

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Bacharelado em Química com Ênfase Tecnológica em Materiais

**BIODEGRADAÇÃO ENANTIOSSELETIVA DO PESTICIDA PIRETROIDE (\pm)-
LAMBDA-CIALOTRINA POR BACTÉRIAS AMBIENTAIS**

Marylyn Setsuko Arai

São Carlos

2016

MARYLYN SETSUKO ARAI

**Biodegradação enantiosseletiva do pesticida piretroide (\pm)-lambda-cialotrina
por bactérias ambientais**

Trabalho de Conclusão de Curso para
obtenção do diploma de graduação em
**Bacharelado em Química com Ênfase
Tecnológica em Materiais** pelo Instituto de
Química de São Carlos, Universidade de São
Paulo.

O presente trabalho teve como intuito a
biodegradação enantiosseletiva do pesticida
piretroide (\pm)-lambda-cialotrina por bactérias
ambientais, sob orientação do Prof. Dr. André
Luiz Meleiro Porto.

São Carlos

2016

APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

O presente trabalho teve como intuito selecionar bactérias ambientais para biodegradar o pesticida (\pm)-lambda-cialotrina e que possam ser empregadas na biorremediação de solos contaminados, buscando reduzir o impacto ambiental causado por esse agrotóxico.

As bactérias ambientais utilizadas neste trabalho foram isoladas da reserva ambiental do campus II da USP São Carlos. O isolamento foi realizado pela estudante Eloá Borges Meira em 2013/2014 dentro do Projeto de Superintendência de Gestão Ambiental do Edital 2013 - Incentivo à Sustentabilidade na USP da Universidade de São Paulo (SGA/USP).

As bactérias foram preservadas no Laboratório de Microbiologia Aplicada no campus II (Profa. Márcia Nitschke) e estão sendo empregadas em diferentes pesquisas como em reações de biocatálise, biotransformação e de biodegradação.

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre fizeram o possível e o impossível para que eu alcançasse meus sonhos e à minha irmã, minha segunda mãe, que sempre esteve presente para me ajudar com qualquer obstáculo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José e Maria, pelo incondicional apoio em todas as escolhas que fiz até hoje, pelos conselhos, sustento e amor infinito. E à minha irmã, Evelin, por estar presente em todos os momentos e por sempre fazer tudo que está ao seu alcance para me ajudar.

Ao meu namorado, André, que sempre me incentivou ao longo dessa etapa e sempre esteve presente nos momentos em que eu mais precisava.

Ao meu orientador, Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto, pela oportunidade, orientação e confiança em meu trabalho.

À todos meus colegas de laboratório: Aline, Iara, Natália, Marília, Irlon, Paulo, David, Samuel, Darlisson e Willian pela ajuda em todos os momentos, pelo conhecimento compartilhado e por todas as conversas. Em especial agradeço ao doutorando Willian pela orientação, incentivo e principalmente pela amizade criada.

Aos meus amigos Karina e Lucas por todo o companheirismo ao longo desses anos de graduação, por toda a paciência comigo, todo incentivo e por deixarem meus dias sempre melhores.

À todos os colegas e funcionários do IQSC/CG que sempre foram muito atenciosos e, de forma direta ou indireta, contribuíram para a conclusão desse trabalho.

Ao IQSC e à USP pela oportunidade de desenvolvimento desse trabalho de conclusão de curso.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e tempo dedicado à participação e contribuições ao trabalho.

À FAPESP pela concessão da bolsa de Iniciação Científica (2014/08558-3).

RESUMO

Tratamentos de eliminação da concentração residual de agrotóxicos estão sendo continuamente desenvolvidos, destacando-se a biorremediação. Neste trabalho avaliou-se o potencial biodegradativo de onze bactérias ambientais frente à (\pm)-lambda-cialotrina (LC), um pesticida do tipo piretroide, analisando sua rota de degradação. Através do controle bacteriano, controle abiótico, recuperação e controle de células mortas pode-se avaliar a interferência de outros fatores durante a biodegradação. Observou-se que todas as linhagens bacterianas empregadas foram capazes de biodegradar a LC, reduzindo sua concentração inicial de 100 mg L⁻¹ a até 74,7 mg L⁻¹ no caso da bactéria *Bacillus* sp. (5H), que apresentou a melhor biodegradação durante 14 dias, a 32°C e 130 rpm. Também foram realizados experimentos com consórcios bacterianos. O consórcio bacteriano composto pelas bactérias *Bacillus* sp. 5H, *Bacillus* sp. 2B e *Bacillus* sp. 2D apresentou o melhor resultado, reduzindo 38% da concentração inicial do piretroide. Aumentando-se o tempo reacional para 10 e 15 d não foi possível observar significativa melhora na biodegradação e utilizando-se outros meios de cultivo pôde-se notar que o desenvolvimento bacteriano foi dependente da composição do meio onde esta se encontra. As razões enantioméricas mostraram que as bactérias que apresentam maior potencial de biodegradação também foram as mais enantiosseletivas. Um dos principais metabólitos formados foi o ácido 3-fenoxibenzoico, apresentando uma concentração de aproximadamente 4 mg L⁻¹. Utilizando-se a cromatografia a gas acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) pôde-se identificar a presença do ácido benzoico, álcool benzílico, ácido feniletanoico, 2-(3-fenoxifenil)acetonitrila, ácido 3-fenoxibenzoico, benzamida e 3-fenoxibenzaldeído. As rotas de biodegradação foram propostas com base nos resultados obtidos e inclui os metabólitos detectados por CG-EM. Conclui-se que as linhagens de bactérias possivelmente atuaram conjuntamente na biodegradação da LC. A biodegradação do pesticida, em geral, formou compostos mais polares, em apenas 5 dias de reação.

ABSTRACT

Treatments to eliminate the residual concentration of pesticides have been developed, including bioremediation. In this study, eleven environmental bacteria were evaluated for the biodegradation of (\pm)-lambda-cyhalothrin (LC), a pyrethroid pesticide, analyzing its biodegradation pathway. Through the bacterial control, abiotic control, recovery and killed cells control, the interference from other factors during biodegradation were assessed. It was observed that all bacterial strains were capable of biodegrading LC, reducing the initial concentration of 100 mg L⁻¹ to 74.7 mg L⁻¹ by *Bacillus* sp. 5H, the most efficient strain. Bacterial consortiums were also employed and *Bacillus* sp. 5H, *Bacillus* sp. 2B and *Bacillus* sp. 2D together showed the best result, reducing 38% of the initial concentration of pyrethroid. The increase of reaction time did not exhibit significant improvements in biodegradability and using other culture media could be noted that bacterial growth was dependent on the composition of the medium. The enantiomeric ratios showed that bacteria with greater biodegradation potential were also the most enantioselective. The main metabolites formed was 3-phenoxybenzoic acid, having a concentration of approximately 4 mg L⁻¹. Using the gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) could be identify the presence of benzoic acid, benzyl alcohol, phenylethanoic acid, 2- (3-phenoxyphenyl) acetonitrile, 3-phenoxybenzoic acid, benzamide and 3-phenoxybenzaldehyde. A biodegradation pathway was proposed including the metabolites detected by GC-MS. It was concluded that the strains of bacteria possibly acted jointly on the biodegradation of LC. The biodegradation of the pesticide usually formed polar compounds in only 5 days of reaction.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. Pesticidas: Aspectos gerais	16
1.2. Pesticidas piretroides.....	17
1.2.1. Riscos dos piretroides à saúde humana	19
1.2.2. Biodegradação de piretroides por bactérias	19
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Objetivo geral	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Pesticida (\pm)-lambda-cialotrina e seus metabólitos de degradação.....	24
3.2. Bactérias ambientais	24
3.3. Cultivo das bactérias	24
3.3.1. Cultivo das bactérias em meio de cultura sólido	24
3.3.2. Cultivo bacteriano em meio de cultura líquido	25
3.4. Consórcio bacteriano	26
3.5. Avaliação de crescimento bacteriano na presença de (\pm)-lambda-cialotrina	26
3.6. Quantificação da biodegradação da (\pm)-lambda-cialotrina	27
3.6.1. Controles bacterianos e abióticos	27
3.6.2. Recuperação.....	27
3.6.3. Controle de células mortas.....	27
3.6.4. Extração do pesticida e de seus metabólitos.....	28
3.6.5. Quantificação do pesticida remanescente e seus produtos de degradação por CLAE-UV	28
3.6.6. Determinação da razão enantiomérica	31
3.7. Identificação de metabólitos.....	32
3.8. Descarte de resíduos.....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1. Crescimento bacteriano em meio sólido na presença do pesticida	33

4.2. Seleção de bactérias degradadoras da (±)-lambda-cialotrina em meio líquido	34
4.2.1. Biodegradação do pesticida (±)-lambda-cialotrina.....	34
4.2.2. Determinação da razão enantiomérica	39
4.2.3. Identificação de metabólitos a partir da degradação da (±)-lambda-cialotrina	42
4.3. Proposta de rota de biodegradação da (±)-lambda-cialotrina.....	51
5. CONCLUSÃO	56
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Bactérias degradadoras de pesticidas piretroides que já foram isoladas e caracterizadas.	20
Tabela 2. Crescimento bacteriano em placas contendo somente ágar-nutriente e em placas contendo ágar-nutriente e agrotóxico.	33
Tabela 3. Valores das concentrações de (\pm)-lambda-cialotrina e ácido 3-fenoxibenzoico nas amostras após a biodegradação com bactérias ambientais (5 d, 32 °C, 130 rpm).	38
Tabela 4. Razões enantioméricas nas amostras após a biodegradação com bactérias ambientais (5 d, 32 °C, 130 rpm).	41
Tabela 5. Metabólitos presentes na biodegradação da (\pm)-lambda-cialotrina para cada uma das bactérias (detectados por CLAE e CG-EM).	49
Tabela 6. Metabólitos presentes na biodegradação da (\pm)-lambda-cialotrina utilizando-se a bactéria <i>Bacillus</i> sp. 5H, variando-se os tempos de reação e o meios (detectados por CLAE e CG-EM).	50

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais processos que atuam na movimentação/deslocamento e degradação de pesticidas na natureza (Adaptado de Gebler, 2004).	15
Figura 2. Exemplos de estruturas de piretroides utilizados como pesticidas. ...	18
Figura 3. (A) Biodegradação da fempropatrina por <i>Achromobacter</i> sp. (Wang et al., 2011) e da (B) cipermetrina por <i>Micrococcus</i> sp. (Tallur et al., 2008).	22
Figura 4. Curva analítica para a (±)-lambda-cialotrina entre 50 e 1250 mg L ⁻¹ . 30	
Figura 5. Curva analítica para o FBAC para a faixa de concentração entre 5-33 mg L ⁻¹	31
Figura 6. Curva analítica para o FBAC para a faixa de concentração entre 25-250 mg L ⁻¹	31
Figura 7. Cromatograma obtido por CLAE-UV para a biodegradação da (±)-lambda-cialotrina (5 d, 32 °C, 130 rpm). Comparação entre o controle abiótico e a biodegradação do pesticida utilizando a bactéria <i>Bacillus</i> sp. 5H.	34
Figura 8. Cromatograma obtido por CLAE-UV para a extração do padrão da (±)-lambda-cialotrina.....	35
Figura 9. Cromatograma obtido por CLAE-UV para a biodegradação da (±)-lambda-cialotrina (5 d, 32 °C, 130 rpm). Comparação entre o controle bacteriano e a biodegradação do pesticida utilizando a bactéria <i>Bacillus</i> sp. 5H.	36
Figura 10. Curva de crescimento bacteriano (Jawetz et al., 2010).	39
Figura 11. Cromatograma obtido por CLAE-UV para a biodegradação da (±)-lambda-cialotrina (5 d, 32 °C, 130 rpm) utilizando-se coluna quiral. Comparação entre o controle bacteriano e a biodegradação do pesticida pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. 5H.....	40
Figura 12. Cromatograma obtido por CLAE-UV para a biodegradação da (±)-lambda-cialotrina (5 d, 32 °C, 130 rpm) utilizando-se coluna quiral. Comparação entre o controle bacteriano e a biodegradação do pesticida pela bactéria <i>Pseudomonas</i> sp. 3F.....	40
Figura 13. Cromatograma (TIC) obtido por CG-EM para a biodegradação da (±)-lambda-cialotrina (10 d, 32 °C, 130 rpm) para a bactéria <i>Bacillus</i> sp. 5H.	

Comparação entre o controle bacteriano e a amostra de biodegradação do pesticida.	42
Figura 14. Ampliação do cromatograma obtido por CG-EM (Figura 13) para a biodegradação da (±)-lambda-cialotrina (10 d, 32 °C, 130 rpm) para a bactéria <i>Bacillus</i> sp. 5H. Comparação entre o controle bacteriano e a amostra de biodegradação do pesticida entre 8,5 e 16,5 min.....	43
Figura 15. Ampliação do cromatograma obtido por CG-EM (Figura 14) para a biodegradação da (±)-lambda-cialotrina (10 d, 32 °C, 130 rpm) para a bactéria <i>Bacillus</i> sp. 5H. Comparação entre o controle bacteriano e a amostra de biodegradação do pesticida entre 23,5 e 27,5 min.....	43
Figura 16. Espectro de massas (70 eV) obtido por CG-EM (A) do composto A e (B) do padrão do álcool benzílico.....	44
Figura 17. Espectro de massas (70 eV) obtido por CG-EM (A) do composto B e (B) do padrão do ácido benzoico.....	44
Figura 18. Espectro de massas (70 eV) obtido por CG-EM (A) do composto C e (B) do padrão do ácido feniletanoico.....	45
Figura 19. Espectro de massas (70 eV) obtido por CG-EM (A) do composto D e (B) do padrão do 3-fenoxibenzaldeído.....	46
Figura 20. Espectros de massas (70 eV) obtidos por CG-EM do composto H (A) e do ácido 3-fenoxibenzoico (B).....	46
Figura 21. Espectros de massas obtidos por CG-EM do composto D (A) e da benzamida (B).	47
Figura 22. Espectros de massas (70 eV) obtidos por CG-EM do composto F (A) e do benzoato de benzila (B).....	47
Figura 23. Espectros de massas (70 eV) obtidos por CG-EM do composto G (A) e do 2-(3-fenoxifenil)acetonitrila (B).	48
Figura 24. Proposta de hidrólise da (±)-lambda-cialotrina por carboxilases de bactérias.....	51
Figura 25. Proposta de biotransformação da 2-(3-fenoxifenil)acetonitrila ao 2-(3-fenoxifenil)acético pela ação da enzima nitrilase e do ácido 2-(3-	

fenoxifenil)acétido em ácido 3- feniletanoico e fenol pela ação da enzima glutathione transferase.....	52
Figura 26. Proposta de biotransformação do 2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila ao 3-fenoxibenzaldeído pela ação da enzima oxinitrilase.	52
Figura 27. Proposta de oxidação do 3-fenoxibenzaldeído ao ácido 3-fenoxibenzóico pela ação da enzima aldeído-desidrogenase	52
Figura 28. Proposta de biotransformação do ácido 3-fenoxibenzoico ao ácido benzoico pela ação da enzima glutathione transferase.	53
Figura 29. Proposta de biotransformação do ácido benzoico a amida pela ação da enzima glutamina sintetase.	53
Figura 30. Proposta de biotransformação do ácido benzoico ao álcool benzílico pela ação da enzima ácido- redutase.	53
Figura 31. Esterificação do álcool benzílico e do o ácido benzoico dando origem ao benzoato de benzila pela ação da enzima esterase.....	54
Figura 32. Cromatograma obtido por CG-EM para uma mistura de ácido benzoico e álcool benzílico.	54
Figura 33. Evidências da rota completa para a biodegradação da (±)-lambda-cialotrina por bactérias ambientais.	55

1. INTRODUÇÃO

O processo de produção agrícola passou por grandes mudanças após a Revolução Verde que ocorreu na década de 1960. A inserção de novos produtos visando à produção intensiva de “commodities” como a soja, a cana e o café trouxe consigo a necessidade do uso de agrotóxicos para o combate de doenças e aumento da produtividade. Popularmente chamados de defensivos agrícolas ou pesticidas, os agrotóxicos visam controlar seres vivos considerados indesejáveis em função da conservação de outros seres vivos, produtos ou do meio ambiente.

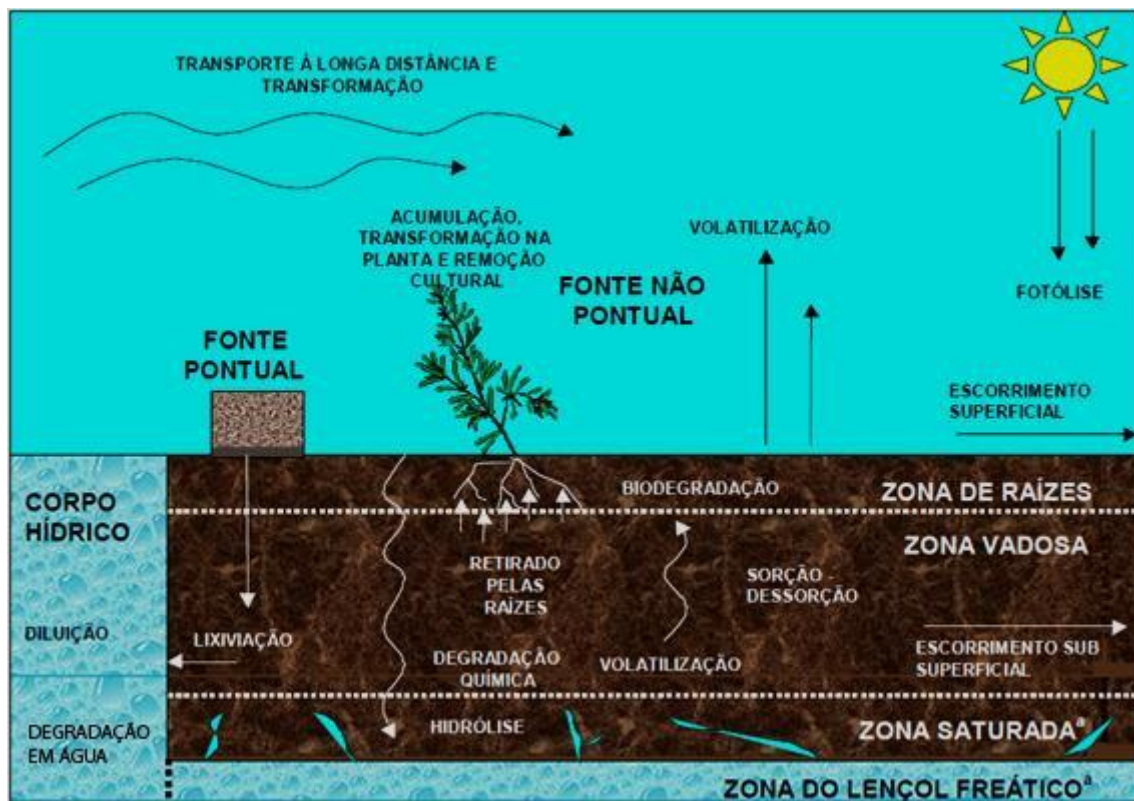
O uso desses produtos químicos tornou-se então parte fundamental do modelo agrícola contemporâneo que apresenta elevados índices de produtividade, porém, essa difusão maciça de agrotóxicos constitui uma das principais ameaças ao meio ambiente. Pois estes, apesar de terem sido desenvolvidos para atuarem em um conjunto específico de organismos, podem também ser danosos a todas as formas de vida com as quais entram em contato. Além disso, dependendo de sua toxicidade e do tempo que permanecem disponíveis no meio ambiente podem interferir em processos básicos do ecossistema, tais como a respiração do solo e a ciclagem de nutrientes ([Rebello et al., 2010](#)).

Na degradação de agrotóxicos é importante levar em consideração processos químicos, físicos e biológicos, pois não ocorre somente uma degradação físico-química do pesticida no solo, mas há também a ação enzimática da biota do solo, de modo que a separação do que é degradado biologicamente daquilo que é transformado abioticamente, especialmente nos casos de grupos funcionais lábeis ou facilmente interconvertíveis, pode se tornar difícil ([Gebler, 2004](#)).

A biodegradação das moléculas envolve a biota existente no solo e na água, sendo mais ativa na chamada zona de raízes. Já a degradação química direta pode ocorrer por processos como: fotólise, hidrólise e oxidação-redução.

É importante ressaltar que quase todos os tipos de agrotóxicos são susceptíveis a essas transformações, entretanto em maior ou menor extensão (Schonoor, 1992; Havens *et al.*, 1995; Radosevich *et al.*, 1997). Os diversos processos que podem atuar na movimentação e degradação dos pesticidas na natureza podem ser observados na Figura 1.

Figura 1. Principais processos que atuam na movimentação/deslocamento e degradação de pesticidas na natureza (Adaptado de Gebler, 2004).



Contaminações por agrotóxicos no meio ambiente e a consequente intoxicação dos seres vivos são comuns. Devido a esses problemas cada vez mais se torna necessário buscar alternativas para recuperar as áreas contaminadas e reduzir o impacto causado na natureza. A biorremediação é uma alternativa de baixo custo para reduzir a concentração de pesticidas acumulados no solo, além de possibilitar o tratamento *in situ*, reduzindo gastos com transporte do material contaminado. Por meio da biorremediação é possível o tratamento de áreas de preservação ambiental e de resíduos considerados de difícil degradação (Young *et al.*, 2003).

Na biodegradação de pesticidas visando uma possível aplicação em processos de biorremediação é importante selecionar microrganismos com potencial para biodegradação e estudar as rotas envolvidas nesse processo. Neste contexto, estudos com culturas puras permitem a elucidação dos mecanismos pelos quais o pesticida é metabolizado (Porto *et al.*, 2011).

Existem diversos trabalhos na literatura que demonstram a eficiência de microrganismos na degradação de organoclorados, organofosforados e carbamatos. No que se refere aos piretroides, existem estudos demonstrando o potencial de degradação por bactérias (Wang *et al.*, 2011) e fungos (Chen *et al.*, 2011d). Assim, o potencial degradativo de bactérias isoladas do cerrado será explorado neste trabalho para o pesticida piretroide (\pm)-lambda-cialotrina.

1.1. Pesticidas: Aspectos gerais

Também conhecidos como pesticidas, os agrotóxicos ou agroquímicos são classificados de acordo com a natureza química do(s) seu(s) ingrediente(s) ativo(s), substância química que é capaz de interferir na atividade biológica dos seres alvos, e podem ser organoclorados, organofosforados, carbamatos e piretroides (EPA, 2013).

Muitos estudos demonstram os malefícios que os pesticidas podem trazer tanto aos seres humanos (Shelton *et al.*, 2014) quanto aos animais (Gibbons *et al.*, 2014), tais efeitos devem-se ao fato de que os agrotóxicos permanecem no ambiente por meses ou até anos após a sua aplicação e se espalhando pelo solo, água e ar. Assim, muitos organismos vivos que não são alvo dos agrotóxicos acabam sendo contaminados de forma indireta.

Historicamente, o uso de agrotóxicos no Brasil aumentou com a expansão e modernização da agricultura nacional. O controle das pragas, que anteriormente era feito por agentes naturais ou métodos mecânicos, foi substituído pelo uso de compostos químicos sintéticos (Almeida *et al.*, 2007). Destacando-se que em 2008 o Brasil assumiu o posto de maior mercado consumidor de pesticidas do mundo (Rebello *et al.*, 2010).

1.2. Pesticidas piretroides

Os piretroides são os derivados sintéticos das piretrinas, ésteres tóxicos isolados das flores das espécies de *Chrysanthemum cinerariaefolium* e espécies relacionadas. Durante muitos anos as piretrinas naturais foram utilizadas como pesticidas, entretanto estas apresentam instabilidade à luz solar e ao ar, fato que diminui sua eficácia no controle de pragas na agricultura (Chen, 1996; Santos *et al.*, 2007).

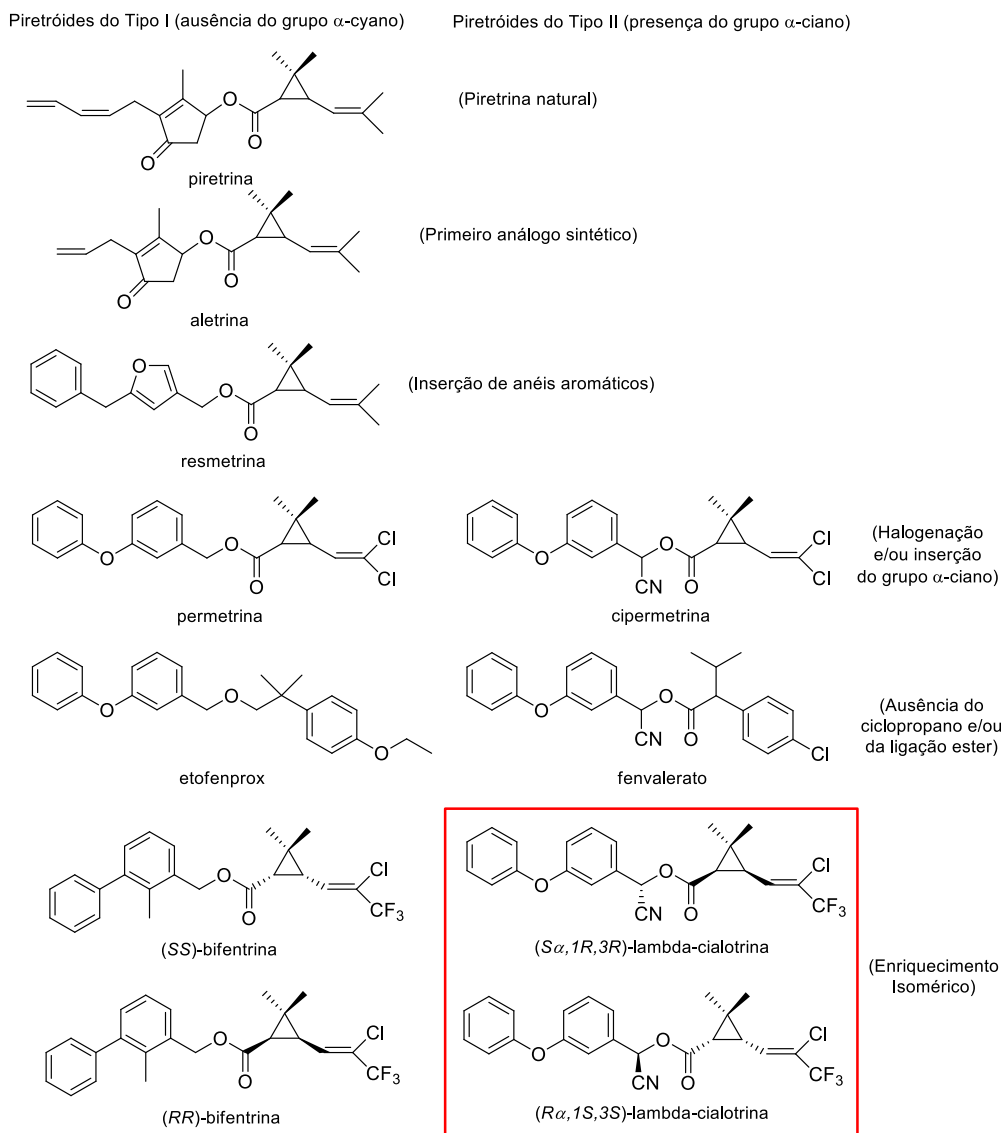
O uso dos piretroides sintéticos na agricultura iniciou-se na década de 70 após mudança estrutural introduzida nas piretrinas, para modificar a estrutura química com o intuito de se obter substâncias com maior estabilidade e potencial inseticida. Assim, a inclusão de átomos de nitrogênio, enxofre e átomos de halogênios às piretrinas solucionou os problemas de estabilidade relacionados às substâncias naturais, enquanto manteve relativamente baixa a toxicidade aguda em mamíferos (Heudorf, 2001; Soderlund *et al.*, 2002).

Os piretroides são, atualmente, os inseticidas mais utilizados, pois apresentam baixa toxicidade em mamíferos, baixo impacto ambiental, são efetivos contra um largo espectro de insetos e são necessárias baixas quantidades para exercerem sua ação. Contudo, em alguns casos, a utilização de piretroides tem aumentado os riscos a pássaros e/ou mamíferos (Narahashi, 1996; Queiroz *et al.*, 2001). Ainda, ensaios laboratoriais mostraram que os piretroides são muito tóxicos para peixes, abelhas e artrópodes aquáticos, tais como lagostas e camarões (Viran, 2003; Grisolia, 2005).

A maioria dos piretroides contém um grupo ciclopropano ligado a anéis aromáticos através de uma ligação éster. Assim, visando uma maior atividade inseticida e estabilidade, foram realizadas diversas modificações nas estruturas destes compostos. Entre estas destaca-se a adição de um grupo ciano que potencializa a atividade inseticida, de modo que os piretroides que não possuem o grupo ciano são conhecidos como piretroides do *tipo I*, enquanto os que possuem este grupo são chamados de *tipo II*. Outras modificações como a inserção de halogênios, posicionamento de grupos hidrofóbicos e arranjos

estereoquímicos também foram introduzidos para o melhor desempenho destes pesticidas (Figura 2). Sendo assim, inúmeras estruturas foram desenvolvidas, inclusive compostos que não possuem o anel ciclopropano e a ligação éster (Soderlund *et al.*, 2002).

Figura 2. Exemplos de estruturas de piretroides utilizados como pesticidas.



Em virtude das vantagens de seu uso, o emprego dos piretroides é ampliado para outros fins, como no controle de infestações urbanas e residenciais, levando à exposição de organismos não alvos aos seus efeitos tóxicos (Valentine, 1990).

A lambda-cialotrina é uma mistura 1:1 de enantiômeros, (Z)-(1R,3R)-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetil-ciclopropionato de (R)- α -ciano-3-

fenoxibenzila e (Z)-(1S,3S)-3-(2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-enil)-2,2-dimetil-ciclopropionato de (R)- α -ciano-3-fenoxibenzila (He *et al.*, 2008).

1.2.1. Riscos dos piretroides à saúde humana

Os piretroides são aproximadamente 2250 vezes mais tóxicos para insetos do que para mamíferos, pois estes invertebrados possuem maior sensibilidade nos canais de sódio, enquanto os mamíferos são protegidos pela baixa absorção dermal e rápido metabolismo de degradação (Bradberry *et al.*, 2005).

Os principais efeitos de intoxicação por piretroides são sobre os canais de sódio e cloreto. Mesmo em baixas concentrações estes compostos podem causar um estado de hiperexcitabilidade, o qual é a base da maioria dos casos de intoxicação (Bradberry *et al.*, 2005). Os sintomas característicos de envenenamento por piretroides são tremores, hipersensibilidade, hiperexcitabilidade, câibras musculares e convulsões (Barrot, 1996).

1.2.2. Biodegradação de piretroides por bactérias

Usualmente, biotransformações metabólicas em sistemas biológicos podem ser divididas em 2 fases. As reações da *fase I* promovem modificações em xenobióticos, como reações de oxidação, redução, hidrólise e outras. Após esta etapa, ocorrem as reações da *fase II* que são nomeadas de conjugações. Estas reações introduzem grupos endógenos, os quais são usualmente polares e presentes em abundância *in vivo*, resultando em produtos mais solúveis em água (exceto em reações de alquilação) e, portanto, são mais facilmente excretados. É importante ressaltar que os xenobióticos conjugados podem sofrer as reações inversas de conjugação gerando o metabólito modificado novamente (Derelanko e Hollinger, 2002).

Um número considerável de bactérias capazes de degradar pesticidas piretróides foram isoladas e caracterizadas ao longo do tempo (Tabela 1).

Tabela 1. Bactérias degradadoras de pesticidas piretroides que já foram isoladas e caracterizadas.

Microrganismos	Piretroides	Referências
<i>Achromobacter</i> sp. SM-2	Deltametrina	(Maloney <i>et al.</i> , 1988)
<i>Bacillus cereus</i> SM-3	Fluvalinato	(Maloney <i>et al.</i> , 1993)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> SM-1	Cipermetrina	
	Fenvalerato	
	Permetrina	
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	Beta-ciflutrina	(Saikia <i>et al.</i> , 2005)
<i>Acidomonas</i> sp.	Aletrina	(Paingankar <i>et al.</i> , 2005)
<i>Stenotrophomonas acidaminiphila</i>	Permetrina	(Liu <i>et al.</i> , 2005)
	Cipermetrina	
	Fenvalerato	
	Deltametrina	
<i>Micrococcus</i> sp.	Cipermetrina	(Tallur <i>et al.</i> , 2008)
<i>Ochrobactrum tritici</i>	Cipermetrina	(Wang <i>et al.</i> , 2011)
<i>Streptomyces aureus</i>	Deltametrina	(Chen <i>et al.</i> , 2011a)
<i>Stenotrophomonas</i> sp.	Fenvalerato	(Chen <i>et al.</i> , 2011b)
<i>Sphingobium</i> sp.	Fenpropatrina	(Guo <i>et al.</i> , 2009)
	Cipermetrina	
	Permetrina	
	Cialotrina	
	Deltametrina	
	Fenvalerato	
	Bifenthrina	
<i>Achromobacter</i> sp.	Deltametrina	(Chen <i>et al.</i> , 2011c)
	Fenvalerato	
	Beta-cipermetrina	
	Beta-ciflutrina	
	Cialotrina	
<i>Streptomyces</i> sp.	Cipermetrina	(Lin <i>et al.</i> , 2011)
<i>Ochrobactrum anthropi</i>	Lambda-cialotrina	(Zhai <i>et al.</i> , 2012)

Rotas biodegradativas da cipermetrina, deltametrina e fempropatrina foram propostas em diferentes estudos utilizando-se bactérias, entretanto poucos metabólitos foram identificados no meio de cultivo ou no interior celular. A maior parte dos metabólitos identificados foi proposta baseando-se em experimentos de determinação de atividades enzimáticas e não na determinação direta da presença destes compostos químicos.

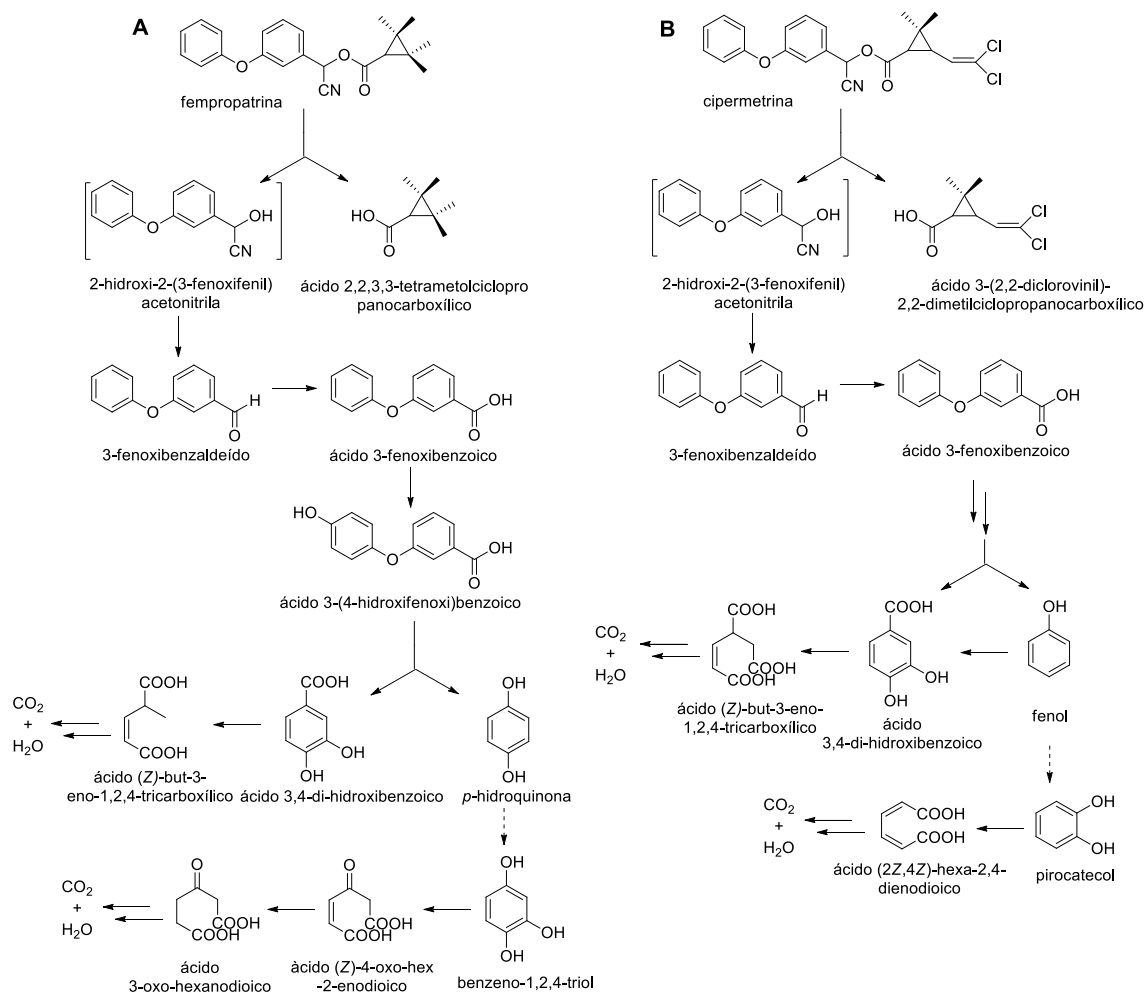
Na rota biodegradativa da fempropatrina por *Achromobacter* sp. observou-se que foi hidrolisada ao ácido 2,2,3,3-

tetrametilciclopropanocarboxílico e 3-fenoxibenzaldeído, este último foi convertido ao ácido 3-fenoxibenzoico. O ácido 3-fenoxibenzoico foi transformado ao ácido 3-(4-hidroxifenoxi) benzoico, que foi oxidado para o ácido 3,4-di-hidroxibenzoico e *p*-hidroquinona. O ácido 3,4-di-hidroxibenzoico foi convertido para ácido (Z)-but-3-eno-1,2,4-tricarboxílico. Enquanto a *p*-hidroquinona foi transformada no ácido (Z)-4-oxo-hex-2-enedioico, o qual foi convertido ao ácido 3-oxo-hexanodioico. Na rota de degradação pela bactéria *Sphingobium* sp. não foi observado a formação do ácido 3-(4-hidroxifenoxi)benzoico, de modo que foi sugerida a conversão direta ao ácido 3,4-di-hidroxibenzoico e fenol (Wang *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2009).

Similarmente, a rota biodegradativa da cipermetrina por *Micrococcus* sp. iniciou-se com a hidrólise da ligação éster, gerando o ácido 3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanocarboxílico e 3-fenoxibenzaldeído. O 3-fenoxibenzaldeído foi posteriormente convertido ao ácido 3-fenoxibenzoico, o qual formou o ácido 3,4-di-hidroxibenzoico e fenol. O ácido 3,4-di-hidroxibenzoico foi convertido ao (Z)-but-3-eno-1,2,4-tricarboxílico, enquanto o fenol foi convertido a pirocatecol, o qual foi transformado em ácido (2Z,4Z)-hexa-2,4-dienodioico (Tallur *et al.*, 2008).

Chen *et al.* mostraram que a deltametrina (Figura 3) foi degradada pela hidrólise do éster carboxílico produzindo α -hidroxi-3-fenoxibenzenoacetonitrila e 3-fenoxibenzaldeído. Estes intermediários foram posteriormente degradados por oxigenólise para formar 2-hidroxi-4-metoxibenzofenona e o ácido 1,2-benzenodicarboxílico, posteriormente resultando em mineralização (Chen *et al.*, 2011).

Figura 3. (A) Biodegradação da fempropatrina por *Achromobacter* sp. (Wang et al., 2011) e da (B) cipermetrina por *Micrococcus* sp. (Tallur et al., 2008).



Neste trabalho foram selecionadas bactérias ambientais capazes de biodegradar o pesticida lambda-cialotrina e que possam ser empregadas na biorremediação de solos contaminados.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo o estudo da biodegradação enantiosseletiva do pesticida piretroide (\pm)-lambda-cialotrina utilizando bactérias ambientais.

2.2. Objetivos específicos

a) Selecionar bactérias ambientais que apresentassem potencial biodegradativo para a (\pm)-lambda-cialotrina ([Figura 2](#)).

b) Quantificar a biodegradação bacteriana da (\pm)-lambda-cialotrina e a formação de seus principais metabólitos de degradação por métodos cromatográficos.

c) Avaliar a presença de biodegradação enantiosseletiva da (\pm)-lambda-cialotrina, determinando a razão enantiomérica e qual enantiômero foi preferencialmente biodegradado.

d) Propor uma rota de biodegradação da (\pm)-lambda-cialotrina por meio dos metabólitos identificados por espectrometria de massas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Pesticida (±)-lambda-cialotrina e seus metabólitos de degradação

O padrão analítico da (±)-lambda-cialotrina (LC, 97%), assim como os padrões técnicos do 3-fenoxibenzaldeído (FBAld, 98%), do ácido 3-fenoxibenzoico (FBAc, 98%) e do álcool 3-fenoxibenzílico (FBAlc, 98%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. A formulação comercial do pesticida (±)-lambda-cialotrina (LCcom) denominada BRASÃO foi doada pela empresa Helm, com a seguinte composição: (±)-lambda-cialotrina (50 g L⁻¹) e outros ingredientes não especificados (974 g L⁻¹).

3.2. Bactérias ambientais

As bactérias utilizadas neste projeto foram isoladas da reserva ambiental do campus 2 da USP-São Carlos para aplicação no desenvolvimento de pesquisas voltadas às soluções de Gestão Ambiental, como a biodegradação de pesticidas e tratamento de resíduos orgânicos. Foi isolado um total de 53 bactérias, das quais 11 foram selecionadas para os estudos de biodegradação da (±)-lambda-cialotrina.

3.3. Cultivo das bactérias

Neste trabalho empregou-se o cultivo de bactérias em meio de cultura sólido e líquido (caldo nutriente).

3.3.1. Cultivo das bactérias em meio de cultura sólido

As bactérias foram cultivadas em meio de cultura sólido utilizando-se placas de Petri. As culturas foram mantidas em refrigeração para posteriores inoculações em meios de cultura sólido e/ou líquido. A composição do meio de cultura para 1 L de água destilada foi de 9 g de caldo nutriente e 20 g de ágar, este último somente para meio de cultura sólido. O pH do meio foi ajustado para 7 utilizando-se solução aquosa de KOH 0,7 mol L⁻¹ por meio do pHmetro Qualxtron/8010. Todos os meios de cultura foram esterilizados em autoclave (Phoenix/AV50) à temperatura de 121 °C por 20 minutos.

Em fluxo laminar (Veco), previamente esterilizado por meio do emprego

de álcool 70% e luz ultravioleta, 25 mL de meio de cultura foram vertidos em cada placa de Petri (9 x 9 cm²) descartável. Após o resfriamento à temperatura ambiente, os meios de cultura foram mantidos em estufa (32 °C, 24 h) para a detecção de eventuais contaminações. A inoculação foi realizada pelo método de estrias, utilizando-se uma alça de transferência (níquel-cromo). As bactérias foram cultivadas em incubadora (Nova Ética B.O.D. 411D) à temperatura de 32 °C por 24-48 h.

3.3.2. Cultivo bacteriano em meio de cultura líquido

A inoculação em meio líquido foi realizada em ambiente estéril utilizando-se 1 mL de uma suspensão de bactérias com densidade ótica 0,1 na escala de McFarland, contendo células retiradas de um cultivo bacteriano de 24 h em incubadora à temperatura de 32 °C. O crescimento em meio líquido foi realizado com o emprego de 50 mL de meio de cultura em frascos Erlenmeyer de 125 mL fechados com tampões de algodão, pois estes permitem trocas gasosas com o ambiente. O cultivo foi realizado em agitador orbital (Tecnal TE-421) à temperatura de 32 °C, rotação de 130 rpm e no abrigo de luz, para evitar a fotodegradação dos xenobióticos.

3.3.2.1. Cultivo bacteriano em meio tamponado

As bactérias foram cultivadas em meio líquido, conforme descrito no item 3.3.2., durante 24 h, após esse período a suspensão foi centrifugada (Hitachi CR22GIII) durante 4 min com 2000 kgf. As bactérias foram ressuspensas em tampão fosfato 1/1,5 M (Na₂HPO₄ e KH₂PO₄) e realizou-se a biodegradação ao longo de 5 d (32 °C, 130 rpm) em agitador orbital. Realizou-se a extração das amostras com acetato de etila conforme o item 3.6.4.

3.3.2.2. Cultivo bacteriano em meio mínimo mineral

Foram realizados cultivos em meio mínimo mineral: (NH₄)₂SO₄ (2 g L⁻¹), MgSO₄.7H₂O (0,2 g L⁻¹), CaCl₂.2H₂O (0,01 g L⁻¹), FeSO₄.7H₂O (0,001 g L⁻¹), Na₂HPO₄.12H₂O (1,5 g L⁻¹), KH₂PO₄ (1,5 g L⁻¹). As bactérias foram inoculadas utilizando-se 1 mL de suspensão 10⁸ células de um cultivo sólido de 24 h. Após

biodegradação de 5 d (32 °C, 130 rpm) em agitador orbital realizou-se a extração com acetato de etila conforme descrito no item 3.6.4.

3.4. Consórcio bacteriano

As três bactérias com maior capacidade de biodegradação foram selecionadas para consórcio. A inoculação em meio líquido foi realizada em ambiente estéril utilizando-se 0,33 mL de uma suspensão de bactérias com densidade ótica 0,1 na escala de McFarland, contendo células retiradas de um cultivo bacteriano de 24 h em incubadora à temperatura de 32 °C. O crescimento em meio líquido foi realizado com o emprego de 17 mL de meio de cultura em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Após 24 h as três linhagens foram transferidas para um único frasco Erlenmeyer e realizou-se a biodegradação ao longo de 5 d (32 °C, 130 rpm) em agitador orbital. Realizou-se a extração das amostras com acetato de etila conforme o item 3.6.4.

3.5. Avaliação de crescimento bacteriano na presença de (±)-lambda-cialotrina

Foram realizados experimentos para a avaliação do crescimento das bactérias empregadas neste estudo, verificando a capacidade de desenvolvimento na presença da (±)-lambda-cialotrina. Para estes experimentos foram preparados meios de cultura sólidos com 100 mg L⁻¹ de (±)-lambda-cialotrina em ágar nutriente. É importante destacar que o pesticida foi adicionado somente após o resfriamento parcial do meio de cultura (entre 40 e 45 °C) visando à prevenção da degradação térmica e que, após a adição, o meio foi homogeneizado utilizando-se movimentos circulares suaves. As linhagens de bactérias foram inoculadas em meio de ágar-nutriente (utilizadas como controle) e em meio ágar-nutriente contendo (±)-lambda-cialotrina. As linhagens que melhor se desenvolveram na presença do pesticida em relação à placa controle foram empregadas em experimento em meio líquido.

3.6. Quantificação da biodegradação da (±)-lambda-cialotrina

A quantificação da biodegradação foi realizada nos experimentos de cultivo em meio líquido, realizando-se a extração da (±)-lambda-cialotrina para posterior determinação residual do pesticida.

3.6.1. Controles bacterianos e abióticos

A quantificação da biodegradação do pesticida foi realizada em meio líquido, onde se cultivou a linhagem de bactéria durante 24 h e posteriormente adicionou-se a (±)-lambda-cialotrina na concentração de 100 mg L⁻¹. Após a adição do pesticida a reação prosseguiu durante 5 d. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas.

Um experimento de controle bacteriano (cultivo na ausência de pesticida) também foi realizado para a diferenciação entre metabólitos naturais produzidos pelas bactérias e os induzidos pela presença da LC.

Controles abióticos (degradação do pesticida na ausência de microrganismos) foram empregados para a avaliação da degradação do pesticida devido aos eventos físico-químicos durante a agitação orbital, a qual foi realizada na ausência de luz e com temperatura controlada de 32 °C.

3.6.2. Recuperação

O experimento de recuperação foi realizado para a determinação de exatidão e precisão do método empregado. O cultivo bacteriano foi realizado durante 5 d como descrito no item 3.3.2., em seguida as células foram autoclavadas (autoclave Phoenix/AV50) e 100 mg L⁻¹ do pesticida foram adicionados. O sistema foi mantido sob agitação por 30 min e posteriormente realizou-se a extração com acetato de etila conforme descrito no item 3.6.4.

3.6.3. Controle de células mortas

O controle de células mortas foi realizado utilizando-se a bactéria com maior capacidade de biodegradação e teve como intuito avaliar a possível perda de lambda-cialotrina por absorção das células e degradação por eventos físico-químicos ao longo do tempo. O cultivo bacteriano foi realizado durante 5 d como descrito no item 3.3.2., em seguida as células foram autoclavadas

(autoclave Phoenix/AV50) e adicionou-se 100 ppm do pesticida. O sistema foi mantido em agitador orbital (32 °C, 130 rpm) por mais 5 d e realizou-se a extração com acetato de etila como descrito no item 3.6.4.

3.6.4. Extração do pesticida e de seus metabólitos

Para a preparação das amostras foram adicionados 50 mL de acetato de etila ao meio de cultura, tornando-a uma mistura de água e acetato de etila (1:1). A mistura foi submetida à agitação magnética vigorosa durante 30 min para a lise celular e extração da (\pm)-lambda-cialotrina remanescente e dos metabólitos formados. Posteriormente realizou-se a centrifugação (Hitachi CR22GIII) da amostra a 12.000 rpm durante 20 min para a remoção do conteúdo sólido. A parte líquida foi transferida para um frasco Becker de 250 mL e teve seu pH ajustado para 7 com o uso de KOH 0,7 mol L⁻¹. Um funil de separação de 250 mL foi utilizado para realizar a extração da mistura por partição líquido-líquido com acetato de etila (P.A.) em 3 etapas de 30 mL. À fase orgânica adicionou-se Na₂SO₄ anidro, a qual foi posteriormente filtrada e transferida para um balão de fundo redondo de 500 mL para a evaporação do solvente a vácuo. Em seguida as amostras foram ressuspensas em metanol utilizando-se de balões volumétricos de 5 mL para as análises cromatográficas de quantificação e identificação de metabólitos.

3.6.5. Quantificação do pesticida remanescente e seus produtos de degradação por CLAE-UV

A (\pm)-lambda-cialotrina e seus metabólitos foram determinados quantitativamente utilizando-se um sistema cromatográfico Shimadzu, composto pelos seguintes módulos: sistema de bombeamento LC-20AT, desgaseificador DGU-20A5, amostrador automático SIL-20AHT, detector UV-VIS SPD-M20A, forno de coluna CTO-20A e controlador de sistema CBM-20A. As separações foram realizadas utilizando uma coluna Shim-pack CLC-ODS(M) (25 cm). O material foi eluído com uma mistura de 0,5% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,5% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B), na seguinte programação: 0-17 min, 60% B (isocrático); 17-18 min, 50-90% B

(gradiente linear); 18-30 min, 90% B (isocrático); 30-31 min, 90-50% (gradiente linear) e 31-45 min (isocrático). A temperatura do forno foi de 40 °C, vazão de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 10 µL. Realizou-se a detecção ultravioleta em 277 nm.

Foram obtidas curvas analíticas utilizando-se o método de padrão externo para cada um dos compostos analisados, de acordo com a Equação 1. É importante ressaltar que as amostras foram ressuspensas em 5 mL de metanol após a extração líquido-líquido, estando concentradas 10 vezes.

$$Y = Ax + B \text{ (Equação 1)}$$

Onde: x = concentração do analito mg L⁻¹

Y = área do analito

A = coeficiente angular

B = coeficiente linear

Para valores inferiores a 5 mg L⁻¹ de concentração dos metabólitos realizou-se uma estimativa linear, de modo que foi utilizada a Equação 2.

$$Y = (0,5x)/A \text{ (Equação 2)}$$

Onde: x = concentração do analito (mg L⁻¹)

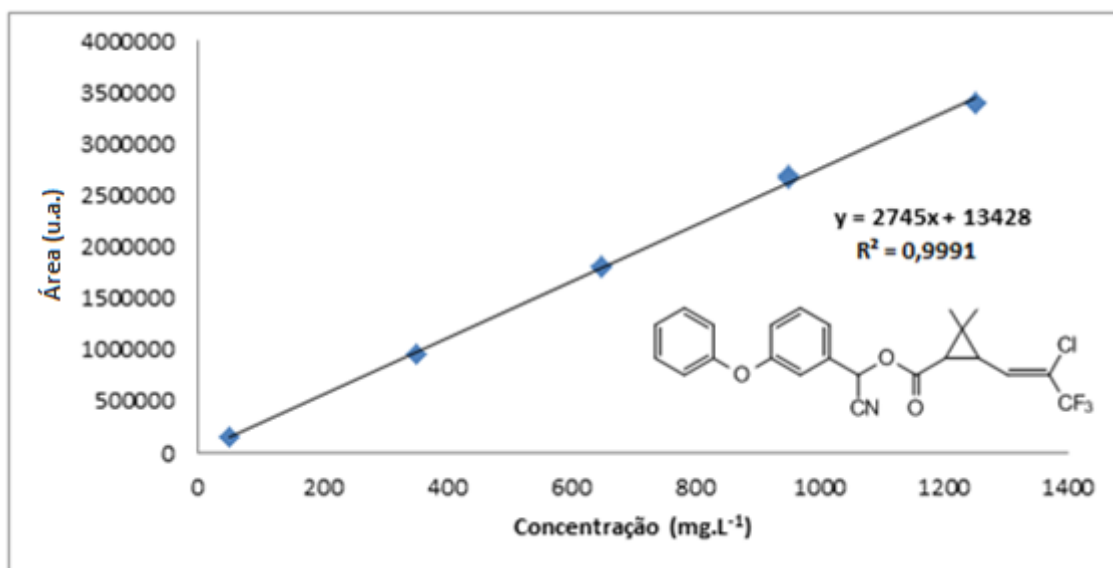
Y = área do analito

A = absorbância para a solução padrão de 5 mg L⁻¹ de concentração.

3.6.5.1. Quantificação da (±)-lambda-cialotrina por CLAE-UV

Para a quantificação da (±)-lambda-cialotrina preparam-se soluções padrões de concentrações 50, 350, 650, 950 e 1250 mg L⁻¹ de LC em metanol, gerando uma equação linear: $y = 2745x + 13428$ (Figura 4).

Figura 4. Curva analítica para a (±)-lambda-cialotrina entre 50 e 1250 mg L⁻¹.



3.6.5.2. Quantificação do ácido 3-fenoxibenzoico por CLAE-UV

Para quantificação do ácido 3-fenoxibenzoico foram elaboradas duas curvas analíticas. Uma para a faixa de concentração entre 5-33 mg L⁻¹, onde se utilizou soluções padrões de 5, 12, 19, 26 e 33 mg L⁻¹ para a qual se obteve a equação $y = 4762,4x - 1732,5$ (Figura 5). E outra curva analítica para a faixa de concentração entre 25 e 250 mg L⁻¹, utilizando-se de soluções padrões de 25, 80, 135, 190 e 250 mg L⁻¹ e gerando a equação linear $y = 4554,7x + 1732,5$ (Figura 6).

Para concentrações inferiores a 5 mg L⁻¹ foi realizada uma estimativa utilizando-se a absorbância da solução padrão de concentração 5 mg L⁻¹, obtendo-se a equação $y = (0,5x)/20495$.

Figura 5. Curva analítica para o FBAC para a faixa de concentração entre 5-33 mg L⁻¹.

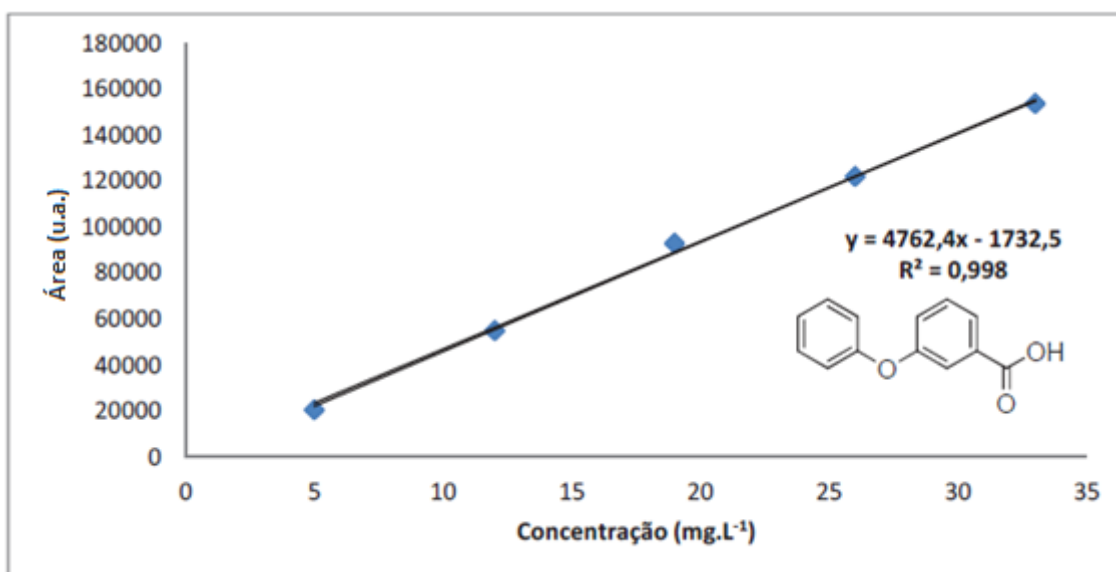
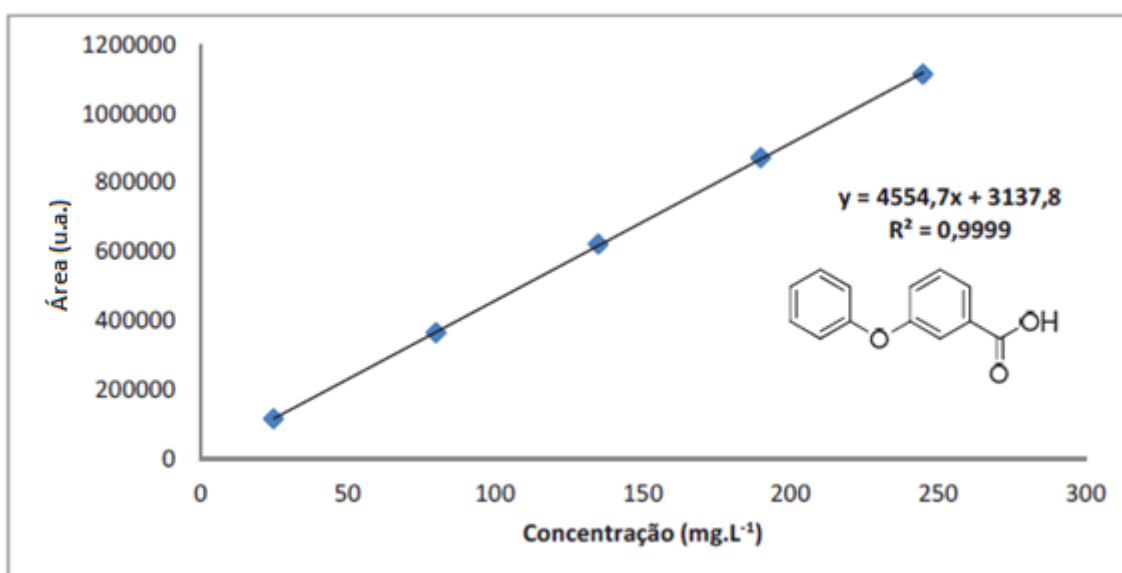


Figura 6. Curva analítica para o FBAC para a faixa de concentração entre 25-250 mg L⁻¹.



3.6.6. Determinação da razão enantiomérica

Utilizando o mesmo sistema cromatográfico Shimadzu do item 3.5.3. foi realizada a determinação da enantiosseletividade da biodegradação da (±)-lambda cialotrina. As separações foram realizadas utilizando uma coluna quiral Chiralcel OD-H da Daicel Chemical Industries (25 cm). A amostra foi eluída isocraticamente com uma mistura de isopropanol (solvente A, 1,0%) e hexano (solvente B, 99%). A temperatura do forno foi de 40 °C, vazão de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 10 µL. A detecção ultravioleta foi realizada em 215 nm.

3.7. Identificação de metabólitos

As análises por cromatografia a gás acoplada à espectrômetro de massas foram realizadas em um aparelho Shimadzu/GC-2010 equipado com auto injetor Shimadzu/AOC-5000 e detector espectrométrico de massas (Shimadzu MS2010plus) com ionização por elétrons (IE, 70eV). Equipou-se o forno do cromatógrafo a gás com uma coluna de sílica fundida DB-5 (J&W Scientific, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Utilizou-se hélio como gás de arraste e a vazão do gás foi de 0,75 mL min⁻¹. A temperatura do injetor foi de 250 °C. Inicialmente manteve-se a coluna à temperatura de 60 °C durante 2 min, em seguida, a uma taxa de 6 °C min⁻¹, a temperatura foi elevada até 280 °C e mantida assim durante 6,30 min. O tempo total de análise foi de 45 min, injetando-se 2 μ L no modo Splitless. A temperatura da fonte de íon foi de 200 °C e a da interface de 270 °C, monitorando-se os íons de 4 a 45 min na faixa entre m/z 40 e 500.

3.8. Descarte de resíduos





As bactérias cultivadas na ausência dos pesticidas foram autoclavadas a 121 °C por 20 min e depois descartadas. Aquelas que foram cultivados em meios de cultura contendo pesticida, depois de autoclavadas, foram armazenadas em frascos devidamente identificados e encaminhados para descarte no Laboratório de Resíduos Químicos (LRQ) do campus de São Carlos da Universidade de São Paulo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Crescimento bacteriano em meio sólido na presença do pesticida

Foram realizados experimentos em meio de cultura sólido contendo 100 mg L⁻¹ de (±)-lambda-cialotrina para a avaliação do crescimento das linhagens bacterianas na presença do pesticida. Placas contendo somente ágar-nutriente, denominadas placas controle, foram usadas para a comparação do crescimento das linhagens (Tabela 2).

Tabela 2. Crescimento bacteriano em placas contendo somente ágar-nutriente e em placas contendo ágar-nutriente e agrotóxico.

	Somente ágar-nutriente	Ágar-nutriente + (±)-lambda-cialotrina
Bactérias* 2B, 2G, 4T e 1E		
Bactérias* 3A1, 5G, 6E e 3F		

* *Bacillus* sp. 2B, *Bacillus* sp. 2G, *Bacillus* sp. 4T, *Curtobacterium* sp. 1E, *Bacillus* sp. 5G, *Bacillus* sp. 6E, *Pseudomonas* sp. 3F e *Bacillus* sp. 3A1

Observou-se que presença da lambda-cialotrina não inibiu o crescimento de nenhuma das linhagens de bactérias utilizadas, visto que estas se desenvolveram igualmente na presença e ausência do pesticida, portanto, todas as linhagens foram empregadas na seleção em meio líquido.

4.2. Seleção de bactérias degradadoras da (±)-lambda-cialotrina em meio líquido

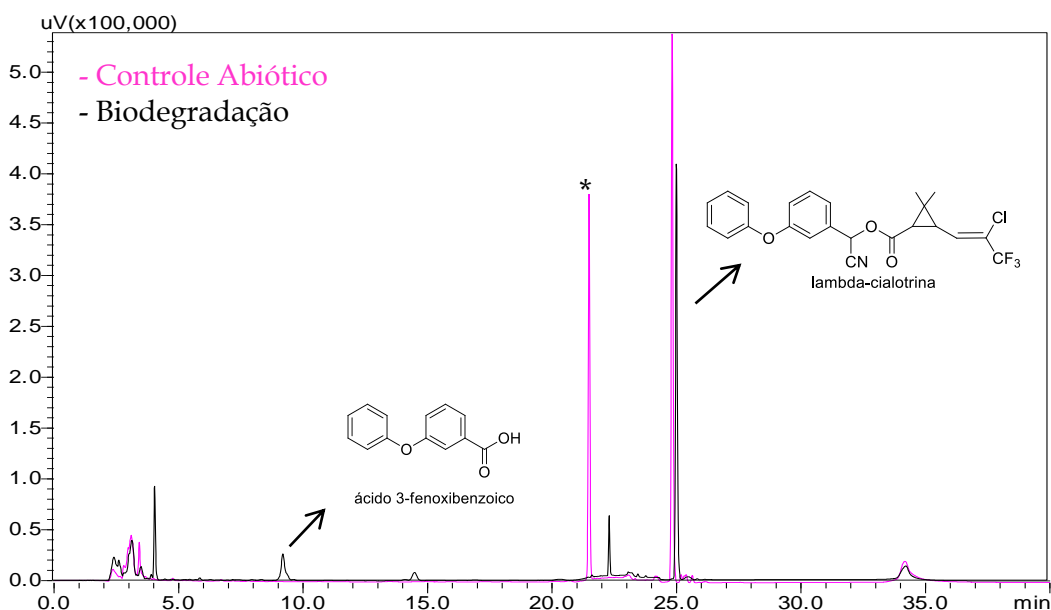
Realizou-se uma seleção bacteriana por meio da quantificação do residual de (±)-lambda-cialotrina em meio líquido visando à avaliação do potencial biodegradativo de cada linhagem.

A bactéria com o maior potencial de biodegradação foi selecionada e realizaram-se análises variando o tempo reacional (10 e 15 d) e os meios de biodegradação (meio tamponado e meio mínimo mineral).

4.2.1. Biodegradação do pesticida (±)-lambda-cialotrina

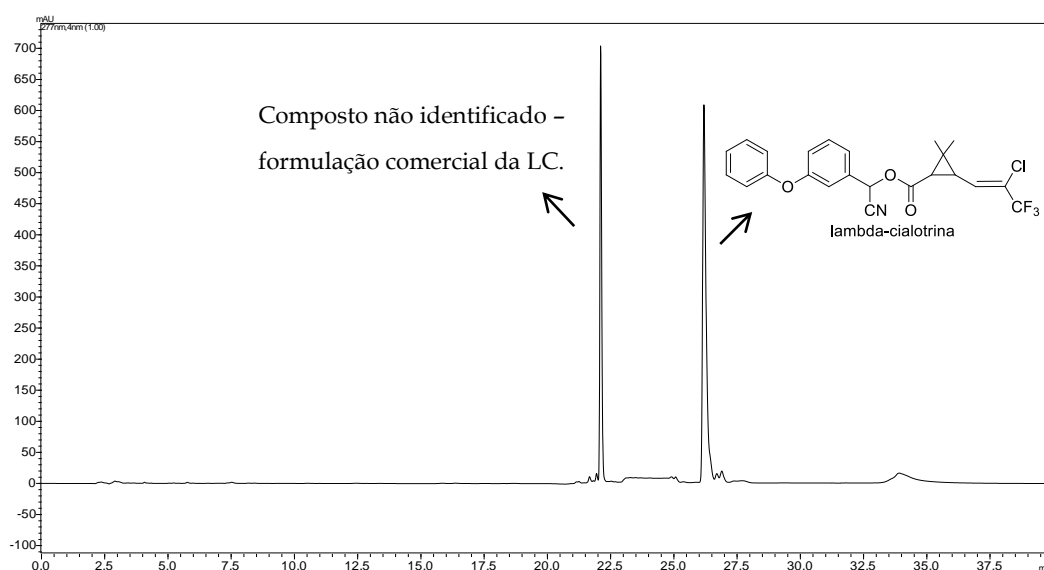
Inicialmente realizou-se a análise do controle abiótico (amostra sem a presença de bactéria) para avaliar a degradação do pesticida devido a eventos físico-químicos que podem ocorrer nas condições de cultivo empregadas. Obteve-se o cromatograma do controle abiótico e das amostras de biodegradação (Figura 7) e através da comparação avaliaram-se quais metabólitos eram originados somente pela ação das bactérias no pesticida.

Figura 7. Cromatograma obtido por CLAE-UV para a biodegradação da (±)-lambda-cialotrina (5 d, 32 °C, 130 rpm). Comparação entre o controle abiótico e a biodegradação do pesticida utilizando a bactéria *Bacillus* sp. 5H.



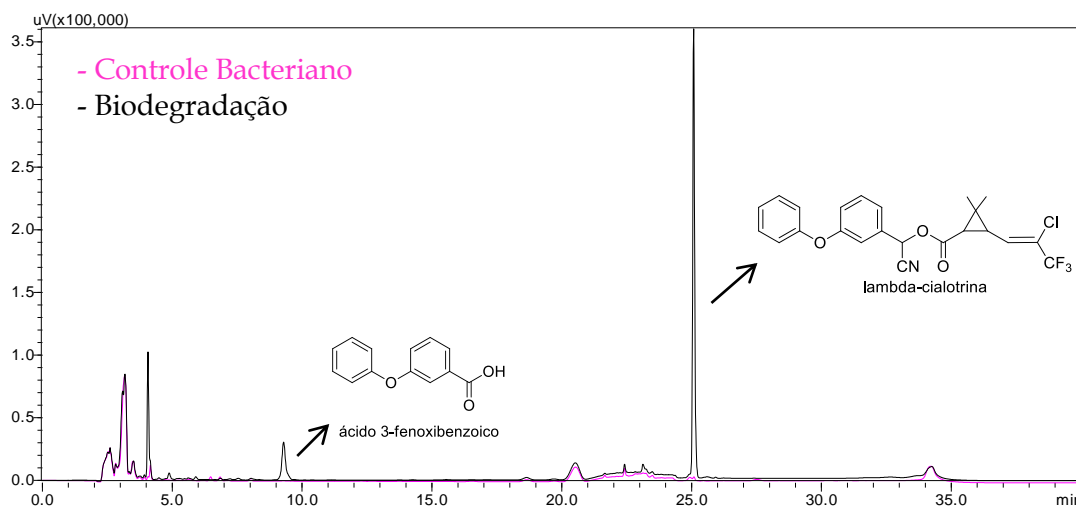
*O pico em aproximadamente 22 min que é observado no cromatograma da amostra de biodegradação não foi identificado, mas provavelmente se deve a algum composto presente na formulação comercial da (±)-lambda-cialotrina que foi empregada nos experimentos, visto que esse também foi encontrado no cromatograma da extração do padrão do pesticida (Figura 8) – extração realizada nas mesmas condições de todas as demais amostras de biodegradação.

Figura 8. Cromatograma obtido por CLAE-UV para a extração do padrão da (±)-lambda-cialotrina.



Em seguida fez-se uma comparação entre os cromatogramas obtidos para o controle bacteriano e para a biodegradação do pesticida visando a observação dos produtos naturais do metabolismo bacteriano que podem interferir na detecção de metabólitos da biodegradação da (±)-lambda-cialotrina (Figura 9).

Figura 9. Cromatograma obtido por CLAE-UV para a biodegradação da (\pm)-lambda-cialotrina (5 d, 32 °C, 130 rpm). Comparação entre o controle bacteriano e a biodegradação do pesticida utilizando a bactéria *Bacillus* sp. 5H.



Os picos que estavam presentes na amostra com pesticida, mas não existiam no controle abiótico (de modo a identificar quais metabólitos eram gerados por eventos físicos-químicos) e bacteriano (que denota os metabólitos do metabolismo natural de cada linhagem bacteriana) foram considerados possíveis produtos gerados pela biodegradação da LC pelas bactérias ambientais.

Foram também realizados experimentos de recuperação e controle de células mortas. A recuperação foi utilizada para mostrar que o método de extração empregado foi eficiente e não houve perda significativa da concentração de LC (Tabela 3) durante as etapas do processo. Os experimentos de controle de células mortas possibilitou concluir que não ocorreu absorção do pesticida pelas mesmas, e, conseqüentemente, sua concentração não é alterada (Tabela 3). Tais resultados mostraram que a lambda-cialotrina foi biodegradada e a diminuição da sua concentração não está significativamente relacionada a outros fatores além da ação bacteriana.

Obteve-se também os cromatogramas dos padrões dos possíveis metabólitos formados: 3-fenoxibenzaldeído, ácido 3-fenoxibenzoico e álcool 3-fenoxibenzílico e também da (\pm)-lambda-cialotrina, observando-se seus

respectivos tempos de retenção e comparando-os com os picos existentes nas amostras. Das onze bactérias que foram analisadas, oito apresentaram somente o pico correspondente ao ácido 3-fenoxibenzoico, sendo que este possui um tempo de retenção de 9,2 min e todas apresentaram o pico correspondente ao pesticida remanescente (25 min). O FBAlc (8,8 min) e o FBAlc (16,8 min) não foram detectados nas análises por CLAE-UV.

Os picos da (\pm)-lambda-cialotrina e do ácido 3-fenoxibenzoico foram integrados e, conhecendo-se os valores das áreas, determinaram-se as concentrações, utilizando-se suas respectivas curvas analíticas. Os valores obtidos para cada uma das onze bactérias e para os diferentes tempos reacionais e meios (somente para a bactéria *Bacillus* sp. 5H) estão listados na [Tabela 3](#).

Por meio das análises pôde-se constatar que todas as bactérias foram capazes de degradar a (\pm)-lambda-cialotrina, pois, para todas as reações a concentração do pesticida foi inferior a 96,6 mg L⁻¹ (concentração do controle abiótico), além disso, a degradação pode ser comprovada pela formação de FBAC. No geral, as bactérias que apresentaram uma biodegradação mais eficiente (*Bacillus* sp. 5H, *Bacillus* sp. 2B e *Bacillus* sp. 2D) também apresentaram uma concentração maior de FBAC (~5 mg L⁻¹). Tais bactérias foram selecionadas para experimentos envolvendo consórcio bacteriano, diferentes meios e maiores tempos reacionais ([Tabela 3](#)).

Tabela 3. Valores das concentrações de (\pm)-lambda-cialotrina e ácido 3-fenoxibenzoico nas amostras após a biodegradação com bactérias ambientais (5 d, 32 °C, 130 rpm).

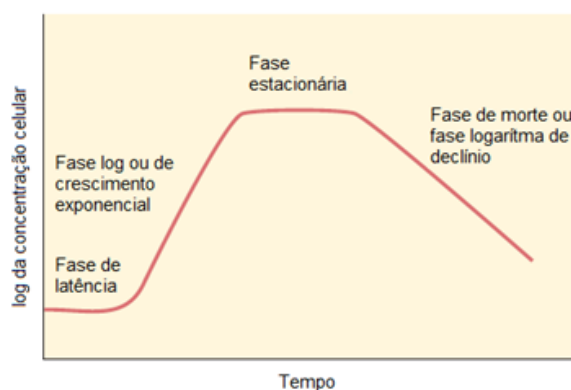
Bactéria	Concentração de lambda-cialotrina (mg L ⁻¹)	Concentração de ácido 3-fenoxibenzoico (mg L ⁻¹)
Controle Abiótico	96,6 \pm 1,1	Nd
Controle de células mortas	103,7 \pm 0,3	Nd
Recuperação	103,1 \pm 1,0	Nd
<i>Curtobacterium</i> sp.1E	96,3 \pm 0,7	Nd
<i>Averyella</i> sp. 4L	93,2 \pm 5,2	Nd
<i>Bacillus</i> sp. 2G	92,8 \pm 0,9	3,3 \pm 0,4
<i>Bacillus</i> sp. 6E	90,9 \pm 8,2	0,4 \pm 0,0
<i>Bacillus</i> sp. 6H	89,8 \pm 0,7	Nd
<i>Bacillus</i> sp. 4T	85,7 \pm 5,0	4,3 \pm 0,5
<i>Pseudomonas</i> sp. 3F	85,5 \pm 1,7	0,2 \pm 0,0
<i>Bacillus</i> sp. 5G	82,5 \pm 3,0	4,3 \pm 0,4
<i>Bacillus</i> sp. 2D	78,4 \pm 3,5	5,3 \pm 0,2
<i>Bacillus</i> sp. 2D (Solução tampão)	69,1 \pm 2,6	3,4 \pm 0,7
<i>Bacillus</i> sp. 2B	77,7 \pm 1,0	4,2 \pm 0,3
<i>Bacillus</i> sp. 2B (Solução tampão)	73,2 \pm 2,0	1,3 \pm 0,7
<i>Bacillus</i> sp. 5H	74,6 \pm 2,8	5,8 \pm 0,4
<i>Bacillus</i> sp. 5H (Mínimo mineral)	102,4 \pm 0,8	Nd
<i>Bacillus</i> sp. 5H (Solução tampão)	87,8 \pm 0,9	Nd
<i>Bacillus</i> sp. 5H (10 d)	67,4 \pm 0,8	6,4 \pm 0,1
<i>Bacillus</i> sp. 5H (15 d)	57,1 \pm 6,0	6,4 \pm 0,2
Consórcio Bacteriano (5H, 2B e 2D)	61,8 \pm 0,9	6,2 \pm 0,2
Consórcio Bacteriano (Solução tampão)	81,7 \pm 2,5	1,9 \pm 0,9

Nd: Não detectado

Os resultados obtidos para 10 e 15 d de reação utilizando-se a bactéria *Bacillus* sp. 5H (Tabela 3) mostraram que a biodegradação foi menos eficiente e mais lenta a partir do quinto dia de reação, pois com o passar do tempo possivelmente as bactérias iniciam a fase de morte celular e portanto realizam a biodegradação do pesticida mais lentamente devido a menor atividade metabólica.

Segundo [Jawetz et al. \(2010\)](#) se um volume fixo de meio líquido foi inoculado com células microbianas retiradas de uma cultura que previamente cresceu até a saturação e o número de células viáveis por mililitro for determinado periodicamente, em geral, se obtém uma curva do tipo apresentada na [Figura 10](#). Tal curva pode ser dividida em quatro fases: latência (não há crescimento), log (crescimento constante), estacionária (sem crescimento) e declínio (taxa de crescimento negativo – morte).

Figura 10. Curva de crescimento bacteriano ([Jawetz et al., 2010](#)).



O consórcio bacteriano envolvendo as bactérias *Bacillus* sp. 5H, *Bacillus* sp. 2B e *Bacillus* sp. 2D mostrou-se mais eficiente do que cultivos individuais para 5 d de biodegradação, apresentando uma redução de 38,3% da concentração da (±)-lambda-cialotrina ([Tabela 3](#)).

Nos experimentos com o cultivo tamponado, para bactérias individuais e para o consórcio, foi possível observar que as células foram capazes de biodegradar o pesticida mesmo na ausência de uma fonte de carbono adicional. Entretanto, em meio mineral constatou-se que as células não foram capazes de se desenvolver na presença da formulação comercial de pesticida como fonte de nutrientes, visto que a concentração de (±)-lambda-cialotrina não se alterou significativamente ([Tabela 3](#)).

4.2.2. Determinação da razão enantiomérica

A (±)-lambda-cialotrina é a mistura de dois enantiômeros: (*Sa*, 1*R*, 3*R*)-lambda-cialotrina e (*Ra*, 1*S*, 3*S*)-lambda-cialotrina ([Figura 2](#)) que pode ser biodegradada enantiosseletivamente, como para a bactéria *Bacillus* sp. 5H ([Figura](#)

11), que apresentou a razão 41:59 ou que pode ser biodegradada igualmente, como ocorreu no caso da bactéria *Pseudomonas* sp. 3F (Figura 12) que apresentou razão 50:50 (Tabela 4).

Figura 11. Cromatograma obtido por CLAE-UV para a biodegradação da (\pm)-lambda-cialotriana (5 d, 32 °C, 130 rpm) utilizando-se coluna quiral. Comparação entre o controle bacteriano e a biodegradação do pesticida pela bactéria *Bacillus* sp. 5H.

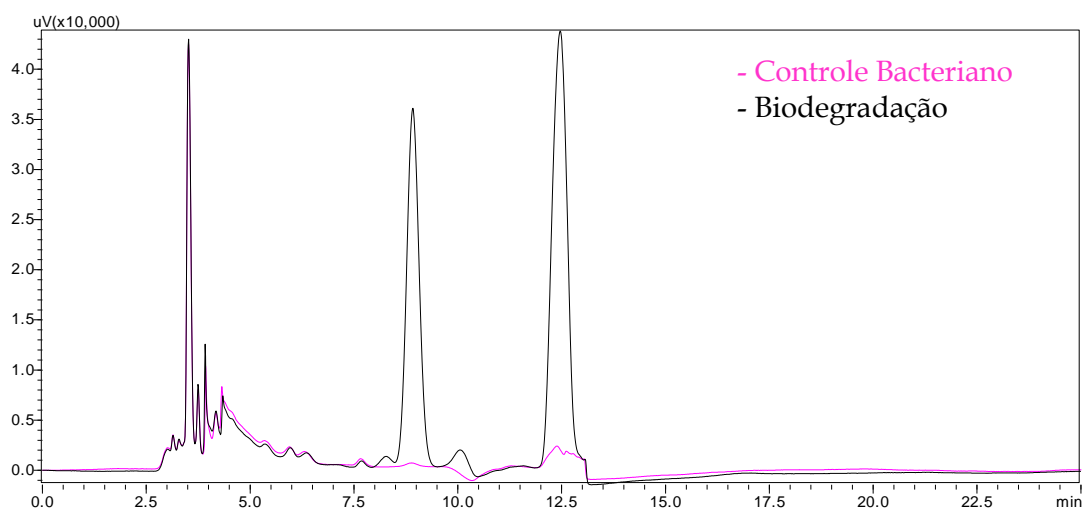


Figura 12. Cromatograma obtido por CLAE-UV para a biodegradação da (\pm)-lambda-cialotriana (5 d, 32 °C, 130 rpm) utilizando-se coluna quiral. Comparação entre o controle bacteriano e a biodegradação do pesticida pela bactéria *Pseudomonas* sp. 3F.

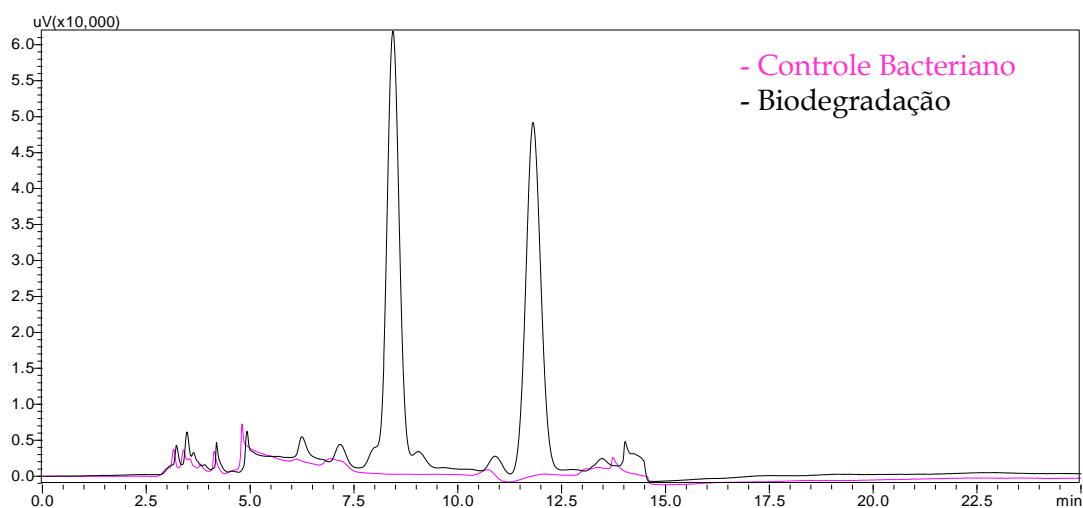


Tabela 4. Razões enantioméricas nas amostras após a biodegradação com bactérias ambientais (5 d, 32 °C, 130 rpm).

Bactéria	Razão Enantiomérica*	% de biodegradação
Controle Abiótico	50:50	3
<i>Curtobacterium</i> sp.1E	50:50	4
<i>Averyella</i> sp. 4L	50:50	6
<i>Bacillus</i> sp. 6E	50:50	9
<i>Bacillus</i> sp. 6H	50:50	10
<i>Pseudomonas</i> sp. 3F	50:50	14
<i>Bacillus</i> sp. 2B	48:52	22
<i>Bacillus</i> sp. 4T	46:54	14
<i>Bacillus</i> sp. 5G	46:54	17
<i>Bacillus</i> sp. 2G	43:57	7
<i>Bacillus</i> sp. 2D	43:57	22
<i>Bacillus</i> sp. 5H	41:59	25
<i>Bacillus</i> sp. 5H (10 d)	40:60	33
<i>Bacillus</i> sp. 5H (15 d)	39:61	43

*Dados obtidos a partir das análises por CLAE-UV utilizando-se coluna quiral (OD- H).

Observou-se que as bactérias com maior potencial de biodegradação (*Bacillus* sp. 5H, *Bacillus* sp. 2B, *Bacillus* sp. 2D) foram aquelas que degradaram preferencialmente um dos enantiômeros da LC, ou seja, aquelas que apresentaram alguma enantiosseletividade. Mesmo porque as linhagens que apresentaram baixa biodegradação da lambda-cialotrina não produziram uma razão enantiomérica detectável, como ocorreu com as bactérias *Bacillus* sp. 6E, *Curtobacterium* sp. 1E, *Pseudomonas* sp. 3F, *Averyella* sp.4L e *Bacillus* sp. 6H.

Poucos trabalhos foram relatados na literatura abordando a biodegradação seletiva de estereoisômeros de pesticidas quirais. A degradação da β -cipermetrina e da β -ciflutrina em solo foi estudada, onde se observou que ocorrem diastereosseletividade e enantiosseletividade durante o processo de degradação (Li *et al.*, 2008). Destaca-se que estas reações não foram realizadas com microrganismos isolados. Em outro estudo foi observada a degradação enantiosseletiva, também em solo, da *cis*-bifentrina, permetrina e ciflutrina em

condições ambiente (Qin *et al.*, 2006). Para nosso conhecimento, a cipermetrina foi o único piretroide que teve sua biodegradação enantiosseletiva estudada por microrganismos descrita na literatura, assim como em sistemas aquáticos (Liu *et al.*, 2005). A (\pm)-lambda-cialotrina não tem sua biodegradação enantiosseletiva estudada, de modo que não está descrito na literatura estudos da degradação enantiosseletiva deste pesticida.

4.2.3. Identificação de metabólitos a partir da degradação da (\pm)-lambda-cialotrina

A cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas foi utilizada para a identificação de produtos da biodegradação que não foram detectados por CLAE-UV. As amostras e os controles bacterianos das onze bactérias foram analisados nas mesmas condições e foi possível a comparação dos cromatogramas obtidos.

Para a biodegradação utilizando a bactéria *Bacillus* sp. 5H foram encontrados sete picos que estavam presentes somente na amostra de biodegradação (Figura 13) e que poderiam ser produtos da ação das bactérias sobre o pesticida. Os picos correspondentes aos compostos formados pela biodegradação do pesticida foram identificados como A (9,1 min), B (12,6 min), C (14,4 min), D (16,3 min), E (23,9 min), F (26,2 min), G (27,1 min) e H (27,2 min).

Figura 13. Cromatograma (TIC) obtido por CG-EM para a biodegradação da (\pm)-lambda-cialotrina (10 d, 32 °C, 130 rpm) para a bactéria *Bacillus* sp. 5H. Comparação entre o controle bacteriano e a amostra de biodegradação do pesticida.

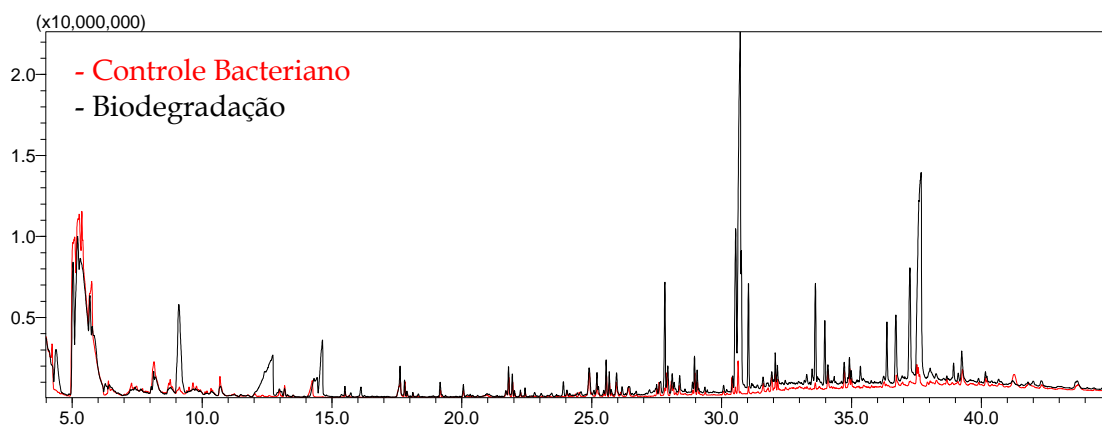


Figura 14. Ampliação do cromatograma obtido por CG-EM (Figura 13) para a biodegradação da (\pm)-lambda-cialotrina (10 d, 32 °C, 130 rpm) para a bactéria *Bacillus* sp. 5H. Comparação entre o controle bacteriano e a amostra de biodegradação do pesticida entre 8,5 e 16,5 min.

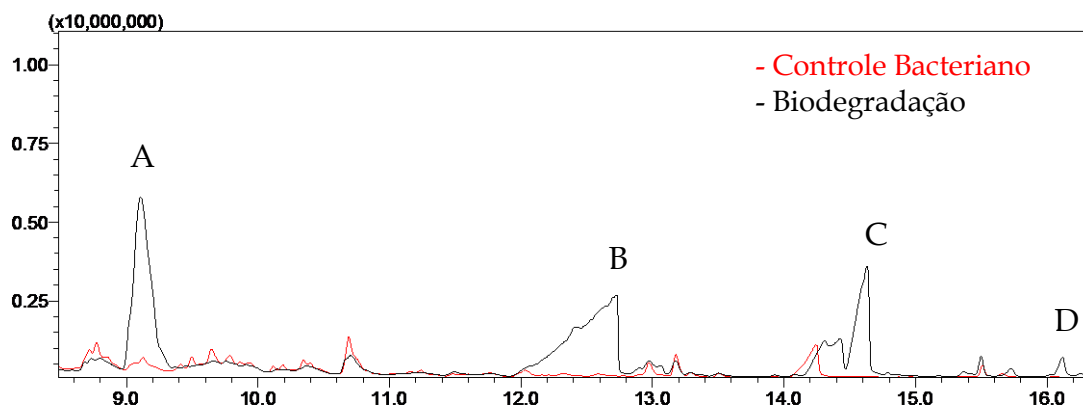
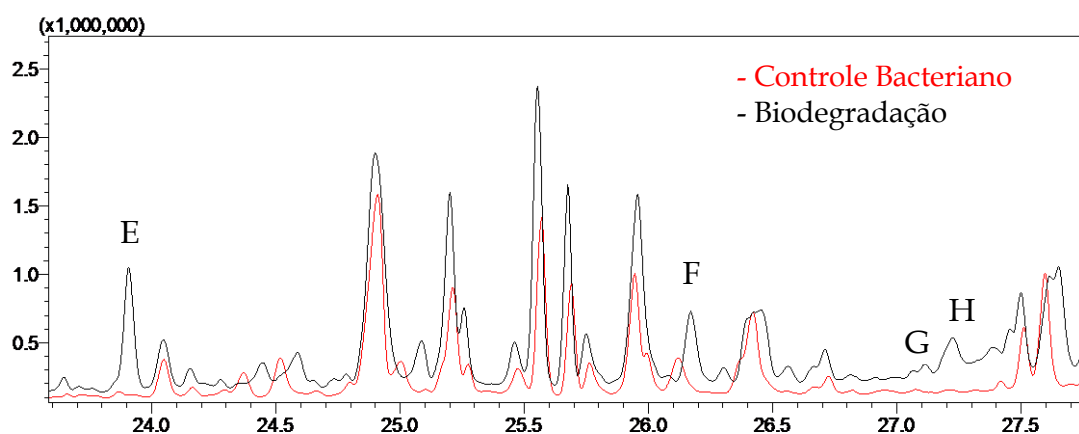


Figura 15. Ampliação do cromatograma obtido por CG-EM (Figura 14) para a biodegradação da (\pm)-lambda-cialotrina (10 d, 32 °C, 130 rpm) para a bactéria *Bacillus* sp. 5H. Comparação entre o controle bacteriano e a amostra de biodegradação do pesticida entre 23,5 e 27,5 min.

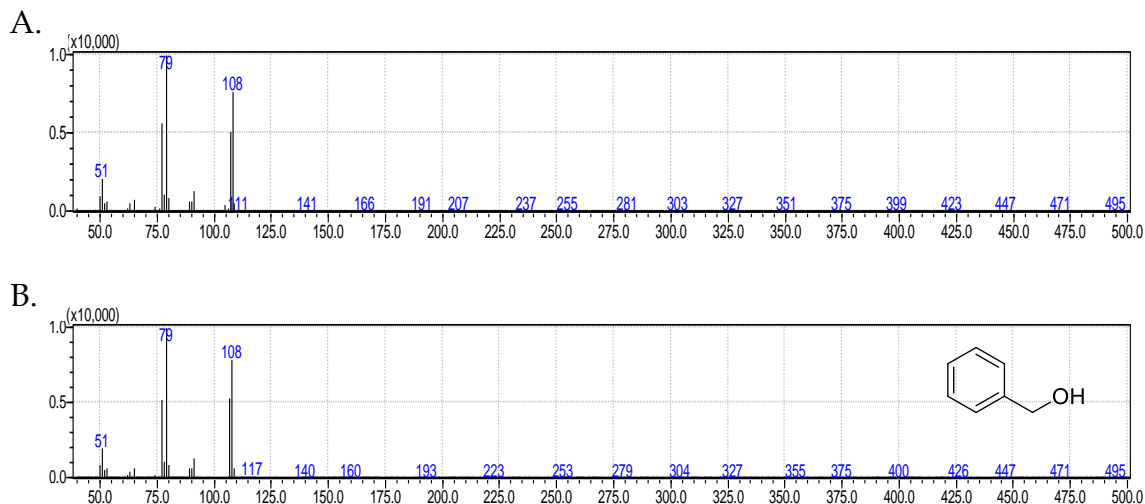


Obteve-se o espectro de massas dos oito compostos e, utilizando-se a biblioteca de dados NIST 05, pôde-se propor a estrutura de cada metabólito utilizando-se a similaridade dos espectros (acima de 90%). Em alguns casos foi realizada a comparação com o espectro de padrões autênticos, levando-se também em conta o tempo de retenção de cada composto.

O composto A possui uma massa molar de 108 g mol^{-1} , correspondente à fórmula molecular $\text{C}_7\text{H}_8\text{O}$, utilizando-se a biblioteca NIST 05 obteve-se 97% de similaridade com o álcool benzílico. A identidade do composto A foi confirmada após obtenção do espectro de massas do padrão do álcool. Observou-se que o

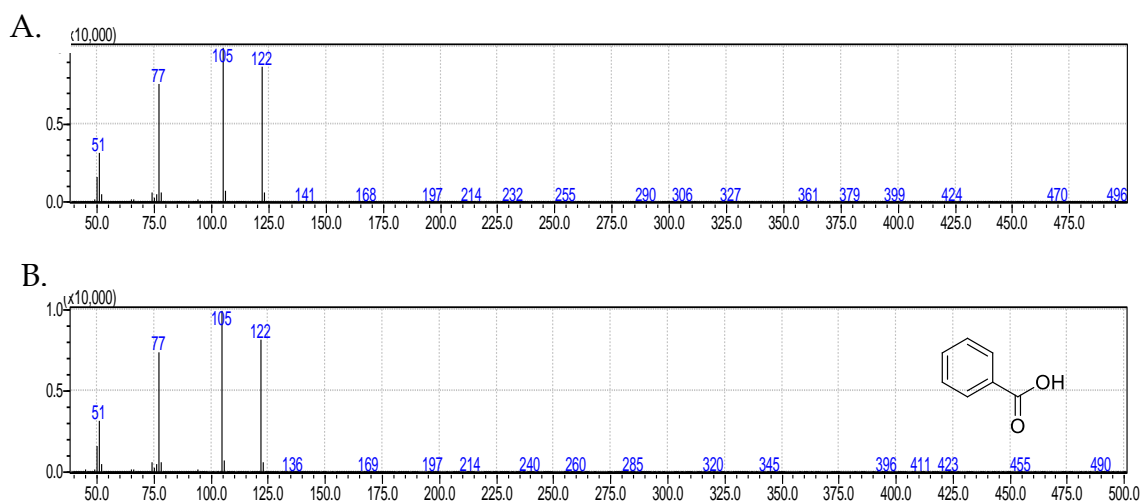
padrão possuía o mesmo tempo de retenção que o composto (9,1 min) e seus espectros de massas (Figura 16) apresentaram-se muito semelhantes.

Figura 16. Espectro de massas (70 eV) obtido por CG-EM (A) do composto A e (B) do padrão do álcool benzílico.



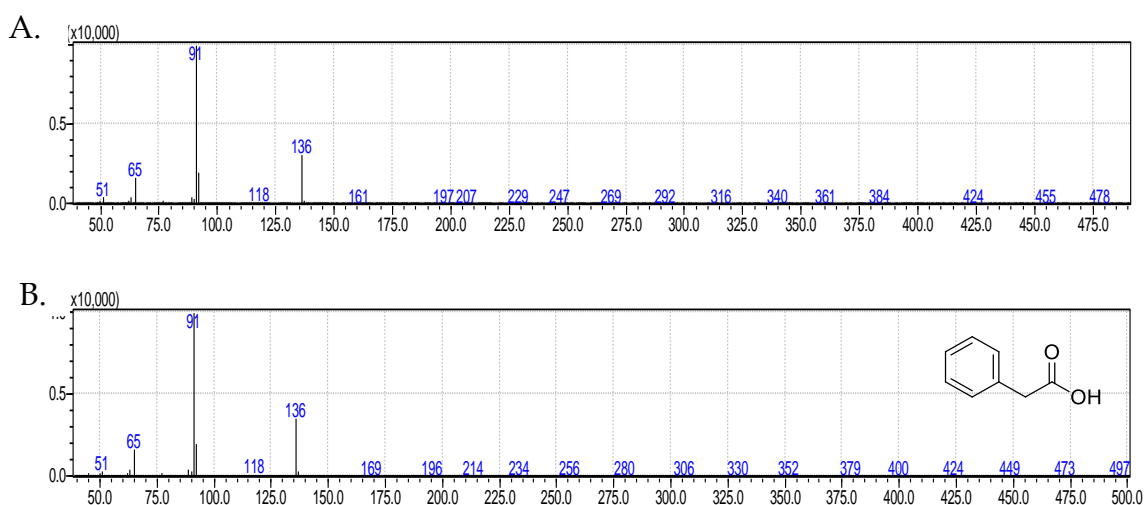
O composto B (Figura 17) apresentou uma massa molar de 122 g mol^{-1} , referente à fórmula $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_2$, e 98% de similaridade com o ácido benzoico. Obteve-se o cromatograma e o espectro de massas do ácido benzoico e pôde-se confirmar a identidade do composto B, visto que o tempo de retenção do padrão do ácido foi o mesmo que o da amostra, 12,6 min e seus espectros de massas foram similares.

Figura 17. Espectro de massas (70 eV) obtido por CG-EM (A) do composto B e (B) do padrão do ácido benzoico.



A massa molar do *composto C* foi de 136 g mol⁻¹, correspondente à fórmula molecular C₈H₈O₂, seu espectro de massa possui 96% de similaridade com o do ácido feniletanoico. O padrão para o ácido feniletanoico apresentou um tempo de retenção de 14,4 min, assim como o *composto C*, e um espectro de massas semelhante ao da amostra (Figura 18), desta forma pôde-se confirmar a identidade do composto.

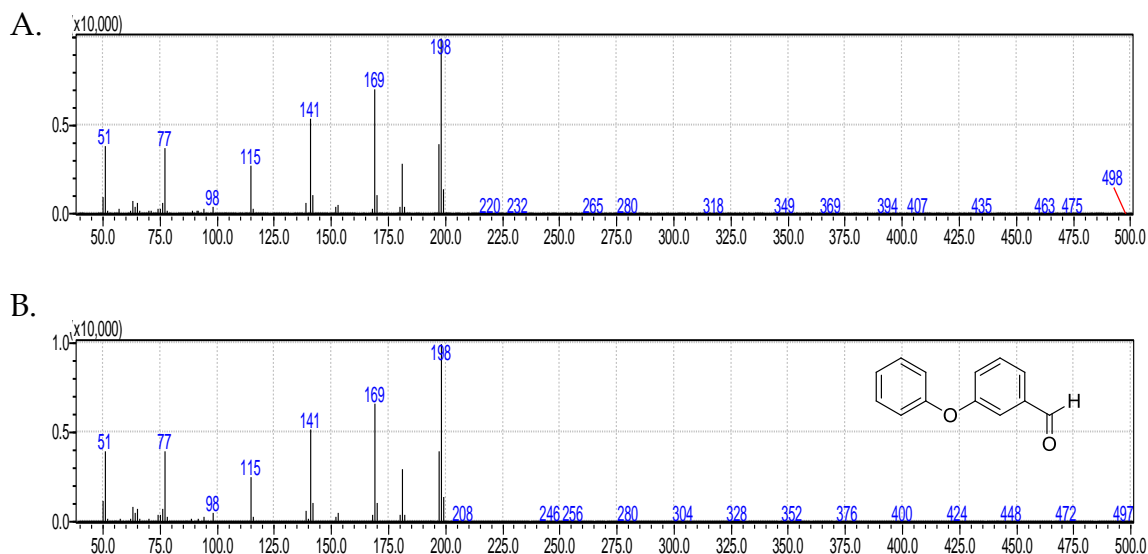
Figura 18. Espectro de massas (70 eV) obtido por CG-EM (A) do composto C e (B) do padrão do ácido feniletanoico.



O *composto E* apresentou uma massa molar igual a 198 g mol⁻¹, referente à fórmula molecular C₁₃H₁₀O₂ e seu espectro de massas apresentou 93% de similaridade com o espectro do 3-fenoxibenzaldeído. Obteve-se o cromatograma e o espectro de massas do padrão do 3-fenoxibenzaldeído e pôde-se confirmar a identificação do *composto E*, visto que o tempo de retenção do padrão do aldeído foi o mesmo que o da amostra (19,1 min) e seus espectros foram semelhantes (Figura 19).

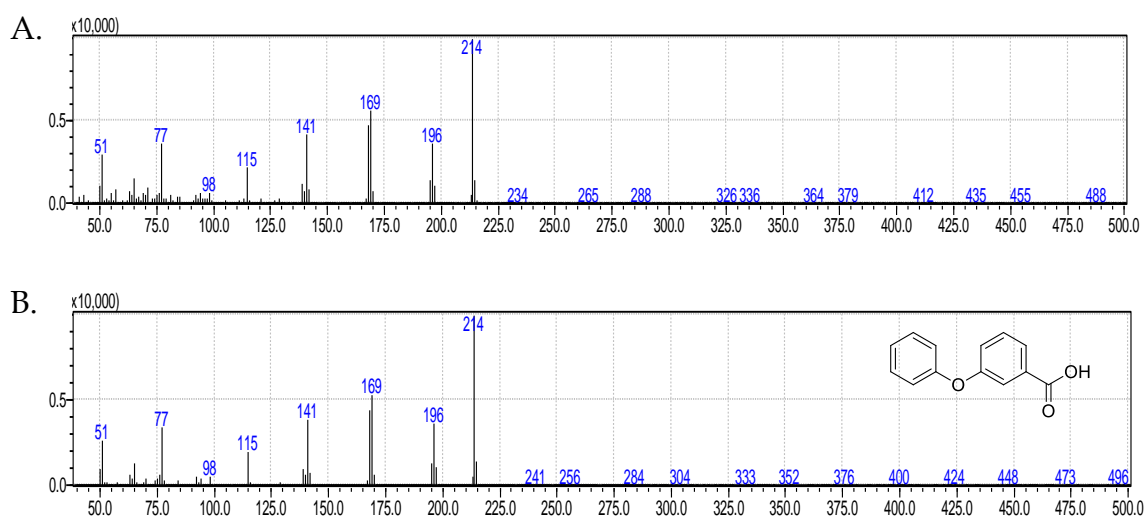
O 3-fenoxibenzaldeído (*composto E*) não foi detectado nas análises por CLAE-UV, entretanto foi observado nas análises por CG-EM, este fato é explicado pela instabilidade da (±)- lambda-cialotrina em altas temperaturas de análise, de modo que este composto pode ser um metabólito resultante da instabilidade do pesticida (Biroli, 2013), o qual foi confirmado pela análise do padrão autêntico.

Figura 19. Espectro de massas (70 eV) obtido por CG-EM (A) do composto D e (B) do padrão do 3-fenoxibenzaldeído.



O composto *H* apresentou uma massa molar de 214 g mol^{-1} , correspondente a fórmula molecular $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{O}_3$, e seu espectro de massas apresentou 88% de similaridade com o espectro do ácido 3-fenoxibenzoico. O padrão para o ácido 3-fenoxibenzoico apresentou um tempo de retenção de 27,2 min, assim como o composto *H* (Figura 20), e um espectro de massas muito semelhante ao da amostra, desta forma pôde-se confirmar a sua identidade.

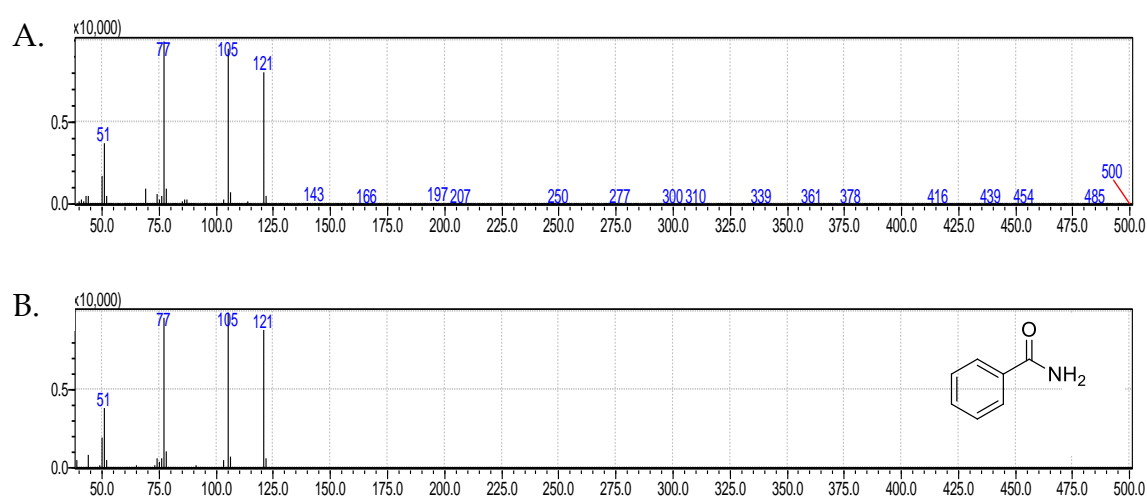
Figura 20. Espectros de massas (70 eV) obtidos por CG-EM do composto *H* (A) e do ácido 3-fenoxibenzoico (B).



Para os compostos *D*, *F* e *G* não foi possível a confirmação da identificação destes compostos utilizando-se padrões. Neste caso considerou-se somente a similaridade obtida pela comparação com moléculas da biblioteca NIST 05.

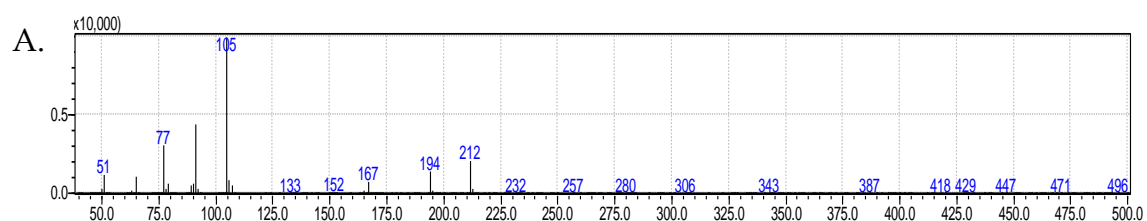
O composto *D* apresentou massa molar de 121 g mol⁻¹, correspondente à fórmula molecular C₇H₇NO e seu espectro de massas apresentou 96% de similaridade com o espectro de massas da benzamida (Figura 21).

Figura 21. Espectros de massas obtidos por CG-EM do composto D (A) e da benzamida (B).

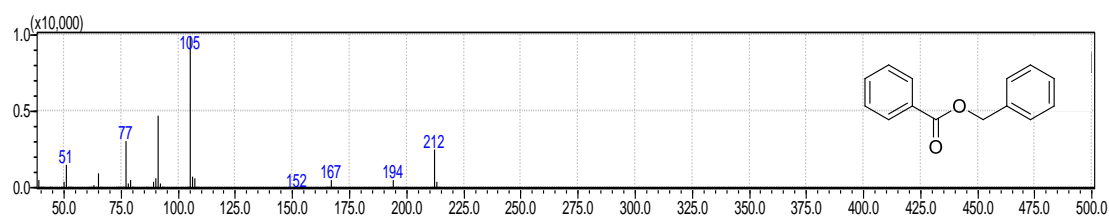


A massa molar para o composto *F* foi de 212 g mol⁻¹, correspondente à fórmula molecular C₁₄H₁₂O₂. Seu espectro de massas apresentou 97% de similaridade com o espectro do benzoato de benzila (Figura 22).

Figura 22. Espectros de massas (70 eV) obtidos por CG-EM do composto F (A) e do benzoato de benzila (B).

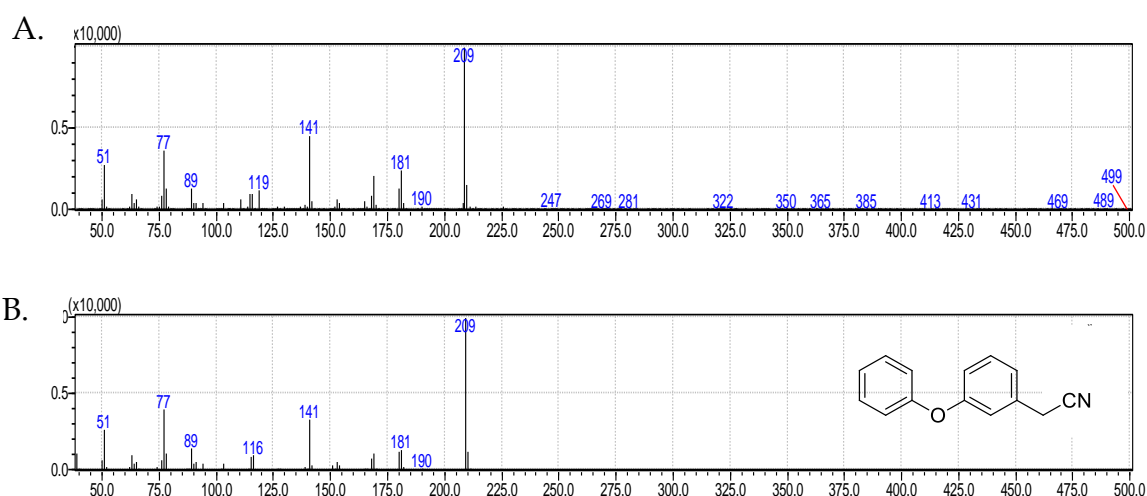


B.



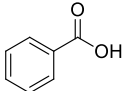
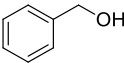
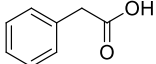
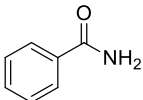
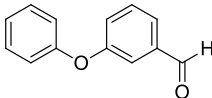
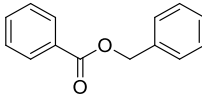
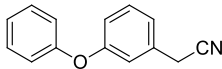
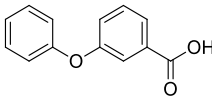
O composto G apresentou massa molar igual a 209 g mol⁻¹, referente a fórmula molecular C₁₄H₁₁NO e seu espectro de massas possui 91% de similaridade com o espectro do 2-(3-fenoxifenil)acetonitrila (Figura 23). Supõe-se que este metabolito foi produzido por um processo de radicais livres. Esta hipótese baseia-se no fato de que as reações radicalares são abundantes *in vivo* (Tortora, 2010), e um intermediário radicalar poderia ser estabilizado pela presença do grupo ciano e anel benzênico. Na literatura este tipo de reação foi relatada na hidrogenação de ésteres de cianidrina (Veum *et al.*, 2006).

Figura 23. Espectros de massas (70 eV) obtidos por CG-EM do composto G (A) e do 2-(3-fenoxifenil)acetonitrila (B).



As análises foram realizadas para as todas as bactérias e os metabólitos encontrados estão descritos na Tabela 5.

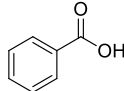
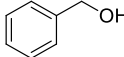
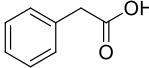
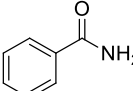
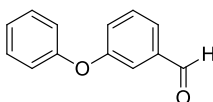
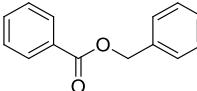
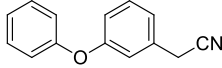
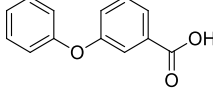
Tabela 5. Metabólitos presentes na biodegradação da (±)-lambda-cialotrina para cada uma das bactérias (detectados por CLAE e CG-EM).

Metabólito	Bactérias									
	1E	2B	6E	3F	5G	4T	2G	2D	4L	6H
 ácido benzoico	x	x	x	-	x	x	x	x	x	-
 álcool benzílico	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
 ácido feniletanoico	-	x	-	-	-	x	-	-	-	-
 benzamida	-	x	-	-	x	x	x	x	x	-
 3-fenoxibenzaldeído	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
 benzoato de benzila	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
 2-(3-fenoxifenil)acetonitrila	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
 ácido 3-fenoxibenzoico	-	x	x	x	x	x	x	x	-	-

(x): detectado; (-): não detectado

A [Tabela 6](#) apresenta os metabólitos encontrados utilizando-se a bactéria *Bacillus* sp. 5H e variando-se os tempos reacionais e os meios de biodegradação.

Tabela 6. Metabólitos presentes na biodegradação da (\pm)-lambda-cialotrina utilizando-se a bactéria *Bacillus* sp. 5H, variando-se os tempos de reação e o meios (detectados por CLAE e CG-EM).

Metabólito	<i>Bacillus</i> sp. 5H				
	5 d	10 d	15 d	Mínimo mineral	Solução tampão
 ácido benzoico	x	x	X	-	x
 álcool benzílico	x	x	x	-	x
 ácido feniletanoico	-	x	x	-	-
 benzamida	x	x	x	-	-
 3-fenoxibenzaldeído	x	x	x	x	x
 benzoato de benzila	x	x	x	x	x
 2-(3-fenoxifenil)acetoneitrila	x	x	x	-	x
 ácido 3-fenoxibenzoico	x	x	x	-	-

(x): detectado; (-): não detectado

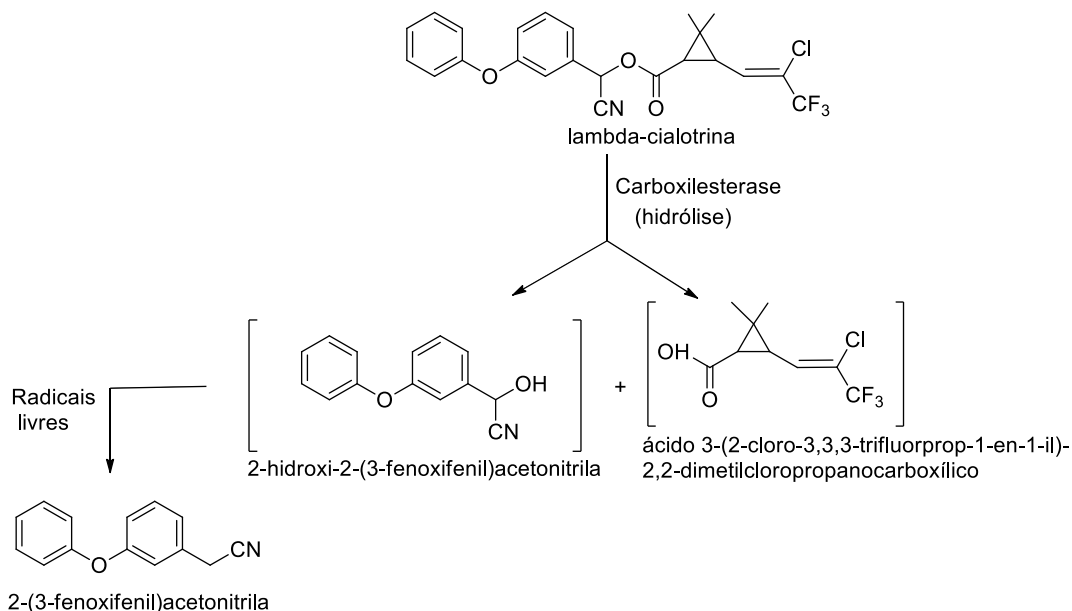
Observa-se que para o meio mínimo mineral poucos metabólitos foram encontrados, pois neste caso, como discutido anteriormente, a bactéria *Bacillus*

sp. 5H não conseguiu se desenvolver no meio mínimo e, portanto, o pesticida foi pouco biodegradado.

4.3. Proposta de rota de biodegradação da (±)-lambda-cialotrina

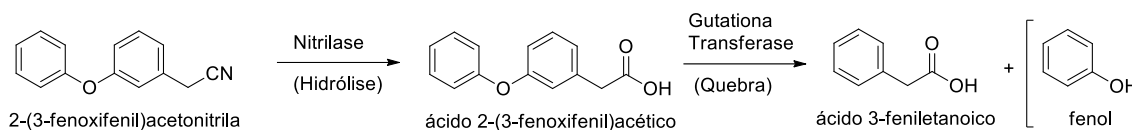
Inicialmente, a (±)-lambda-cialotrina pode sofrer uma reação de hidrólise por carboxilesterases, dando origem ao ácido 3-(2-cloro-3,3,3-trifluorprop-1-en-1-il)-2,2-dimetilcloropropanocarboxílico e 2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila. Possivelmente a 2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila pode sofrer reações via radicais livres, dando origem a 2-(3-fenoxifenil)acetonitrila (Figura 24). As carboxiesterases são enzimas que realizam a hidrólise de ligações de ésteres, formando a cianidrina e o ácido correspondentes (ExPASy, 2015).

Figura 24. Proposta de hidrólise da (±)-lambda-cialotrina por carboxilases de bactérias.



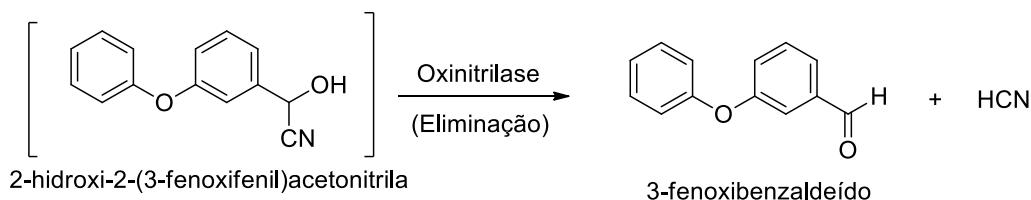
A 2-(3-fenoxifenil)acetonitrila pode ser convertida em ácido 2-(3-fenoxifenil)acético pela ação da enzima nitrilase, capaz de hidrolisar nitrilas transformando-as em ácido carboxílicos (ExPASy, 2015). Em seguida, a enzima glutathione transferase, que atua na quebra de ligações éteres (Masai *et al.*, 2003), pode converter o ácido 2-(3-fenoxifenil)acético em ácido 3-feniletanoico e fenol (Figura 25).

Figura 25. Proposta de biotransformação da 2-(3-fenoxifenil)acetonitrila ao 2-(3-fenoxifenil)acético pela ação da enzima nitrilase e do ácido 2-(3-fenoxifenil)acético em ácido 3-feniletanoico e fenol pela ação da enzima glutatona transferase.



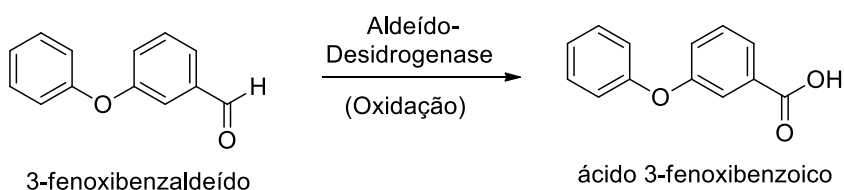
A 2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila pode ser convertida bioticamente ao 3-fenoxibenzaldeído pela ação da enzima oxinitrilase, a qual converte cianidrinhas a aldeídos e ácido cianídrico (ExPASy, 2015).

Figura 26. Proposta de biotransformação do 2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila ao 3-fenoxibenzaldeído pela ação da enzima oxinitrilase.



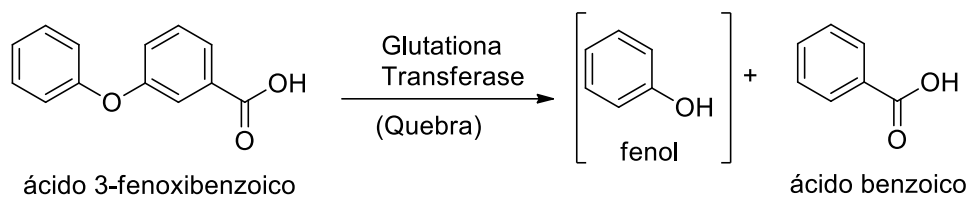
O 3-fenoxibenzaldeído pode ser biotransformado ao ácido 3-fenoxibenzoico pela ação de uma aldeído-desidrogenase, uma enzima que oxida aldeídos aos seus correspondentes ácidos carboxílicos, que, neste caso, é o ácido 3-fenoxibenzoico (ExPASy, 2015).

Figura 27. Proposta de oxidação do 3-fenoxibenzaldeído ao ácido 3-fenoxibenzoico pela ação da enzima aldeído-desidrogenase



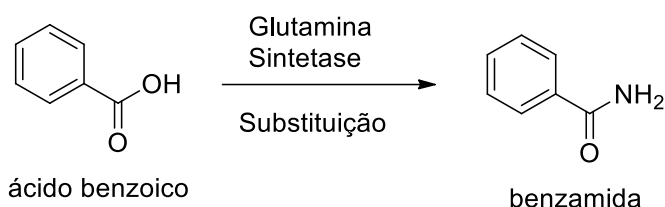
A enzima glutatona transferase (Masai *et al.*, 2003) também pode atuar convertendo o ácido 3-fenoxibenzoico em ácido benzoico e fenol pela quebra da ligação éter (Figura 28). Outros estudos envolvendo microrganismos já documentaram a oxidação do 3-fenoxibenzaldeído em ácido 3-fenoxibenzoico seguida da formação do fenol e de um ácido carboxílico (Tallur, 2007).

Figura 28. Proposta de biotransformação do ácido 3-fenoxibenzoico ao ácido benzoico pela ação da enzima glutatona transferase.



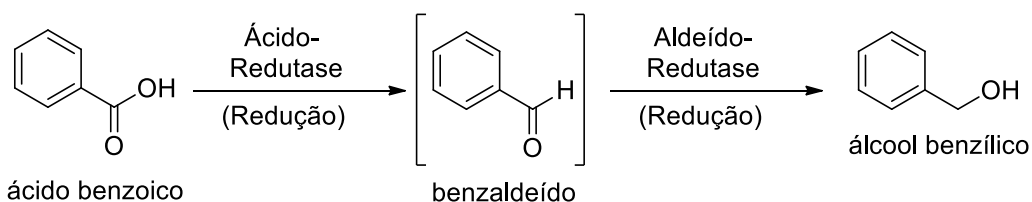
O ácido benzoico pode ser convertido bioticamente em amida pela ação da enzima glutamina sintetase (Figura 29). Esta enzima transforma um carboxilato em fosfato de acila e, por uma reação de substituição, o fosfato de acila é convertido à correspondente amida (ExPASy, 2015).

Figura 29. Proposta de biotransformação do ácido benzoico a amida pela ação da enzima glutamina sintetase.



O ácido benzoico também pode ser transformado bioticamente em álcool benzílico pela ação das enzimas ácido-redutase e aldeído-redutase (Figura 30), as quais atuam reduzindo ácidos carboxílicos a aldeídos e aldeídos a álcoois, respectivamente. Tais reações de redução envolvendo ácidos carboxílicos já foram documentadas por outros autores utilizando-se as bactérias *Nocardia* sp. (Li *et al.*, 2000) e *Mycobacterium marinum* (Akhtar *et al.*, 2013).

Figura 30. Proposta de biotransformação do ácido benzoico ao álcool benzílico pela ação da enzima ácido- redutase.



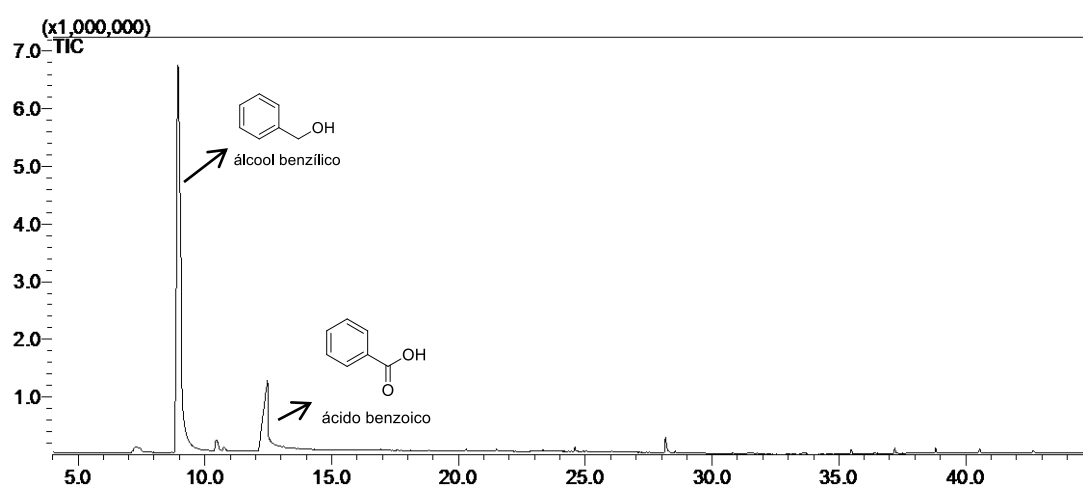
Possivelmente o álcool benzílico e o ácido benzoico também podem sofrer a ação de uma esterase, dando origem ao benzoato de benzila (Figura 31). A esterase é uma enzima capaz de realizar esterificação, transformando ácidos

carboxílicos e álcoois em ésteres (ExPASy, 2015). Tal reação pode ser considerada enzimática, pois se preparou uma mistura contendo o ácido benzoico e álcool benzílico e analisou por CG-EM. De acordo com a análise verificou-se que não houve a formação do benzoato de benzila a partir da mistura de ácido benzoico e álcool benzílico. Concluiu-se que o benzoato de benzila possivelmente foi formado devido à ação de enzimas das bactérias e não por possíveis efeitos térmicos no sistema de cromatografia a gás (Figura 32).

Figura 31. Esterificação do álcool benzílico e do o ácido benzoico dando origem ao benzoato de benzila pela ação da enzima esterase.



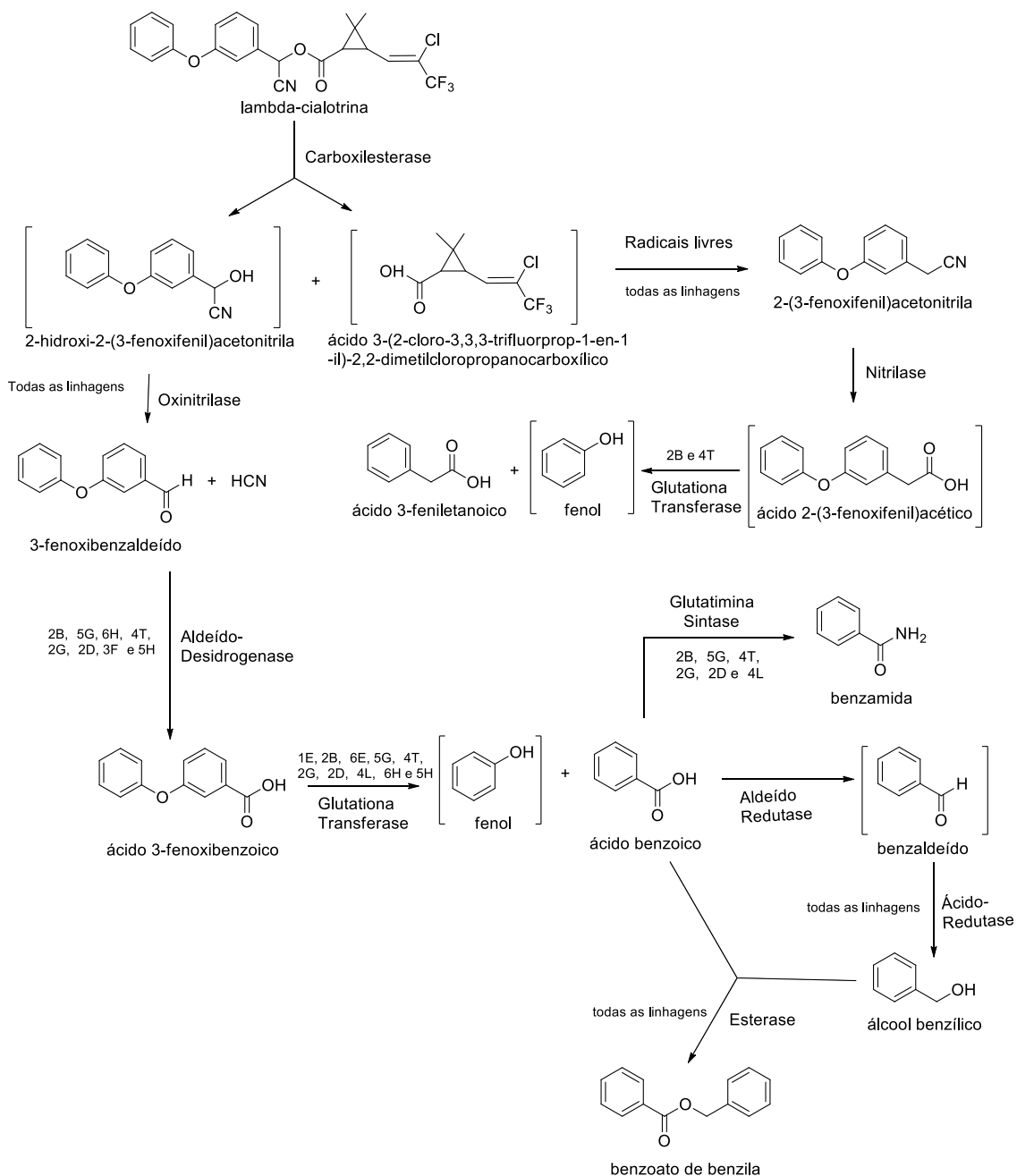
Figura 32. Cromatograma obtido por CG-EM para uma mistura de ácido benzoico e álcool benzílico.



Alguns metabólitos já foram observados em outros estudos de biodegradação da (\pm)-lambda-cialotrina, como o ácido 3-fenoxibenzoico e o fenol (Chen *et al.*, 2015). Em estudos envolvendo outros piretroides como a β -cipermetrina (Xiao *et al.*, 2015, Pankaj *et al.*, 2016) e a fempropratrina (Wang *et al.*, 2015) também foram identificados o 3-fenoxibenzaldeído e ácido 3-fenoxibenzoico.

A [Figura 33](#) ilustra a rota de biodegradação da (±)-lambda-cialotrina proposta a partir da identificação dos metabólitos produzidos.

Figura 33. Evidências da rota completa para a biodegradação da (±)-lambda-cialotrina por bactérias ambientais.



* As linhagens de bactérias estão citadas na [Tabela 3](#).

5. CONCLUSÃO

Neste estudo observou-se a biodegradação da (\pm)-lambda-cialotrina por diferentes linhagens bacterianas. Foi possível concluir que todas as linhagens empregadas foram capazes de acelerar a biodegradação da (\pm)-lambda-cialotrina. Pôde-se observar também que as bactérias mais eficientes no processo de biodegradação do pesticida são as que apresentaram a maior quantidade de metabólitos formados e a maior enantiosseletividade: *Bacillus* sp. 5H com biodegradação igual a 25,4% e razão enantiomérica 41:59 e *Bacillus* sp. 2B com 22,3% de biodegradação e razão enantiomérica 48:52.

Aumentando-se o tempo reacional pôde-se observar pouca mudança nos valores de biodegradação, pois acredita-se que com o passar dos dias as bactérias iniciam sua fase de morte ou diminuição da taxa metabólica e a biodegradação deixa de ser significativa.

Observou-se que o desenvolvimento bacteriano foi dependente da composição do seu meio de cultivo, visto que no meio mínimo mineral quase não houve biodegradação da LC, e que as bactérias apresentam maior potencial de biodegradação quando cultivadas em consórcio (*Bacillus* sp. 5H, *Bacillus* sp. 2B e *Bacillus* sp. 2D), visto que se alcançou uma diminuição de 38,3% na concentração do pesticida.

A utilização de métodos cromatográficos na identificação dos metabólitos formados possibilitou a proposta de uma rota de biodegradação para a (\pm)-lambda-cialotrina composta pelo 3-fenoxibenzaldeído, ácido 3-feniletanoico, ácido 3-fenoxibenzoico, ácido benzoico, álcool benzílico e benzoato de benzila, todos confirmados com padrões autênticos.

Concluiu-se que linhagens de bactérias possivelmente atuam conjuntamente na biodegradação da LC no solo. A biodegradação do pesticida, em geral, formou compostos mais polares, em apenas 5 d de reação.

Outros estudos precisam ser realizados para que essas bactérias possam ser empregadas na biorremediação de solos contaminados, destacando-se a

avaliação da toxicidade dos metabólitos formados, pois estes, por serem menores e mais polares, podem ser mais facilmente lixiviados e podem levar a contaminação de lençóis freáticos e outros corpos hídricos. Além disso, a maioria dos experimentos foram realizados empregando-se 5 dias de reação, nessa fase ocorrem preferencialmente as reações de *fase I*: oxidação, redução e hidrólise; acredita-se que aumentando o tempo de contato das bactérias com o pesticida terão início as reações de *fase II*, que são reações de conjugação, e estas podem dar origem a metabólitos menos tóxicos.

Também seria interessante realizar experimentos com diferentes concentrações de pesticida, analisar a cinética de degradação da LC e de formação dos metabólitos identificados e realizar análise diretamente em solos contaminados.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKHTAR, M.K.; TURNER, N.J.; JONES, P.R. Carboxylic acid reductase is a versatile enzyme for the conversion of fatty acids into fuels and chemical commodities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.110, p. 87-92, 2013.
- ALMEIDA, F. V.; CENTENO, A. J.; BISINOTI, M. C.; JARDIM, W. F. Substâncias tóxicas persistentes (STP) no Brasil. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1976-1985, 2007.
- BARROT, R. Critical comment on the symptomatology of pyrethroid poisoning. **Arbeitsmedizin Sozialmedizin Umweltmedizin**, v. 31, p. 196-203, 1996.
- BRADBERRY, S.M.; CAGE, S.A.; PROUDFOOT, A.T.; ALLISTER, V.J. Poisoning due to pyrethroids. **Toxicological Reviews**, v. 24, p. 93-106, 2005.
- BROOKS, G. F., JAWETZ, E., MELNICK, J. L., & ADELBURG, E. A. **Jawetz, Melnick, & Adelberg's medical microbiology**. New York, McGraw Hill Medical, 2010.
- CHEN, S.; LAI, K.; LI, Y.; HU M.; ZHANG, Y.; ZENG, Y. Biodegradation of deltamethrin and its hydrolysis product 3-phenoxybenzaldehyde by a newly isolated *Streptomyces aureus* strain HP-S-01. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 1471-1483, 2011a.
- CHEN, S.; YANG, L.; HU, M.; LIU, J. Biodegradation of fenvalerate and 3-phenoxybenzoic acid by a novel *Stenotrophomonas* sp. strain ZS-S-01 and its use in bioremediation of contaminated soils. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 90, p. 755-767, 2011b.
- CHEN, Z.; WANG, Y. Chromatographic methods for the determination of pyrethrin and pyrethroid pesticide residues in crops, foods and environmental samples. **Journal Chromatography A.**, v.754, p.367-395, 1996.
- CHEN, S.; LUO, J.; HU, M.; LAI, K.; GENG, P.; XIAO, Y. Isolation, identification, degradation characteristics and pathway of a pyrethroid-degrading bacterial strain. **Huanjing Kexue Xuebao/ Acta Scientiae Circumstantiae**, v. 31, p. 1616-1626, 2011c.
- CHEN, S.; HU, Q.; HU, M.; LUO, J.; WENG, Q.; LAI, K. Isolation and characterization of a fungus able to degrade pyrethroids and 3-phenoxybenzaldehyde. **Bioresource Technology**, v.102, p. 8110-8116, 2011d.
- CHEN, S.; HU, W.; XIAO, Y.; DENG, Y.; JIA, J.; Hu, M. Degradation of 3-Phenoxybenzoic Acid by a *Bacillus* sp. **Plos One**, v. 7, e50456, 2012.
- CHEN, S.; DENG, Y.; CHANG, C.; LEE, J.; CHENG, Y. Pathway and kinetics of cyhalothrin biodegradation by *Bacillus thuringiensis* strain ZS-19. **Scientific Reports**, v. 5, e8784, 2015.

DERELANKO, M.J.; HOLLINGER, M.A. **Handbook of toxicology**. New Jersey: Taylor & Francis, 2002. v. 1, p. 1440.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). **About pesticides**. Washington, 2012. Disponível em: <<http://www.epa.gov/pesticides/about/types.htm>>. Acesso em: 20 fev. 2016.

EXPASY: **Bioinformatics Resource Portal**. Disponível em: < <http://www.http://enzyme.expasy.org/>>. Acesso em 25 de agosto de 2015.

GEBLER, L. **Banco de informações ambientais e toxicológicas dos agrotóxicos utilizados até a safra 2002/2003 na produção integrada de maçãs no Brasil**. Bento Gonçalves: 2004. v. 48, p. 3. (Relatório técnico). Disponível em: < <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/circular/cir048.pdf>>. Acesso em: 15 fevereiro 2016.

GIBBONS, D.; Morrissey, C.; MINEAU, P. A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. **Environmental Science and Pollution Research**, 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s11356-014-3180-5/fulltext.html>>. Acessado em: 15 dez. 2014.

GRISOLIA, C. K. **Agrotóxicos: mutações, câncer e reprodução**. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2005. 392p

GUO, P.; WANG, B.Z.; HANG, B.J.; LI, L.; ALL, S.W.; HE, J.; LI, S.P. Pyrethroid-degrading *Sphingobium* sp. JZ-2 and the purification and characterization of a novel pyrethroid hydrolase. **Internation Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 1107-1112, 2009.

HAVENS, P.L.; SIMS, G.K.; ERHARDT-ZABIK, S. Fate of herbicides in the environment. In: SMITH, A. **Handbook of weed management systems**. New York: John Wiley, 1995. p. 245-278.

HE, L.-M. et al. Environmental chemistry, ecotoxicity, and fate of lambda-cyhalothrin. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 195, p. 71-91, 2008.

HEUDORF, U.; ANGERER, J. Metabolites of pyrethroid insecticides in urine specimens: Current exposure in an urban population in Germany. **Environ. Health Perspect.**, v.109, n.3, p.213-217, 2001

LI, Z.Y.; ZHANG, Z.C., ZHANG, L. and LENG, L. Stereo and enantioselective degradation of β -cypermethrin and β -cyfluthrin in soil. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 80, p. 335-339, 2008.

LI, T. and ROSAZZA, J. P.N. The carboxylic acid pathway in *Nocardia*. Purification and characterization of the aldehyde reductase. **Jornal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.25, p.328-332, 2000.

LIN, Q.S.; CHEN, S.H.; HU, M.Y.; UL HAQ, M.R.; YANG, L.; LI, H. Biodegradation of cypermethrin by a newly isolated actinomycetes HU-s-01 from wastewater sludge. **International Journal of Environmental Science and Technology**, v. 8, p. 45-56, 2011.

LIU, W.; GAN, J.; LEE, S.; WERNER, I. Isomer selectivity in aquatic toxicity and biodegradation of bifenthrin and permethrin. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, p.1861-1866, 2005.

MALONEY, S.E.; MAULE, A.; SMITH, A.R.W. Microbial transformation of the pyrethroid insecticides: permethrin, deltamethrin, fastac, fenvalerate, and fluvalinate. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, p. 2874-2876, 1988.

MALONEY, S.E.; MAULE, A.; SMITH, A.R.W. Purification and preliminary characterization of permethrinase from a pyrethroid-transforming strain of *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, p. 2007-2013, 1993.

MASAI, E.; ICHIMURA, A.; SATO, Y. Roles of the enantioselective glutathione S-transferases in cleavage of *o*-aryl ether. **Journal of Bacteriology** v.185, p. 68-75, 2003.

NARAHASHI, T. Neuronal ion channel as the target sites of insecticides. **Pharmacol. Toxicol.**, v.79, n.1, p.1-14, 1996.

PAINGANKAR, M.; JAIN, M.; DEOBAGKAR, D. Biodegradation of allethrin, a pyrethroid insecticide, by an *Acidomonas* sp. **Biotechnology Letters** v. 27, p. 1909-1913, 2005.

PANKAJ, S. A.; GANGOLA, S.; KHATI, P.; KUMAR, G.; SRIVASTAVA, A. Novel pathway of cypermethrin biodegradation in a *Bacillus* sp. strain SG2 isolated from cypermethrin-contaminated agriculture field. **3 Biotech.** v.6(1), 2016.

PORTO, A. L. M.; MELGAR, G. Z.; KASEMODEL, M. C.; NITSCHKE, M. Biodegradation of pesticides. In: STOYCHEVA, M. (Ed.). **Pesticides in the modern world: Pesticides use and management**. Rijeca: InTech, 2011. p. 1-32.

QIN, S., BUDD, R., BONDARENKO, S., LIU, W. and GAN, J. Enantioselective degradation and chiral stability of pyrethroids in soil and sediment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 5040-5045, 2006.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fl uídos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Quim. Nova**, v.24, n.1, p.68-76, 2001

RADOSEVICH, S. R.; HOLT, J.; GHERSA, C. **Weed ecology**. New York: John Wiley, 1997. p. 472-495.

- REBELO, R.M.; VASCONCELOS, R.A.; CORMICK BUYS, B.D.M.; REZENDE, J.A.; DE MORAES, K.O.C.; OLIVEIRA R.P. **Produtos agrotóxicos e afins comercializados em 2009 no Brasil: Uma abordagem ambiental**. 2010. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/phocadownload/Qualidade_Ambiental/produtos_agrotoxicos_comercializados_brasil_2009.pdf>. Acesso em: 08 fevereiro de 2016.
- SAIKIA, N.; DAS, S.K.; PATEL, B.K.C.; NIWAS, R.; SINGH, A.; GOPAL, M. Biodegradation of beta-cyfluthrin by *Pseudomonas stutzeri* strain S1. **Biodegradation**, v.16, p. 581-589, 2005.
- SANTOS, M.A.T.; AREAS, M.A.; REYES, F.G.R. Piretroides - uma visão geral. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 18, p. 339-349, 2007.
- SCHONNOOR, J. L. Chemical fate and transport in the environment. In: SCHONNOOR, J. L. **Fate of pesticides & chemicals in the environment**. New York: John Wiley, 1992. cap. 1, p. 1-25.
- SCHROLL, R.; BRAHUSHI, R.; DORFLER, U.; KUHN, S.; FEKETE, J.; MUNCH, J.C. Biomineralization of 1,2,4-trichlorobenzene in soils by an adapted microbial population. **Environmental Pollution**, v. 127, p. 395-401, 2004.
- SHELTON, J. F.; GERAGHTY, E. M.; TANCREDI, D. J.; DELWICHE, L.; SCHMIDT, R.; RITZ, B.; HANSEN, R. L., PICCIOTO, I. Neurodevelopmental disorders and prenatal residential proximity to agricultural pesticides: The CHARGE Study. **Environmental Health Perspectives**. Disponível em: <<http://ehp.niehs.nih.gov/1307044/>> . Acessado em 12 dez. 2014.
- SODERLUND, D.M.; CLARK, J.M.; SHEETS, L.P.; MULLIN, L.S.; PICCIRILLO, V.J.; SARGENT, D.; STEVENS, J.T.; WEINER, M.L. Mechanisms of pyrethroid Neurotoxicity: implications for cumulative risk assessment. **Toxicology**, v. 171, p. 3-59, 2002.
- TALLUR, P.N.; MEGADI, V.B.; NINNEKAR, H.Z. Biodegradation of cypermethrin by *Micrococcus* sp. strain CPN 1. **Biodegradation**, v. 19, p. 77-82, 2008.
- TORTORA, GERARD J., BERDELL R. FUNKE, AND CHRISTINE L. CASE. **Microbiology: An Introduction**. San Francisco, CA: Benjamin Cummings, 2004.
- VALENTINE, W. M. Toxicology of selected pesticides, drugs, and chemicals. Pyrethrin and pyrethroid insecticides. **Veterinary Clinics North America Small Animal Practice**, v.20, n.2, p.375-382, 1990.
- VEUM, L., PEREIRA, S.R.M., VAN DER WAAL, J.C., HANEFELD, U. Catalytic hydrogenation of cyanohydrin esters as a novel approach to *N*-acyl-beta-aminio alcohols - Reaction optimisation by a design of experiment approach. **European Journal of Organic Chemistry** (7), 1664-1671, 2006.

VIRAN, R. et al. Investigation of acute toxicity of deltamethrin on guppies (*Poecilia reticulata*). **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v.55, p.82-85, 2003

WANG, B.; MA, Y.; ZHOU, W.; ZHENG J.; ZHU, J.; HE, J.; LI, S. Biodegradation of synthetic pyrethroids by *Ochrobactrum tritici* strain pyd-1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2315-2324, 2011.

XIAO, Y.; CHEN, S.; GAO, Y.; HU, W. Isolation of a novel beta-cypermethrin degrading strain *Bacillus subtilis* BSF01 and its biodegradation pathway. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2014.

YOUNG, R. N.; MULLIGAN, C. N. Natural attenuation of contaminants in soil. **Boca Raton: Lewis Publishers**, 2003. 307p.

ZHAI, Y.; LI, K.; SONG, J.; SHI, Y.; YAN, Y. Molecular cloning, purification and biochemical characterization of a novel pyrethroid-hydrolyzing carboxylesterase gene from *Ochrobactrum anthropi* YZ-1. **Journal of Hazardous Materials**, v. 221– 222, p. 206-212, 2012.