaminado por petróleo. UFRJ (2007).

Dua, M.; Singh, A.; Sethunathan, N.; Johri, A. K. Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**, 143–152 (2002).

Dupret, J.M.; Dairou, J.; Busi, Florent; Silar, P.; Martins, M.; Mougin, C.; Rodrigues-Lima, R.; Cocaign, A. Pesticide-derived aromatic amines and their biotransformation. *Pesticides in the Modern World - Pests Control and Pesticides Exposure and Toxicity Assessment*. Dr. Margarita Stoytcheva (Ed.), ISBN: 978-953-307-457-3, InTech, disponível em: <http://www.intechopen.com/books/pesticides-in-the-modern-world-pests-control-and-pesticides-exposure-and-toxicity-assessment/pesticide-derived-aromatic-amines-and-their-biotransformation> (2011).

Eerd, L.L.V.; Hoagland, R.E.; Zablutowicz, R.M.; Hall, J.C. Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Science*, **51**, 472–495 (2003).

Ebbing, T. S.; Santos, E. A. Estudo da capacidade de biotransformação de arilaminas pelo fungo *Aspergillus sp.*, UFMS (2016).

English, J.C.; Bhat V. S.; Ball, G. L.; McLellan C. J. Establishing a total allowable concentration of *o*-toluidine in drinking water incorporating early lifestage exposure and susceptibility. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **64**, 269–284 (2012).

Fang, S.H; Chung, J.G. \*; Chang W.C; Chang, S.S. - Evidence for arylamine *N*-acetyltransferase activity in the fungi *Candida albicans*. *Toxicology Letters*, **92**, 109–116 (1997).

Feng, Y.; Li, M; Liu, J.; Xu, T.-Y.; Fang, R.-S.; Chen, Q.-H.; He, G.-Q. A novel one-step microbial transformation of betulin to betulinic acid catalyzed by *Cunninghamella blakesleeana*. *Food Chemistry*, **136**, 73-9 (2013).

Freitas, J.S.; Kupsco, A.; Diamante, G.; Felicio, A.A.; Almeida, E.A.; Schlenk, D. Influence of temperature on the thyroidogenic effects of diuron and its metabolite 3,4-DCA in tadpoles of the american bullfrog (*Lithobates catesbeianus*). *Environ. Sci. Technol.*, **50**, 13095–13104 (2016).

Harms, H.; Schlosser, D.; Wick, L. Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. *Nature reviews microbiology*, **9**, 177-192 (2011).

Jacques, R. J. S.; Silva, K. J.; Bento, F. M.; Camargo, F. A. O. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. *Ciência Rural*, **40** n. 2, 280-287(2010).

Kathiravan, S.; Nicholl, I.A. Monoprotected L-amino acid (I-MPAA), accelerated bromination, chlorination, and iodination of C(sp<sup>2</sup>)-H bonds by iridium(III) catalysis. *Chemistry a European Journal*. (2017).

King, T.C.; Kirkovsky, L.; Kirkovsky, A; Purcell, W.P. Review of mutagenicity of monocyclic aromatic amines: quantitative structure–activity relationships. *Environmental Health Perspectives*, **49**, 43-50 (1983).

Kim, D.; Guengerich, F.P. Cytochrome p450 activation of arylamines and heterocyclic amines. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**, 27–49 (2005).

Ko, H. J.; Bang, W.G.; Kim, K. H.; Choi, I. G. Production of *p*-acetaminophenol by whole-cell catalysis using *Escherichia coli* overexpressing bacterial aryl acylamidase. *Biotechnol Lett*, **34**, 677–682 (2012).

Lazzeri, T; Vergotti, M. Agrotóxicos: Brasil libera quantidade até 5 mil vezes maior do que Europa. *Repórter Brasil* [periódico na internet]. 2017. [acesso em 22/06/2018]. Disponível em: <http://reporterbrasil.org.br/2017/11/agrotoxicos-alimentos-brasil-estudo/>

Leresche, J. E.; Meyer, H.P. Chemocatalysis and biocatalysis (biotransformation): some thoughts of a chemist and of a biotechnologist. *Organic Process Research & Development*, Suíça, **10**, 572-580 (2006).

Lim, S.L.; Lee, L.H.; Wu, T.Y. Sustainability of using composting and vermicomposting technologies for organic solid waste biotransformation: recent overview, greenhouse gases emissions and economic analysis. *Journal of Cleaner Production*, **111**, 262-278 (2016).

Martins, M.; Rodrigues-Lima, F.; Dairou, J.; Lamouri, A.; Malagnac, F.; Silar, P.; Dupret, JM. An acetyltransferase conferring tolerance to toxic aromatic amine chemicals. *The journal of biological chemistry*, **284**, n. 28, 18726–18733 (2009).

Niti, C.; Sunita, S.; Kamlesh, K.; Rakesh, K. Bioremediation: An emerging technology for remediation of pesticides. *Research Journal of Chemistry and Environment, India*, **17**, n. 4, 88-105 (2013).

Oliveira, F.R.; Pessoa, M.C.; Albuquerque, R.F.V.; Schalcher, T.R.; Monteiro, M.C.; Clinical Applications and Methemoglobinemia Induced by Dapsone. *J. Braz. Chem. Soc.*, **25**, No. 10, 1770-1779 (2014).

Oliveira, S. D.; Lemos, J. L. S.; Barros, C. A; Leite, S. G. F. Emprego de fungos filamentos na biorremediação de solos contaminados por petróleo: estado da arte. *Série Tecnologia Ambiental – CETEM* **45** (2008).

Parales, R.E.; Bruce, N.C.; Schmid, A.; Wackett, L. P. Biodegradation, Biotransformation, and Biocatalysis (B3), *Applied And Environmental Microbiology*, **68**, nº 10, 4699–4709 (2002).

Perrin, D. D.; Armarego, Wl. L. F. Purification of laboratory chemicals, 3<sup>a</sup> ed. Pergamon Press, Oxford (1988).

Pira, E.; Piolatto, G.; Negri, E.; Romano, C; Boffetta, P; Lipworth, L; McLaughlin, J. K.; La Vecchia, C. Bladder Cancer Mortality of Workers Exposed to Aromatic Amines: A58-Year Follow-up. Oxford University Press, 1096-9 (2010).

Radomsk, J. L., The primary aromatic amines: their biological properties and structureactivity relationships. *Ann. Rev. Pharmacol Toxicol* **19**, 129-156 (1979).

Rizzo, A.C.L.; Leite, S.G.F.; Soriano, A.U.; Dos Santos, R.L.C.; Biorremediação de solos contaminados por petróleo: ênfase no uso de biorreatores. CETEM- Centro de Tecnologia Mineral. *Série Tecnológica Ambiental*, **37**, 37-47 (2006)

Rodrigues-Lima, F.; Dairou, J; Diaz, C. L.; Rubio, M. C.; Sim, E.; Spaink, H. P.; Dupret, J.M.; Cloning, functional expression and characterization of *Mesorhizobium loti* arylamine *N*-acetyltransferases: rhizobial symbiosis supplies leguminous plants with the xenobiotic *N*-acetylation pathway. *Molecular Microbiology, France*, **60**, 2, 505–512 (2006).

Silar, P.; Dairou, J.; Coccagn, A.; Busi, F.; Rodrigues-Lima, F. & Dupret, J. M. Fungi as a promising tool for bioremediation of soils contaminated with aromatic amines, a major class of pollutants. *Nature reviews microbiology* **9**, 477 (2011).

Silva, C. M. M. S.; De Melo, I. S.; Oliveira, P. R. Produção de Enzimas Ligninolíticas por Fungos Isolados de Solos sob Cultivo de Arroz Irrigado. *Boletim de pesquisa e desenvolvimento/ Embrapa meio ambiente*. Jaguariúna (2004).

Silva, J. P. L.; Souza, E. F.; Penha, E. M.; Gottschalk, L. M. F.; Terzi, S. C. Catálogo da coleção de microrganismos de interesse da indústria de alimentos e agroenergia. Embrapa Agroindústria de Alimentos, RJ (2013).

Sinclair, J.; Delgoda, R.; Noble, M.; Jarmin, S.; Goh, N.; Sim, E. Purification, characterisation and crystallisation of an *N*-hydroxyarylamine *O*-acetyltransferase from *Salmonella typhimurium*. *Protein expression and purification*. **12**, 371-380 (1998).

Tixier, C.; Sancelme, M.; Aït-Aïssa, S.; Widehem, P.; Bonnemoy F.; Cuer, A.; Truffaut, N.; Veschambre, H. Biotransformation of phenylurea herbicides by a soil

bacterial strain, *Arthrobacter* sp. N2: structure, ecotoxicity and fate of diuron metabolite with soil fungi. *Chemosphere* **46**, 519-526 (2002).

Tweedy B.G.; Loeppky C.; Ross J.A. Metobromuron: acetylation of the aniline moiety as a detoxification mechanism. *Science*, **168**, 482-3 (1970).

U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Toxicology Program. 11th Report on Carcinogens, National Toxicology Program, Research Triangle Park, NC. (2005).

Vidali, M. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.*, **73**, 7, 1163–1172 (2001).

Westwood, I.M.; Holto, N, S.J.; Rodrigues-Lima, F.; Dupret, J.M.; Bhakta, S.; Noble, M.E.M.; Sim, E.; Expression, purification, characterization and structure of *Pseudomonas aeruginosa* arylamine *N*-acetyltransferase. *Biochem. J.* **385**, 605–612 (2005).

Windmill, K. F.; McKinnonb, R. A.; Zhua, X.; Gaedigk, A. Grant, D. M.; McManusa M. E., The role of xenobiotic metabolizing enzymes in Mutation Research **376**, 153–160 (1997).

World Health Organization, International Agency For Research On Cancer. IARC Monographs on the Evaluation of carcinogenic risks to humans. Some aromatic amines, organic dyes, and related exposures. **99**, 41-54 (2010).