UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Biodegradação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil por bactérias do gênero *Bacillus* isoladas da cultura da laranja

Juliana Galan Viana

São Carlos

2020

Juliana Galan Viana

Biodegradação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil por bactérias do gênero *Bacillus* isoladas da cultura da laranja

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

São Carlos

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura:
Data:

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Viana, Juliana Galan
Biodegradação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil por bactérias do gênero Bacillus isoladas da cultura da laranja / Juliana Galan Viana. — São Carlos, 2020.
176 f.

Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2020.
Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

1. Biorremediação. 2. Agroquímicos. 3. Degradação. 4. Cromatografia líquida. 5. Cromatografia gasosa. I. Título.

Solange Maria Simões Puccinelli - CRB: 1500/8

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais Faustina Rosse Galan Viana e Luiz Carlos Viana, a melhor família que Deus me presenteou.

ERRATA

Agradecimentos

A Deus por ter me ajudado e guiado os meus passos até aqui. Não há palavras que consigam expressar a minha gratidão.

Ao Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto pela orientação nesta minha trajetória, pela paciência comigo e por tudo que me ensinou.

À minha amiga Thay pela amizade, pelas inúmeras conversas, pelas risadas, pelo companheirismo e ajuda.

Aos meus amigos, colegas e companheiros de laboratório Aline, Charlene, David, Erika, Fábio, Fabrício, Iara, Juliana Barreiro, Lohany, Lucas, Pedro, Rafaely, Samuel e Willian. Obrigada por tudo.

À Dona Edvania pela amizade, carinho e os inúmeros abraços.

Aos técnicos Marília, André, Sylvana e Silmara pelo auxílio e ajuda ao longo deste trabalho.

Aos secretários Gislei, Daniele, Andreia e Fabiano por toda ajuda ao longo desse trabalho.

A todos os funcionários da USP por toda ajuda e serviços prestados.

Ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo pelo suporte e infraestrutura fornecidos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2017/24429-7 pela bolsa concedida.

À Sueli e família por terem me abraçado como filha na cidade de São Carlos.

Aos meus pais Faustina e Luiz que sempre colocaram fé nos meus sonhos e me ajudaram a concluir mais essa etapa importante da minha vida.

Muito obrigada!

"As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP e da CAPES".

Salmos 23.

RESUMO

Uma triagem com 8 linhagens de bactérias do gênero *Bacillus* foi realizada para analisar a biodegradação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil. Por meio de análises por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC/UV-vis) verificou-se uma biodegradação entre 24 e 88% da Bifentrina. Por meio da técnica de cromatografia em coluna foi possível separar o composto 4-hidroxibenzoato de metila. Das análises em cromatografia a gás acoplado à espectrometria de massas (CG-EM) foram identificados os compostos 4-di-*terc*-butilfenol, 1-nonadeceno, *N*-fenetilacetamida e 1,4-diisopropilbenzeno nas amostras com a Bifentrina. Uma reação de hidrólise da Bifentrina com KOH foi realizada e os produtos da reação foram analisados por HPLC/UV-vis para verificar a possível presença desses compostos nas reações entre as bactérias e a Bifentrina. Em seguida, foi realizada uma reação utilizando o álcool 2-metil-[1,1'-bifenil]-3-metanol (**BF-OH**) com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) para observar possíveis produtos de biodegradação. Para as reações entre as bactérias e o pesticida Fipronil foi verificado uma biodegradação entre 51 e 93% e por meio das análises de CG-EM foram identificados diversos compostos dentre os quais o terpeno esqualeno, 1*H*-indol, ciclo (Pro-Leu), *N*-fenetilacetamida, 5-hexil-di-hidrofurano-2-(3*H*)-ona, 1,3-diisopropilbenzeno e 1,4-diisopropilbenzeno. Um experimento de consórcio empregando as 8 linhagens de bactérias mostrou que a porcentagem de biodegradação do pesticida Bifentrina e Fipronil foi de 51 e 81%, respectivamente. Análises no cromatógrafo líquido de ultra performance acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução (UPLC-HRMS) foram realizadas e observou-se possíveis metabólitos de biotransformação da Bifentrina e a Fipronil-sulfona proveniente da oxidação do Fipronil. Destaca-se também que foi identificado o terpeno esqualeno, possivelmente devido à associação entre a cultura de laranja e os microrganismos. Em todos os experimentos foram realizadas reações controle na ausência do pesticida e também foi realizado um experimento para se avaliar a concentração final da Bifentrina e do Fipronil, obtendo-se uma porcentagem de 96% de recuperação para ambos os pesticidas. Por fim, este estudo demonstrou que as bactérias do gênero *Bacillus* isoladas das folhas da cultura da laranja foram importantes na biodegradação da Bifentrina e Fipronil.

Palavras-chave: biorremediação, agroquímicos, degradação, cromatografia líquida, cromatografia gasosa.

ABSTRACT

A screening with 8 strains of bacteria of the genus *Bacillus* was made to analyze the biodegradation of the pesticides Bifenthrin and Fipronil. High performance liquid chromatography (HPLC/UV-vis) analyzes revealed a biodegradation between 24 and 88%. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) analyzes identified the compounds 4-di-tert-butylphenol, 1-nonadecene, N-phenethylacetamide and 1,4-diisopropylbenzene in reactions with Bifenthrin. A hydrolysis reaction of Bifenthrin with KOH was performed and the reaction products were analyzed by HPLC/UV-vis to verify the possible presence of these compounds in the reactions between bacteria and Bifenthrin. Then, a reaction using 2-methyl- [1,1'-biphenyl] -3-methanol (**BF-OH**) with the bacterium *B. pseudomycoides* (4RF1C) was performed to observe possible biodegradation products. For the reactions between bacteria and pesticide Fipronil a biodegradation between 51 and 93% was verified and by GC-MS analyzes were identified several compounds among which the squalene terpene, 1*H*-indole, cycle (Pro-Leu), *N*-phenethylacetamide, 5-hexyl dihydrofuran-2- (3*H*) -one, 1,3-diisopropylbenzene and 1,4-diisopropylbenzene. A consortium experiment employing the 8 bacterial strains showed that the percentage of biodegradation of pesticide Bifenthrin and Fipronil was 51 and 81%, respectively. Analyzes on the ultra performance liquid chromatograph coupled with the high-resolution mass spectrometer (UPLC-HRMS) were performed and possible biotransformation metabolites of Bifenthrin and Fipronil sulfone from Fipronil oxidation were observed. It is also noted that squalene terpene was identified, possibly due to the association between orange culture and microorganisms. In all experiments control reactions were carried out in the absence of pesticide and an experiment was also performed to evaluate the final concentration of Bifenthrin and Fipronil, obtaining a 96% recovery for both pesticides. Finally, this study demonstrated that bacteria of the genus *Bacillus* isolated from orange leaves were important in the biodegradation of pesticides Bifenthrin and Fipronil.

Keywords: bioremediation, agrochemicals, degradation, liquid chromatography, gas chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Pesticidas empregados em formulações comerciais de agroquímicos. 4
Figura 2. Metabólitos encontrados em extrato típico de flores do gênero *Chrysanthemum*. 6
Figura 3. Piretroides do Tipo I e do Tipo II provenientes das piretrinas.....7
Figura 4. Exemplos de pesticidas pirazólicos.....8
Figura 5. Estrutura química do pesticida Fipronil. 8
Figura 6. Representação da hidrólise (enzimática) de ligação éster por CBEs.....11
Figura 7. Reação de hidrólise por enzimas carboxilesterases nos pesticidas piretroides (a) Permetrina, (b) Cipermetrina e (c) Deltametrina. 12
Figura 8. Reação de biodegradação do pesticida (±)-Lambda-cialotrina por fungos de ambiente marinho. Hidrólise realizada por enzimas do tipo CbEs. 13
Figura 9. Produtos de biodegradação da Bifentrina utilizando bactérias do gênero *Pseudomonas*. 14
Figura 10. Via metabólica de degradação da Bifentrina pela levedura *Candida pelliculosa*. 15
Figura 11. Reação de hidrólise do piretroide Fempropatrina pela enzima PytH isolada de *Sphingobium* sp. 16
Figura 12. Via metabólica para a biotransformação do Fipronil pela bactéria *Stenotrophomonas acidaminiphila*. 17
Figura 13. Terpenos (terpenoides) contendo diferentes funções químicas.....18
Figura 14. Terpenos produzidos pelos microrganismos *Streptomyces* e *Kitasatospora*. 19
Figura 15. Metabólito artemisinina, composto ativo contra o protozoário *Plasmodium falciparum* e o paclitaxel, ativo contra câncer de mama e ovário. 20
Figura 16. Cultura em meio sólido das bactérias isoladas das folhas de laranja empregadas no estudo de biodegradação da Bifentrina e do Fipronil. 28
Figura 17. Diluição seriada para quantificar as bactérias nos inóculos em meio líquido. 29
Figura 18. Etapas de cultivo das bactérias em meio de cultura líquido. 32
Figura 19. Fluxograma do processo de hidrólise em meio básico da Bifentrina. 36
Figura 20. Organograma do processo de separação por cromatografia em coluna de frações do extrato bruto da reação em replicatas com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e a Bifentrina. 38
Figura 21. Organograma do processo de purificação por cromatografia em coluna da fração Fr. 3.2 de um metabólito proveniente da reação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) com a Bifentrina.....39
Figura 22. Organograma do processo de purificação por cromatografia em coluna do Fipronil. 40

Figura 23. Ilustração do procedimento experimental das reações em consórcio entre as 8 bactérias e os pesticidas Bifentrina e Fipronil. 42
Figura 24. Curva analítica para a quantificação do pesticida Bifentrina por HPLC/UV-vis.....43
Figura 25. Curva analítica para a quantificação do álcool **BF-OH** por HPLC/UV-vis. 44
Figura 26. Curva analítica para a quantificação do pesticida Fipronil por HPLC/UV-vis.....45
Figura 27. Condições de análise para os pesticidas Bifentrina e Fipronil por CG-EM.....47
Figura 28. Árvore filogenética pertencente às bactérias isoladas das folhas da laranja. A distância filogenética foi indicada na barra de escala. 51
Figura 29. Cultivo da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) em placas de Petri contendo meio nutriente *Broth* e Agar na presença de diferentes concentrações de Bifentrina (30, 50, 70 e 100 mg L^{-1}).....52
Figura 30. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação da Bifentrina com as bactérias isoladas da cultura da laranja. Condições de reação: 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reação em triplicata. 53
Figura 31. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação da Bifentrina com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) no intervalo de 1, 3 e 5 dias. Condições de reação: 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 1, 3 e 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reações em triplicata.....58
Figura 32. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e a Bifentrina. Condições de reação: 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 10 dias, 130 rpm, 32 ºC, reação em triplicata.....59
Figura 33. Cultivo das bactérias *B. pseudomycoides* (4RF1C) em 10 dias de reação com a Bifentrina.....59
Figura 34. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação de biodegradação da Bifentrina com o caldo de cultivo da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C). Condições de reação: 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reação em triplicata. 60
Figura 35. Hidrólise da Bifentrina na presença de KOH. 61
Figura 36. (A) Cromatograma obtido por análises de CG-EM (IE, 70 eV) do ácido **BF-COOH** proveniente da hidrólise básica da Bifentrina. Tempo de retenção: 9,5 minutos. (B) Espectro de massas para o ácido **BF-COOH**. Massa molar: 242,03 g mol^{-1}. 61
Figura 37. (A) Cromatograma obtido por análise de CG-EM (IE, 70 eV) do álcool **BF-OH** proveniente da hidrólise básica da Bifentrina. Tempo de retenção: 22,9 minutos. (B) Espectro de massas para o álcool **BF-OH**. Massa molar: 198,10 g mol^{-1}.....62
Figura 38. Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) do ácido **BF-COOH** proveniente da hidrólise básica da Bifentrina com KOH. 63
Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) do ácido **BF-COOH** proveniente da hidrólise básica da Bifentrina com KOH. 63

Figura 40. Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, C_3D_6O) do álcool **BF-OH** proveniente da hidrólise básica da Bifentrina com KOH. 65
Figura 41. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, C_3D_6O) do álcool **BF-OH** proveniente da hidrólise básica da Bifentrina com KOH. 65
Figura 42. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e a Bifentrina e os produtos de hidrólise (álcool **BF-OH** e ácido **BF-COOH**) da Bifentrina com KOH. 66
Figura 43. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e o álcool **BF-OH**. Condições de reação: 30 mg L^{-1} de álcool **BF-OH**, 3 e 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reação em triplicata.....68
Figura 44. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) com a Bifentrina (5 dias) e com o álcool **BF-OH** (3 e 5 dias). Condições de reação: 30 mg L^{-1} de álcool **BF-OH**, 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 130 rpm, 32 ºC, reação em triplicata. 68
Figura 45. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e o álcool **BF-OH** (15 mg L^{-1}). Condições de reação: 130 rpm, 32 ºC, 15 mg L^{-1} de álcool **BF-OH**, 5 dias, reação em triplicata. 69
Figura 46. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) o álcool **BF-OH** (10 mg L^{-1}). Condições de reação: 10 mg L^{-1} de álcool **BF-OH**, 15 dias, 130 rpm, 32 ºC, reação em triplicata.....70
Figura 47. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) com a Bifentrina e com o álcool **BF-OH**. Condições de reação: 10 mg L^{-1} de álcool **BF-OH**, 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reação em triplicata. 71
Figura 48. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) com a Bifentrina e com o álcool **BF-OH**. Condições de reação: 10 mg L^{-1} de álcool **BF-OH**, 30 mg L^{-1} de Bifentrina 10 dias, 130 rpm, 32 ºC. 71
Figura 49. Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do composto 4-hidroxibenzoato de metila isolado da reação de biodegradação da Bifentrina com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C).....74
Figura 50. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do composto 4-hidroxibenzoato de metila isolado da reação de biodegradação da Bifentrina com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C).....74
Figura 51. Espectro de massas do 4-hidroxibenzoato de metila isolado da fração Fr. 3.2.1 da reação de biodegradação da Bifentrina com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C). 75
Figura 52. Proposta de fragmentação para o composto 4-hidroxibenzoato de metila.....75
Figura 53. Etapa da biossíntese envolvida na formação do ânion 4-hidroxibenzoato. 76

Figura 54. Metilação do 4-hidroxibenzoato por meio da enzima S-adenosilmetionina (SAM). 76
Figura 55. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação de biodegradação da Bifentrina em consórcio com todas as bactérias isoladas da cultura da laranja. Condições de reação: 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC. 77
Figura 56. Espectro de Infravermelho do Fipronil. 79
Figura 57. Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, C_3D_6O) do Fipronil. 80
Figura 58. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, C_3D_6O) do Fipronil. 80
Figura 59. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, C_3D_6O) do Fipronil. 81
Figura 60. Cultivo da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) em placas de Petri contendo meio Nutriente *Broth* e Agar na presença de diferentes concentrações de Fipronil (10, 20 e 30 mg L^{-1}). 81
Figura 61. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação do Fipronil com as bactérias isoladas da cultura da laranja. Condições de reação: 10 mg L^{-1} de Fipronil, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reações em triplicata. 83
Figura 62. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação do Fipronil com a bactéria *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) no intervalo de 1, 3 e 5 dias. Condições de reação: 10 mg L^{-1} de Fipronil, 130 rpm, 32 ºC, reações em triplicata. 89
Figura 63. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação do Fipronil com a bactéria *B. aryabhattai/ Bacillus* sp. (2RF3C) no intervalo de 1, 3 e 5 dias. Condições de reação: 130 rpm, 32 ºC, 10 mg L^{-1} de Fipronil. 89
Figura 64. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação em consórcio do Fipronil com todas as bactérias isoladas da cultura da laranja. Condições de reação: 10 mg L^{-1} de Fipronil, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC. 90
Figura 65. Cromatograma obtido por CG-EM (IE, 70 eV) do extrato da reação da bactéria *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) na ausência da Bifentrina onde se identificou o metabólito 2,4-di-*terc*-butilfenol. Tempo de retenção: 14,4 minutos. 99
Figura 66. Espectro de massas obtido pelas análises das amostras por CG-EM para o metabólito 2,4-di-*terc*-butilfenol (IE, 70 eV). 99
Figura 67. Cromatograma obtido por CG-EM (IE, 70 eV) do extrato da reação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) na ausência da Bifentrina onde se identificou o metabólito 1,3,5-trimetilbenzeno. Tempo de retenção: 4,3 minutos. 100
Figura 68. Espectro de massas obtido pelas análises das amostras por CG-EM para o metabólito 1,3,5-trimetilbenzeno (IE, 70 eV). 100
Figura 69. Cromatograma obtido por CG-EM (IE, 70 eV) do extrato da reação da bactéria *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) na ausência da Bifentrina onde se identificou o metabólito 1-nonadeceno. Tempo de retenção: 19,9 minutos. 102

Figura 70. Espectro de massas obtido pelas análises das amostras por CG-EM para o metabólito 1-nonadeceno (IE, 70 eV). 102
Figura 71. Cromatograma obtido por CG-EM (IE, 70 eV) do extrato da reação da bactéria *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) na ausência da Bifentrina onde se identificou os metabólitos (*E*)-hexacos-9-eno e 1-iecoseno. Tempo de retenção do (E)-hexacos-9-eno: 26,4 minutos. Tempo de retenção do 1-eicoseno: 23,3, 26,3 e 29,2 minutos. 104
Figura 72. Espectro de massas obtido pelas análises das amostras por CG-EM para o metabólito (*E*)-hexacos-9-eno (IE, 70 eV). 104
Figura 73. Espectro de massas obtido pelas análises das amostras por CG-EM para o metabólito 1-eicoseno (IE, 70 eV). 104
Figura 74. Estrutura do terpeno hopanóide, hopan-22-ol ($C_{30}H_{52}O$), encontrado em membranas lipídicas de bactérias. 105
Figura 75. Cromatograma obtido por CG-EM (IE, 70 eV) do extrato da reação da bactéria *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) na presença do Fipronil onde se identificou o metabólito esqualeno. Tempo de retenção: 34,5 minutos. 106
Figura 76. Espectro de massas obtido pelas análises das amostras por CG-EM para o metabólito esqualeno (IE, 70 eV). 106
Figura 77. Cromatograma obtido por CG-EM (IE, 70 eV) do extrato da reação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF2C) na presença do Fipronil onde se identificou o metabólito *N*-fenetilacetamida. Tempo de retenção: 16,9 minutos. 108
Figura 78. Espectro de massas obtido pelas análises das amostras por CG-EM para o metabólito *N*-fenetilacetamida (IE, 70 eV). 108
Figura 79. Cromatograma obtido por CG-EM (IE, 70 eV) do extrato da reação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) na presença do Fipronil onde se identificou o metabólito 5-hexil-di-hidrofurano-2-(3*H*)-ona. Tempo de retenção: 14,0 minutos. 110
Figura 80. Espectro de massas obtido pelas análises das amostras por CG-EM para o metabólito 5-hexil-di-hidrofurano-2-(3*H*)-ona (IE, 70 eV). 110
Figura 81. Biotransformação do monoterpeno *p*-cimeno por *Staphylococcus epidermidis*. Condições reacionais: pH 7,0, T = 37 ºC, 7 dias. 111
Figura 82. Cromatograma obtido por CG-EM (IE, 70 eV) do extrato da reação da bactéria *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) na ausência do Fipronil onde se identificou o metabólito os metabólitos 1,3-diisopropilbenzeno e 1,4-diisopropilbenzeno. Tempo de retenção do 1,3-diisoproprilbenzeno: 7,1 minutos. Tempo de retenção do 1,4-diisopropilbenzeno: 7,7 minutos. 112
Figura 83. Espectro de massas obtido pelas análises das amostras por CG-EM para os metabólitos 1,3-diisopropilbenzeno e 1,4-diisopropilbenzeno (IE, 70 eV). 112
Figura 84. Resumo da síntese enzimática do 1*H*-indol em bactérias. 113

Figura 85. Comparação do composto padrão 1*H*-indol com as amostras das reações das bactérias *B. pseudomycoides* (3RF2C), *B. pseudomycoides* (4RF2C) e *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) na presença e ausência do pesticida Fipronil. Tempo de retenção do 1*H*-indol: 10,7 minutos. 114
Figura 86. Espectro de massas obtido pelas análises das amostras por CG-EM para o metabólito 1*H*-indol (IE, 70 eV). 114
Figura 87. Cromatograma obtido por CG-EM (IE, 70 eV) do extrato da reação da bactéria *B. pseudomycoides* (3RF2C) na ausência do Fipronil onde se identificou o metabólito ciclo-(Pro-Leu). Tempo de retenção: 22,7 minutos. 116
Figura 88. Espectro de massas da ciclo-(Pro-Leu) (IE, 70 eV). 116
Figura 89. Proposta de fragmentação da ciclo-(Pro-Leu) (IE, 70 eV). 116
Figura 90. Cromatograma obtido por UPLC-HRMS da reação do Fipronil com a bactéria *B. amyloliquefaciens* (RFD1C). Condições de reação: 10 mg de Fipronil, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC. 118
Figura 91. Espectro de íons totais obtido por UPLC-HRMS da reação do Fipronil com a bactéria *B. amyloliquefaciens* (RFD1C). Condições de reação: 10 mg de Fipronil, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC. 119
Figura 92. Espectro de massas obtido por UPLC-HRMS para o composto de biotransformação do Fipronil com a bactéria *B. amyloliquefaciens* (RFD1C). (A) Experimental. (B) Teórico. 120
Figura 93. Proposta de biotransformação do Fipronil promovida pela bactéria *B. amyloliquefaciens* (RFD1C). 120
Figura 94. Cromatograma obtido por UPLC-HRMS da reação da Bifentrina com a bactéria *B. pseudomcyoides* (4RF2C). Condições de reação: 30 mg de Bifentrina, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC. 121
Figura 95. Espectro de íons totais obtido por UPLC-HRMS da reação da Bifentrina com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C). Condições de reação: 30 mg de Bifentrina, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC. 122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação média de litros de agroquímicos por hectare que foram aplicados em culturas brasileiras no ano de 2015. 2

Tabela 2. Relação dos 10 IAs mais vendidos em 2017 em toneladas (t) no Brasil. 3

Tabela 3. Código de isolamento e código de identificação das bactérias empregadas neste estudo. 28

Tabela 4. Valores das absorbâncias das soluções de bactérias que foram empregadas nos experimentos de degradação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil. 30

Tabela 5. Parâmetros das análises de Bifentrina e Fipronil (HPLC/UV-vis). 46

Tabela 6. Gradiente da fase móvel para as análises da biodegradação da Bifentrina e Fipronil em HPLC/UV-vis. 46

Tabela 7. Parâmetros do espectrômetro de massas de alta resolução empregado nas análises de biodegradação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil. 48

Tabela 8. Parâmetros das análises de Bifentrina e Fipronil por UPLC-HRMS. 48

Tabela 9. Gradiente da fase móvel para as análises da biodegradação da Bifentrina e Fipronil por UPLC-HRMS. 48

Tabela 10. Concentração final do pesticida Bifentrina determinado por HPLC/UV-vis, empregando as bactérias isoladas da cultura da laranja. Condições de reação: 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reação em triplicata. 56

Tabela 11. Massa celular bacteriana obtida após a extração dos experimentos de biodegradação da Bifentrina em meio líquido. Condições de reação: 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reação em triplicata. 57

Tabela 12. Determinação da concentração de Bifentrina no período de 1, 3 e 5 dias empregando a bactérias *B. pseudomycoides* (4RF1C). Condições de reação: 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reações em triplicata. 58

Tabela 13. Biodegradação associada entre a Bifentrina e o álcool **BF-OH** com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C). Concentração inicial de Bifentrina: 30 mg L^{-1}. Concentração inicial de álcool **BF-OH**: 10 mg L^{-1}. 72

Tabela 14. Concentração final do pesticida Bifentrina determinado por HPLC/UV-vis, empregando as bactérias isoladas da cultura da laranja. Condições de reação: 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reações em triplicata. 78

Tabela 15. Concentração final do pesticida Fipronil determinado por HPLC/UV-vis, empregando as bactérias isoladas da cultura da laranja. Condições de reação: 10 mg L^{-1} de Fipronil, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reações em triplicata. 86

Tabela 16. Massa celular bacteriana seca obtida nos experimentos de biodegradação do Fipronil em meio líquido após a extração. 87

Tabela 17. Determinação da concentração de Fipronil no período de 1, 3 e 5 dias empregando as bactérias *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) e *B. aryabhattai/ Bacillus* sp. (2RF3C). Condições de reação: 10 mg L^{-1} de Fipronil, 130 rpm, 32 ºC, reações em triplicata. 88
Tabela 18. Concentração final do pesticida Fipronil determinado por HPLC/UV-vis, empregando as bactérias isoladas da cultura da laranja. Condições de reação: 10 mg L^{-1} de Fipronil, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reações em triplicata. 91
Tabela 19. Metabólitos identificados por análises de CG-EM (IE, 70 eV) das amostras com as bactérias na presença do pesticida Bifentrina. 92
Tabela 20. Metabólitos identificados por análises de CG-EM (IE, 70 eV) das amostras com as bactérias na ausência do pesticida Bifentrina. 93
Tabela 21. Metabólitos identificados por análises de CG-EM (IE, 70 eV) das amostras com as bactérias na presença do pesticida Fipronil. 95
Tabela 22. Metabólitos identificados por análises de CG-EM (IE, 70 eV) das amostras com as bactérias na ausência do pesticida Fipronil. 96
Tabela 23. Estruturas propostas provenientes da biodegradação/biotransformação da Bifentrina. 123
Tabela 24. Recuperação e limite de detecção dos pesticidas Bifentrina e Fipronil por HPCL-UV-vis. 123

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC - Ionização química a pressão atmosférica
BF - Bifentrina
BF-COOH - Ácido-(1*R*,3*R*)-3-((*Z*)-2-cloro-3,3,3-triflúor-prop-1-en)-2,2-dimetilciclopropanílico
BF-OH - Álcool 2-metil-[1,1'-bifenil]-3-metanol
CA - Controle abiótico
CB - Controle biótico
CbEs - Carboxilesterases
CG-EM - Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas
CN - Grupo ciano
CONAB - Companhia Nacional de Abastecimento
DESI - Ionização por *desorption electrospray ionization*
DNA - Ácido desoxirribonucléico
EROs - Espécies reativas de oxigênio
ESI - Ionização por *electrospray*
FP - Fipronil
FTIR-IRA
Hc - Hidrocarboneto
HPLC/UV-vis - Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta
IA - Ingrediente ativo
IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IE - Impacto de elétrons
LB - Luria-Bertani
M - Metabólito
m/z - Razão massa/carga
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
nanoESI - *Nanoelectrospray*
pH - Potencial hidrogeniônico
PytH - Enzima hidrolase de piretroide
RMN - Ressonância magnética nuclear
TMS - Tetrametilsilano
UAE - Extração assistida por ultrassom
UFC - Unidade formadora de colônia
UPLC-HRSM - Cromatógrafo líquido de ultra performance acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução
UV - Ultravioleta
α_D - Rotação óptica

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....1

1.1 Emprego de agroquímicos no Brasil 1

1.2 Bifentrina 5

1.3 Fipronil 7

1.4 Biodegradação e biotransformação de pesticidas por microrganismos 9

1.5 Terpenos 18

2 OBJETIVOS.....22

2.1 Objetivo 22

2.2 Metas 22

3 MATERIAIS E MÉTODOS 24

3.1 Reagentes, materiais e equipamentos 25

3.1.1 Pesticidas, solventes e meios de cultura 25

3.1.2 Materiais 25

3.1.3 Equipamentos 25

3.2 Procedimento experimental 26

3.2.1 Soluções empregadas e meios de cultivo.....26

3.2.1.1 Pesticidas Bifentrina e Fipronil 26

3.2.1.2 Solução de 5000 mg L^{-1} de Bifentrina.....26

*3.2.1.3 Solução de 5000 mg L^{-1} de 2-metil-[1,1'-bifenil]-3-metanol (**BF-OH**)*.....26

3.2.1.4 Solução salina (0,86%).....26

3.2.1.5 Meio de cultivo sólido.....277

3.2.1.6 Meio de cultivo líquido 27

3.3 Microrganismos empregados 27

3.3.1 Quantificação das bactérias no inóculo em meio líquido – diluição seriada 29

3.4 Cultivo das bactérias em meio sólido e líquido na presença de Bifentrina e Fipronil.....31

3.4.1 Meio de cultivo sólido.....31

3.4.2 Meio de cultivo líquido 31

3.4.3 Reações controle na ausência de bactéria em meio líquido 32

3.4.4 Reações controle na ausência dos pesticidas.....32

3.5 Extração dos compostos da reação de biodegradação 33

3.5.1 Ressuspensão da solução da extração contendo os compostos de biodegradação nas reações com a Bifentrina e o Fipronil.....33

3.6 Análise da diminuição da concentração de Bifentrina realizada pela bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) 33

3.7 Cultivo da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) em meio sólido e líquido na presença da Bifentrina.....34

3.8 Cultivo da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) em meio líquido e reação com o sobrenadante (caldo de cultivo) do microrganismo na presença da Bifentrina 34

3.9 Hidrólise da Bifentrina na presença de KOH 34

3.10 Cultivo da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) em meio sólido e líquido na presença do álcool **BF-OH**.....37

3.11 Cultivo da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) em meio sólido e líquido na presença do álcool **BF-OH** (10 mg L^{-1}) e da Bifentrina (30 mg L^{-1}) 37

3.12 Emprego da técnica de cromatografia em coluna para o isolamento e a purificação de um possível produto proveniente da reação entre a Bifentrina e a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) 37

3.12.1 Purificação das frações das reações entre a bactéria B. pseudomycoides (4RF1C) e a Bifentrina 38

3.13 Purificação do Fipronil comercial 40

3.13.1 Medida de rotação óptica 41

3.13.2 Espectroscopia na região de absorção do Infravermelho (IV) 41

3.13.3 Medida de ponto de fusão 41

3.14 Análise da diminição da concentração de Fipronil realizada pelas bactérias *Bacillus amyloliquefaciens* (RFD1C) e *Bacillus aryabhattai*/ *Bacillus* sp. (2RF3C).....41

3.15 Consórcio contendo as bactérias do gênero *Bacillus* e os pesticidas Bifentrina e Fipronil .41

3.16 Recuperação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil e a determinação do limite de detecção.42

3.17 Curva analítica para a quantificação do pesticida Bifentrina.....43

3.18 Curva analítica para a quantificação do álcool **BF-OH** 44

3.19 Curva analítica para a quantificação do pesticida Fipronil 44

3.20 Ressonância magnética nuclear (RMN) 45

3.21 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (HPLC/UV-vis) 45

3.22 Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM).....46

3.23 Cromatógrafo líquido de ultra performance acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução (UPLC-HRMS) 47

3.24 Descarte de resíduos 48

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 50

4.1 Identificação dos microrganismos isolados das folhas da cultura da laranja e utilizados nos estudos de biodegradação da Bifentrina e do Fipronil 50

4.2 Cultivo das bactérias em placas de Petri na presença e ausência do pesticida Bifentrina 52

4.3 Biodegradação da Bifentrina 52

4.4 Determinação da massa celular (*pellets*) das bactérias do gênero *Bacillus* das reações com a Bifentrina em 5 dias de reação 56

4.5 Diminuição da concentração de Bifentrina na presença da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) 57

4.6 Reação de biodegradação da Bifentrina com o caldo de cultivo da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) 60

4.7 Hidrólise da Bifentrina com KOH e a caracterização dos produtos, o álcool **BF-OH** e o ácido **BF-COOH** 60

4.7.1 Comparação entre os produtos da hidrólise química com KOH com a reação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) na presença de Bifentrina 66

4.8 Reação de biodegradação do álcool **BF-OH** com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) .. 67

4.9 Reação de biodegradação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e o álcool **BF-OH** e a Bifentrina 70

4.10 Identificação do 4-hidroxibenzoato de metila produzido pela bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) 72

4.11 Consórcio contendo as bactérias do gênero *Bacillus* para a reação de biodegradação do pesticida Bifentrina 77

4.12 Caracterização do Fipronil comercial 78

4.13 Cultivo das bactérias em meio sólido na presença de Fipronil 81

4.14 Cultivo das bactérias em meio líquido na presença de Fipronil 82

4.15 Determinação da massa celular das bactérias do gênero *Bacillus* das reações com o Fipronil em 5 dias de reação 86

4.16 Biodegradação do Fipronil pelas bactérias *Bacillus amyloliquefaciens* (RFD1C) e *Bacillus aryabhattai*/ *Bacillus* sp. (2RF3C) 88

4.17 Consórcio contendo as bactérias do gênero *Bacillus* para a reação de biodegradação do pesticida Fipronil 90

4.18 Identificação por CG-EM dos compostos produzidos pelas bactérias na presença e ausência dos pesticidas Bifentrina e Fipronil 91

4.19 Compostos identificados por cromatógrafo líquido de ultra performance acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução (UPLC-HRMS) 117

4.20 Recuperação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil e limite de detecção.....123

5 CONCLUSÕES.....125

5.1 Considerações finais.....125

5.2 Conclusão.....127

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 129

APÊNDICE 137

1. INTRODUÇÃO

BIODEGRADAÇÃO DOS PESTICIDAS BIFENTRINA E FIPRONIL POR BACTÉRIAS DO GÊNERO *BACILLUS* ISOLADAS DA CULTURA DA LARANJA

1 INTRODUÇÃO

1.1 Emprego de agroquímicos no Brasil

O desenvolvimento econômico brasileiro está voltado principalmente para as atividades agrícolas. No Brasil os agroquímicos são amplamente aplicados em culturas como soja, milho, citros, algodão, batata, cana-de-açúcar, tomate, arroz, entre outras. O Brasil é o maior exportador de açúcar do mundo e, segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB), na safra de 2018/2019 a estimativa de área plantada de cana-de-açúcar foi de aproximadamente 8,6 milhões de hectares (CONAB, 2019a). No cultivo da soja, em que o Brasil é o segundo maior produtor mundial ficando atrás apenas dos EUA, a área plantada do grão foi de 35,8 milhões de hectares no mesmo período. Outras culturas de grãos que incluem, por exemplo, amendoim, algodão, milho, girassol, feijão, trigo, aveia, entre outros, somaram 27,0 milhões de hectares plantados na safra de 2018/2019 (CONAB, 2019b). E, no mesmo período, a área cultivada com milho e café foi equivalente a 17,2 e 2,16 milhões de hectares, respectivamente (CONAB, 2019c).

Pignati e colaboradores (2017) estudaram 21 culturas predominantes no Brasil, indicando o consumo de agroquímicos por hectare dessas culturas e danos à saúde. Dados de 2015 mostraram que o Brasil cultivou 71,2 milhões de hectares dos quais a soja, o milho e a cana-de-açúcar representaram 42%, 21% e 13% dessas áreas, respectivamente. Esses três cultivos foram os que mais consumiram agroquímicos de um total de 899.073.840,70 litros utilizados, merecendo destaque a cultura de soja no qual se utilizou 570.060.129,90 litros de agroquímicos.

No estudo de Pignati e colaboradores (2017) o uso de agroquímicos no Brasil foi correlacionado com as incidências de intoxicações agudas, de malformação fetal e mortalidade por câncer infanto-juvenil, concluindo-se que houve correlação com os agravos à saúde, além disso, foi possível identificar os municípios prioritários para a

Vigilância em Saúde e assim desenvolver ações de prevenção e mitigação dos impactos dos agroquímicos tanto para o homem quanto para o meio ambiente.

A Tabela 1 mostra a quantidade média de litros de agroquímicos utilizados por hectare plantado para alguns cultivos. Embora a soja tenha sido o cultivo em que mais foram aplicados agroquímicos no ano de 2015, vale destacar que o cultivo de fumo apresentou a maior média de litros de agroquímicos por hectare (60 litros de agroquímicos por hectare de fumo) (PIGNATI *et al*., 2017).

Tabela 1. Relação média de litros de agroquímicos por hectare que foram aplicados em culturas brasileiras no ano de 2015.

Cultura	Média de litros de agroquímicos por hectare (l/ha)
Fumo	60,0
Algodão	28,6
Cítricos (laranja, limão e tangerina)	23,0
Tomate	20,0
Soja	17,7
Uva	12,0
Banana, arroz, trigo e mamão	10,0
Milho e girassol	7,4

1 ha = 10.000 m^2 Fonte: PIGNATI *et al*., 2017.

Dada a importância de instrumentos legais para o controle dos agroquímicos foi promulgada a Lei Federal nº 7.802 de 11 de julho de 1989, regulamentada por meio do Decreto nº 4.074 de 4 de janeiro de 2002, no qual define-se agroquímicos como:

> Os produtos e os agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, no armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas, nativas ou implantadas, e de outros ecossistemas e também de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos.

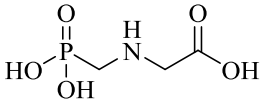
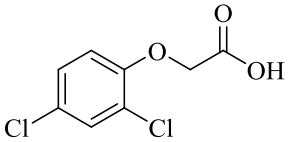
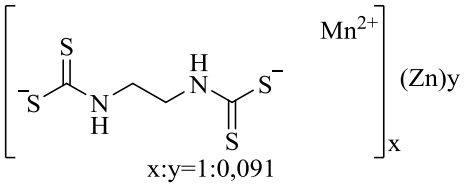
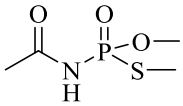
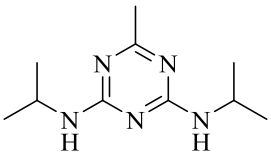
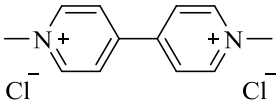
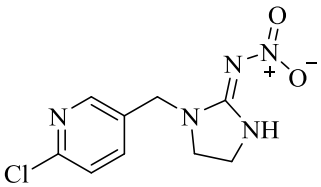
E, ainda, são considerados agroquímicos *"substâncias e produtos, empregados como desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento"* (BRASIL, 1989).

De acordo com a União Europeia, um pesticida é definido como "algo que impede, destrói ou controla um organismo prejudicial ou doença, ou ainda que protege

as plantas ou produtos vegetais durante sua produção, armazenamento e transporte" (EUROPEAN COMISSION, 2019a).

Os agroquímicos englobam os acaricidas, cupinicidas, fungicidas, herbicidas, inseticidas e neonicotinoides. Segundo o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), os dez ingredientes ativos (IAs) mais vendidos em 2017 e algumas de suas estruturas estão mostrados na Tabela 2. Os IAs são os agentes químicos, físicos ou biológicos que conferem eficácia aos agroquímicos e afins (BRASIL, 2002; IBAMA, 2017).

Tabela 2. Relação dos 10 IAs mais vendidos em 2017 em toneladas (t) no Brasil.

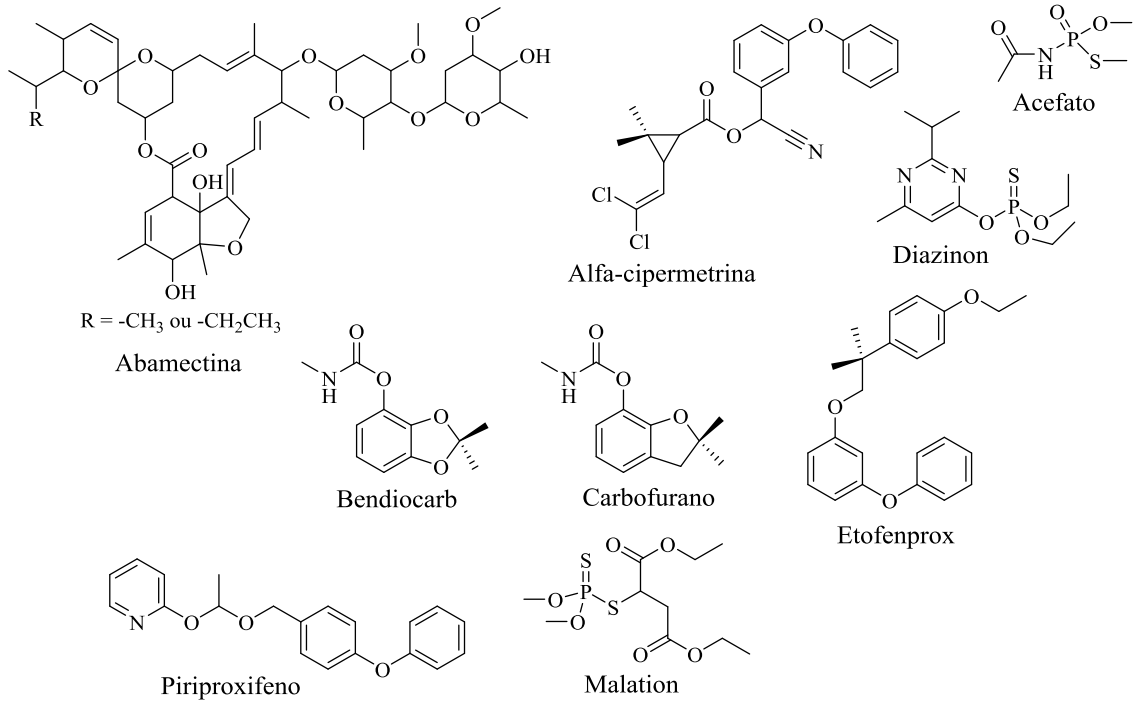
Ingrediente Ativo	Estrutura	Vendas (t)
Glifosato* e sais		173.150,75
Ácido 2,4-diclorofenoxiacético*		57.389,35
Mancozebe*		30.815,09
Acefato*		27.057,66
Óleo Mineral	-	26.777,62
Atrazina*		24.730,90
Óleo Vegetal	-	13.479,17
Dicloreto de Paraquate*		11.756,39
Imidacloprido*		9.364,57
Oxicloreto de cobre	-	7.443,62

*Estrutura na tabela. **Fonte:** IBAMA, 2017.

No Brasil, o órgão responsável por realizar o registro de agroquímicos é o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável pela avaliação toxicológica. Até setembro de 2019 foram registrados 325 novos agroquímicos; no mesmo período em 2018 foram registrados 309. Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimentos desse total de produtos registrados em 2019, 140 são produtos já prontos para serem adquiridos pelos produtores mediante a recomendação de um engenheiro agrônomo; 185 são produtos técnicos destinados para o uso industrial, exclusivamente (MAPA, 2019).

Um estudo recente realizado pelo Instituto Butantã e encomendado pelo Ministério da Saúde, mostrou que os pesticidas Abamectina, Acefato, Alfa-cipermetrina, Bendiocarb, Barbofurano, Diazinon, Etofenprox, Glifosato, Malathion e Piriproxifeno (Figura 1) que são amplamente utilizadas em diversas formulações comerciais de agroquímicos são extremamente tóxicos ao meio ambiente e, também, à vida em qualquer concentração mesmo àquela recomendada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e que não há uma dosagem mínima não letal para esses defensivos quando aplicados na agricultura (ESTADÃO, 2019).

Figura 1. Pesticidas empregados em formulações comerciais de agroquímicos.



Foram testadas diferentes concentrações dos pesticidas na água de aquários que continham ovas de peixes-zebra (*Danio rerio*) fertilizadas. Os peixes são bioindicadores e possuem mecanismos de defesa empregados para combater as espécies reativas de oxigênio (EROs) como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila (·OH). Estes compostos produzidos podem causar desde a inativação enzimática até a morte celular nesses organismos quando em concentrações elevadas de EROs (NWANI *et al*., 2010).

Desta forma, os embriões de peixes-zebra foram analisados em intervalos determinados de tempo para se verificar se houve alguma deformidade ou interferência no seu desenvolvimento. Os pesticidas Glifosato, Melathion e Piriproxifeno foram responsáveis pela morte de todos os embriões dos peixes-zebra num intervalo de 24 horas de exposição. O emprego de peixes neste tipo de estudo é uma forma de se avaliar o risco potencial de contaminação no ambiente aquático, causado principalmente pelo escoamento superficial de compostos químicos provenientes de atividades agrícolas e industriais, especialmente após o período das chuvas (NWANI *et al*., 2010; ESTADÃO, 2019).

Estudar e conhecer cientificamente a destinação final dos agroquímicos e seus metabólitos empregados na agricultura se mostra essencial para o meio ambiente e para o homem. Dentre os inúmeros agroquímicos empregados na agricultura, neste trabalho foram estudados a Bifentrina e o Fipronil, amplamente utilizados em diferentes tipos de cultura.

1.2 Bifentrina

A Bifentrina (carboxilato de (*Z*)-(1*RS*,3*RS*)-3-(2-cloro-3,3,3-triflúor-prop-1-enil)-2,2-dimetilciclopropano de 2-metilbifenil-3-metila) é um piretroide comercializado na sua forma racêmica e classificado como inseticida, formicida e acaricida de uso agrícola. De acordo com a ANVISA, a Bifentrina é aplicada nas folhas das culturas de citros, tomate, trigo, uva, batata; aplicação no solo em culturas de cana-de-açúcar, milho; aplicação em sementes de algodão, arroz, feijão, milho, soja e trigo (ANVISA, 2019a).

Os piretroides foram desenvolvidos por químicos britânicos e japoneses nas décadas de 1960 e 1970 para que os pesticidas organofosforados e os carbamatos fossem substituídos por uma classe menos letal ao meio ambiente. A estrutura dos

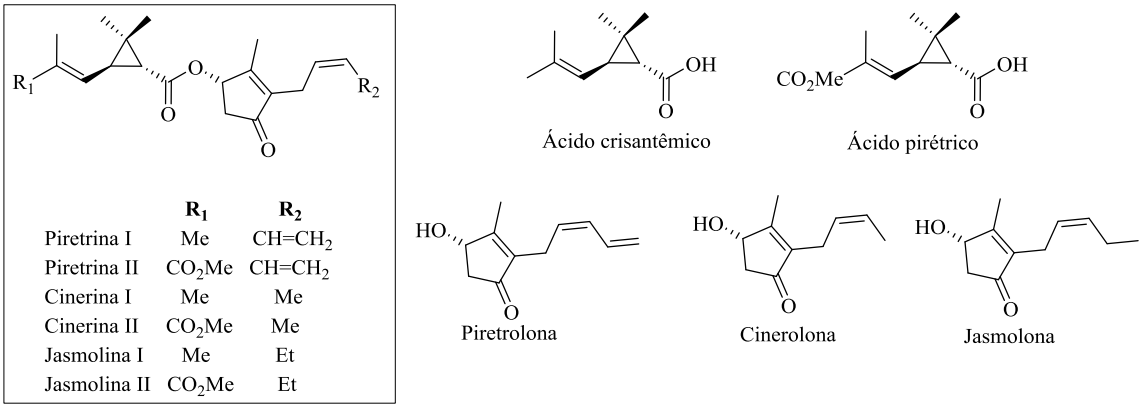
piretroides é proveniente dos ésteres da piretrina, um composto natural isolado a partir da flor do crisântemo (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) (ROSS, 2011).

As piretrinas naturais são usadas como *sprays* para combater insetos domésticos e também como inseticidas em colheitas, agindo de forma rápida no sistema nervoso dos insetos. São naturalmente biodegradáveis e tal processo inicia-se pelo ar e pela luz o que faz com que poucos insetos venham a desenvolver resistência às piretrinas, embora a vida útil desses pesticidas naturais seja limitada a algumas horas (ROSS, 2011).

As flores de crisântemos podem conter de 0,7 a 2% de piretrinas, e um extrato típico das flores pode conter piretrinas I e II, cinerinas I e II, jasmolinas I e II, cujas estruturas representam ésteres de ácido crisantêmico ou pirétrico com os álcoois piretrolona, cinerolona e jasmolona, como é mostrado na Figura 2 (DEWICK, 2002).

Os piretroides sintéticos aumentaram seu poder de ação contra os insetos com a modificação em sua estrutura como, por exemplo, com a substituição de grupos metilas terminais do ácido crisantêmico por átomos de cloro e a inclusão do grupo ciano, aumentando-se a atividade inseticida e a sua estabilidade frente à piretrina (DEWICK, 2002).

Figura 2. Metabólitos encontrados em extrato típico de flores do gênero *Chrysanthemum*.

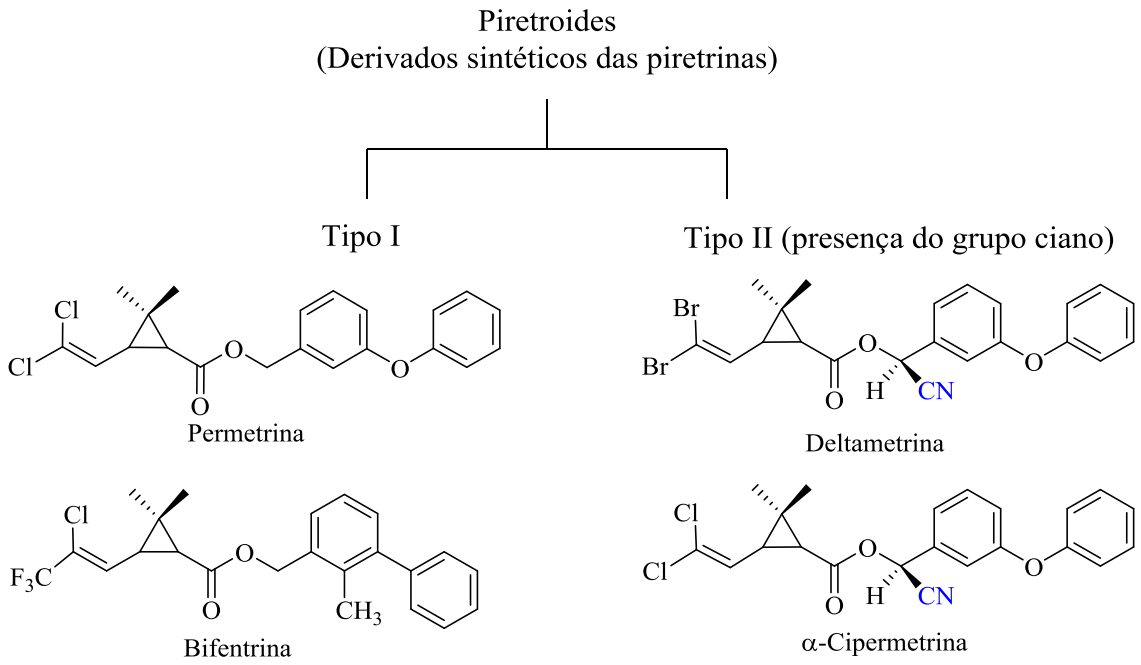


	R_1	R_2
Piretrina I	Me	$CH=CH_2$
Piretrina II	CO_2Me	$CH=CH_2$
Cinerina I	Me	Me
Cinerina II	CO_2Me	Me
Jasmolina I	Me	Et
Jasmolina II	CO_2Me	Et

Fonte: DEWICK, 2002.

Os piretroides sintéticos podem ser divididos em classes do Tipo I e do Tipo II. Em relação às estruturas, os piretroides do Tipo I e do Tipo II apresentam uma porção carboxila esterificada, porém os piretroides do Tipo II tipicamente possuem um grupo ciano, como exemplifica a Figura 3.

Figura 3. Piretroides do Tipo I e do Tipo II provenientes das piretrinas.



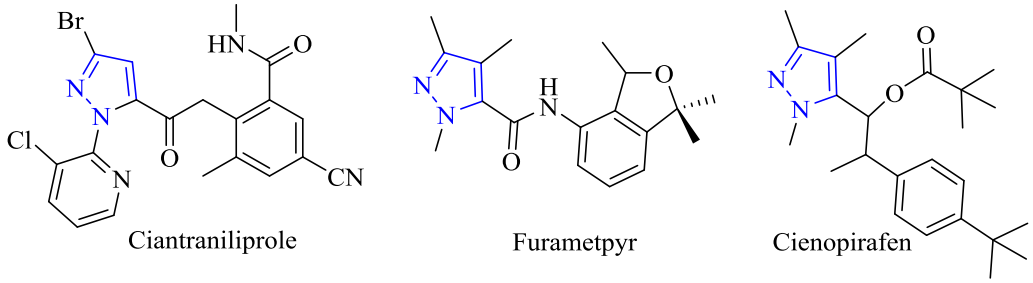
Fonte: ROSS, 2011.

1.3 Fipronil

O Fipronil ((*RS*)-5-amino-1-(2,6-dicloro-α,α,α-triflúor-*p*-toluil)-4-triflúor metilsulfinilpirazol-3-carbonitrila) é um pirazol. Os pirazóis apresentam em sua estrutura um anel heterocíclico de cinco membros com dois átomos de nitrogênio, conferindo à ele as mais diversas aplicações na agricultura (UNIYAL *et al*., 2016b).

Alguns compostos pirazólicos são descritos como inibidores de glicosilação de proteínas, além de serem agentes antibacterianos, antifúngicos, anticâncer, antidepressivos e antivirais. São amplamente estudados, pois apresentam aplicabilidade para a indústria agroquímica na produção de herbicidas, inseticidas, fungicidas e acaricidas. Alguns desses compostos estão mostrados na Figura 4 (KHAN *et al*., 2016; KARROUCHI *et al*., 2018).

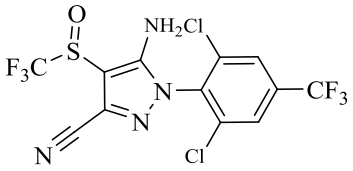
Figura 4. Exemplos de pesticidas pirazólicos.



Fonte: KARROUCHI *et al.*, 2018.

O Fipronil (Figura 5) é classificado segundo a ANVISA como inseticida, formicida e cupinicida, sendo aplicado no solo em culturas de batata, cana-de-açúcar e milho, nas folhas de culturas de algodão, arroz, eucalipto e soja; e nas sementes de cevada, feijão, soja, trigo e na água de irrigação para o cultivo de arroz, podendo também ser empregado na forma de iscas granuladas e em solução. O Fipronil passou a ser utilizado contra insetos tolerantes aos inseticidas piretroides, ciclodienos, organofosforados e carbamatos. O pesticida Fipronil é capaz de atingir o sistema nervoso central dos animais invertebrados, levando-os à paralisia e até à morte (ANVISA, 2019b, ZHAO *et al.*, 2003).

Figura 5. Estrutura química do pesticida Fipronil.



Os pesticidas possuem como função reduzir o impacto de espécies invasoras. No entanto, eles também perturbam processos biológicos, pois podem causar redução nos rendimentos e na qualidade de culturas, além do uso indiscriminado resultar em uma acumulação no meio ambiente. Embora durante o processamento de alimentos possa ocorrer a redução do nível de resíduos de pesticidas, alguns processos como a secagem pode elevar a concentração de pesticidas, e muitos deles podem ser transformados em outros compostos químicos, por exemplo, pela ação da temperatura e de enzimas de microrganismos.

A aplicação de quantidades incorretas de pesticidas nas culturas agrícolas, a resistência dos insetos/ pragas ao pesticida, a bioacumulação dos resíduos de defensivos

agrícolas em organismos não-alvos e a contaminação de águas subterrâneas e superficiais são problemas que devem ser evitados e/ou solucionados.

Dentre os métodos para remediar os ambientes contaminados destaca-se a biorremediação, na qual empregam-se processos biológicos que visam à redução ou à eliminação de compostos que são considerados perigosos. A biorremediação é ambientalmente eficaz, pois é menos prejudicial, mais econômica e ainda pode promover a biodegradação ou a biotransformação de xenobióticos em produtos menos tóxicos através de microrganismos como os fungos e as bactérias. Os microrganismos são capazes de utilizar os poluentes orgânicos como fonte de carbono e energia e, no caso dos metais tóxicos, são capazes de promover uma transformação de um estado oxidativo ou complexo para outro, alterando assim a solubilidade em água e podendo diminuir a sua toxicidade (DZIONEK; WOJCIESZYŃSKA; GUZIK, 2016).

1.4 Biodegradação e biotransformação de pesticidas por microrganismos

As bactérias do gênero *Bacillus* apresentam muitas espécies que são úteis aos seres humanos, como por exemplo a *B. thuringienses* que é amplamente empregada como inseticida microbiano. Essa bactéria é capaz de esporular e formar as denominadas δ-endotoxina (gene *cry*), que são tóxicas para diferentes hospedeiros e então podem ser utilizadas no controle biológico em que o ingrediente ativo é o próprio microrganismo (COSTA *et al.*, 2010). Além disso, as bactérias do gênero *Bacillus* geram produtos que são comercializados, pois são capazes de produzir enzimas, proteínas, metabólitos secundários com propriedades antibióticas, entre outros compostos (RABINOVITCH; OLIVEIRA, 2015). Desta forma, as bactérias apresentam grande potencial para estudos de biodegradação de pesticidas.

A *Biorremediação* é um processo que se utiliza microrganismos, plantas ou enzimas microbianas ou vegetais para desintoxicar contaminantes presentes no solo, na água e em outros ambientes (GOUMA *et al*., 2014).

No entanto, os produtos de biodegradação podem ser mais tóxicos que as substâncias degradadas (IUPAC GOLD BOOK, 1997a).

A *Biotransformação* é qualquer conversão química de uma substância mediada por organismos vivos ou enzimas deles derivados (IUPAC GOLD BOOK, 1997b).

Para o desenvolvimento adequado de uma planta a fertilidade do solo é necessária e é proporcionada pela disponibilidade de nutrientes e pela comunidade microbiana presente. São esses microrganismos a principal via de remoção de pesticidas

presentes no solo, por meio de processos como a oxidação, a redução e a hidrólise (SZCZEPANIEC *et al.*, 2011; SINGH; GUPTA; SHARMA, 2015; SAVI *et al.*, 2016).

Grande atenção vem sendo dada para a degradação de agroquímicos pela ação bacteriana, pois é um mecanismo importante na destinação final dos defensivos agrícolas nos compartimentos ambientais (KUMAR; SINGH; GUPTA, 2012; MANDAL *et al.*, 2014; SAVI *et al.*, 2016).

Tanto o Fipronil quanto a Bifentrina apresentam problemas relacionados com a contaminação ambiental. Além disso, tais pesticidas, banidos pela União Europeia, são altamente tóxicos para as abelhas (EUROPEAN COMISSION, 2019a, EUROPEAN COMISSION, 2019b). Investigar uma forma adequada de tornar esses contaminantes do ambiente menos prejudiciais se mostra de grande importância e a biodegradação é um processo considerado seguro e viável economicamente para remediar ambientes contaminados. Muitos microrganismos têm a capacidade de degradar os pesticidas, resultando em produtos que podem ou não ser tóxicos.

A biodegradação de pesticidas pode ocorrer por meio de microrganismos como fungos e bactérias (GUO *et al*., 2009; CHEN *et al*., 2011; PANDEY; PANT; SIBI, 2014). O processo de metabolização dos pesticidas pode envolver três fases:

i. *Fase I:* o composto pode ser transformado por meio de reações de oxidação, redução ou hidrólise;

ii. *Fase II:* ocorre a conjugação do composto formado da *Fase I*, por exemplo, com um açúcar ou aminoácido, aumentando-se sua solubilidade em água e podendo-se ter redução da sua toxicidade;

iii. *Fase III:* conversão dos metabólitos da *Fase II* em conjugados secundários que também pode ter sua toxicidade reduzida e podem ser eliminados do meio celular. Nesses processos, microrganismos, como fungos e bactérias, produzem enzimas como hidrolases, peroxidases e oxigenases (HERNANDÉZ *et al.*, 2013).

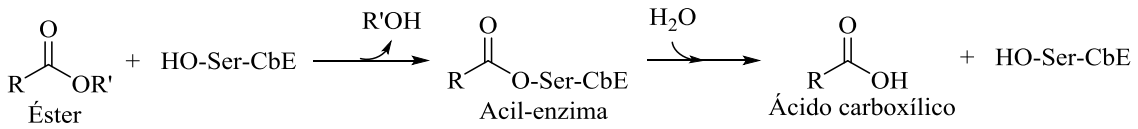
No processo de biodegradação ou biotransformação de pesticidas ou outros compostos xenobióticos, diversas enzimas podem ser utilizadas, as quais podem realizar diferentes funções de acordo com o ambiente em que o microrganismo está inserido. Assim, de acordo com o meio, as enzimas podem ser produzidas ou ainda terem sua concentração aumentada. As enzimas constitutivas são aquelas sintetizadas

independentes do meio de cultivo e estão presentes em quantidades constantes nas células. Já as enzimas indutivas são aquelas que, mediante a presença de um substrato no meio de cultura ou às condições ambientais, tem suas concentrações aumentadas no meio celular. A enzima indutiva é capaz de transformar o substrato em um produto ou metabólito que poderá ser empregado pelas células do microrganismo como fonte nutricional.

No processo de biodegradação algumas enzimas já são conhecidas, como é o caso das carboxilesterases (CbEs). O primeiro passo da biodegradação de pesticidas piretroides pode ser a hidrólise da ligação éster por essas enzimas. De acordo com a União Nacional de Bioquímica e Biologia Molecular, as carboxilesterases são hidrolases (Classe EC 3) e as esterases estão na subclasse EC 3.1 das hidrolases. As CbEs estão incluídas na subclasse EC 3.1.1 das esterases e aquelas capazes de hidrolisar ligações de ésteres carboxílicos encontram-se na subclasse EC 3.1.1.1 (SOGORB; VILANOVA, 2002).

Na reação de hidrólise realizada por essas enzimas, primeiramente ocorre uma acilação reversível de um resíduo de serina no sítio ativo da proteína, provocando assim a liberação da porção alcoólica do éster carboxílico e da enzima acilada. Esta última sofre um ataque nucleofílico da água e é hidrolisada, liberando o ácido carboxílico e a enzima é regenerada, como mostrado simplificadamente na Figura 6 (SOGORB; VILANOVA, 2002).

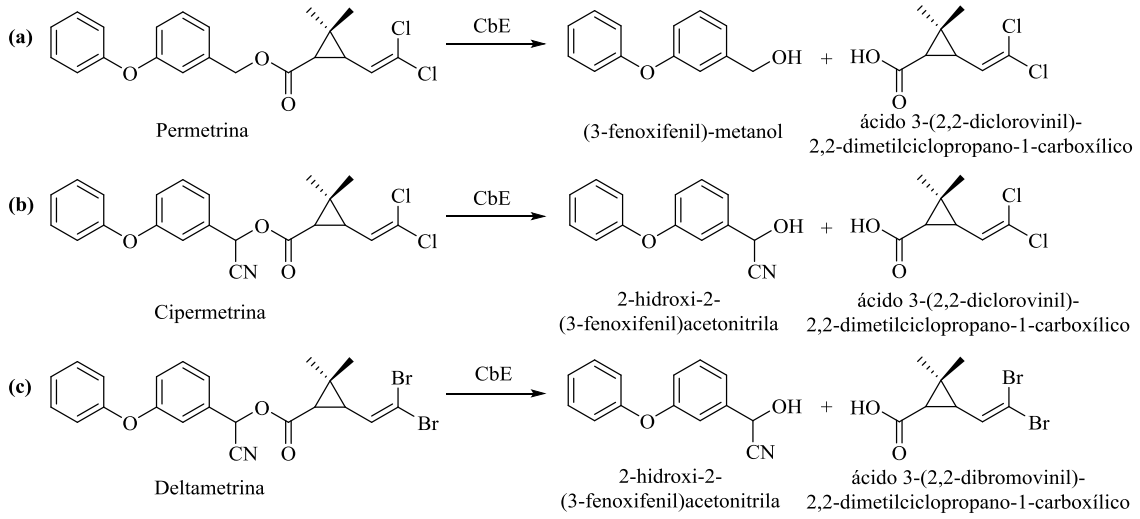
Figura 6. Representação da hidrólise (enzimática) de ligação éster por CBEs.



Fonte: SOGORB; VILANOVA, 2002.

Alguns exemplos de reações catalisadas por carboxilesterases são mostrados na Figura 7. As reações ocorrem na ligação éster do ácido carboxílico dos piretroides, liberando a porção ácida e alcoólica. Outras reações podem ocorrer a depender da estrutura química do pesticida.

Figura 7. Reação de hidrólise por enzimas carboxilesterases nos pesticidas piretroides (a) Permetrina, (b) Cipermetrina e (c) Deltametrina.

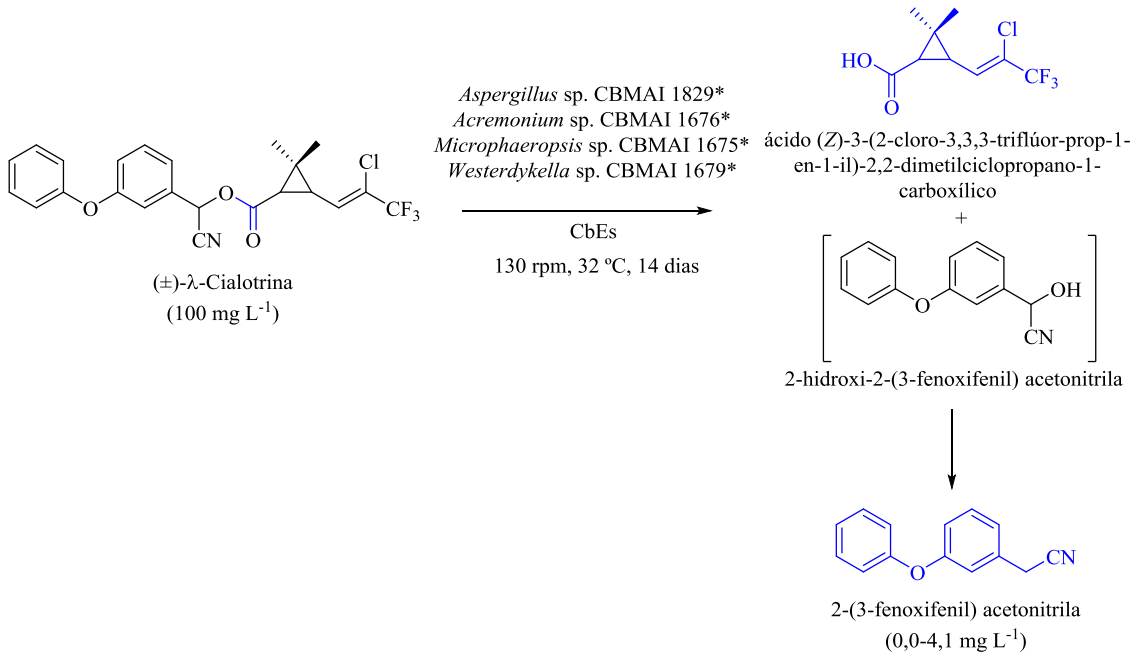


Fonte: SOGORB; VILANOVA, 2002.

Birolli e colaboradores (2018) estudaram a biodegradação do pesticida (±)-λ-Cialotrina pelos fungos de ambiente marinho *Aspergillus* sp. CBMAI 1829, *Acremonium* sp. CBMAI 1676, *Microphaeropsis* sp. CBMAI 1675 e *Westerdykella* sp. CBMAI 1679. Os metabólitos do pesticida gerados pela ação de enzimas CbEs foram identificados por CG-EM. Dois desses metabólitos são mostrados em azul na Figura 8.

Neste estudo, a concentração do pesticida (±)-λ-Cialotrina foi de 100 mg L^{-1} e foi observado que todas as cepas dos fungos marinhos biodegradaram o pesticida piretroide variando de 20,8 a 44,8% de biodegradação. Os excessos enantioméricos variaram de 2 a 42% do pesticida remanescente e a concentração do metabólito 2-hidróxi-2-(3-fenoxifenil)-acetonitrila variou de 0,0 a 4,1 mg L^{-1}. Todos os experimentos foram conduzidos em meio líquido de malte 3%, a 130 rpm, a 32 ºC por um período de 14 dias (BIROLLI *et al.*, 2018).

Figura 8. Reação de biodegradação do pesticida (±)-λ-Cialotrina por fungos de ambiente marinho. Hidrólise realizada por enzimas do tipo CbEs.



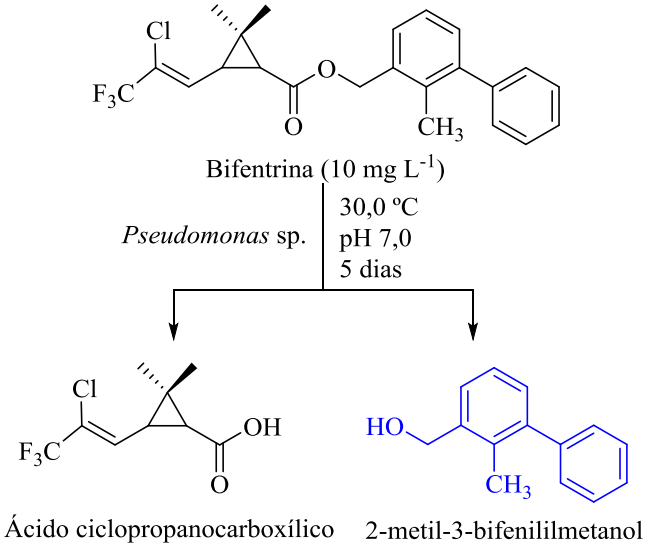
*Utilizou-se um fungo por vez.

Fonte: BIROLLI *et al.*, 2018.

Zhang e colaboradores (2018) utilizaram bactérias do gênero *Pseudomonas* isoladas de lodo ativado em que a concentração de Bifentrina empregada foi de 10 mg L^{-1} e a reação foi realizada em frascos de 100 mL contendo meio mineral e mantida a 30 ºC e pH 7,0. Após 5 dias de reação, 80,2% da Bifentrina foi biodegradada, não tendo sido especificada a porcentagem de conversão dos produtos de biodegradação.

A reação foi analisada por CG-EM e o metabólito detectado foi o 2-metil-3-bifenililmetanol na reação com a Bifentrina. A partir deste estudo pode-se concluir que as bactérias empregadas apresentaram a capacidade em degradar o pesticida podendo ser úteis para processos de biorremediação. A rota de biodegradação proposta pelos autores encontra-se na Figura 9 (ZHANG, 2018).

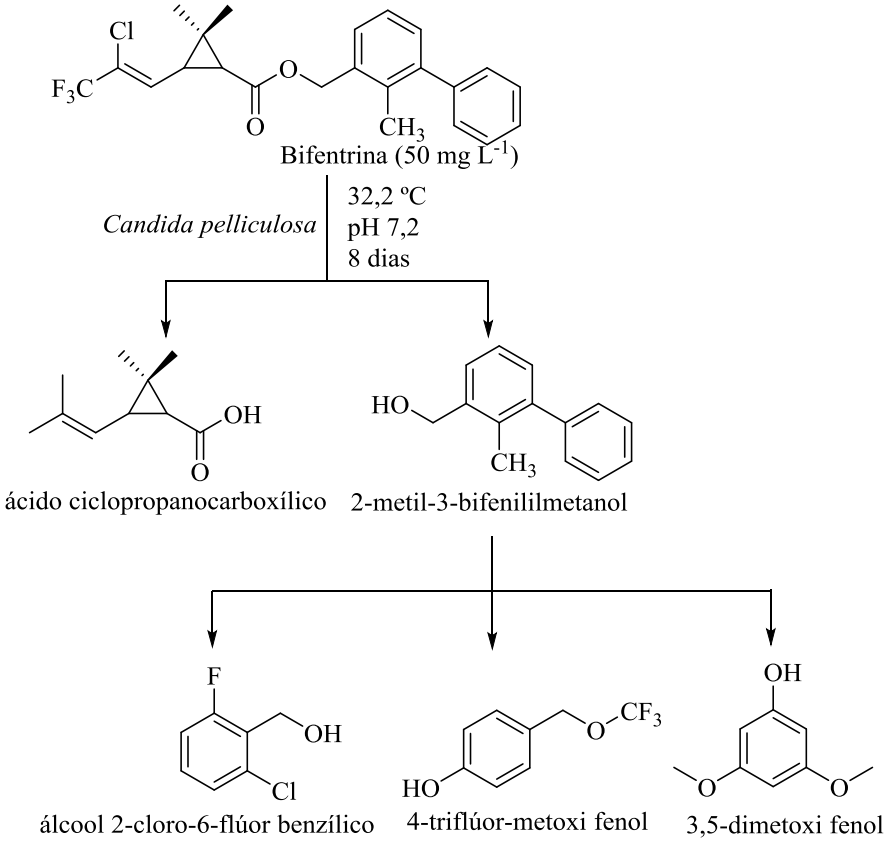
Figura 9. Produtos de biodegradação da Bifentrina utilizando-se bactérias do gênero *Pseudomonas.*



Fonte: Adaptado de ZHANG, 2018.

Em outro trabalho, CHEN e colaboradores (2012) estudaram a rota de biodegradação da Bifentrina utilizando-se o fungo *Candida pelliculosa* e observaram que o pesticida foi degradado em uma ampla faixa de temperatura (20-40 ºC) e pH (5-9). As condições ideais de reação foram de 32,3 ºC e pH 7,2, nas quais, em 8 dias, foi observada a completa metabolização de 50 mg L^{-1} da Bifentrina. Além do álcool e do ácido carboxílico provenientes da hidrólise da Bifentrina, foram identificados por CG-EM a degradação do 3-metil-2-bifenililmetanol nos metabólitos álcool 2-cloro-6-flúor benzílico, 4-triflúor-metoxi fenol e 3,5-dimetoxi fenol, como é mostrado na Figura 10. Não foram relatadas suas porcentagem de conversão provenientes da biodegradação da Bifentrina.

Figura 10. Via metabólica de degradação da Bifentrina pela levedura *Candida pelliculosa*.

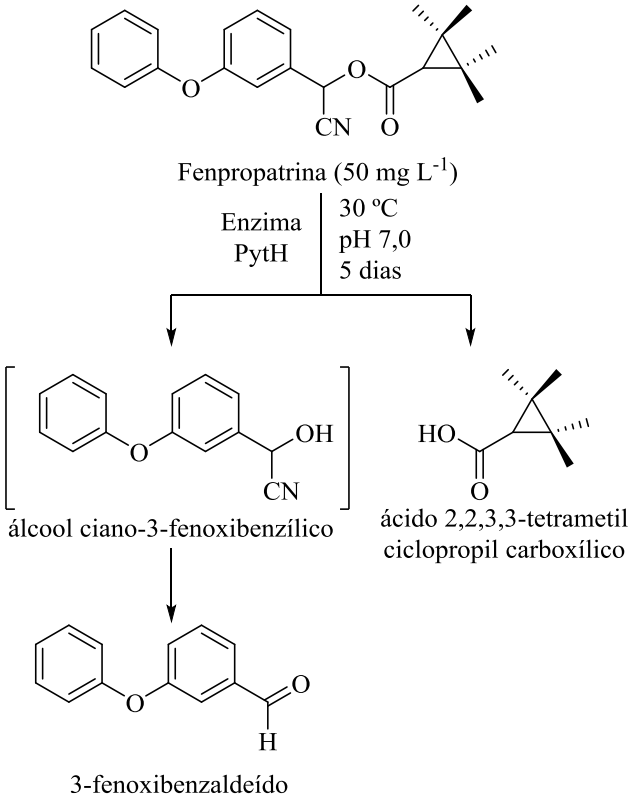


Fonte: Adaptado de CHEN *et al.*, 2012.

Há também estudos na literatura sobre o isolamento, purificação e a identificação da enzima hidrolase de piretroide (PytH) de uma bactéria do gênero *Sphingobium* sp. JZ-2 obtida de lodo ativado a qual foi capaz de hidrolisar a ligação éster dos piretroides Fenpropatrina, Permetrina, Cipermetrina, Fenvalerato, Derametrina e Bifentrina (GUO *et al.*, 2009).

A bactéria foi cultivada em 50 mL de meio líquido LB (Luria-Bertani). A massa celular foi centrifugada e adicionada a um Erlenmeyer de 250 mL com 50 mL de meio líquido de sais minerais e com uma concentração final de piretróide de 50 mg L^{-1}. A reação foi mantida à temperatura de 30 ºC e em agitador rotativo a 180 rpm. Foram feitas extrações em intervalos de tempo de 24 h e os extratos obtidos foram analisados por espectrofotômetro UV-vis e CG-MS. A Figura 11 mostra os produtos obtidos da reação de biodegradação. A enzima purificada foi capaz de hidrolisar a Fenpropatrina em quantidades equimolares de 3-fenoxibenzaldeído e o ácido 2,2,3,3-tetrametil ciclopropilcarboxílico. O álcool ciano-3-fenoxibenzílico é instável e foi transformado espontaneamente em 3-fenoxibenzaldeído (GUO *et al.*, 2009). Nesses estudos não foi especificada a porcentagem de conversão dos produtos de biodegradação.

Figura 11. Reação de hidrólise do piretroide Fenpropatrina pela enzima PytH isolada de *Sphingobium* sp.

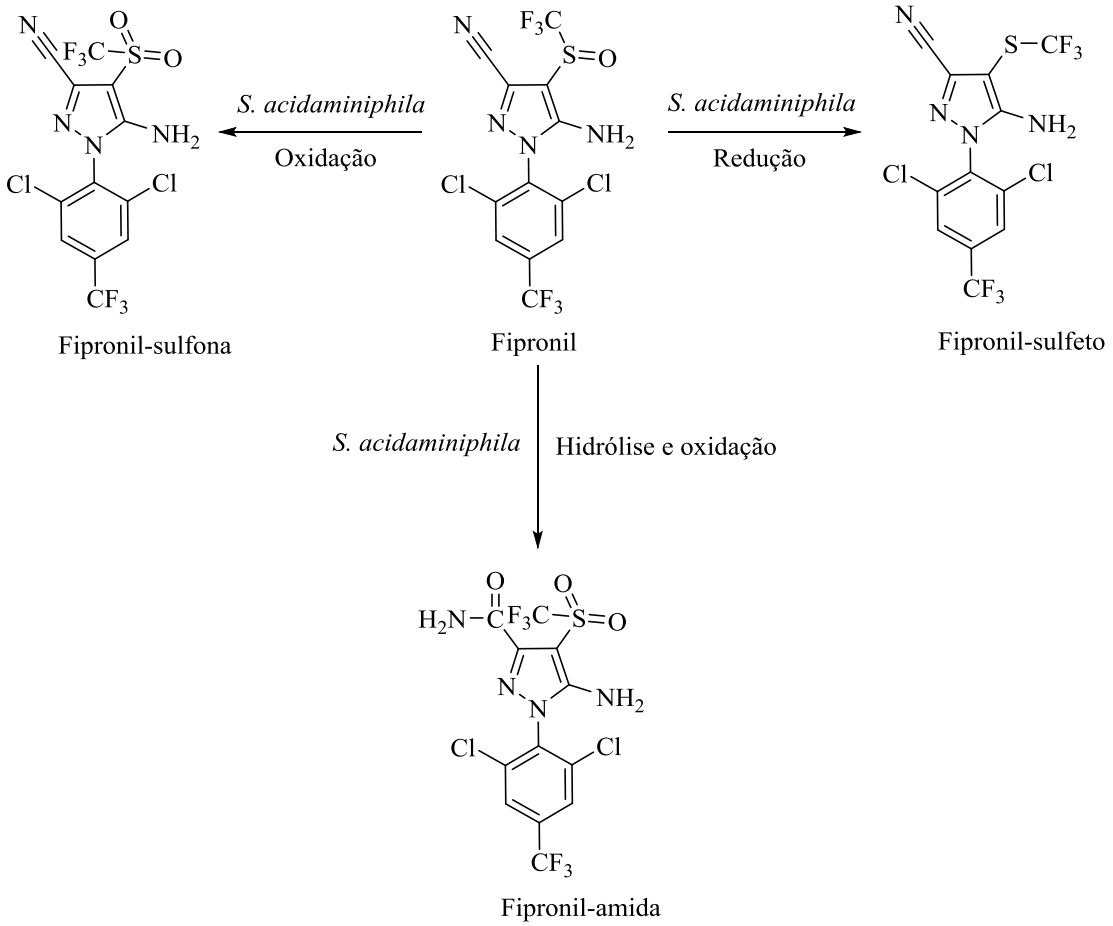


Fonte: Adaptado de GUO *et al.*, 2009.

Na literatura há também diversos exemplos de estudos que tiveram como objetivo a biodegradação do Fipronil por bactérias (KUMAR; SINGH; GUPTA, 2012; MANDAL *et al.*, 2013; MANDAL *et al.*; 2014).

UNIYAL e colaboradores (2016a) propuseram uma rota de biodegradação para o Fipronil utilizando-se a bactéria *Stenotrophomonas acidaminiphila*. O estudo foi realizado adicionando-se os *pellets* celulares (0,175 g L^{-1}) em meio de cultura líquido esterilizado. As culturas bacterianas foram mantidas a 120 rpm em agitador rotativo, 35 ºC, pH 7,5 por 14 dias e foi adicionado 25 mg L^{-1} de Fipronil. Posteriormente, 5 mL das amostras foram centrifugadas a 12.000*g* durante 10 min e então extraídas com 30 mL de hexano. Todos os experimentos de degradação foram realizados em triplicata e com um frasco controle, ou seja, sem a cultura bacteriana, que também foi mantido nas mesmas condições das reações. Após 14 dias de reação, 86% do Fipronil foi biodegradado. O estudo mostrou a capacidade do microrganismo em utilizar o Fipronil em reações de biotransformação, e os metabólitos identificados foram o Fipronil-sulfona, Fipronil-sulfeto e Fipronil-amida (Figura 12). Não foi especificada a porcentagem de conversão dos produtos de biodegradação.

Figura 12. Via metabólica para a biotransformação do Fipronil pela bactéria *Stenotrophomonas acidaminiphila.*



Fonte: UNIYAL *et al.*, 2016a.

ABRAHAM e GAJENDIRA (2019) estudaram a degradação do Fipronil utilizando-se actinobactérias que são microrganismos Gram-positivos com alto teor de guanina e citosina em seu DNA (DHAKAL *et al.*, 2017). A cepa capaz de realizar a biodegradação do Fipronil foi identificada, por sequenciamento genético, como *Streptomyces rochei*.

Os experimentos foram realizados em meio mineral (0,25 g de $MgSO_4$, 1,0 g de NH_4Cl, 5,8 g de Na_2HPO_4, 3,0 g de KH_2PO_4,0,5 g de NaCl em 1 L de água destilada, pH 6,8 ± 0,2) em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio estéril. Adicionou-se o Fipronil na concentração de 500 mg L^{-1} e então foi adicionado o microrganismo no meio líquido. Os frascos foram mantidos em agitação a 120 rpm, 28 ºC por um período de 15 dias e foram feitas as análises no intervalo de 24 horas. Posteriormente, as amostras foram coletadas, extraídas e analisadas por HPLC/UV-vis e CG-EM. Como resultado, foi observado a biotransformação do Fipronil em Fipronil-

sulfona, o qual não foi quantificado.

ABRAHAM e GAJENDIRA (2017) também estudaram a degradação do Fipronil em meio líquido utilizando-se o fungo *Aspergillus glaucus*. Os experimentos foram realizados em frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido (composição por litro: 2,0 g de $NaNO_3$, 0,5 g de KCl, 0,5 g de $MgSO_4.7H_2O$, 10,0 g de glicose, 10 mg de $FeCl_3$, 0,2 g de $BaCl_2$, 0,05 g de $CaCl_2$, pH 6,8). Em seguida foi adicionado 900 mg L^{-1} de Fipronil e 1 mL da cepa do fungo (10^8 esporos mL^{-1}).

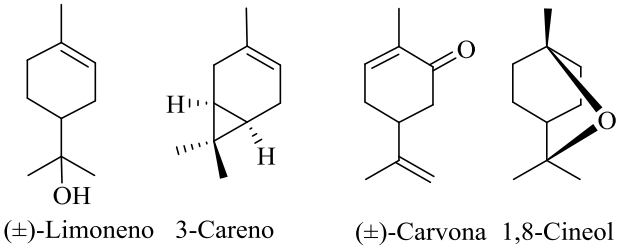
A reação foi mantida em agitação a 120 rpm por um período de 15 dias e as amostras foram analisadas em intervalos de 24 horas por HPLC. Neste trabalho também foi observado a biotransformação do Fipronil no seu metabólito Fipronil-sulfona, porém não foi quantificado (GAJENDIRA; ABRAHAM, 2017; ABRAHAM; GAJENDIRA, 2019).

Na natureza, os microrganismos além de realizarem diversas reações quando em contato com compostos xenobióticos como os agroquímicos e seus metabólitos também podem produzir produtos naturais como terpenos, flavonoides, alcaloides, etc.

1.5 Terpenos

Microrganismos tanto de habitats terrestres quanto marinhos são produtores de inúmeros produtos naturais, de diversos tipos de classes. Dentre elas destacam-se os terpenos que são um grupo de moléculas orgânicas denominadas metabólitos secundários. Os terpenos também são produzidos por plantas e são hidrocarbonetos derivados do isopreno, podendo apresentar as mais diversas funções orgânicas, como ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis ou epóxidos terpênicos como mostra a Figura 13 (FELIPE; BICAS, 2017).

Figura 13. Terpenos (terpenoides) contendo diferentes funções químicas.



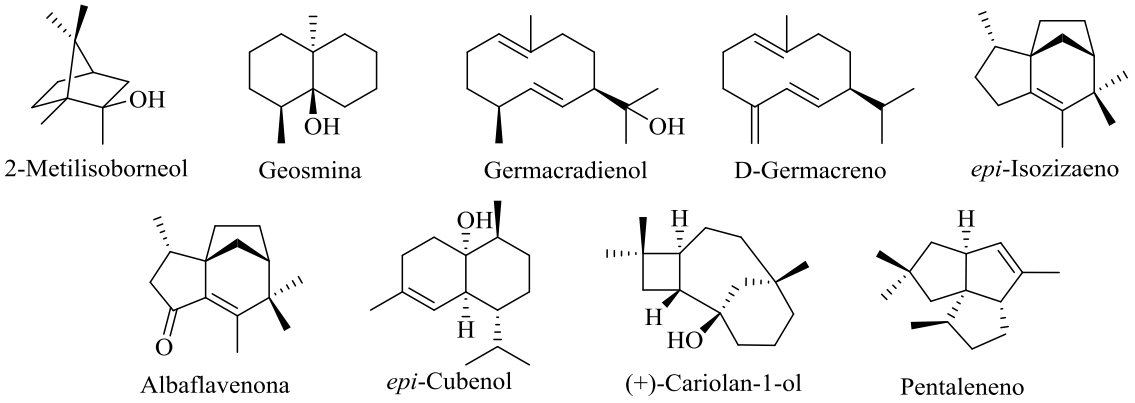
Fonte: Adaptado de FELIPE e BICAS, 2017.

Os microrganismos são capazes de produzir terpenos (isoprenos e monoterpenos, por exemplo), e tais compostos quais podem estar presentes em plantas,

solos e ambientes aquáticos (YAMADA *et al*., 2014). Eles podem servir como fonte de carbono e energia para esses microrganismos. Diversos tipos de reações ocorrem com os terpenos, como oxidação, rearranjos moleculares e a inserção de grupos funcionais, que são catalisadas por vários tipos de enzimas.

YAMADA e colaboradores (2014) confirmaram a produção de metabólitos secundários nos microrganismos dos gêneros *Streptomyces* e *Kitasatospora*. As culturas desses microrganismos foram obtidas em meio Agar, posteriormente foram extraídos com hexano e metanol e em seguida os extratos foram analisados por CG-EM. Os terpenos produzidos pelos microrganismos foram o 2-metilisoborneol, geosmina, germacradienol, D-germacreno, *epi*-Isozizaeno, albaflavenona, e*pi*-cubenol, (+)-cariolan-1-ol e pentaleneno. Suas estruturas encontram-se na Figura 14.

Figura 14. Terpenos produzidos pelos microrganismos *Streptomyces* e *Kitasatospora*.



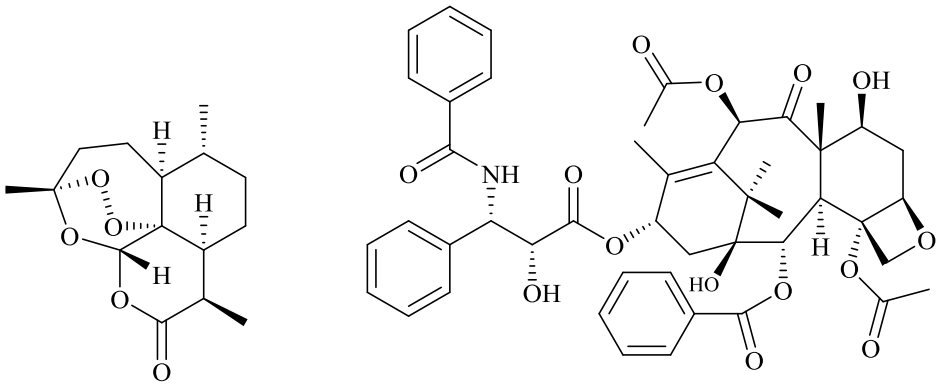
Fonte: YAMADA *et al.*, 2014.

Em geral os terpenos exibem funções biológicas que podem ser benéficas ao ser humano, como é o caso do terpenóide artemisinina (Figura 15) que é um metabólito encontrado na planta *Artemisia annua* amplamente ativo contra *Plasmodium falciparum*, o parasita da malária. No entanto, o nível de produção industrial desse composto é muito baixo frente à demanda, então a solução encontrada foi a produção biotecnológica do ácido artemisínico por expressão em levedura e posterior elaboração por síntese química (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993; CITRON; DICKSCHAT, 2013).

O paclitaxel (Figura 15) é um diterpenóide utilizado como medicamento no tratamento de câncer de mama e carcinoma metastático de ovário. É isolado de algumas

plantas como *Taxus brevifolia* e também é produzido por fungos *Taxomyces andreanae* (STIERLE; STROBEL; STIERLE, 1993; CITRON; DICKSCHAT, 2013).

Figura 15. Metabólito artemisinina, composto ativo contra o protozoário *Plasmodium falciparum* e o paclitaxel, ativo contra câncer de mama e ovário.



Fonte: CITRON, DICKSCHAT, 2013.

Os pesticidas reduzem, diminuem ou eliminam o impacto de espécies invasoras das mais diversas culturas. Embora tenham grande importância para a agricultura, eles podem acumular nos compartimentos ambientais, contaminar águas, influenciar no desenvolvimento e na longevidade de organismos não-alvos, como as abelhas. Assim, estudar a degradação dos pesticidas é crucial na atualidade. Dessa forma, este trabalho visou ao estudo da biodegradação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil por bactérias isoladas das folhas da cultura da laranja.

2. Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo

Estudar a biodegradação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil por diferentes linhagens de bactérias do gênero *Bacillus* isoladas de folhas da cultura de laranja.

2.2 Metas

a) Selecionar bactérias da cultura da laranja capazes de promoverem as reações de biodegradação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil;

b) Identificar e quantificar os possíveis metabólitos de biodegradação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil;

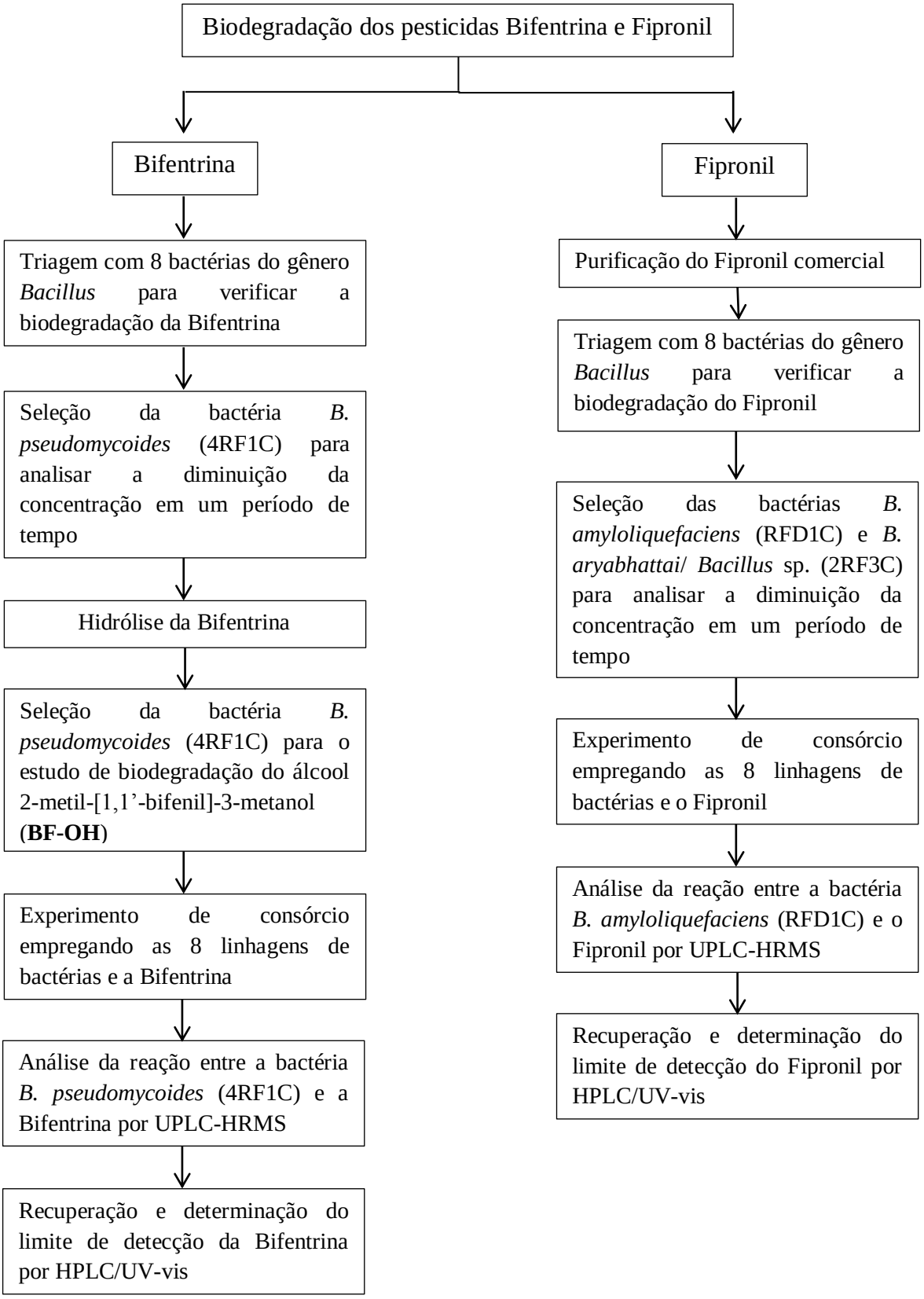
c) Validar o método analítico utilizado via HPLC/UV-vis;

d) Propor a rota de biodegradação dos pesticidas estudados quando possível.

3. Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

- Esquema experimental do estudo de biodegradação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil.



3.1 Reagentes, materiais e equipamentos

3.1.1 Pesticidas, solventes e meio de cultura

a) Pesticidas: Bifentrina (**BF**) (pureza 99%) (*Chem Service*) e Fipronil comercial (Insetimax);

b) Solventes e reagentes: acetato de etila (Synth) ($CH_3CO_2CH_2CH_3$), acetonitrila grau HPLC (LiChrosolv) (CH_3CN), ácido clorídrico (Synth) (HCl), água destilada, água *Milli-Q*, cloreto de sódio (Synth) (NaCl), hexano (Synth) (C_6H_{14}), hidróxido de sódio (Synth) (NaOH), metanol (Honeywell) (CH_3OH), sulfato de sódio anidro (Synth) (Na_2SO_4), álcool 2-metil-[1,1'-bifenil]-3-metanol (TCI) (**BF-OH)**, dimetilsulfóxido deuterado (Synth) (DMSO-d_6), solução de clorofórmio deuterado (Sigma-Aldrich) ($CDCl_3$), solução de acetona deuterada (Sigma-Aldrich) (C_3D_6O), diclorometano (Synth) (CH_2Cl_2), brometo de potássio anidro (Synth) (KBr), hidróxido de potássio (Synth) (KOH), solução hidroalcoólica de *p*-anisaldeído (6%) ($C_8H_8O_2$), éter etílico (Synth) ($(C_2H_5)_2O$) e Agar (Himedia);

c) Meio de cultura: Nutriente *Broth* (Acumedia);

3.1.2 Materiais

Balões de fundo redondo de 100 mL e 250 mL, bico de Bunsen, frascos Erlenmeyer de 125 mL e 250 mL, frascos Béquer de 250 mL, funil de separação, funil simples, micropipetas de 20 e 1000 µL, placas de Petri descartáveis, tubos de ensaio, *vial* de 2 mL, cubetas de acrílico de 1 mL, pinças, espátulas, pipetas Pasteur, alça de inoculação e placas para cromatografia em camada delgada (CCD) de sílica (SiO_2) com indicador UV em 254 nm de dimensões 20x20 cm (Marca: Merck).

3.1.3 Equipamentos

Agitador de tubos tipo vortex (Gehaka), autoclave vertical (Phoenix), balança analítica (Shimadzu), centrífuga (Hitachi – Modelo CR22GIII), Cromatógrafo à Gas-Espectrômetro de Massas (CG-EM) (Shimadzu), Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência com detector UV-vis (HPLC/UV-vis) (Shimadzu), evaporador rotativo (Tecnal), incubadora *shaker* de bancada refrigerada (Novatecnica), medidor de pH de bancada (Qualxtron – Modelo 8010), espectrofotômetro UV-1800 (Shimadzu), câmara de UV (Tecnal), capela de fluxo laminar (Veco), espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) – 500 MHz (Marca: Agilent Technologies, Modelo: 500/54 Premium Shielded), espectrofotômetro FTIR-IRA (Marca: Shimadzu, Modelo:

IRAffinity1, polarímetro equipado com lâmpada espectral de sódio (λ = 589 nm) (Marca: Jasco, Modelo: P2000), determinador de ponto de fusão a seco (Marca: Fisatom, Modelo: 431), cromatógrafo líquido de ultra-performance (Modelo: Accela High Speed LC, Marca: Thermo Scientific) acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução (Modelo: LTQ Orbitrap Velos, Marca: Thermo Scientific) (UPLC-HRMS).

3.2 Procedimento experimental

3.2.1 Soluções empregadas e meios de cultivo

3.2.1.1 Pesticidas Bifentrina e Fipronil

O pesticida comercial Fipronil (25 g L^{-1}) contendo o princípio ativo foi adquirido em comércio local especializado de acordo com o nome comercial Bioinset 25 CE.

O pesticida Bifentrina (100 g L^{-1}) foi doado pela associação Fundecitrus, localizada no município de Araraquara/SP pelo Dr. Rodrigo Facchini Magnani.

3.2.1.2 Solução de 5000 mg L^{-1} de Bifentrina

Para a adição de Bifentrina (30 mg L^{-1}) nos frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo as bactérias e 50 mL de caldo nutriente foi preparada uma solução de 5000 mg L^{-1} a partir do pesticida comercial (100 g L^{-1}), adicionando-se 1,25 mL em um balão de 25 mL e completou-se com água destilada esterilizada em autoclave por 20 minutos a 121 ºC, 1,5 kPa.

*3.2.1.3 Solução de 5000 mg L^{-1} de 2-metil-[1,1'-bifenil]-3-metanol (**BF-OH**)*

Para a adição do álcool **BF-OH** nos frascos Erlenmeyer contendo as bactérias e 50 mL de caldo nutriente foi preparada previamente uma solução aquosa de 5000 mg L^{-1} a partir do álcool **BF-OH** padrão, adicionando-se 25,0 mg (0,126 mmol) em um balão de 5 mL e o volume foi completado com DMSO.

3.2.1.4 Solução salina (0,86%)

Preparou-se 1 L de solução salina adicionando-se 8,6 gramas de cloreto de sódio em 1 L de água destilada. Esta solução foi então esterilizada em autoclave por 20 minutos a 121 ºC, 1,5 kPa.

3.2.1.5 Meio de cultivo sólido

Em um frasco Béquer de 1 L foram adicionados 1 L de água destilada, 8 g de nutriente *Broth* e 20 g de Agar. A solução foi submetida à agitação em agitador magnético e o pH foi ajustado para 7,0 com uma solução de HCl (1,0 mol L^{-1}) ou KOH (0,7 mol L^{-1}). Em seguida o meio de cultura foi esterilizado em autoclave (121 ºC, 1,5 kPa) e após esse período foi resfriado à temperatura de 45 ºC e então adicionado em placas de Petri de diâmetro de 90x15 mm (descartáveis). Em cada placa foi adicionado 30 mL de nutriente *Broth* e Agar esterilizados e em seguida adicionou-se 180 µL de Bifentrina e 12 µL de Fipronil comercial para que a concentração final do pesticida na placa fosse de 30 mg L^{-1} e 10 mg L^{-1}, respectivamente. Toda a manipulação foi realizada em cabine de fluxo laminar (Veco) previamente limpa com álcool 70%, hipoclorito de sódio 2% e luz germicida UV (254 nm) por 20 minutos.

3.2.1.6 Meio de cultivo líquido

Em um frasco Béquer de 1 L foi adicionado 1 L de água destilada e 20 g de nutriente *Broth*. A solução foi submetida à agitação em agitador magnético e o pH foi ajustado para 7,0 com uma solução de HCl (1,0 mol L^{-1}) ou NaOH (0,7 mol L^{-1}). Em seguida, o meio de cultura foi distribuído em frascos Erlenmeyer de 125 mL e adicionou-se 50 mL da solução em cada um dos frascos que foram esterilizados em autoclave por 20 minutos (121 ºC, 1,5 kPa).

3.3 Microrganismos empregados

Os microrganismos utilizados neste trabalho foram isolados previamente pela Dra. Charlene Souza dos Anjos. Foram utilizadas diferentes linhagens de bactérias epífiticas (*Bacillus amyloliquefaciens* MF510169, *Bacillus pseudomycoides* KY621921.1, *Bacillus* sp. KX645723.1, *Bacillus aryabhattai* MF537625.1, *Bacillus megaterium* MF537621.1, *Bacillus pumilus* MF540569.1 e *Bacillus safensis* MF523646.1) as quais foram isoladas de folhas da cultura de laranja na região de Araquarara/SP (ANJOS, 2014). A Tabela 3 mostra os códigos de isolamento e de identificação das bactérias que foram empregadas neste estudo de biodegradação da Bifentrina e do Fipronil.

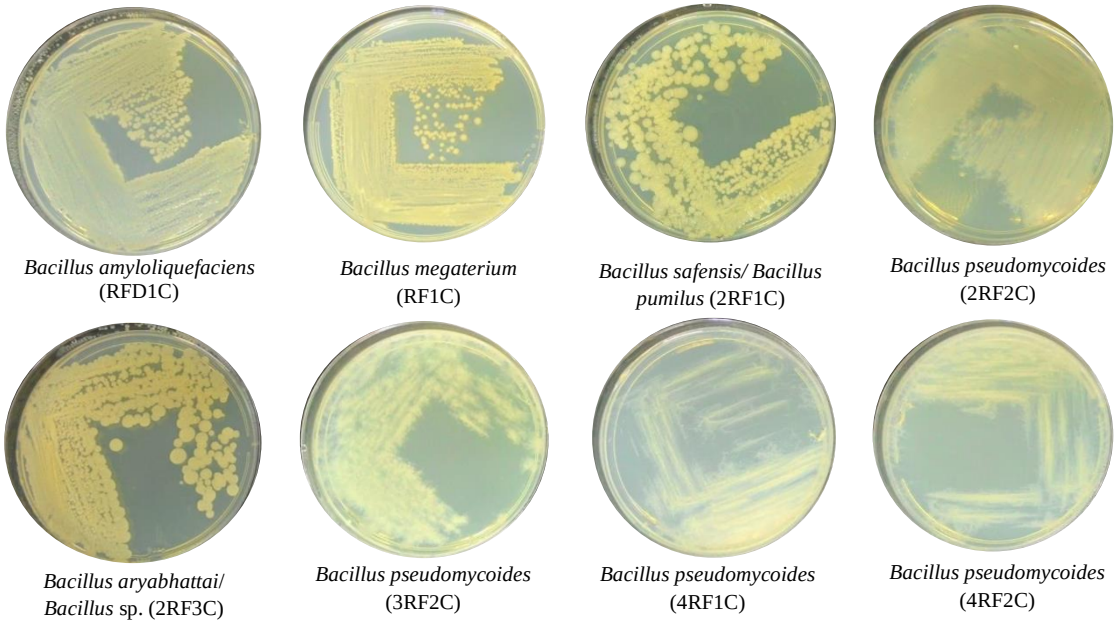
Tabela 3. Código de isolamento e código de identificação das bactérias empregadas neste estudo.

Bactéria	Código de isolamento	Código de identificação
Bacillus amyloliquefaciens	MF510169	RFD1C
Bacillus pseudomycoides	KY621921.1	2RF2C, 3RF2C, 4RF1C, 4RF2C*
Bacillus sp.	KX645723.1	2RF3C
Bacillus aryabhattai	MF537625.1	2RF3C
Bacillus megaterium	MF537621.1	RF1C
Bacillus pumilus	MF540569.1	2RF1C
Bacillus safensis	MF523646.1	2RF1C

*Representam 4 linhagens de *B. pseudomycoides.*

A bactéria codificada como 2RF1C pode ser *Bacillus safensis* ou *Bacillus pumilus* e a bactéria codificada como 2RF3C pode ser *Bacillus aryabhattai ou Bacillus* sp. de acordo com a árvore filogenética obtida durante o processo de identificação. Todas as bactérias encontram-se preservadas em solução de glicerina a -20 ºC e em -80 ºC (ANJOS, 2014). A Figura 16 mostra as bactérias cultivadas em meio sólido utilizadas no estudo de biodegradação da Bifentrina e do Fipronil.

Figura 16. Cultura em meio sólido das bactérias isoladas das folhas de laranja empregadas no estudo de biodegradação da Bifentrina e do Fipronil.

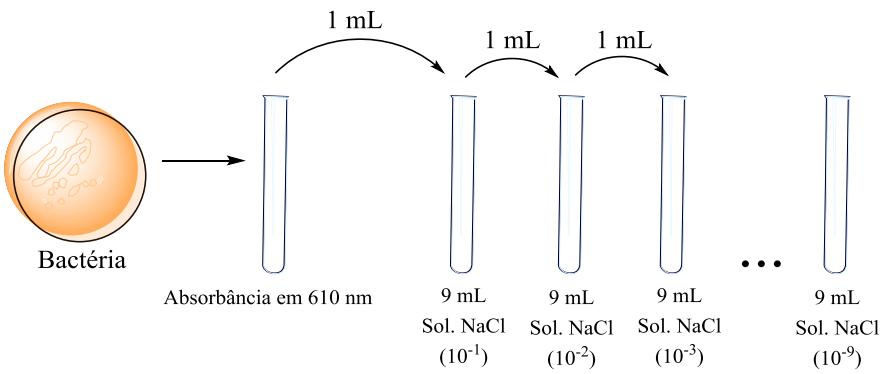


3.3.1 Quantificação das bactérias no inóculo em meio líquido – diluição seriada

Para calcular a concentração das bactérias (células mL^{-1}) que foram inoculadas nos meios de cultura líquidos realizaram-se as seguintes etapas:

a) Um repique com os microrganismos que estavam preservados a -20 ºC foi feito em placa de Petri contendo Agar nutriente o qual foi mantido em estufa a 32 ºC e 24 h para se desenvolverem;
b) Decorrido o período de 24 h, utilizou-se uma solução de NaCl (0,86 %) e adicionou-se em um tubo de ensaio 5 mL desta solução. Em seguida, com uma alça de inoculação esterilizada em chama de bico de Bunsen, retirou-se da placa uma quantidade de inóculo bacteriano que foi adicionado ao tubo de ensaio. Então, o tubo foi mantido em agitação no agitador tipo Vortex para homogeneizar a solução;
c) De posse de ponteiras esterilizadas e com uma pipeta automática, adicionou-se 1 mL da solução preparada no tubo anterior em uma cubeta de acrílico de 1 mL e mediu-se a sua absorbância no comprimento de onda de 610 nm em espectrofotômetro UV-vis;
d) Retirou-se 1 mL da solução deste tubo de ensaio e adicionou-se em um outro tubo de ensaio contendo 9 mL da solução salina (Tubo 10^{-1});
e) Colocou-se o tubo 1 (Tubo 10^{-1}) para agitar no agitador tipo Vortex e deste retirou-se 1 mL e adicionou-se em outro tubo contendo 9 mL de solução salina (Tubo 10^{-2}). Assim sucessivamente até o tubo de concentração 10^{-9}, como mostra a Figura 17.

Figura 17. Diluição seriada para quantificar as bactérias nos inóculos em meio líquido.



f) De cada tubo de ensaio retirou-se 5 gotas de 15 µL de solução bacteriana que foram adicionadas em uma placa de Petri contendo a solução de meio nutriente *Broth* e Agar. Posteriormente as nove placas foram mantidas em estufa a 32 ºC por 24 h.

g) Observou-se na placa de Petri a quantidade de colônias bacterianas formadas, de maneira que fosse maior que 5 e menor que 50 por gota aplicada.

h) Somou-se a quantidade de colônias formadas por gota e então calculou-se a média de acordo com a Equação 1, na qual C1, C2, C3, C4 e C5 correspondem à quantidade de colônias por gota e *y* é o módulo do expoente correspondente à diluição da placa em que foi possível contar as colônias:

$$d\frac{\%s\ E\ \%t\ E\ \%u\ E\ \%v\ E\ \%w}{w}hT\,sr\ ^{\grave{\imath}}\ :'MQ=-\ \ Ks;$$

Calculou-se a quantidade de bactérias presentes em 1000 µL (retirado do primeiro tubo de ensaio). A concentração de bactérias empregadas neste trabalho foi da ordem de 10^6 UFC mL^{-1}. Os valores das absorbâncias empregadas encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Valores das absorbâncias das soluções de bactérias que foram empregadas nos experimentos de degradação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil.

Bactéria	Absorbância (610 nm)
Bacillus amyloliquefaciens (RFD1C)	0,360-0,370
Bacillus megaterium (RF1C)	0,110-0,120
Bacillus safensis / Bacillus pumilus (2RF1C)	0,700-0,710
Bacillus pseudomycoides (2RF2C)	0,460-0,470
Bacillus aryabhattai/ Bacillus sp. (2RF3C)	0,520-0,530
Bacillus pseudomycoides (3RF2C)	0,460-0,470
Bacillus pseudomycoides (4RF1C)	0,460-0,470
Bacillus pseudomycoides (4RF2C)	0,460-0,470

3.4 Cultivo das bactérias em meio sólido e líquido na presença de Bifentrina e Fipronil

Nesta etapa realizou-se o cultivo de todas as bactérias (Tabela 4) em meio sólido e líquido para o estudo de biodegradação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil.

3.4.1 Meio de cultivo sólido

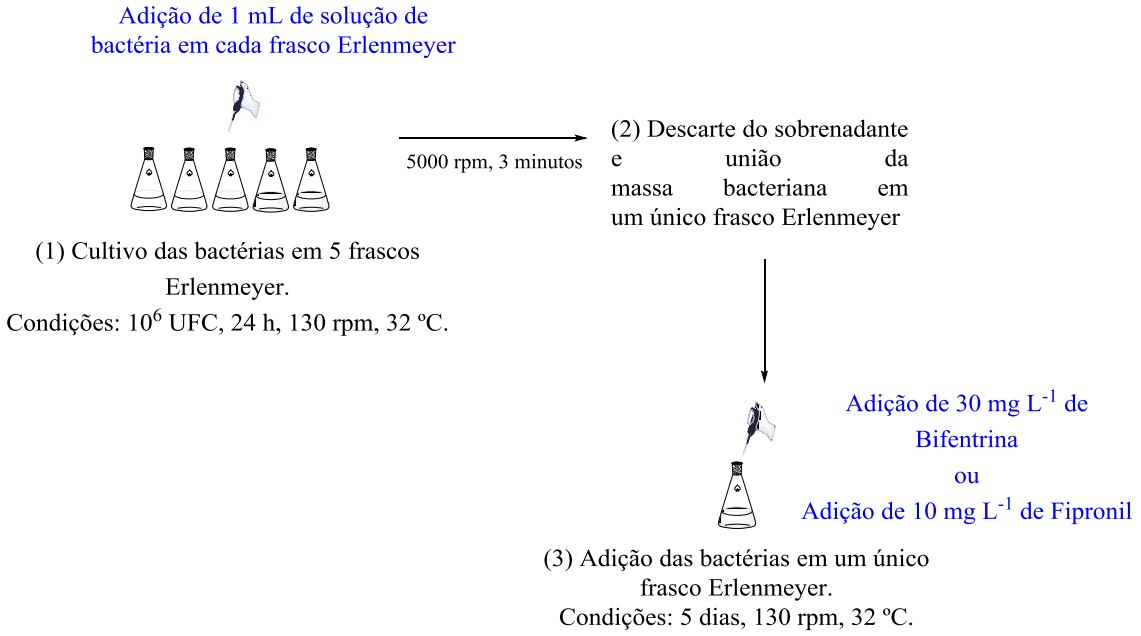
As bactérias foram cultivadas em placas de Petri contendo 30 mL do meio de cultura sólido na presença e ausência (controle positivo) dos pesticidas Bifentrina e Fipronil. As bactérias que se adaptaram ao meio sólido foram cultivadas em meio líquido para se verificar uma possível degradação do pesticida, bem como, a formação de metabólitos na biodegradação do pesticida. Cultivaram-se os microrganismos nas placas de Petri nas concentrações de 30, 50, 70 e 100 mg L^{-1} de Bifentrina comercial considerando a concentração do princípio ativo de 100 g L^{-1}. Os microrganismos foram também cultivados em placas de Petri com meio sólido com as concentrações de 10, 30 e 100 mg L^{-1} de Fipronil comercial considerando a concentração do princípio ativo de 25 g L^{-1}.

3.4.2 Meio de cultivo líquido

As reações de biodegradação em meio líquido foram realizadas em um frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultivo. Cultivou-se os microrganismos em 5 frascos Erlenmeyer contendo 1 mL de solução de bactéria em cada frasco e após 24 h de cultivo, os frascos Erlenmeyer contendo as bactérias já cultivadas foram transferidos para frascos de centrífuga de 250 mL e centrifugadas a 5.000 rpm por 3 minutos.

Em seguida, o meio de cultura foi descartado e a massa bacteriana foi transferida para um único frasco Erlenmeyer contendo 50 mL de solução de nutriente *Broth*. Então, adicionou-se o pesticida Bifentrina na concentração de 30 mg L^{-1} (300 µL) e para o Fipronil foi adicionado a concentração final de 10 mg L^{-1} (20 µL) (Figura 18), separadamente. Posteriormente, os frascos Erlenmeyer foram incubados em agitadores tipo *shaker* e mantidos por 5 dias, a 130 rpm e 32 ºC. Todas as reações foram realizadas em triplicata.

Figura 18. Etapas de cultivo das bactérias em meio de cultura líquido.



3.4.3 Reações-controle na ausência de bactéria em meio líquido

Para os experimentos foi realizada uma reação-controle sem a adição das bactérias em estudo para verificar a estabilidade dos pesticidas nessas condições (Reação de *controle abiótico*). Os experimentos foram conduzidos adicionando-se os pesticidas em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura nutriente *Broth*, de maneira que a concentração final de Bifentrina e de Fipronil no frasco foram de 30 mg L^{-1} e 10 mg L^{-1}, respectivamente. Os experimentos para os pesticidas foram realizados separadamente. A reação foi mantida em agitador tipo *shaker* por 5 dias, a 130 rpm e 32 ºC. Para as reações de controle abiótico não foi realizado replicatas.

3.4.4 Reações controle na ausência dos pesticidas

Para os experimentos foi realizada uma reação-controle somente com as bactérias cultivadas no meio de cultura líquido para verificar a possível produção de metabólitos (Reação de *controle biótico*). O experimento foi conduzido em um frasco Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura nutriente *Broth*. A reação foi mantida em agitador tipo *shaker* por 5 dias, a 130 rpm e 32 ºC. Para as reações de controle biótico não foram realizadas replicatas.

3.5 Extração dos compostos da reação de biodegradação

Posteriormente ao período de 5 dias de reação foram realizadas as extrações dos produtos de biodegradação. Inicialmente, adicionou-se 50 mL de acetato de etila em cada frasco Erlermeyer de 125 mL contendo uma barra magnética e então a solução foi submetida à agitação magnética por 30 min a 250 rpm (processo de lise celular). Em seguida, as misturas (líquido e massa bacteriana) foram transferidas para frascos de centrífuga de 250 mL e centrifugadas a 10.000 rpm (Força G = 15.456 *g*) por 20 min.

O sobrenadante foi transferido para frascos Béquer de 250 mL e o pH da fase aquosa de cada solução foi ajustado para 7,0, pois o pH da solução aquosa encontrava-se acima de 8,0. Separadamente, cada solução foi transferida para um funil de separação no qual foram realizadas 3 extrações com 50 mL de acetato de etila cada. A fase aquosa foi descartada e à fase orgânica foi adicionado o sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), então foi filtrada e o solvente adicionado em um balão de fundo redondo e então removido em evaporador rotativo. O mesmo procedimento foi realizado para as reações controle (Seções 3.4.3 e 3.4.4).

3.5.1 Ressuspensão da solução da extração contendo os compostos de biodegradação nas reações com a Bifentrina e o Fipronil

A fração obtida da fase orgânica foi ressuspendida em 5 mL de metanol (grau HPLC) e, então, 1 mL dessa solução foi transferida para um frasco *vial* de 2 mL e analisado em HPLC/UV-vis e CG-EM. As análises por HPLC/UV-vis foram feitas no comprimento de onda de 220 nm para ambos os pesticidas. O mesmo procedimento foi realizado para as reações controle (Seções 3.4.3 e 3.4.4).

3.6 Análise da diminuição da concentração de Bifentrina realizada pela bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C)

Os mesmos procedimentos de cultivo em meio sólido e líquido descritos nas Seções 3.4 e 3.5 foram realizados para as reações com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) na presença da Bifentrina (30 mg L^{-1}). As extrações foram feitas com 1, 3 e 5 dias de reação para se avaliar a possível formação de metabólitos provenientes da degradação do pesticida (Seção 3.5). As análises por HPLC/UV-vis foram realizadas no comprimento de onda de 220 nm.

3.7 Cultivo da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) em meio sólido e líquido na presença da Bifentrina

Os mesmos procedimentos de cultivo em meio sólido e líquido descritos nas Seções 3.4 e 3.5 foram realizados para as reações com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) na presença da Bifentrina. As extrações foram realizadas com 10 dias de reação para se avaliar se houve a degradação da Bifentrina pela bactéria. As análises por HPLC/UV-vis foram realizadas no comprimento de onda de 220 nm.

3.8 Cultivo da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) em meio líquido e reação com o sobrenadante (caldo de cultivo) do microrganismo na presença da Bifentrina

Os mesmos procedimentos de cultivo das bactérias em meio sólido e líquido descritos na Seção 3.4 e a extração descrita na Seção 3.5 foram realizados para o cultivo e as reações com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C), porém a massa bacteriana foi separada do meio líquido por centrifugação e à solução sobrenadante (caldo de cultivo) foi adicionada a solução de Bifentrina (30 mg L^{-1}) para se verificar se as enzimas responsáveis pela reação de biodegradação eram extracelulares. Todo o procedimento foi realizado em capela de fluxo laminar. As extrações foram realizadas em 5 dias de reação e as análises por HPLC/UV-vis foram realizadas no comprimento de onda de 220 nm.

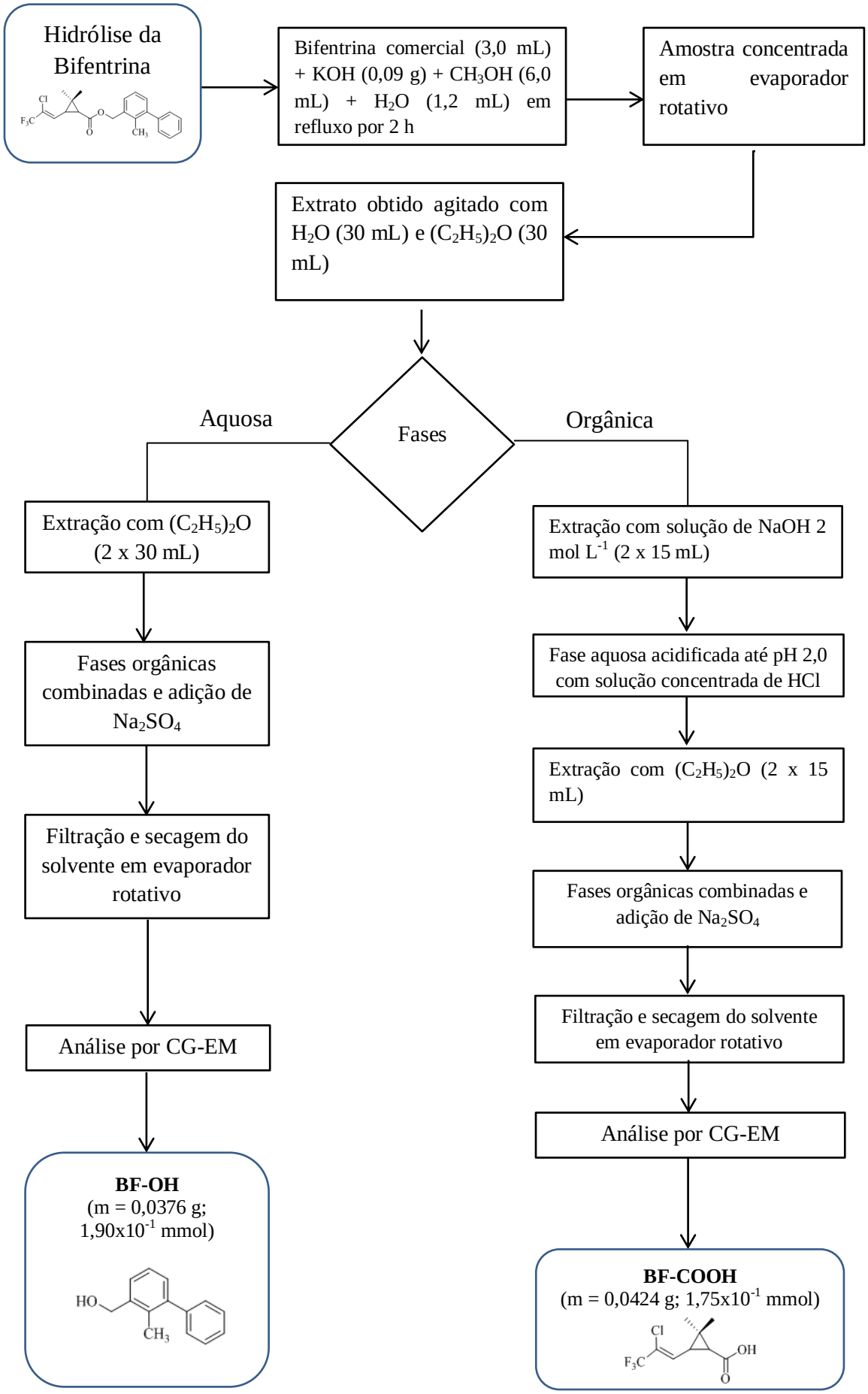
3.9 Hidrólise da Bifentrina na presença de KOH

A hidrólise da Bifentrina foi realizada de acordo com o fluxograma da Figura 19, obtendo-se como produtos o álcool **BF-OH** e o ácido **BF-COOH.**

Uma mistura de Bifentrina comercial (3,0 mL) e hidróxido de potássio (0,09 g) em metanol (6,0 mL) e água (1,2 mL) foi aquecida sob refluxo durante 2 horas e posteriormente concentrada em evaporador rotativo. O extrato obtido foi agitado com água (30 mL) e éter etílico (30 mL). As fases orgânica e aquosa foram separadas. A fase aquosa foi extraída com éter etílico (2 x 15 mL) e a fase orgânica foi extraída com solução de hidróxido de sódio aquoso 2 mol L^{-1} (2 x 15 mL). As fases orgânicas foram combinadas e adicionou-se sulfato de sódio anidro, filtrou-se e em seguida evaporou-se obtendo o 2-metil-[1,1'-bifenil]-3-metanol, nomeado de álcool **BF-OH**. Neste trabalho, apenas o álcool **BF-OH** foi empregado nos experimentos de biodegradação com as bactérias.

A fase aquosa foi acidificada até pH 2,0 com solução de ácido clorídrico concentrado, extraída com éter etílico (3 x 15 mL) e as fases orgânicas foram combinadas e adicionou-se sulfato de sódio anidro, filtrou-se e evaporou-se o solvente em evaporador rotativo obtendo-se o ácido-(1*R*,3*R*)-3-((*Z*)-2-cloro-3,3,3-triflúor-prop-1-en)-2,2-dimetilciclopropanílico, nomeado de ácido **BF-COOH** (FARNHAM; KHAMBAY, 1995). Neste trabalho, não foi empregado o ácido **BF-COOH** nos experimentos de biodegradação com as bactérias.

Figura 19. Fluxograma do processo de hidrólise em meio básico da Bifentrina.



3.10 Cultivo da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) em meio sólido e líquido na presença do álcool BF-OH

Os mesmos procedimentos de cultivo de bactérias em meio sólido e líquido e posterior extração descritos nas Seções 3.4 e 3.5 foram realizados para as reações com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) na presença do álcool **BF-OH** (30 mg L^{-1}) e na ausência da Bifentrina. As extrações foram feitas com 3 e 5 dias de reação para essa concentração. Posteriormente, empregou-se as concentrações de 10 mg L^{-1} e 15 mg L^{-1} do álcool **BF-OH** em 15 e 10 dias de reação, respectivamente, para avaliar a formação de possíveis produtos de biodegradação do álcool **BF-OH**. As análises por HPLC/UV-vis foram realizadas no comprimento de onda de 220 nm.

3.11 Cultivo da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) em meio sólido e líquido na presença do álcool BF-OH (10 mg L^{-1}) e da Bifentrina (30 mg L^{-1})

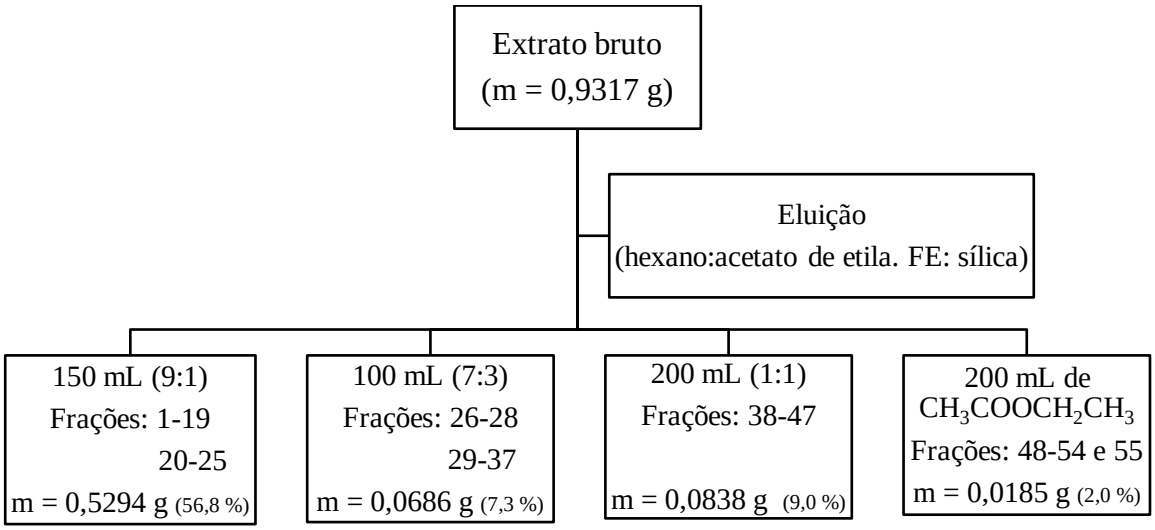
Os mesmos procedimentos de cultivo de bactéria em meio sólido e líquido e posterior extração descritos nas Seções 3.4 e 3.5 foram realizados para as reações com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) na presença da Bifentrina (30 mg L^{-1}) e do álcool **BF-OH** (10 mg L^{-1}) no mesmo frasco Erlenmeyer. As extrações foram realizadas com 5 e 10 dias de reação para se avaliar se houve aumento na concentração do álcool **BF-OH** proveniente da hidrólise da Bifentrina realizada pela bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C). As análises das amostras por HPLC/UV-vis foram realizadas no comprimento de onda de 220 nm.

3.12 Emprego da técnica de cromatografia em coluna para o isolamento e a purificação de um possível produto proveniente da reação entre a Bifentrina e a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C)

Os mesmos procedimentos de cultivo de bactéria em meio sólido e líquido e posterior extração descritos nas Seções 3.4 e 3.5 foram realizados para as reações com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) na presença da Bifentrina (30 mg L^{-1}) em replicatas. Obteve-se ao final 0,9317 g de extrato bruto da reação. Por meio de cromatografia em coluna foi feita uma separação em diferentes frações de acordo com a polaridade dos compostos (empregando-se hexano (C_6H_{14}) e acetato de etila ($CH_3COOCH_2CH_3$)), que foram acompanhados por CCD e revelados em luz ultravioleta de 254 nm e com uma solução hidroalcoólica de *p*-anisaldeído (6%).

Neste processo de purificação, uma coluna de vidro de 3 cm de diâmetro e 50 cm de comprimento foi empregada, 35 g de sílica (fase estacionária (FE)) foi utilizada e os produtos foram eluídos com 150 mL da mistura dos solventes C_6H_{14} e $CH_3COOCH_2CH_3$ na proporção 9:1, seguido com 100 mL da mistura de C_6H_{14} e $CH_3COOCH_2CH_3$ na proporção 7:3, em seguida 200 mL da mistura de C_6H_{14} e $CH_3COOCH_2CH_3$ na proporção 1:1 e por fim 200 mL de $CH_3COOCH_2CH_3$, como mostra o organograma da Figura 20. As frações obtidas foram analisadas por CCD e aquelas que foram semelhantes foram reunidas.

Figura 20. Organograma do processo de separação por cromatografia em coluna de frações do extrato bruto da reação em replicatas com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e a Bifentrina.



3.12.1 Purificação das frações das reações entre a bactéria B. pseudomycoides (4RF1C) e a Bifentrina

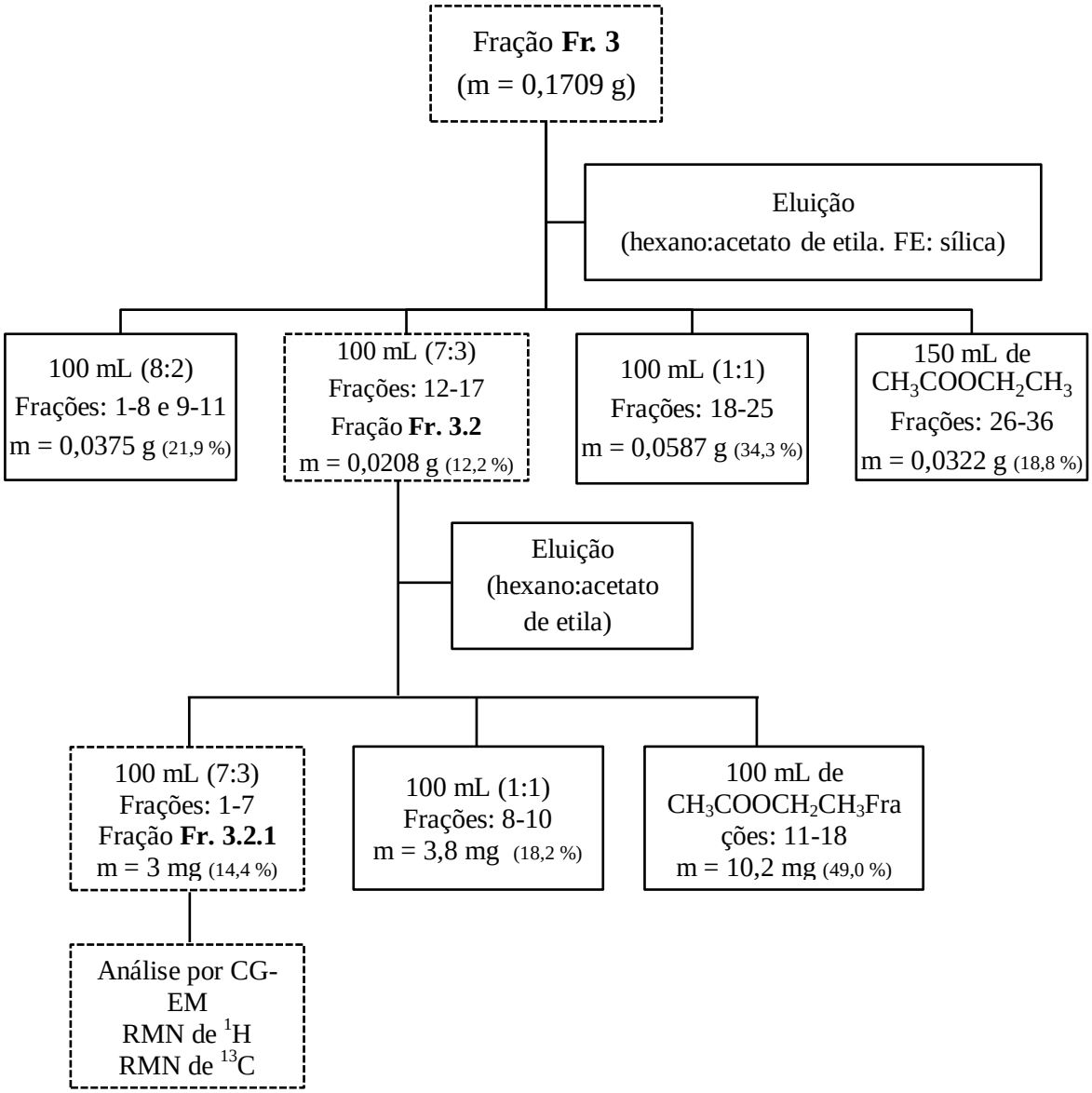
A partir do processo de separação das 55 frações descrito na Seção 3.12 (Figura 20), foi necessário realizar novas purificações. As frações foram unidas em 7 novas frações após serem analisadas por CCD.

Fez-se a junção da fração 29-37, da fração 38-47 e da fração 48-55 em uma única fração, que foi denominada de **Fr. 3**. Para a separação e purificação dos produtos da **Fr. 3** empregou-se uma coluna de vidro de 1,5 cm de diâmetro, 15 g de sílica e na separação utilizou-se 100 mL da mistura de C_6H_{14} e $CH_3COOCH_2CH_3$ na proporção 8:2, seguida de 100 mL da mistura de C_6H_{14} e $CH_3COOCH_2CH_3$ na proporção 7:3, então 100 mL da mistura C_6H_{14} e $CH_3COOCH_2CH_3$ na proporção 5:5 e 150 mL de $CH_3COOCH_2CH_3$ para eluir os compostos. Todo o processo de eluição foi acompanhado por CCD que foi revelada em luz ultravioleta de 254 nm e empregando o reagente hidroalcoólico de *p*-anisaldeído (6%).

A fração **Fr. 3** foi submetida a purificação obtendo-se 4 novas frações (Fração **Fr. 3.1**, fração **Fr. 3.2**, fração **Fr. 3.3** e fração **Fr. 3.4**) e então foram analisadas por CG-EM. A fração **Fr. 3.2** foi novamente purificada empregando-se uma coluna de vidro de 1,5 cm de diâmetro, 15 g de sílica e na separação utilizaram-se 100 mL da mistura de C_6H_{14} e $CH_3COOCH_2CH_3$ na proporção 7:3, seguida de 100 mL da mistura de C_6H_{14} e $CH_3COOCH_2CH_3$ na proporção 1:1, e então 100 mL de $CH_3COOCH_2CH_3$ para eluir os compostos.

A fração **Fr. 3.2** foi submetida a purificação obtendo-se 3 novas frações (Fração **Fr. 3.2.1**, fração **Fr. 3.2.2** e fração **Fr. 3.2.3**). O processo de purificação da fração **Fr. 3** está mostrado na Figura 21.

Figura 21. Organograma do processo de purificação por cromatografia em coluna da fração **Fr. 3.2** de um metabólito proveniente da reação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) com a Bifentrina.



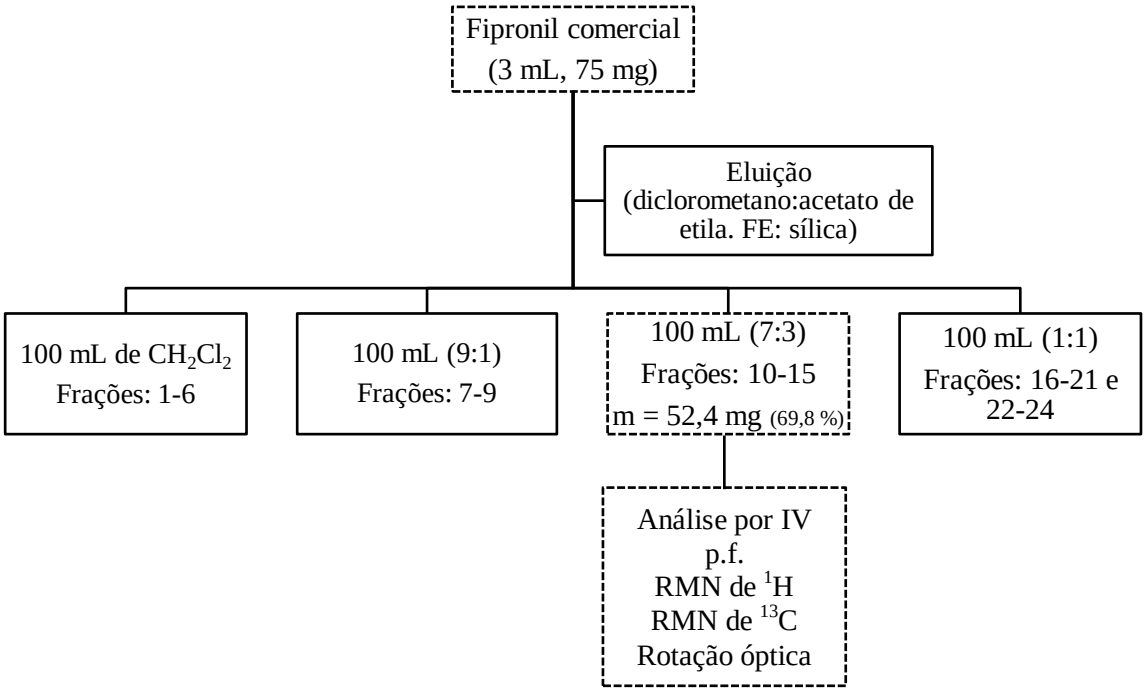
3.13 Purificação do Fipronil comercial

Objetivando-se a purificação do Fipronil comercial para realizar a quantificação nas amostras das reações de biodegradação/biotransformação, empregou-se a técnica de cromatografia em coluna. Purificaram-se 3 mL do Fipronil comercial.

Utilizou-se uma coluna de vidro de 1,5 cm de diâmetro, 12 g de sílica e os solventes diclorometano (Cl_2CH_2) e $CH_3COOCH_2CH_3$ nas proporções de 100 mL de Cl_2CH_2, seguida de 100 mL da mistura de Cl_2CH_2 e $CH_3COOCH_2CH_3$ na proporção 9:1, seguida de 100 mL da mistura de Cl_2CH_2 e $CH_3COOCH_2CH_3$ na proporção 7:3, seguida de 100 mL da mistura de Cl_2CH_2 e $CH_3COOCH_2CH_3$ na proporção 1:1 para eluir os compostos, como mostra o organograma da Figura 22.

Todo o processo de eluição foi acompanhado por CCD que foi revelada em luz ultravioleta de 254 nm e com uma solução hidroalcoólica de *p*-anisaldeído (6%). Depois de purificado o Fipronil foi analisado por RMN de ^{1}H e RMN de ^{13}C, infravermelho, rotação óptica e ponto de fusão (p.f.).

Figura 22. Organograma do processo de purificação por cromatografia em coluna do Fipronil comercial.



3.13.1 Medida de rotação óptica

Analisou-se 5 mg de Fipronil purificado em 800 µL de clorofórmio grau espectroscópico e a medida foi realizada à temperatura de 25 ºC. O caminho óptico da cubeta empregada foi de 0,1 dm. O polarímetro empregado é equipado com lâmpada espectral de sódio (λ = 589 nm) (Marca: Jasco, Modelo: P2000). A análise de rotação óptica foi realizada na Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI no Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP).

3.13.2 Espectroscopia na região de absorção do Infravermelho (IV)

Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos usando o equipamento Shimadzu, modelo IRAffinity1 com transformada de Fourier. A análise foi realizada empregando-se pastilhas de KBr anidro. As frequências de absorção foram expressas em número de onda (cm^{-1}) na região de 600-4000 cm^{-1}. A análise de infravermelho foi realizada na Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI no Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP).

3.13.3 Medida de ponto de fusão

O ponto de fusão foi analisado em um determinador de ponto de fusão a seco (Marca: Fisatom, Modelo: 431). A massa empregada foi de 1 mg.

3.14 Análise da diminuição da concentração de Fipronil realizada pelas bactérias *Bacillus amyloliquefaciens* (RFD1C) e *Bacillus aryabhattai*/ *Bacillus* sp. (2RF3C)

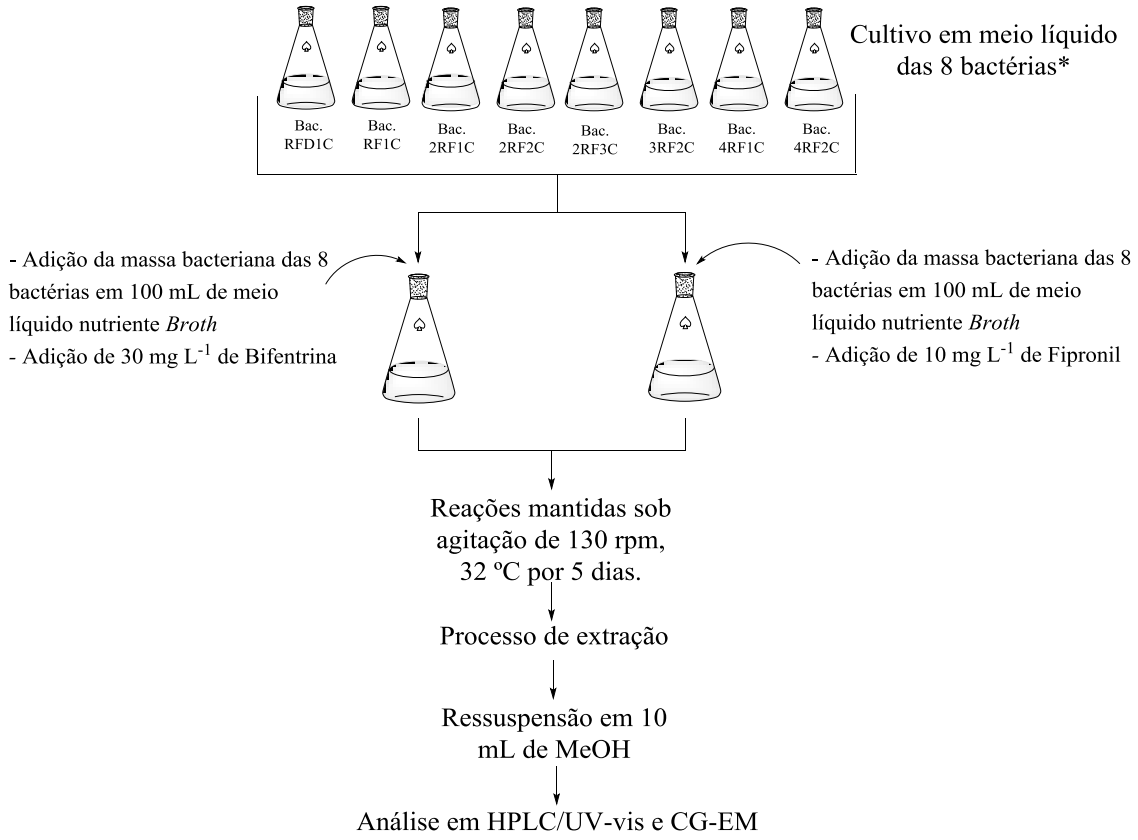
Os mesmos procedimentos de cultivo de bactéria em meio sólido e líquido e posterior extração descritos nas Seções 3.4 e 3.5 foram realizados para as reações com as bactérias *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) e *B. aryabhattai*/ *Bacillus* sp. (2RF3C) na presença do Fipronil (10 mg L^{-1}). As extrações foram feitas em 1, 3 e 5 dias de reação para se avaliar a possível formação de metabólitos provenientes da degradação do pesticida. As análises por HPLC/UV-vis foram realizadas no comprimento de onda de 220 nm.

3.15 Consórcio contendo as bactérias do gênero *Bacillus* e os pesticidas Bifentrina e Fipronil

Os mesmos procedimentos de cultivo de bactéria em meio sólido e líquido e posterior extração descritos nas Seções 3.4 e 3.5 foram realizados, porém empregaram-se nesse experimento as 8 linhagens de bactérias (Tabela 4) que foram cultivadas

separadamente e unidas em um único frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido. Em diferentes frascos adicionaram-se separadamente 600 µL do pesticida Bifentrina (30 mg L^{-1}) e 40 µL do pesticida Fipronil (10 mg L^{-1}). Para cada reação de pesticida foi realizada uma reação de controle biótico (Seção 3.4.2). A extração foi realizada em 5 dias de reação e a ressuspensão foi realizada em um balão de 10 mL com solução de MeOH grau HPLC, como mostra a Figura 23. Em seguida o extrato das reações foi analisado por HPLC/UV- vis e CG-EM.

Figura 23. Ilustração do procedimento experimental das reações em consórcio entre as 8 bactérias e os pesticidas Bifentrina e Fipronil.



*Bactérias: *Bacillus amyloliquefaciens* (RFD1C), *Bacillus megaterium* (RF1C), *Bacillus safensis/ Bacillus pumilus* (2RF1C), *Bacillus pseudomycoides* (2RF2C), *Bacillus aryabhattai/ Bacillus* sp. (2RF3C), *Bacillus pseudomycoides* (3RF2C), *Bacillus pseudomycoides* (4RF1C) e *Bacillus pseudomycoides* (4RF2C).

3.16 Recuperação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil e a determinação do limite de detecção

Um experimento em quintuplicata foi realizado com as bactérias *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) e *B. pseudomycoides* (4RF1C) com os pesticidas Bifentrina e Fipronil. As bactérias foram cultivadas como descrito na Seção 3.4, e em seguida foram esterilizadas em autoclave (121 ºC, 20 min) para promover a desnaturação

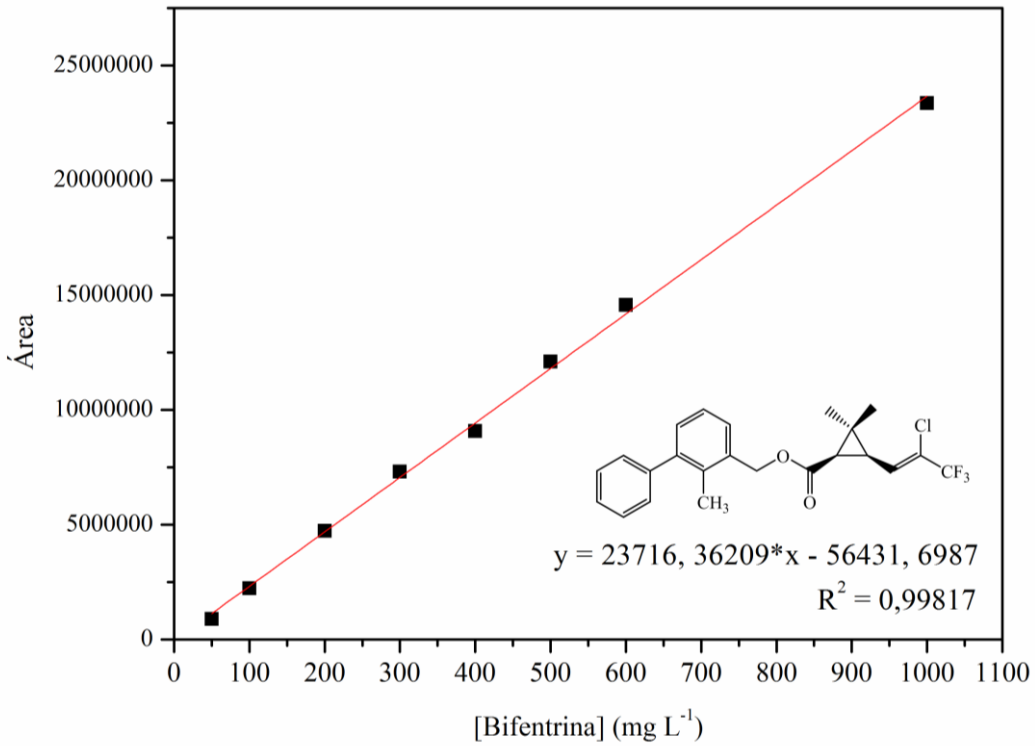
enzimática e a morte celular. Em seguida, 30 mg L^{-1} de Bifentrina foram adicionados aos frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio líquido nutriente *Broth* contendo a massa bacteriana de *B. pseudomycoides* (4RF1C) e 10 mg L^{-1} de Fipronil foram adicionados aos frascos Erlenmeyer contendo a massa bacteriana de *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) e então todos os frascos foram mantidos em agitação (130 rpm) por 30 minutos.

Decorrido esse tempo, as amostras foram extraídas, analisadas e quantificadas por HPLC/UV-vis (Seção 3.5). As concentrações dos pesticidas Bifentrina e Fipronil para se determinar o limite de detecção do equipamento HPLC/UV-vis foram aquelas cujas áreas das bandas cromatográficas foram iguais a três vezes a área da banda cromatográfica referente ao ruído do equipamento (BIROLLI *et al.*, 2019).

3.17 Curva analítica para a quantificação do pesticida Bifentrina

Para a quantificação da Bifentrina foram preparadas soluções nas concentrações de 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600 e 1.000 mg L^{-1} a partir do padrão analítico da Bifentrina. Cada concentração foi analisada por HPLC/UV-vis obtendo-se um valor de área referente à concentração das soluções e a partir disso, construiu-se a uma curva analítica para a quantificação da Bifentrina (Figura 24).

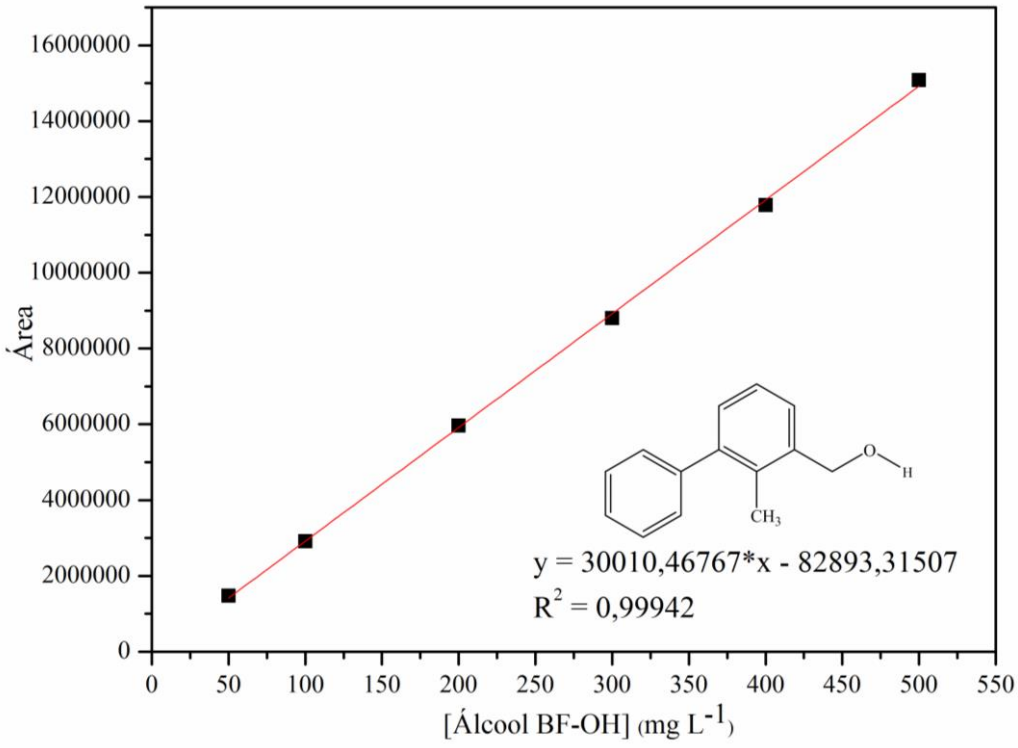
Figura 24. Curva analítica para a quantificação do pesticida Bifentrina por HPLC/UV-vis.



3.18 Curva analítica para a quantificação do álcool BF-OH

Para a quantificação do álcool **BF-OH** foram preparadas as soluções nas concentrações de 50, 100, 200, 300, 400 e 500 mg L^{-1} a partir do padrão analítico comercial. Cada concentração foi analisada por HPLC/UV-vis obtendo-se um valor de área referente à concentração das soluções e a partir disso construiu-se uma curva analítica para a quantificação do álcool **BF-OH** (Figura 25).

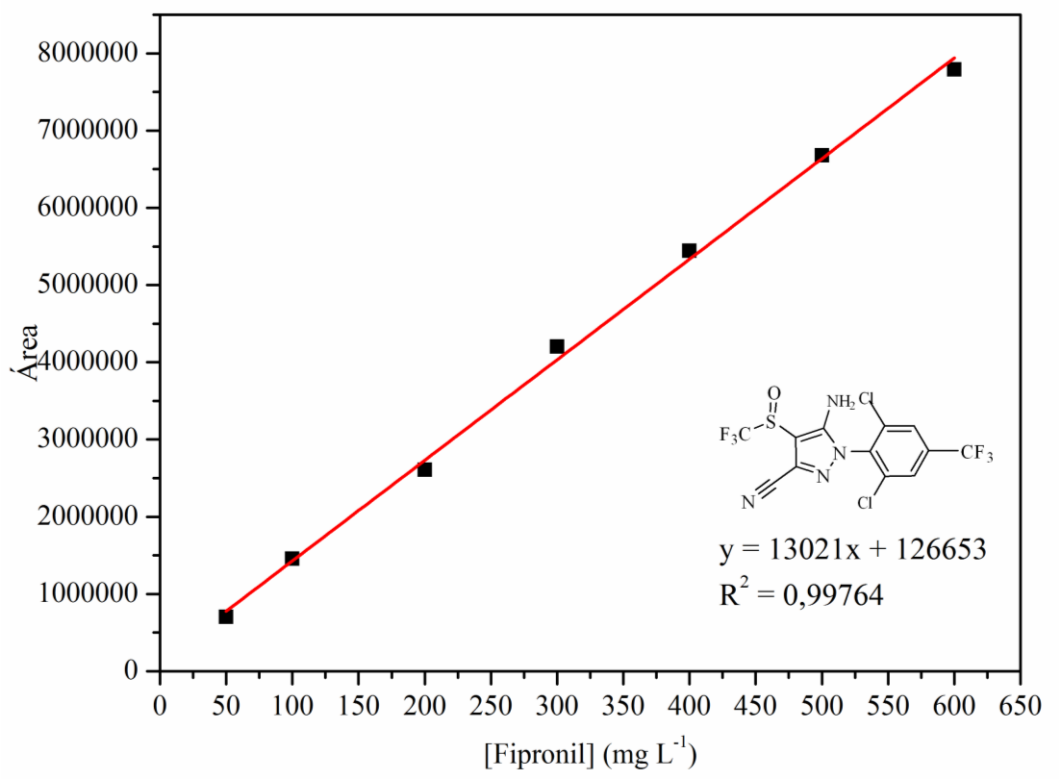
Figura 25. Curva analítica para a quantificação do álcool **BF-OH** por HPLC/UV-vis.



3.19 Curva analítica para a quantificação do pesticida Fipronil

Para a quantificação do Fipronil foram preparadas soluções nas concentrações de 50, 100, 200, 300, 400, 500 e 600 mg L^{-1} a partir do produto comercial previamente purificado por cromatografia em coluna (Seção 3.13). Cada concentração foi analisada por HPLC/UV- vis obtendo-se um valor de área referente à concentração das soluções e a partir disso, construiu-se a uma curva analítica para a quantificação do pesticida Fipronil (Figura 26).

Figura 26. Curva analítica para a quantificação do pesticida Fipronil por HPLC/UV-vis.



3.20 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Empregou-se o espectrômetro de RMN de 500 MHz (Marca: Agilent Technologies, Modelo: 500/54 Premium Shielded). As amostras foram solubilizadas em solvente deuterado. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm e referenciados em relação ao sinal do padrão interno do tetrametilsilano (TMS) ou em relação ao solvente deuterado empregado ($CDCl_3$: δ_H = 7,26, s; δ_C = 77,0, t; C_3D_6O: δ_H = 2,05, quint; δ_C = 29,8, sep., 206,2, s.; DMSO-d_6: δ_H = 2,5, quint.; δ_C = 39,5, sep.). As constantes de acoplamento (*J*) foram expressas em *hertz* (Hz). As análises de RMN de ^{1}H e RMN de ^{13}C foram realizadas na Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI no Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP),

3.21 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta (HPLC/UV-vis)

Os parâmetros cromatográficos para o método analítico de quantificação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil foram determinados experimentalmente a partir das análises da banda cromatográfica e pela resposta do analito (Tabela 5). Para ambos os pesticidas Bifentrina e Fipronil, a fase móvel foi empregada no modo gradiente

utilizando-se os solventes acetonitrila (grau cromatográfico) e água *Milli-Q*. Na Tabela 5 encontram-se os parâmetros empregados nas análises. O gradiente da fase móvel encontra-se na Tabela 6. O tempo de retenção da Bifentrina e do Fipronil foi de 33,3 e 20,1 minutos, respectivamente, e o comprimento de onda monitorado no ultravioleta foi de 220 nm.

Tabela 5. Parâmetros das análises de Bifentrina e Fipronil (HPLC/UV-vis).

Vazão	1 mL min^{-1}
Volume de injeção	5 µL
Tempo de análise	55 min
Coluna	C_{18} (250 x 4,6 mm)
Tamanho de partícula	5 µm
Temperatura do forno	40 ºC

Tabela 6. Gradiente da fase móvel para as análises da biodegradação da Bifentrina e Fipronil em HPLC/UV-vis.

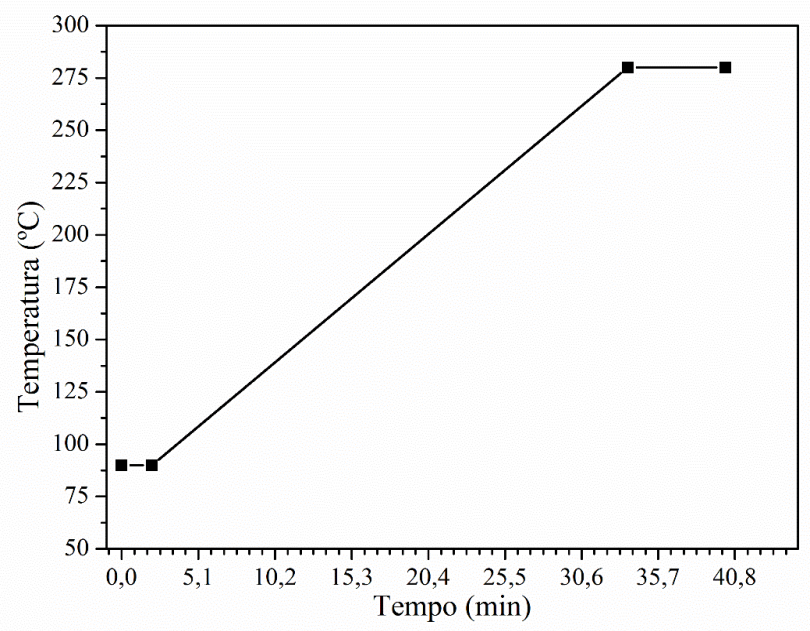
Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Água *Milli-Q* (%)
0,01	20	80
20,0	85	15
30,0	85	15
35,0	95	5
40,0	20	80

3.22 Cromatografia a gás acoplada ao espectrômetro de massas (CG-EM)

As análises em CG-EM foram realizadas em um aparelho Shimadzu/ CG-2010plus equipado com um injetor Shimadzu/ AOC-5000 e detector de massas (Shimadzu MS2010plus) com impacto eletrônico (IE, 70 eV). As separações foram realizadas em uma coluna capilar de sílica fundida (DB-5MS 5%-fenil-95%-dimetil arileno siloxano (Agilent J&W Advanced 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno), 0,25 mm de espessura de filme).

As amostras foram analisadas com fluxo constante de gás hélio utilizando-se uma vazão de 0,75 mL min^{-1} e pressão de 46,5 kPa. A temperatura do injetor foi de 250 ºC. A temperatura inicial da coluna foi de 90 ºC mantida durante 2 min, em seguida foi elevada a 280 ºC na taxa de 6 ºC min^{-1} e mantida nessa temperatura por 6,5 min (Figura 27). O tempo total de análise foi de 40,17 min, injetando-se 1 µL com razão de divisão de fluxo 5,0. A temperatura da fonte de íon foi de 200 ºC e da interface foi de 270 ºC. Os íons foram monitorados de 4 a 40 min na faixa de *m/z* 40 a 500.

Figura 27. Condições de análise para os pesticidas Bifentrina e Fipronil por CG-EM.



3.23 Cromatógrafo líquido de ultra performance acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução (UPLC-HRMS)

O espectrômetro de massas de alta resolução LTQ Orbitrap Velos é equipado com interface de ionização por *electrospray* (ESI), *nanoelectrospray* (nanoESI), ionização química a pressão atmosférica (APCI) e interface de ionização por *desorption electrospray ionization* (DESI). O espectrômetro de massas está acoplado a um cromatógrafo líquido de alta performance (Modelo: Accela High Speed LC, Marca: Thermo Scientific) e a um sistema de nano-LC EASY-nLCII (Thermo Scientific). Os equipamentos encontram-se na Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI no Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP).

As análises no espectrômetro de massas de alta resolução foram realizadas por ionização *electrospray* em modo positivo [M-H^+]. Os parâmetros das análises encontram-se na Tabela 7.

Tabela 7. Parâmetros do espectrômetro de massas de alta resolução empregado nas análises de biodegradação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil.

Método *tuning*	
Tipo da fonte	*Heated Electrospray Ionization* (HESI)
Temperatura capilar (ºC)	350,00
Temperatura do aquecedor da fonte (ºC)	300,00
Vazão de gás* (mL min^{-1})	50,00
Método das análises	
Polaridade	Positiva
Voltagem da fonte (kV)	4,50
Corrente da fonte (µA)	100,00
Nível de radiofrequência da lente-S (%)	69,00
Faixa dos íons monitorados (*m/z*)	200-600

* Gás nitrogênio.

No UPLC foi empregada uma coluna C_{18} (YMC-Triart) com tamanho de partícula de 5 µm com tamanho de poro de 120 Å. Para os pesticidas Bifentrina e Fipronil, a fase móvel foi empregada no modo gradiente utilizando-se os solventes acetonitrila (grau cromatográfico) e acetato de amônio (grau cromatográfico). Na Tabela 8 encontram-se os parâmetros empregados nas análises. O gradiente da fase móvel encontra-se na Tabela 9.

Tabela 8. Parâmetros das análises de Bifentrina e Fipronil por UPLC-HRMS.

Vazão	0,3 mL min^{-1}
Volume de injeção	5 µL
Tempo de análise	27 min
Coluna	C_{18} (150 mm x 4,6 mm) ODS
Tamanho de partícula	5 µm

Tabela 9. Gradiente da fase móvel para as análises da biodegradação da Bifentrina e Fipronil por UPLC-HRMS.

Tempo (min)	Acetonitrila (%)	Acetato de amônio (%)
0,01	20	80
10,0	85	15
15,0	85	15
18,0	95	5
20,0	20	80

3.24 Descarte de resíduos

As soluções que continham microrganismos sem o pesticida Bifentrina, Fipronil e o álcool **BF-OH** foram esterilizadas em autoclave por 20 min a 121 ºC, 1,5 kPa e descartadas.

As soluções das reações que continham a Bifentrina, o álcool **BF-OH** e o Fipronil foram devidamente armazenadas e identificadas para posterior encaminhamento para o Laboratório de Resíduos Químicos do Campus de São Carlos/USP.

4. Resultados e Discussão

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Identificação dos microrganismos isolados das folhas da cultura da laranja e utilizados nos estudos de biodegradação da Bifentrina e do Fipronil

O isolamento das bactérias e o preparo da extração do material genético por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) foram realizados pela doutora Charlene Souza dos Anjos (ANJOS, 2014). As linhagens de bactérias foram identificadas por meio da amplificação do DNA no Laboratório de Biotecnologia na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ).

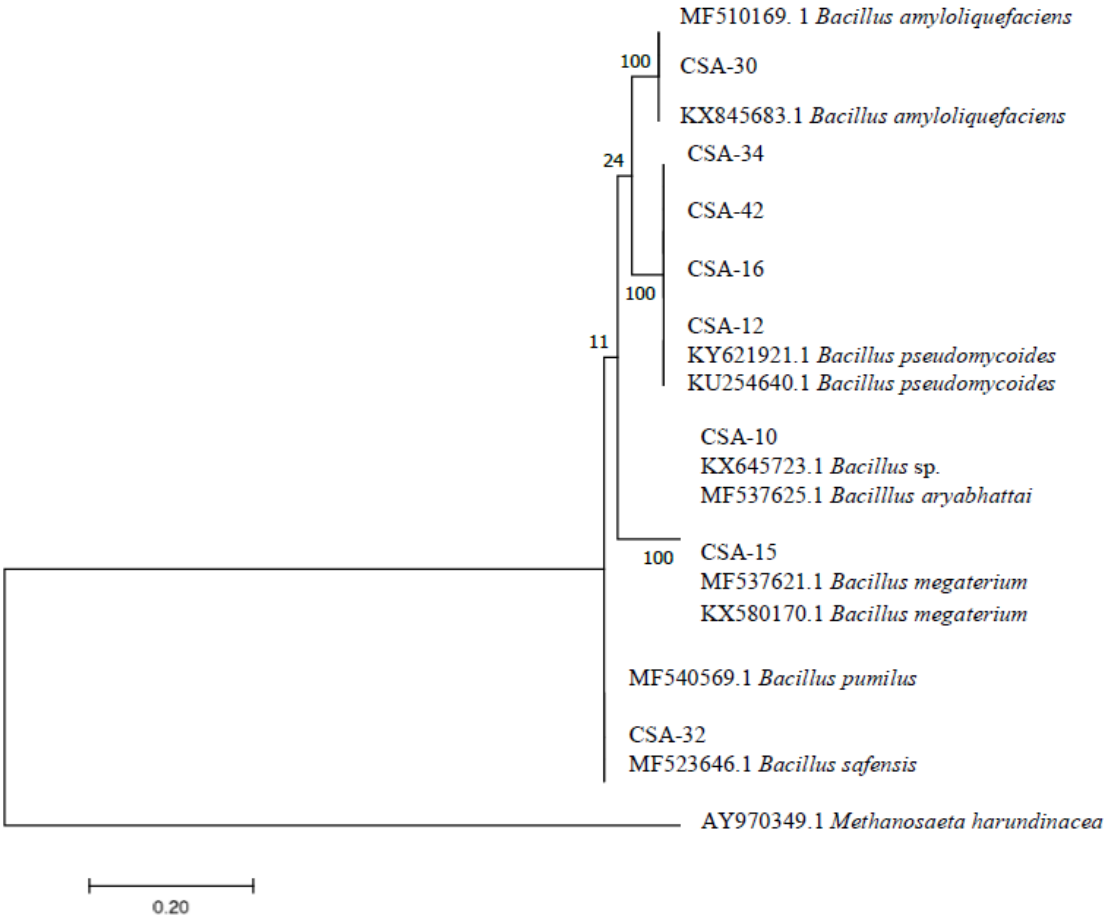
As árvores filogenéticas foram divididas em grupos (*clusters*) para que as espécies de bactérias fossem melhor organizadas para a sua identificação. Para a obtenção das árvores filogenéticas, o microrganismo *Methanosaeta harundinacea* (Filo: *Euryarchaetota*, domínio: *Archaea*) foi utilizado como grupo externo, já que todas as estirpes isoladas e identificadas foram de bactérias. Dessa forma, os *clusters* foram divididos de acordo com o material coletado:

a) 1º *cluster*: amostras coletadas dos frutos do solo;
b) 2º *cluster*: amostras coletadas das folhas do solo, solo e musgo do caule;
c) 3º *cluster*: amostras coletadas das folhas;
d) 4º *cluster*: amostras coletadas dos frutos verdes, pétalas, florescência e galhos.

Por meio da extração do material genético (DNA) e sequenciamento de 16S rDNA obtiveram-se as árvores filogenéticas dos *clusters* utilizando-se o Programa Mega 6.0 Mega (*Molecular Evolutionary Genetics Analysis*). As sequências parciais do 16S rDNA foram obtidas variando-se o número de nucleotídeos entre 429 a 540.

Neste trabalho, as bactérias utilizadas foram pertencentes ao 3º *cluster*, sendo as bactérias isoladas de folhas da cultura da laranja. Na Figura 28, encontra-se a árvore filogenética obtida para essas bactérias (ANJOS, 2014).

Figura 28. Árvore filogenética pertencente às bactérias isoladas das folhas da laranja. A distância filogenética foi indicada na barra de escala.



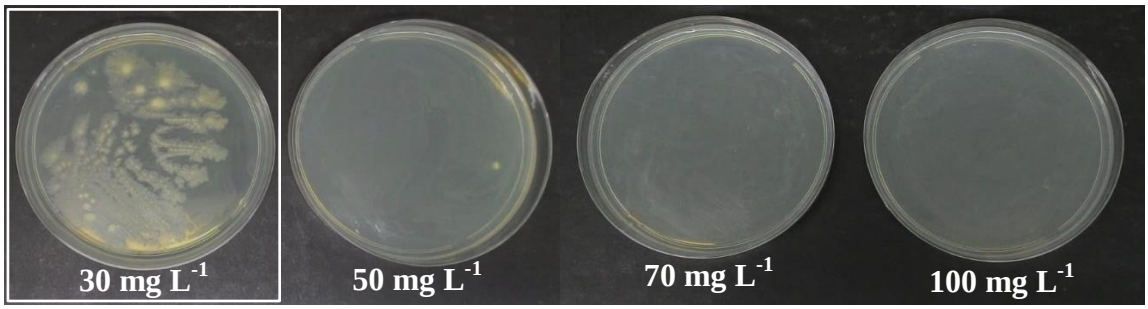
Fonte: ANJOS, 2018.

O número inserido no nó interno da árvore filogenética representa o valor do *bootstrap*, no qual é um procedimento de amostragem que se dá por meio da sequência do processo evolutivo e uma reamostragem da sequência original da amostra (ZHARKIKH, LI, 1992). Para as bactérias *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus aryabhattai*/ *Bacillus* sp. e *Bacillus megaterium* obteve-se um *bootstrap* de 100, o que significa uma similaridade de 100% para a identificação dessas bactérias com a base de dados utilizadas.

4.2 Cultivo das bactérias em placas de Petri na presença e ausência do pesticida Bifentrina

Inicialmente foram realizados alguns ensaios de cultivo para verificar o crescimento das bactérias em meio sólido que já continham o pesticida Bifentrina e verificou-se que na presença de 100 mg L^{-1} apenas a bactéria *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) se desenvolveu. Então um novo ensaio foi realizado utilizando-se concentrações de 30, 50 e 70 mg L^{-1} de Bifentrina e foi observado que todas as bactérias se desenvolveram em meio sólido na concentração de 30 mg L^{-1} e não foi observado crescimento nas concentrações de 50 e 70 mg L^{-1}. A Figura 29 mostra o cultivo do crescimento da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) em meio sólido e em diferentes concentrações.

Figura 29. Cultivo da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) em placas de Petri contendo meio nutriente *Broth* e Agar na presença de diferentes concentrações de Bifentrina (30, 50, 70 e 100 mg L^{-1}).

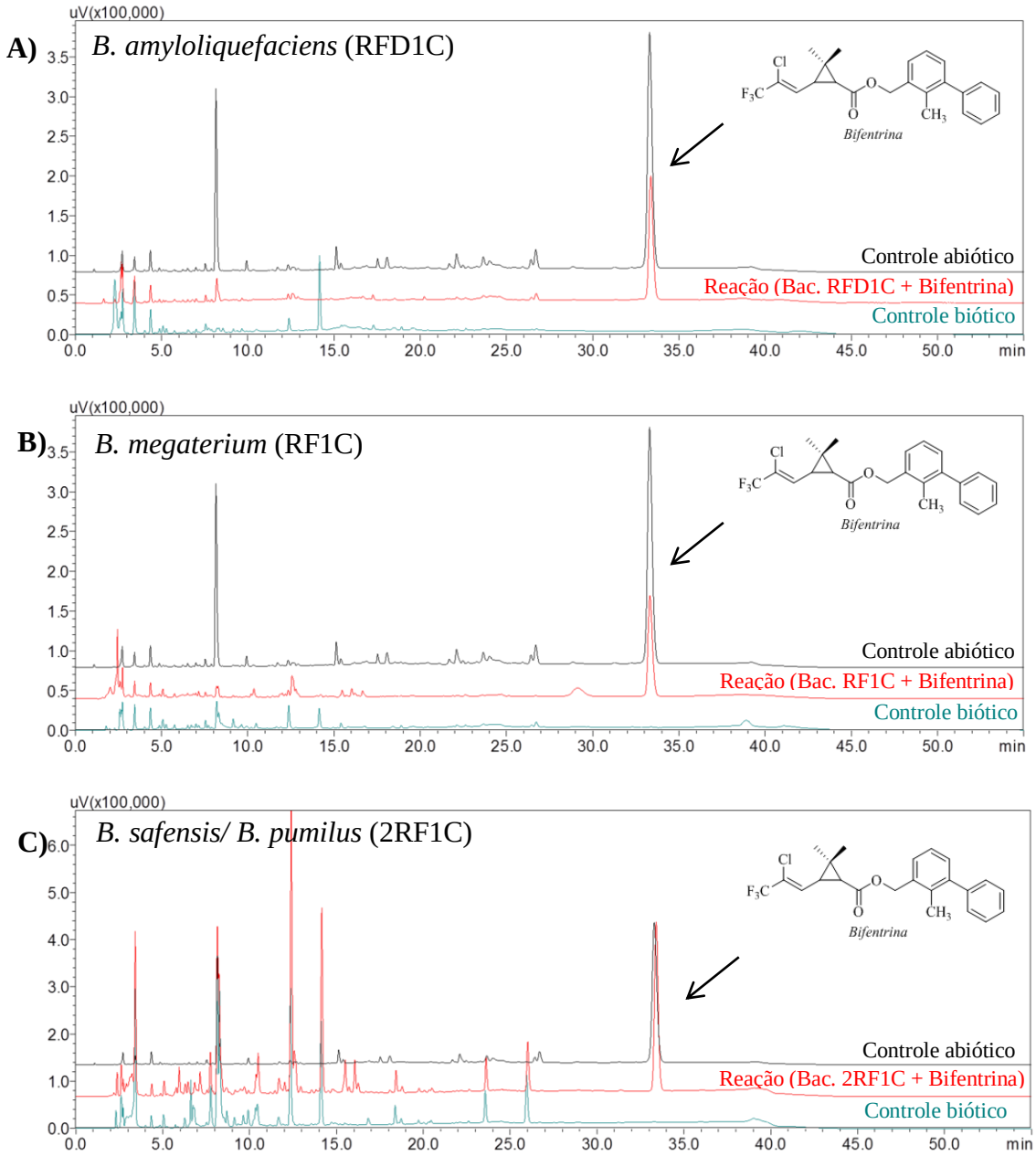


4.3 Biodegradação da Bifentrina

Uma vez que todas as bactérias cresceram em meio sólido na concentração de 30 mg L^{-1} de Bifentrina, realizou-se uma triagem com as 8 linhagens em meio líquido para se avaliar a biodegradação do pesticida. A concentração para o inóculo das bactérias em meio líquido em todos os experimentos realizados foi de 10^6 UFC mL^{-1}.

Na Figura 30A-H encontram-se os cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis das análises da triagem com as 8 linhagens de bactéria do gênero *Bacillus* no período de 5 dias na concentração de 30 mg L^{-1} de Bifentrina. Nestes casos, têm-se as análises das reações entre as bactérias e a Bifentrina. A reação de *controle biótico* (CB) correspondeu ao meio de cultivo bacteriano na ausência do pesticida e o *controle abiótico* (CA) correspondeu ao meio de cultura com a Bifentrina na ausência dos microrganismos.

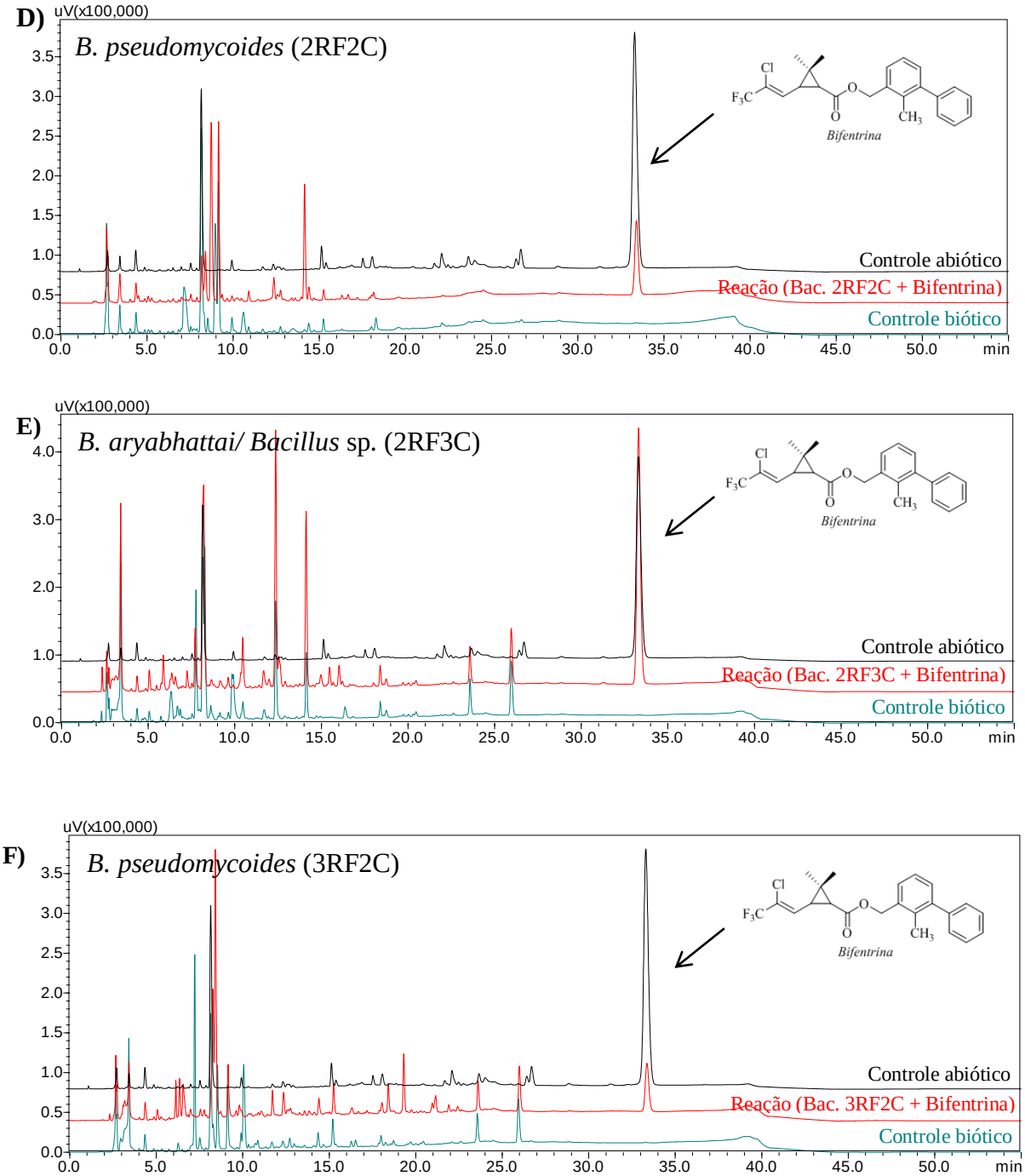
Figura 30. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação da Bifentrina com as bactérias isoladas da cultura da laranja. Condições de reação: 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reação em triplicata.



Condições de análise: HPLC/UV-VIS com coluna Phenomenex C_{18} (0,46 cm x 25 cm; 5 µm), modo de eluição gradiente 20-95% acetonitrila e água *Milli-Q* em 55 min, com vazão de 1 mL min^{-1}. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 220 nm.

Continua...

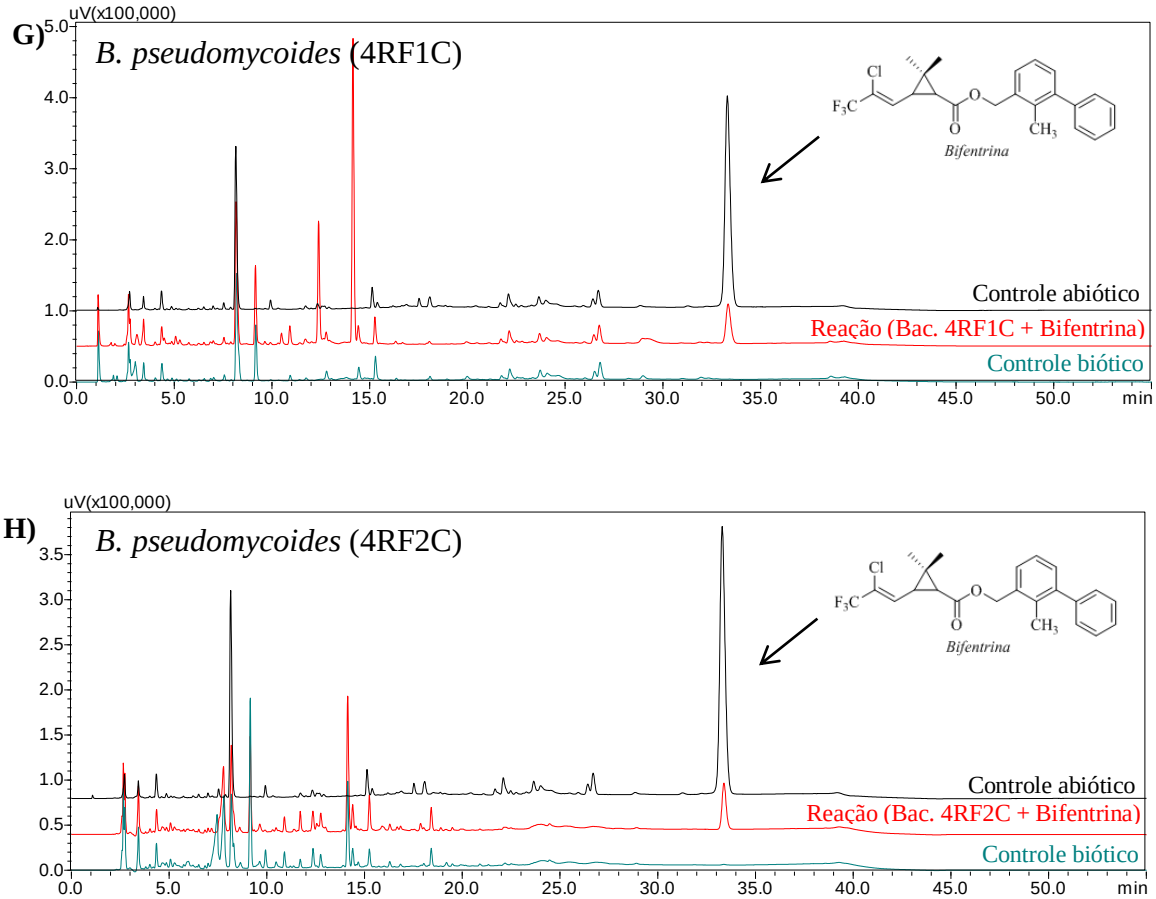
Continuação da Figura 30...



Condições de análise: HPLC/UV-vis com coluna Phenomenex C_{18} (0,46 cm x 25 cm; 5 µm), modo de eluição gradiente 20-95% acetonitrila e água *Milli-Q* em 55 min, com vazão de 1 mL min^{-1}. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 220 nm.

Continua...

Continuação da Figura 30...



Condições de análise: HPLC/UV-vis com coluna Phenomenex C_{18} (0,46 cm x 25 cm; 5 µm), modo de eluição gradiente 20-95% acetonitrila e água *Milli-Q* em 55 min, com vazão de 1 mL min^{-1}. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 220 nm.

As concentrações finais de Bifentrina remanescente nas amostras das reações das bactérias com o pesticida foram analisadas por HPLC/UV-vis, quantificadas pela curva de calibração previamente obtida e encontram-se na Tabela 10. Todas as análises das reações foram realizadas em triplicata.

Para cada reação de biodegradação individualmente realizou-se um controle abiótico do pesticida Bifentrina. As porcentagens de recuperação da Bifentrina nas reações de controle abiótico também são mostradas na Tabela 10.

Tabela 10. Concentração final do pesticida Bifentrina determinado por HPLC/UV-vis, empregando-se as bactérias isoladas da cultura da laranja. Condições de reação: 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reação em triplicata.

Bactérias	Concentração final de BF[a] (mg L^{-1})*	Porcentagem de biodegradação da BF[a] (%)	Porcentagem de recuperação da BF[a] nos CA[b] (%)
Bacillus amyloliquefaciens (RFD1C)	18,9 ± 0,9	37	97
Bacillus megaterium (RF1C)	20,1 ± 1,1	33	98
Bacillus safensis/ Bacillus pumilus (2RF1C)	22,8 ± 0,3	24	97
Bacillus pseudomycoides (2RF2C)	4,7 ± 0,3	84	98
Bacillus aryabhattai/ Bacillus sp. (2RF3C)	22,4 ± 0,9	25	98
Bacillus pseudomycoides (3RF2C)	3,5 ± 0,3	88	98
Bacillus pseudomycoides (4RF1C)	6,3 ± 0,5	79	98
Bacillus pseudomycoides (4RF2C)	4,3 ± 0,3	86	97

[a]BF = Bifentrina
[b]CA = Controle abiótico da reação para cada triplicata. Reação na ausência de bactéria.
*Valor médio das triplicatas

Analisando-se os dados obtidos na Tabela 10 foi possível observar que as bactérias *B. amyloliquefaciens* (RFD1C), *B. megaterium* (RF1C), *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) e *B. aryabhattai/ Bacillus* sp. (2RF3C) apresentaram a menor biodegradação de Bifentrina em 5 dias de reação, correspondendo à uma porcentagem de 24 a 37%.

As bactérias *B. pseudomycoides* (2RF2C), *B. pseudomycoides* (3RF2C), *B. pseudomycoides* (4RF1C) e *B. pseudomycoides* (4RF2C) apresentaram uma porcentagem de biodegradação, entre 79 e 88%. Essas porcentagens corresponderam à média das reações em triplicata da Bifentrina com as bactérias.

Todas as bactérias que apresentaram uma porcentagem entre 79 e 88% de biodegradação foram identificadas como *B. pseudomycoides*, e foram do mesmo local de coleta, demonstrando que possivelmente se tratam da mesma população microbiana.

4.4 Determinação da massa celular (*pellets*) das bactérias do gênero *Bacillus* das reações com a Bifentrina em 5 dias de reação

Após o procedimento de extração, a massa celular que foi separada do meio líquido por centrifugação, foi seca à temperatura ambiente e então foi determinada por gravimetria. A Tabela 11 mostra os valores obtidos das massas celulares bacterianas das reações em triplicata e do controle biótico para cada bactéria empregada no experimento de biodegradação da Bifentrina após ser extraído o pesticida.

Tabela 11. Massa celular bacteriana obtida após a extração dos experimentos de biodegradação da Bifentrina em meio líquido. Condições de reação: 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reação em triplicata.

Bactérias	Massa celular bacteriana (g)	
	Reação*	CB[a]
B. amyloliquefaciens (RFD1C)	1,3 ± 0,1	1,1
B. megaterium (RF1C)	1,7 ± 0,02	1,3
B. safensis/ B. pumilus (2RF1C)	1,6 ± 0,1	1,3
B. pseudomycoides (2RF2C)	2,5 ± 0,4	1,2
B. aryabhattai/ Bacillus sp. (2RF3C)	1,7 ± 0,2	1,5
B. pseudomycoides (3RF2C)	1,9 ± 0,2	1,4
B. pseudomycoides (4RF1C)	1,1 ± 0,1	1,0
B. pseudomycoides (4RF2C)	2,1 ± 0,2	1,6

*Corresponde à reação entre a bactéria utilizada e a Bifentrina (30 mg L^{-1}).
[a]CB = Controle biótico da reação para cada triplicata. Reação na ausência de Bifentrina.

Na Tabela 11 é possível se observar que as massas bacterianas obtidas das reações com a Bifentrina apresentaram valores acima dos controles bióticos em 5 dias de reação. A bactéria *B. pseudomycoides* (2RF2C) apresentou a maior média de valor de massa bacteriana (2,5 g), enquanto a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) apresentou o menor valor com 1,1 g.

A *B. pseudomycoides* (3RF2C) foi a que melhor biodegradou a Bifentrina (88% de biodegradação) e apresentou uma média de 1,9 g de massa microbiana. Já a bactéria *Bacillus safensis/ Bacillus pumilus* (2RF1C) biodegradou apenas 24% da Bifentrina em 5 dias de reação e apresentou uma massa bacteriana de 1,6 g.

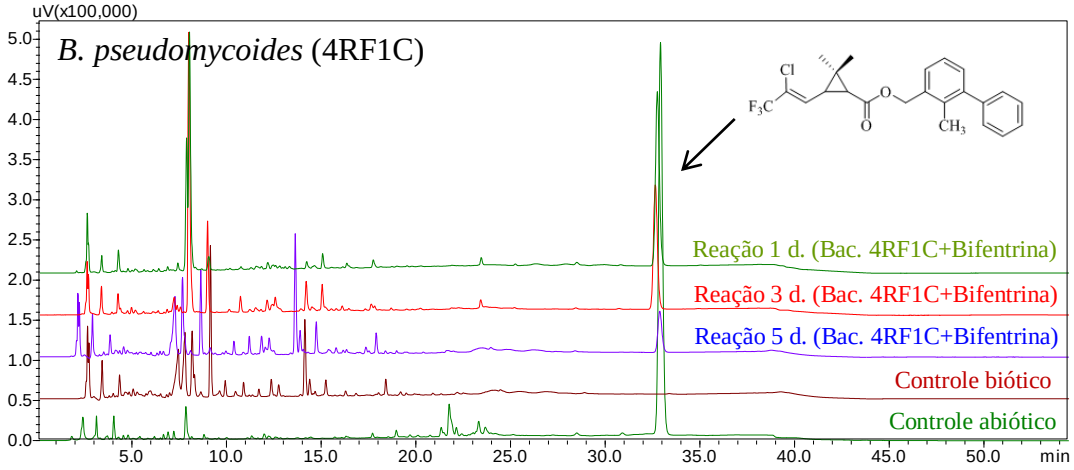
Dessa forma, pode-se concluir que não houve uma relação direta entre a quantidade de massa bacteriana e a capacidade de biodegradação da Bifentrina pelas bactérias empregadas neste estudo, nota-se que os valores de massas obtidos foram próximos.

4.5 Diminuição da concentração de Bifentrina na presença da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C)

Um experimento para avaliar a biodegradação da Bifentrina (30 mg L^{-1}) ao longo de 5 dias de reação foi realizado empregando-se a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) (Seção 3.6). O intervalo de tempo das reações foi de 1, 3 e 5 dias.

Foi possível se observar que com 1 e 3 dias de reação, 61 e 68% da Bifentrina foi consumida, respectivamente. A Figura 31 mostra os cromatogramas das análises obtidos por HPLC/UV-vis e os resultados encontram-se na Tabela 12.

Figura 31. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação da Bifentrina com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) no intervalo de 1, 3 e 5 dias. Condições de reação: 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 1, 3 e 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reações em triplicata.



Condições de análise: HPLC/UV-vis com coluna Phenomenex C_{18} (0,46 cm x 25 cm; 5 µm), modo de eluição gradiente 20-95% acetonitrila e água *Milli-Q* em 55 min, com vazão de 1 mL min^{-1}. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 220 nm.

Tabela 12. Determinação da concentração de Bifentrina no período de 1, 3 e 5 dias empregando a bactérias *B. pseudomycoides* (4RF1C). Condições de reação: 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reações em triplicata.

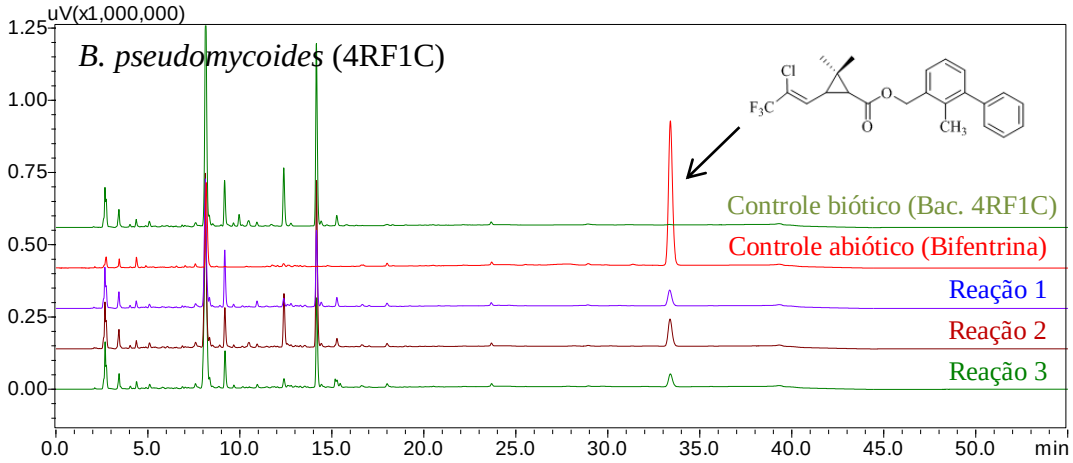
	Concentração de Bifentrina (mg L^{-1})					
Bactéria	1 dia	% biod.*	3 dias	% biod.*	5 dias	% biod.*
B. pseudomycoides (4RF1C)	11,8 ± 1,0	61	9,7 ± 0,4	68	6,3 ± 0,5	79

*%biod.: porcentagem de biodegradação da Bifentrina.

Tendo-se como objetivo desses estudos alcançar a máxima biodegradação da Bifentrina, foi realizado um experimento de 10 dias de reação empregando-se a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e a Bifentrina (30 mg L^{-1}). Os procedimentos de cultivo da bactéria em meio sólido e líquido e posterior extração e análise do extrato obtido foram descritos nas Seções 3.4 e 3.5. A reação foi realizada em triplicata (Reação 1, 2 e 3).

A Figura 32 mostra os cromatogramas obtidos das análises das amostras das reações. A reação de *controle biótico* correspondeu ao meio de cultivo bacteriano na ausência do pesticida e o *controle abiótico* correspondeu ao meio de cultura com a Bifentrina na ausência da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C).

Figura 32. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e a Bifentrina. Condições de reação: 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 10 dias, 130 rpm, 32 ºC, reação em triplicata.



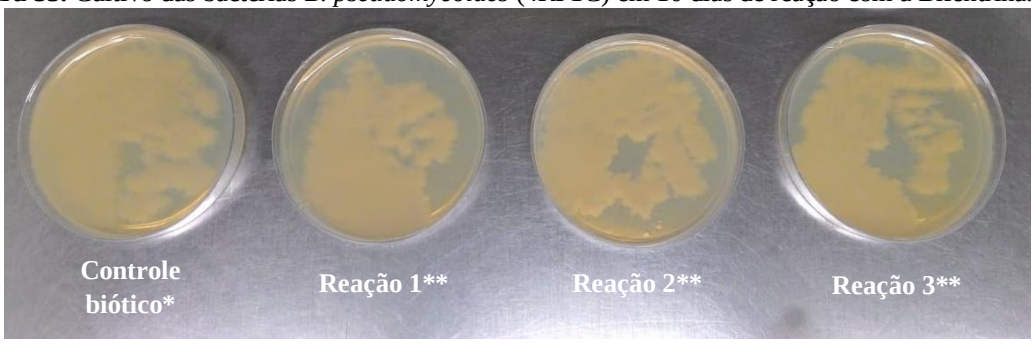
Condições de análise: HPLC/UV-vis com coluna Phenomenex C_{18} (0,46 cm x 25 cm; 5 µm), modo de eluição gradiente 20-95% acetonitrila e água *Milli-Q* em 55 min, com vazão de 1 mL min^{-1}. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 220 nm.

Como resultado, observou-se que a concentração final da Bifentrina recuperada depois das extrações em triplicata foi de 3,3 ± 0,3 mg L^{-1} com uma porcentagem de biodegradação de aproximadamente 89%.

Antes do processo de extração (Seção 3.5) foi feito um cultivo das bactérias *B. pseudomycoides* (4RF1C) de cada um dos frascos Erlenmeyer (triplicata da reação e reação de controle biótico) em placa de Petri contendo Agar e meio Nutriente *Broth*.

Todas as placas foram mantidas em estufa por 24 h e à temperatura controlada de 32 ºC. Após esse período, verificou-se que, em todas as placas, as bactérias *B. pseudomycoides* (4RF1C) cultivadas tanto na ausência quanto na presença de Bifentrina apresentaram um bom crescimento, como mostra a Figura 33. Portanto, conclui-se que a bactéria permaneceu viva durante o processo de biodegradação.

Figura 33. Cultivo das bactérias *B. pseudomycoides* (4RF1C) em 10 dias de reação com a Bifentrina.



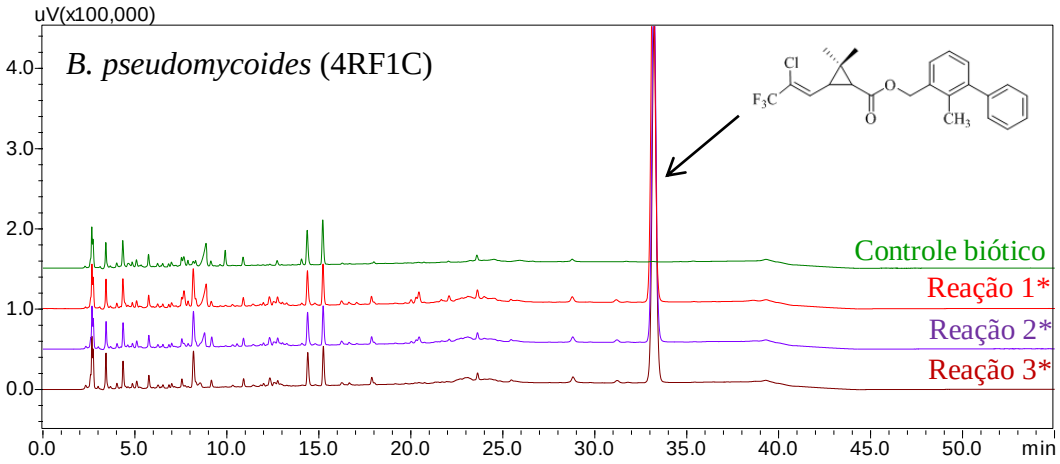
*Controle biótico: reação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) na ausência da Bifentrina.
**Reação 1, 2 e 3: referem-se à triplicata da reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e a Bifentrina (30 mg L^{-1}).

4.6 Reação de biodegradação da Bifentrina com o caldo de cultivo da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C)

A bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) foi cultivada em meio sólido e líquido e a massa bacteriana foi separada do meio líquido por centrifugação. À solução sobrenadante (caldo de cultivo) foi adicionada a solução de Bifentrina (30 mg L^{-1}) e mantida sob agitação de 130 rpm e 32 ºC (Seção 3.8). Decorrido o período reacional de 5 dias, fez-se o processo de extração (Seção 3.5) e os extratos foram analisados por HPLC/UV-vis.

Os cromatogramas obtidos das análises encontram-se na Figura 34. A reação foi realizada em triplicata e a média da concentração final de Bifentrina recuperada foi de 30,8 ± 0,4 mg L^{-1}. Este resultado indicou que possivelmente as enzimas da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) que promoveram a degradação da Bifentrina foram intracelulares, uma vez que a recuperação do pesticida foi acima de 95%.

Figura 34. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação de biodegradação da Bifentrina com o caldo de cultivo da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C). Condições de reação: 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reação em triplicata.



*Reação 1, 2 e 3: referem-se à triplicata da reação de biodegradação da Bifentrina com o caldo de cultivo da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C).
Condições de análise: HPLC/UV-vis com coluna Phenomenex C_{18} (0,46 cm x 25 cm; 5 µm), modo de eluição gradiente 20-95% acetonitrila e água *Milli-Q* em 55 min, com vazão de 1 mL min^{-1}. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 220 nm.

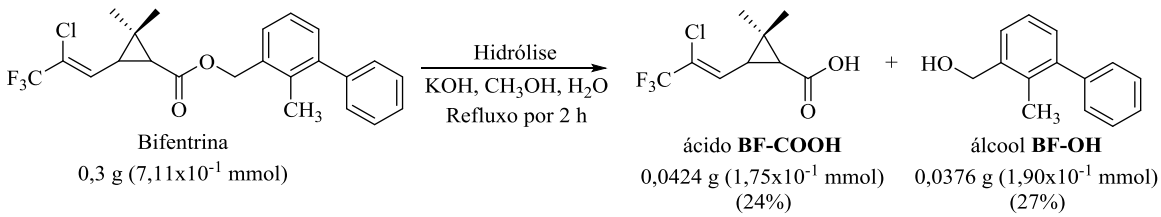
4.7 Hidrólise da Bifentrina com KOH e a caracterização dos produtos, o álcool BF-OH e o ácido BF-COOH

Objetivando-se avaliar se a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) realizou a hidrólise química da Bifentrina (Figura 35), comparou-se a reação entre a bactéria com

a Bifentrina e os produtos de hidrólise da mesma (padrões sintéticos); o álcool **BF-OH** e o ácido **BF-COOH**.

Na reação de hidrólise da Bifentrina com KOH foi empregado 0,3 g do pesticida. Ao final da reação obteve-se 0,0424 g do ácido **BF-COOH** e 0,0376 g do álcool **BF-OH**, com rendimentos de 25 e 27%, respectivamente.

Figura 35. Hidrólise da Bifentrina na presença de KOH.



Nas Figuras 36A-B e 37A-B encontram-se os cromatogramas e os espectros de massas dos produtos da hidrólise da Bifentrina com KOH. Como pode ser observado através dos espectros de massas, as Figuras 36B e 37B corresponderam ao ácido **BF-COOH** e o álcool **BF-OH**, respectivamente.

O ácido **BF-COOH** não mostrou similaridade com a biblioteca do equipamento e o álcool **BF-OH** apresentou similaridade de 83% com a biblioteca NIST05.

Figura 36. (A) Cromatograma obtido por análises de CG-EM (IE, 70 eV) do ácido **BF-COOH** proveniente da hidrólise básica da Bifentrina. Tempo de retenção: 9,5 min. (B) Espectro de massas para o ácido **BF-COOH**. Massa molar: 242,03 g mol^{-1}.

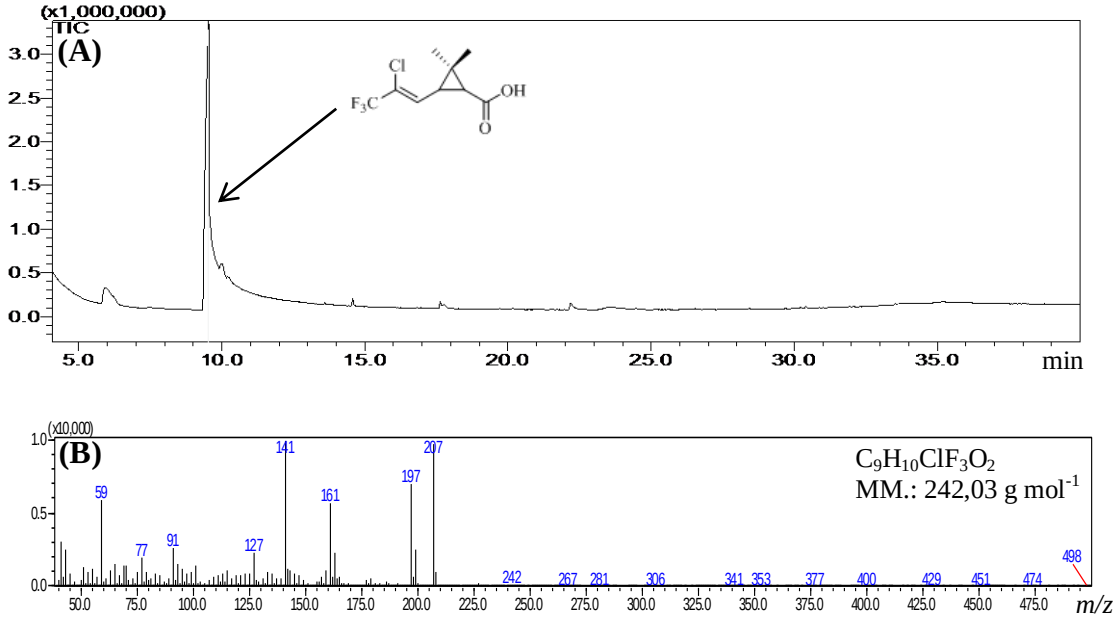
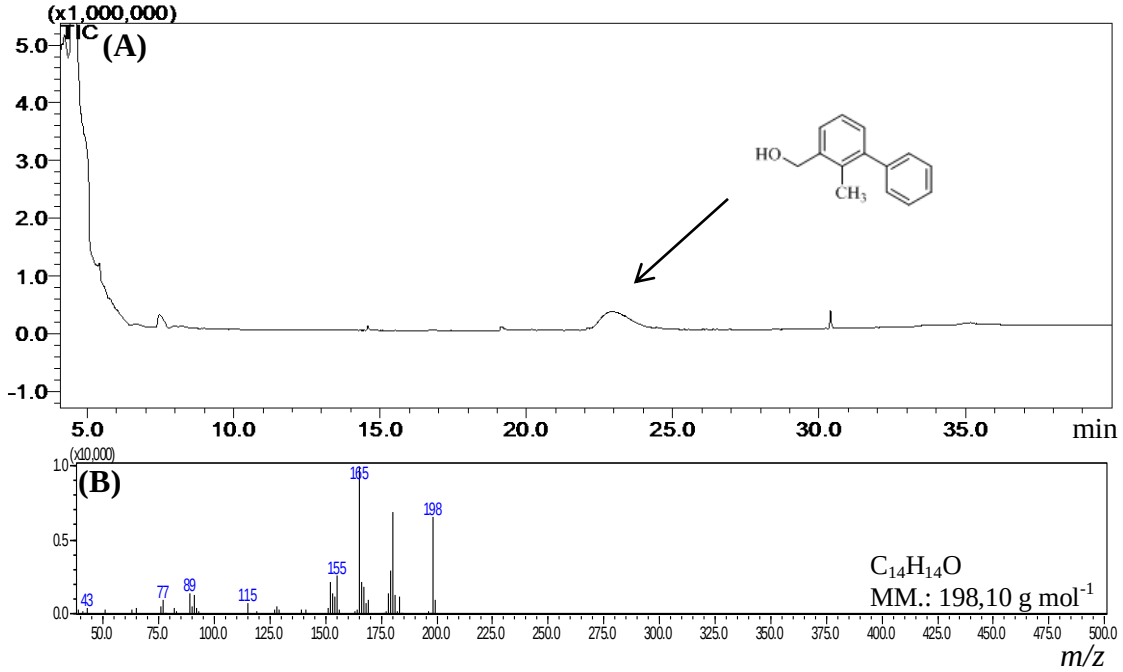


Figura 37. (A) Cromatograma obtido por análise de CG-EM (IE, 70 eV) do álcool **BF-OH** proveniente da hidrólise básica da Bifentrina. Tempo de retenção: 22,9 min. (B) Espectro de massas para o álcool **BF-OH**. Massa molar: 198,10 g mol^{-1}.



Foram feitas as análises espectroscópicas de RMN de ^{1}H e RMN de ^{13}C do álcool **BF-OH** e do ácido **BF-COOH**, obtidos da reação da hidrólise química da Bifentrina. A Figura 38 mostra o RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) do ácido **BF-COOH** e revelou a presença de dois singletos, um em δ 1,21 (3H) e outro em δ 1,24 (3H) indicando a presença de dois grupos metilas do ciclo propano, um dubleto em δ 2,06 (1H) (J = 8,3 Hz) referente ao hidrogênio do ciclopropano vicinal ao grupo carboxílico. Contudo, um sinal referente ao duplo dubleto apresentou uma intensidade maior, possivelmente devido à sobreposição de um sinal de hidrogênio proveniente da água. Um multipleto em δ 2,15 (m, 1H) referente ao hidrogênio do ciclopropano vicinal ao grupo olefínico e um multipleto em δ 7,02 (m, 1H, *overlap*) referente ao hidrogênio olefínico, o qual apresentou também acoplamento com o flúor. No entanto, não se verificou um possível dubleto referente ao acoplamento do flúor com o hidrogênio vinílico. Em δ 3,40 foi observado um sinal largo referente ao hidrogênio do grupo carboxila. O sinal do solvente DMSO-d_6 está em δ 2,50. Os demais sinais foram provenientes de impurezas da amostra.

A Figura 39 mostra o espectro de RMN de ^{13}C do ácido **BF-COOH**, observaram-se os sinais δ 171,5 (C_9), $\delta_{C\text{-}F}$ 132,5 (C_3) (q, J = 4,5 Hz), $\delta_{C\text{-}F}$ 120,0 (C_1) (q, J= 270,6 Hz), $\delta_{C\text{-}F}$ 118,8 (C_2) (q, J = 36,8 Hz), δ 32,9 (C_8), δ 29,7 (C_7), δ 27,5 (C_4), δ 14,8 (C_5 e C_6). O sinal do solvente DMSO-d_6 está em δ 39,5.

Figura 38. Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, DMSO-d_6) do ácido **BF-COOH** proveniente da hidrólise básica da Bifentrina com KOH.

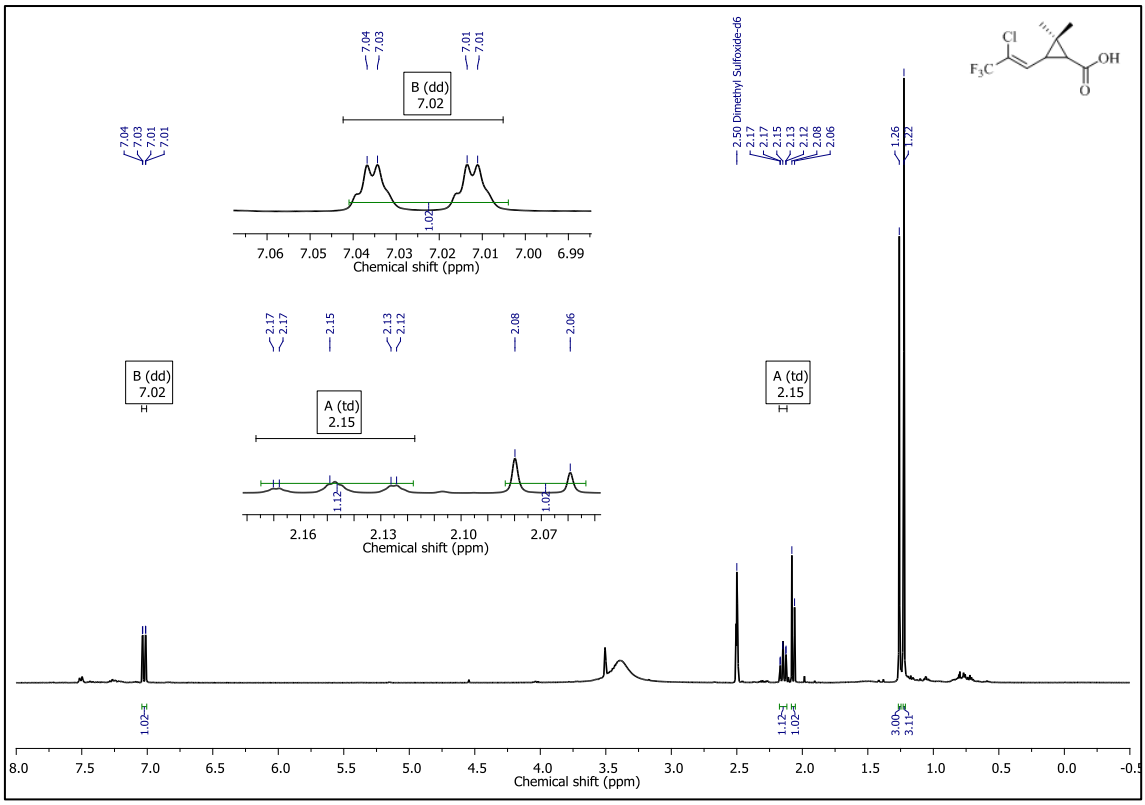
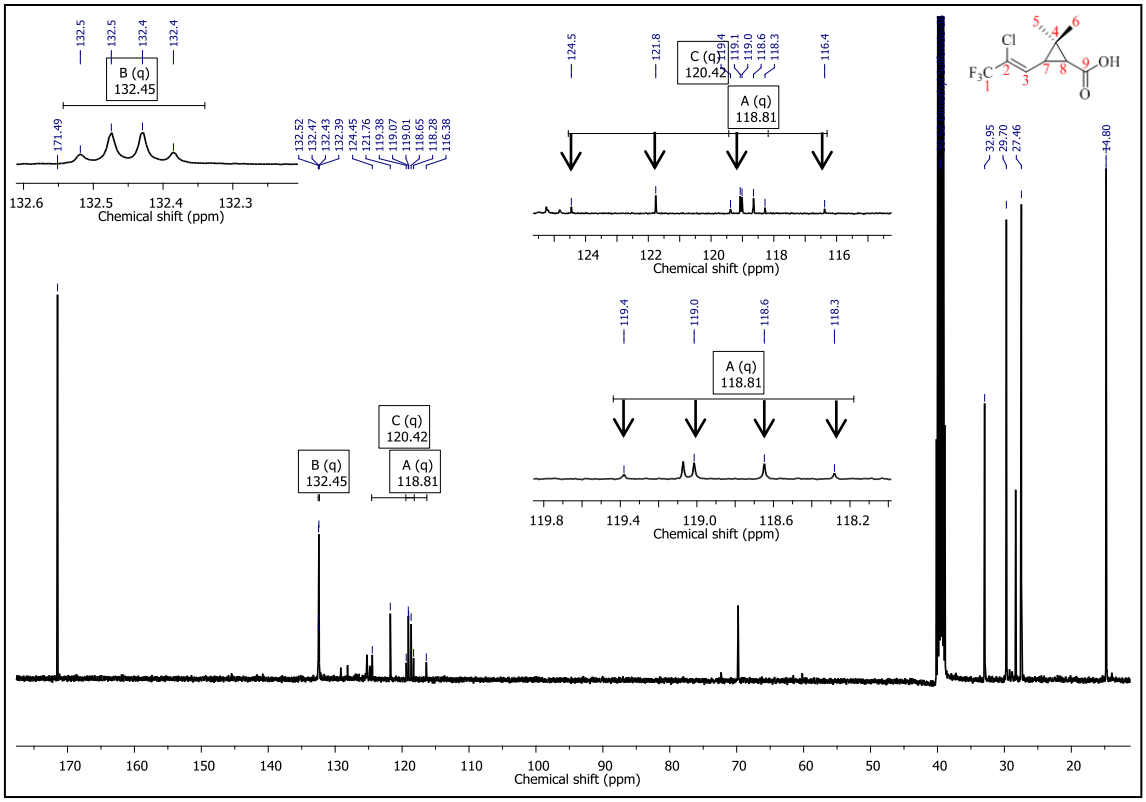


Figura 39. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) do ácido **BF-COOH** proveniente da hidrólise básica da Bifentrina com KOH.



A Figura 40 mostra o RMN de ^{1}H (500 MHz, C_3D_6O) do álcool **BF-OH** e revelou a presença de um singleto em δ 2,18 (3H), um dubleto em δ 4,70 (2H) (J = 5,5 Hz), um tripleto em δ 4,18 (1H) (J = 5,5 Hz), um duplo dubleto em δ 7,10 (1H) (J = 7,6 Hz e 1,6 Hz), um tripleto em δ 7,23 (1H) (J = 7,6 Hz) e multipletos provenientes dos hidrogênios dos anéis aromáticos em δ 7,43 (3H), δ 7,29 (2H) e δ 7,35 (1H). O sinal do solvente acetona-d_6 (C_3D_6O) está em δ 2,05 e δ 2,89. Os demais sinais foram provenientes de impurezas da amostra.

A Figura 41 mostra o espectro de RMN de ^{13}C do álcool **BF-OH** e observaram-se os sinais em δ 15,8 (C_1) para o carbono da metila ligada ao anel aromático, δ 63,3 (C_2) para o carbono metilênico ligado ao grupo hidroxila, e os carbonos dos núcleos aromáticos em δ 126,1 (C_3), δ 127,0 (C_4), δ 127,5 (C_5), δ 128,9 (C_7 e C_8), 129,3 (C_6), δ 130,1 (C_9 e C_{10}), δ 133,5 (C_{11}), δ 141,6 (C_{12}), δ 143,1 (C_{13}) e δ 143,2 (C_{14}). O sinal do solvente C_3D_6O em δ 29,8 e δ 206,2.

Figura 40. Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, C_3D_6O) do álcool **BF-OH** proveniente da hidrólise básica da Bifentrina com KOH.

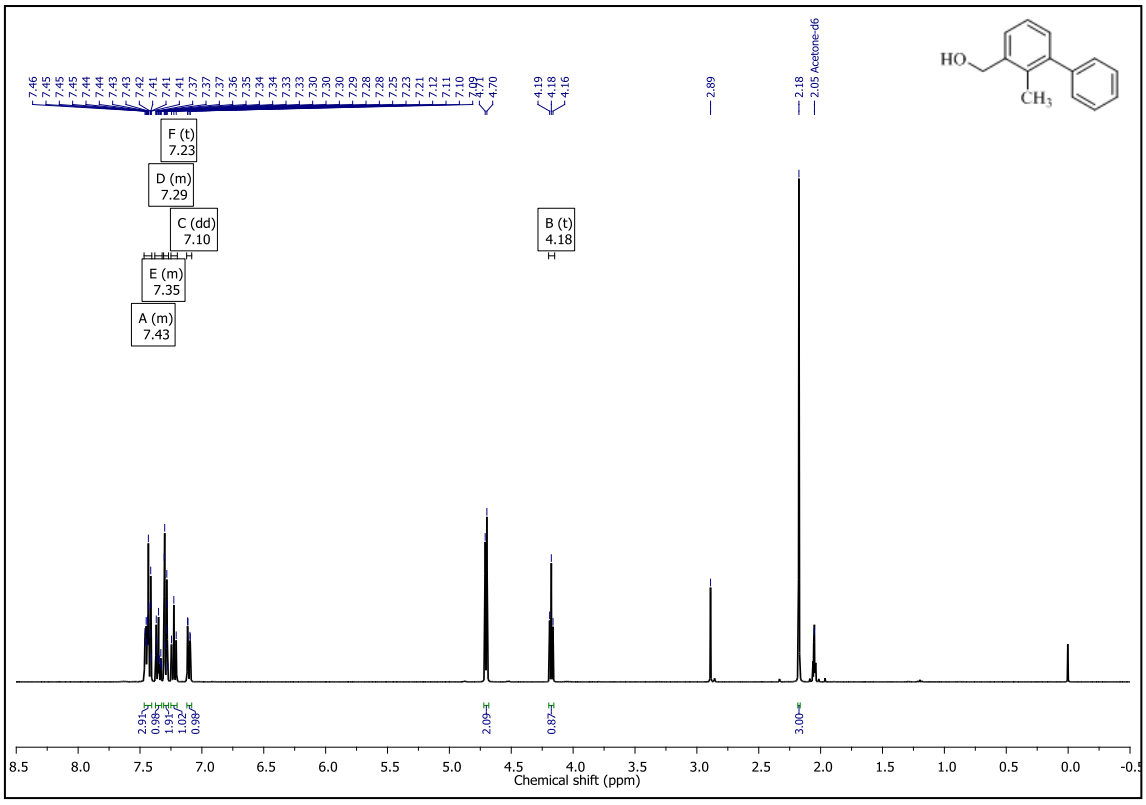
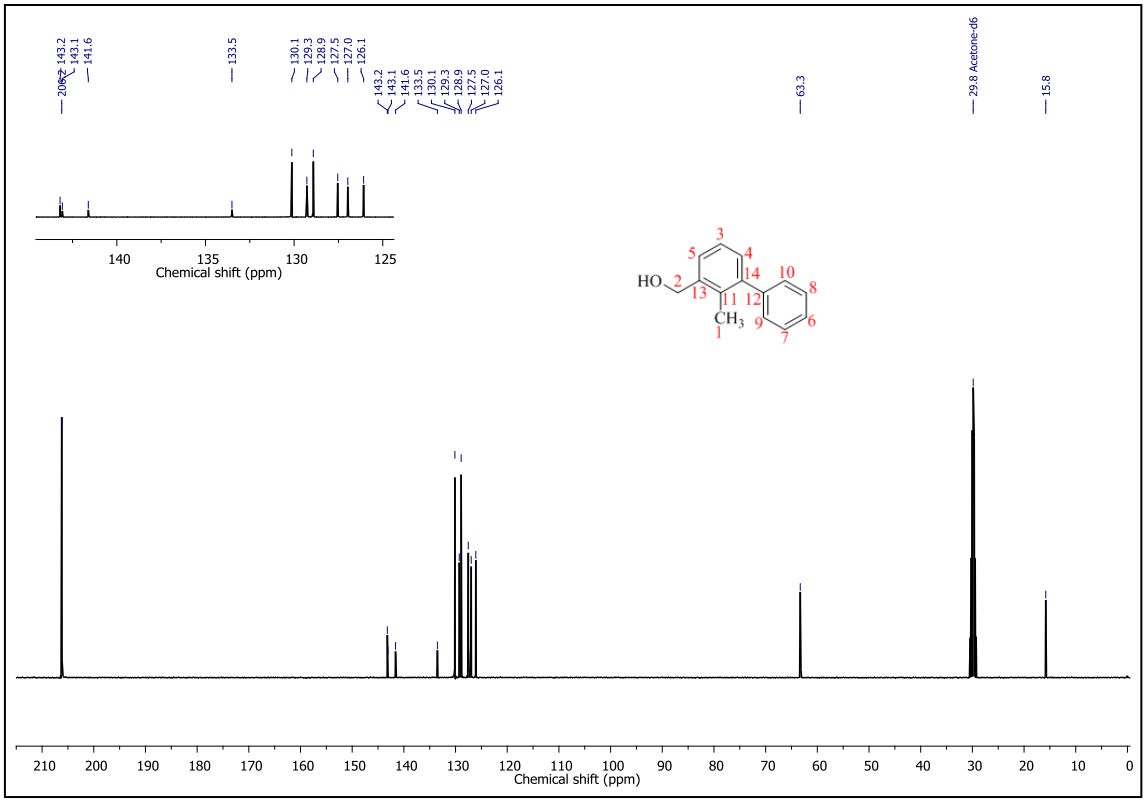


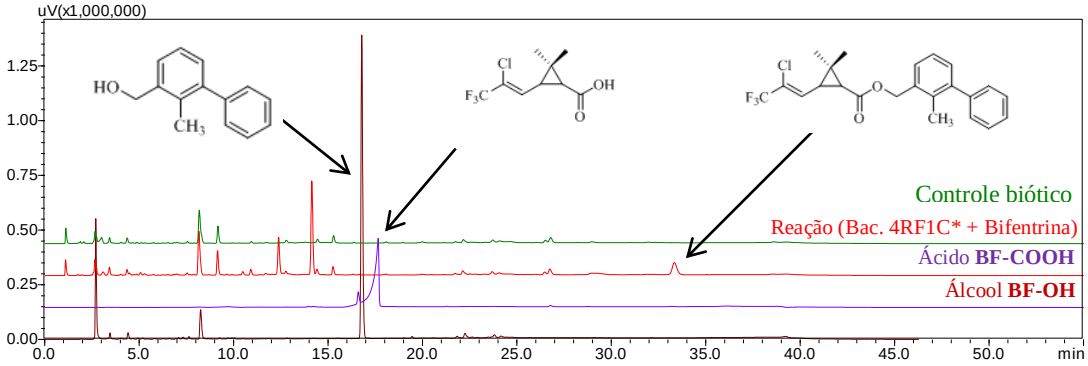
Figura 41. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, C_3D_6O) do álcool **BF-OH** proveniente da hidrólise básica da Bifentrina com KOH.



4.7.1 Comparação entre os produtos da hidrólise química com KOH com a reação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) na presença de Bifentrina

Após a caracterização dos produtos de hidrólise da Bifentrina com KOH, comparou-se a reação com os produtos de hidrólise enzimática empregando a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C). A Figura 42 mostra o cromatograma da reação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) com a Bifentrina e os produtos (álcool **BF-OH** e ácido **BF-COOH**) provenientes da hidrólise do pesticida em meio básico (KOH).

Figura 42. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e a Bifentrina e os produtos de hidrólise (álcool **BF-OH** e ácido **BF-COOH**) da Bifentrina com KOH.



*Bac. 4RF1C: bactéria *B. pseudomycoides*
Condições de análise: HPLC/UV-vis com coluna Phenomenex C_{18} (0,46 cm x 25 cm; 5 µm), modo de eluição gradiente 20-95% acetonitrila e água *Milli-Q* em 55 minutos, com vazão de 1 mL min^{-1}. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 220 nm.

Por meio das análises dos cromatogramas da Figura 42 verificou-se que as bandas correspondentes aos produtos de hidrólise da Bifentrina com KOH (álcool **BF-OH** e ácido **BF-COOH**) não foram observadas nos cromatogramas da reação entre a Bifentrina e a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C). Contudo, observou-se uma degradação de 79% do pesticida na presença da bactéria em 5 dias de reação.

É possível que a não identificação dos produtos de biodegradação da Bifentrina como o álcool **BF-OH** e o ácido **BF-COOH**, seja devido à ocorrência de reação de fase II da metabolização de compostos pela bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C), fazendo com que tanto o álcool **BF-OH** quanto o ácido **BF-COOH** estejam sendo conjugados com unidades de açúcares, aminoácidos, etc., formando produtos não identificados nessas análises. Também é possível ter havido a formação de produtos que foram mineralizados ou muito polares que não foram extraídos. Assim, conclui-se através das análises que a biodegradação da Bifentrina foi muito eficiente uma vez que não foram

detectados produtos de degradação, como ocorreu com o estudo de biodegradação da Bifentrina (Seção 4.7.1).

4.8 Reação de biodegradação do álcool BF-OH com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C)

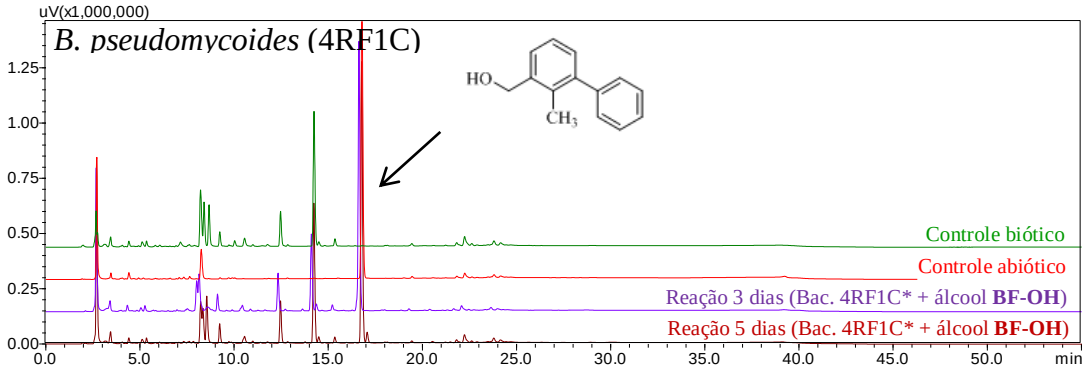
Para avaliar os possíveis produtos de biodegradação do álcool **BF-OH**, fez-se o cultivo em meio sólido e líquido da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) (Seção 3.4) na presença do álcool **BF-OH** (30 mg L^{-1}), o qual foi obtido comercialmente.

Posteriormente ao período reacional de 3 e 5 dias, as amostras foram extraídas e os extratos obtidos foram analisados em HPLC/UV-vis no comprimento de onda de 220 nm (Seção 3.5). Na Figura 43 encontram-se os cromatogramas das reações com 3 e 5 dias com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e o padrão do álcool **BF-OH**.

Por meio das análises dos cromatogramas não foi possível se observar bandas distintas provenientes de metabólitos obtidos a partir de uma possível degradação do álcool **BF-OH.**

A concentração final de álcool **BF-OH** foi de 25,8 ± 0,6 mg L^{-1} em 3 dias e 25,0 ± 0,6 mg L^{-1} em 5 dias de reação, com uma porcentagem de biodegradação de 14 e 17% para 3 e 5 dias, respectivamente. Este resultado refere-se à concentração inicial de 30 mg L^{-1} do álcool **BF-OH**. Portanto, nessas condições, e empregando o álcool **BF-OH** como substrato, a degradação do mesmo foi relativamente baixa.

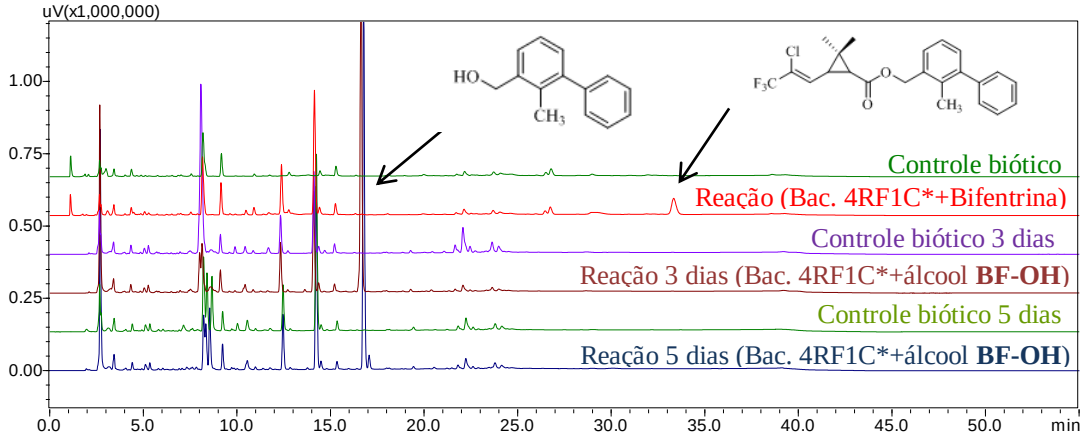
Figura 43. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e o álcool **BF-OH**. Condições de reação: 30 mg L^{-1} de álcool **BF-OH**, 3 e 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reação em triplicata.



*Bac. 4RF1C: bactéria *B. pseudoycoides*
Condições de análise: HPLC/UV-vis com coluna Phenomenex C_{18} (0,46 cm x 25 cm; 5 µm), modo de eluição gradiente 20-95% acetonitrila e água *Milli-Q* em 55 min, com vazão de 1 mL min^{-1}. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 220 nm.

A Figura 44 mostra os cromatogramas das reações entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) com a Bifentrina e a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e o álcool **BF-OH**. Verificou-se que não houve a formação do álcool **BF-OH** na reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) com a Bifentrina em 5 dias de reação. Esse resultado revelou que o álcool **BF-OH** proveniente da hidrólise enzimática não foi detectado nas análises, pois possivelmente foi degradado.

Figura 44. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) com a Bifentrina (5 dias) e com o álcool **BF-OH** (3 e 5 dias). Condições de reação: 30 mg L^{-1} de álcool **BF-OH**, 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 130 rpm, 32 ºC, reação em triplicata.



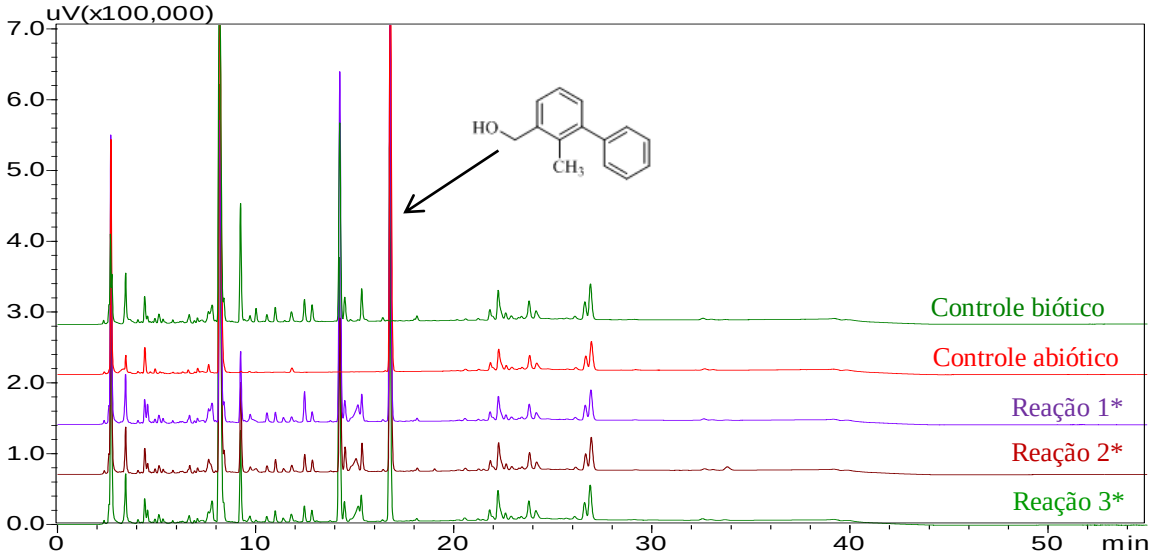
*Bac. 4RF1C: *B. pseudomycoides*
Condições de análise: HPLC/UV-vis com coluna Phenomenex C_{18} (0,46 cm x 25 cm; 5 µm), modo de eluição gradiente 20-95% acetonitrila e água *Milli-Q* em 55 min, com vazão de 1 mL min^{-1}. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 220 nm.

Novos experimentos foram realizados, pois ocorreu uma baixa porcentagem de biodegradação do álcool **BF-OH** na concentração de 30 mg L^{-1} quando foi utilizado como substrato. Isso pode ter ocorrido devido a sua concentração estar muito alta para que a bactéria fosse capaz de biodegradá-lo. Então, utilizaram-se menores concentrações do álcool **BF-OH** e observou-se a capacidade de degradação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) utilizando-se 15 mg L^{-1} do álcool **BF-OH** em 5 dias de reação e 10 mg L^{-1} do álcool **BF-OH** em 15 dias de reação.

Os cultivos da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) foram realizados em meio sólido e líquido na presença do álcool **BF-OH** (10 e 15 mg L^{-1}) (Seção 3.4). As reações foram realizadas em triplicata, sob agitação de 130 rpm, à temperatura de 32 ºC no período de 5 e 15 dias. Posteriormente ao período reacional, as amostras foram extraídas e os extratos obtidos foram analisados em HPLC/UV-vis no comprimento de onda de 220 nm (Seção 3.5).

A Figura 45 mostra os cromatogramas das reações entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e o álcool **BF-OH** (15 mg L^{-1}) em 5 dias de reação e verificou-se que a porcentagem de biodegradação do álcool **BF-OH** foi de 17%, sendo a concentração final do álcool **BF-OH** de 12,5 ± 0,3 mg L^{-1}.

Figura 45. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e o álcool **BF-OH** (15 mg L^{-1}). Condições de reação: 130 rpm, 32 ºC, 15 mg L^{-1} de álcool **BF-OH**, 5 dias, reação em triplicata.

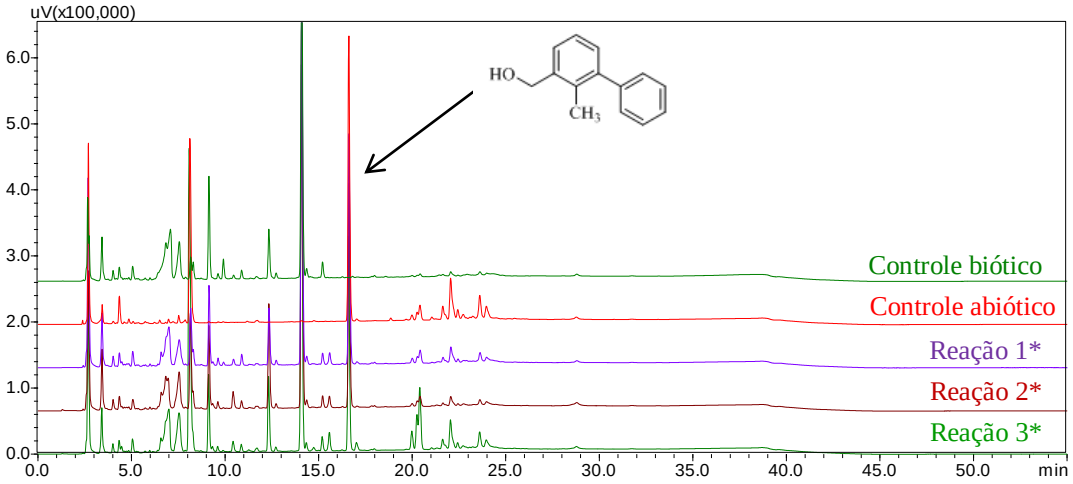


*Reação 1, 2 e 3: referem-se à triplicata da reação de biodegradação do álcool **BF-OH** com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C).

Condições de análise: HPLC/UV-vis com coluna Phenomenex C_{18} (0,46 cm x 25 cm; 5 µm), modo de eluição gradiente 20-95% acetonitrila e água *Milli-Q* em 55 min, com vazão de 1 mL min^{-1}. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 220 nm.

A Figura 46 mostra os cromatogramas das reações entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e o álcool **BF-OH** (10 mg L^{-1}) em 15 dias de reação. Verificou-se que a porcentagem de biodegradação do álcool **BF-OH** foi de 15% e a concentração final do álcool **BF-OH** foi de 8,5 ± 0,1 mg L^{-1}.

Figura 46. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) o álcool **BF-OH** (10 mg L^{-1}). Condições de reação: 10 mg L^{-1} de álcool **BF-OH**, 15 dias, 130 rpm, 32 ºC, reação em triplicata.



*Reação 1, 2 e 3: referem-se à triplicata da reação de biodegradação do álcool **BF-OH** com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C).
Condições de análise: HPLC/UV-vis com coluna Phenomenex C_{18} (0,46 cm x 25 cm; 5 µm), modo de eluição gradiente 20-95% acetonitrila e água *Milli-Q* em 55 min, com vazão de 1 mL min^{-1}. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 220 nm.

Com esse estudo concluiu-se que embora a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) tenha sido capaz de biodegradar a Bifentrina na porcentagem de 79%, não ocorreu a mesma capacidade de biodegradação para o álcool **BF-OH** quando adicionado puro o qual apresentou uma porcentagem de biodegradação entre 15 e 17% nas concentrações de 10 e 15 mg L^{-1} de álcool **BF-OH**.

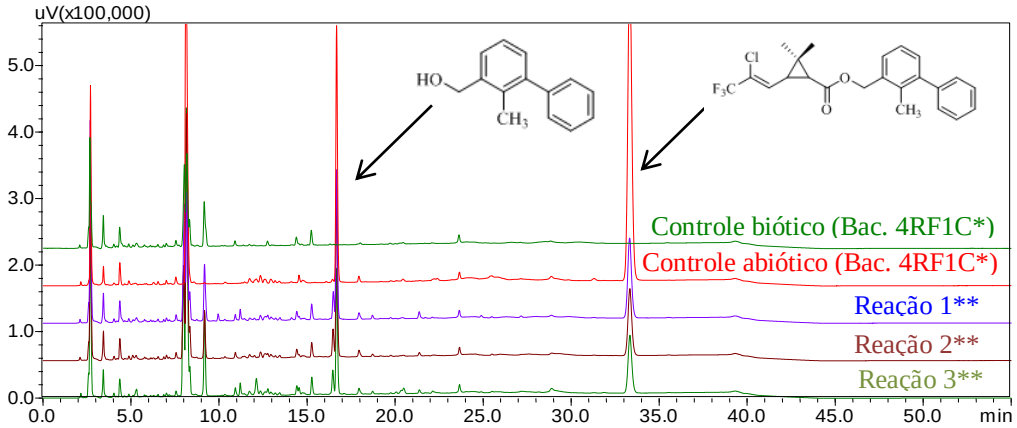
4.9 Reação de biodegradação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e o álcool BF-OH e a Bifentrina

Tendo como objetivo avaliar a biodegradação do álcool **BF-OH** na presença da Bifentrina, fez-se o cultivo em meio sólido e líquido das bactérias *B. pseudomycoides* (4RF1C) (Seção 3.4) na presença do álcool **BF-OH** (10 mg L^{-1}) e da Bifentrina (30 mg L^{-1}). As reações foram realizadas em triplicata, sob agitação de 130 rpm, à temperatura de 32 ºC no período de 5 e 10 dias.

As amostras foram extraídas e os extratos obtidos foram analisados em HPLC/UV-vis no comprimento de onda de 220 nm (Seção 3.5).

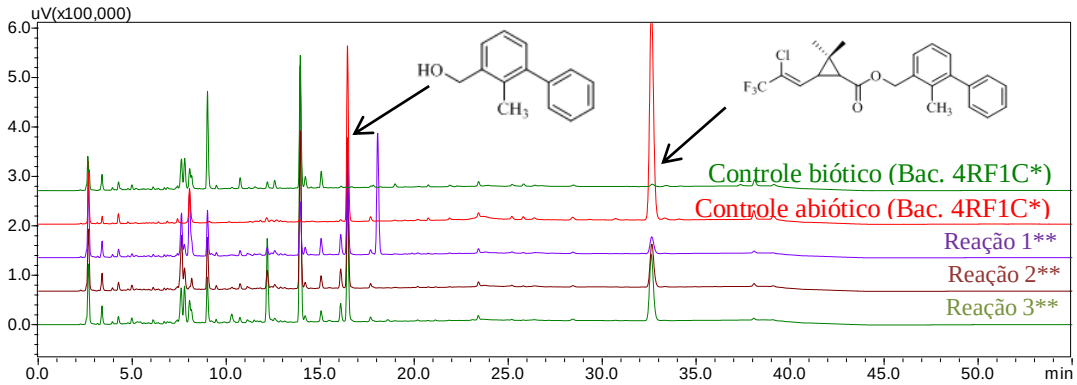
Os cromatogramas das análises encontram-se nas Figuras 47 e 48 para 5 e 10 dias de reação, respectivamente, entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e o álcool **BF-OH** e a Bifentrina. As reações foram realizadas em triplicata (Reação 1, 2 e 3).

Figura 47. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) com a Bifentrina e com o álcool **BF-OH**. Condições de reação: 10 mg L^{-1} de álcool **BF-OH**, 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reação em triplicata.



*Bac. 4RF1C: bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C).
Reação 1, 2 e 3: referem-se à triplicata da reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e a Bifentrina (30 mg L^{-1}) e o álcool **BF-OH (10 mg L^{-1}).
Condições de análise: HPLC/UV-vis com coluna Phenomenex C_{18} (0,46 cm x 25 cm; 5 µm), modo de eluição gradiente 20-95% acetonitrila e água *Milli-Q* em 55 min, com vazão de 1 mL min^{-1}. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 220 nm.

Figura 48. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) com a Bifentrina e com o álcool **BF-OH**. Condições de reação: 10 mg L^{-1} de álcool **BF-OH**, 30 mg L^{-1} de Bifentrina 10 dias, 130 rpm, 32 ºC.



*Bac. 4RF1C: bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C).
Reação 1, 2 e 3: referem-se à triplicata da reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e a Bifentrina (30 mg L^{-1}) e o álcool **BF-OH (10 mg L^{-1}).
Condições de análise: HPLC/UV-vis com coluna Phenomenex C_{18} (0,46 cm x 25 cm; 5 µm), modo de eluição gradiente 20-95% acetonitrila e água *Milli-Q* em 55 min, com vazão de 1 mL min^{-1}. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 220 nm.

A Tabela 13 mostra os valores das concentrações da Bifentrina e do álcool **BF-OH** para as reações de 10 dias com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C), pois não foi observado uma diferença de 5 para 10 dias. Foi possível se observar que a biodegradação da Bifentrina foi de 76% e 44% do álcool **BF-OH**.

É interessante notar que a porcentagem de biodegradação de apenas o álcool **BF-OH** na presença da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) na concentração de 10 mg L^{-1} em 15 dias de reação foi de 15%; enquanto que na mesma concentração mas, na presença da Bifentrina (30 mg L^{-1}), a porcentagem de biodegradação do álcool **BF-OH** em 10 dias de reação foi de 44%. Possivelmente deve existir um "sinergismo" enzimático que favorece a biodegradação do álcool **BF-OH** quando o mesmo está presente com a Bifentrina. Sugere-se que as enzimas sejam produzidas na presença da Bifentrina auxiliando assim a biodegradação do álcool **BF-OH**.

Tabela 13. Biodegradação associada entre a Bifentrina e o álcool **BF-OH** com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C). Concentração inicial de Bifentrina: 30 mg L^{-1}. Concentração inicial de álcool **BF-OH**: 10 mg L^{-1}.

Tempo de reação (dias)	Concentração de Bifentrina (mg L^{-1})	Porcentagem de biodegradação de BF* (%)	Concentração de álcool **BF-OH** (mg L^{-1})	Porcentagem de biodegradação de álcool **BF-OH** (%)
10	7,0 ± 0,3	76	5,6 ± 0,5	44

*BF: Bifentrina

4.10 Identificação do 4-hidroxibenzoato de metila produzido pela bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C)

Por meio do experimento em replicatas com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e a Bifentrina e após extração e purificação do extrato bruto por cromatografia em coluna como descrito na metodologia (Seção 3.12), diferentes frações foram obtidas e posteriormente analisadas por CG-EM.

Através das análises espectroscópicas de RMN de ^{1}H e RMN de ^{13}C e espectrometria de massas foi possível identificar o composto 4-hidroxibenzoato de metila. O espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$), apresentado na Figura 49, revelou a presença de dois dubletos, um em δ 6,86 (d, 2H, J = 8,8 Hz) e o outro em δ 7,95 (d, 2H, J = 8,8 Hz), indicando a presença de um anel aromático *para* dissubstituído. O singleto em δ 3,88 (s, 3H) foi atribuído a um grupo metoxila presente na molécula.

O espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$), ilustrado na Figura 50,

apresentou um sinal em δ 52,0 atribuído ao carbono de um grupo metoxila. Os sinais observados em δ 115,4 (carbono *orto* ao grupo hidroxila), δ 122,8 (carbono *orto* ao grupo carboxila), δ 132,1 (carbono *ipso* ao grupo hidroxila) e δ 160,3 (carbono *ipso* ao grupo carboxila) foram atribuídos aos carbonos de anel aromático presente na molécula. O sinal em δ 167,1 foi atribuído ao carbono de um grupo carboxila. Os dados de RMN de ^{1}H e RMN de ^{13}C foram concordantes com os obtidos por simulação no programa *ChemDraw Professional* versão 15.0.

Figura 49. Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) do composto 4-hidroxibenzoato de metila isolado da reação de biodegradação da Bifentrina com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C).

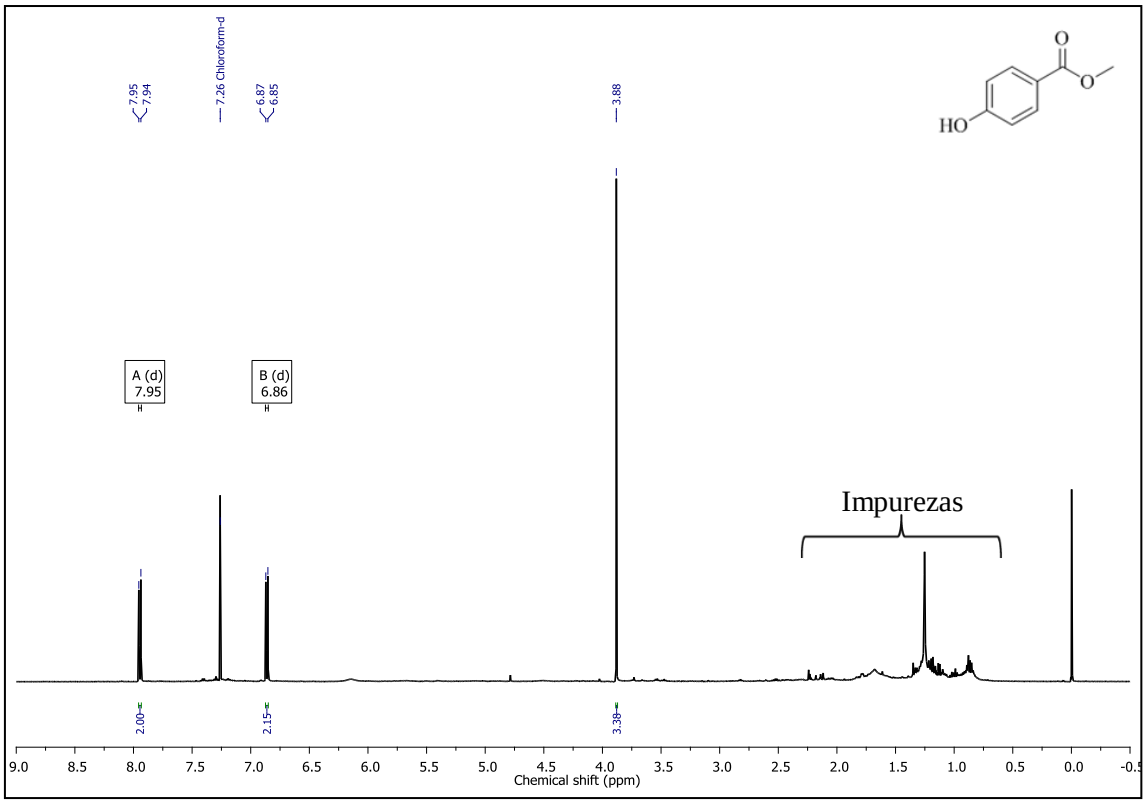
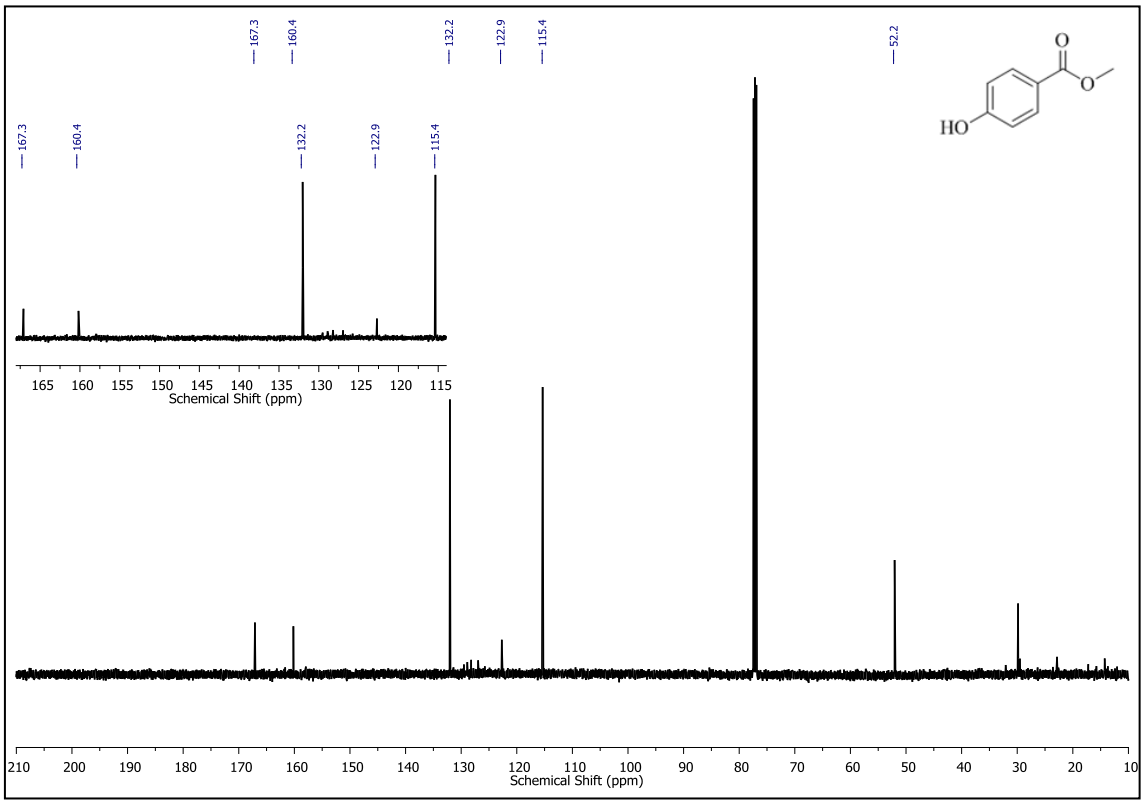
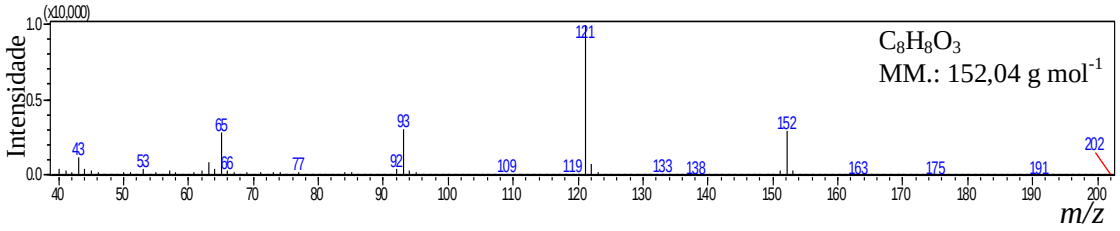


Figura 50. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) do composto 4-hidroxibenzoato de metila isolado da reação de biodegradação da Bifentrina com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C).



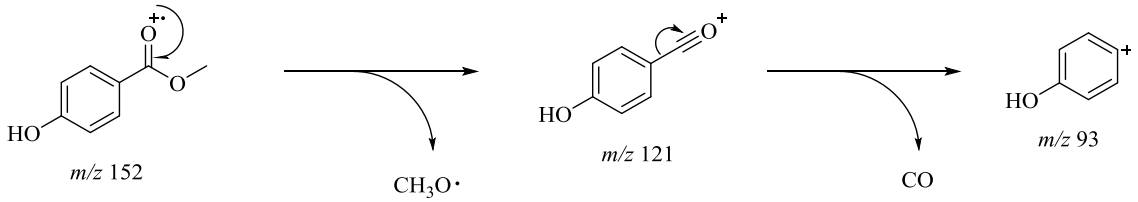
O espectro de massas, obtido através da técnica CG-EM (IE, 70 eV), do composto isolado da fração **Fr. 3.2.1** por cromatografia em coluna mostrou similaridade >70% com o observado para o composto 4-hidroxibenzoato de metila presente na biblioteca NIST.05 do CG-EM (Figura 51).

Figura 51. Espectro de massas do 4-hidroxibenzoato de metila isolado da fração **Fr. 3.2.1** da reação de biodegradação da Bifentrina com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C).



Na Figura 52 tem-se uma proposta de fragmentação de alguns dos principais íons provenientes do 4-hidroxibenzoato de metila. O íon molecular de $M^{+\bullet}$ 152 perdeu o grupo $CH_3O^{\bullet}$ radicalar, originando o íon de *m/z* 121. Em seguida, a eliminação da molécula neutra de CO a partir de *m/z* 121 formou o íon com *m/z* 93.

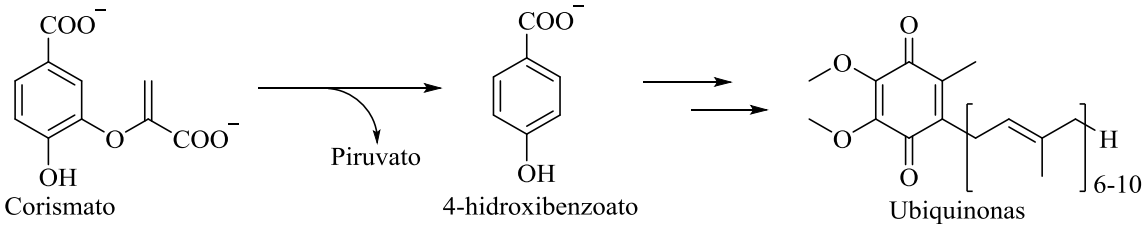
Figura 52. Proposta de fragmentação para o composto 4-hidroxibenzoato de metila.



O composto 4-hidroxibenzoato ou *p*-hidroxibenzoato (Figura 54) é empregado na indústria na produção de polímeros e seus derivados de éter alquílico são utilizados como conservantes em fármacos e cosméticos. Em bactérias, fungos e plantas tal composto é obtido via rota biossintética do chiquimato, a forma aniônica do ácido chiquímico, sendo este último precursor de aminoácidos (fenilalanina, tirosina e triptofano), do indol e derivados, entre outros compostos (VERHOEF *et al.*, 2007).

Dessa forma, é possível que o metabólito 4-hidroxibenzoato de metila tenha sido obtido via rota biossintética do chiquimato. Dentre as muitas ramificações da rota do chiquimato, o intermediário corismato é produzido e torna-se um precursor comum na biossíntese de outros compostos como a ubiquinona, a qual é produzida a partir do ânion 4-hidroxibenzoato (Figura 53) (DOSSELAERE, VANDERLEYDEN, 2001).

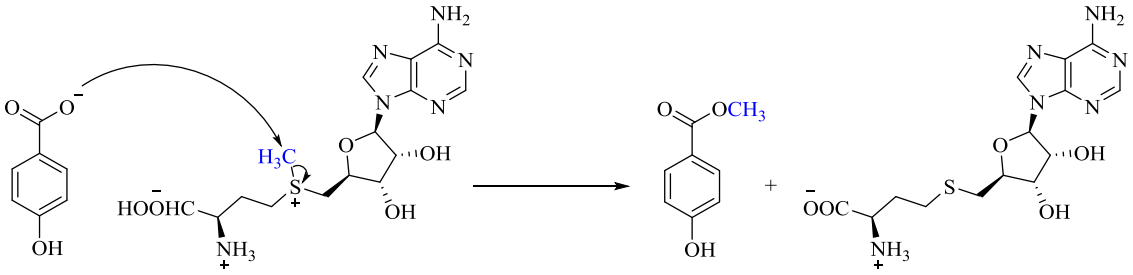
Figura 53. Etapa da biossíntese envolvida na formação do ânion 4-hidroxibenzoato.



Fonte: Adaptado de DOSSELAERE e VANDERLEYDEN, 2001.

A metilação do 4-hidroxibenzoato pode ter ocorrido por meio da enzima S-adenosilmetionina (SAM) (Figura 54), que é capaz de doar o grupo metila de sua molécula para outra.

Figura 54. Metilação do 4-hidroxibenzoato por meio da enzima S-adenosilmetionina (SAM).



Em um trabalho de Akone e colaboradores (2016) foi empregado o fungo *Chaetomium* sp. em consórcio com a bactéria *Bacillus subtilis* em meio de cultivo de arroz sólido. As cepas dos microrganismos foram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 1 L contendo 60 mL de água destilada e 50,0 g de arroz comercial, mantidos sob condição estática por 5 semanas e a 23 ºC. Posteriormente, foi feita uma extração com acetato de etila e o extrato obtido foi ressuspenso em metanol para ser analisado por HPLC. Como resultado, foi observado, dentre outros compostos, a produção do metabólito 4-hidroxibenzoato de metila e o aumento de sua concentração em relação às reações de controle biótico pela bactéria *B. subtilis* e pelo fungo *Chaetomium* sp.

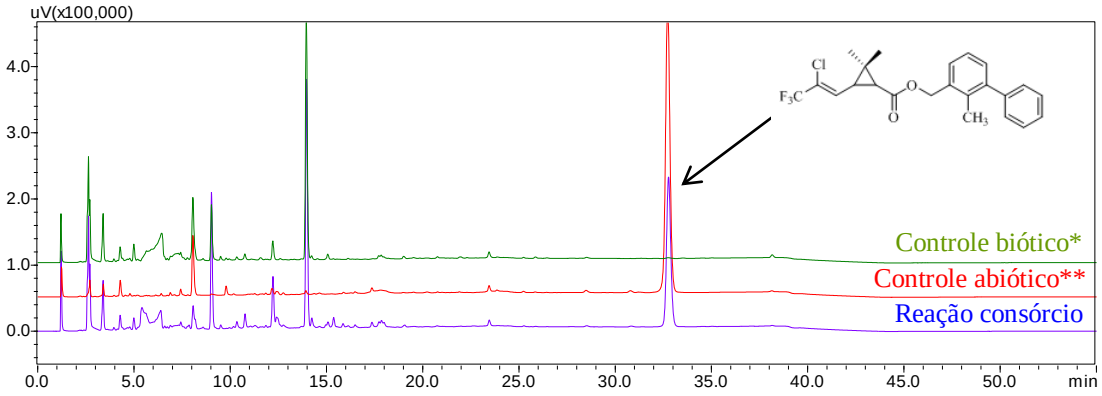
Os metabólitos secundários, assim como o ânion 4-hidroxibenzoato, mostram-se importantes para o metabolismo de um determinado organismo, pois apresentam algumas funções específicas que favorecem o seu produtor no ambiente em que vive.

É possível que no caso específico da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C), a produção do 4-hidroxibenzoato de metila pode estar sendo estimulada pelo microrganismo devido à presença da Bifentrina.

4.11 Consórcio contendo as bactérias do gênero *Bacillus* para a reação de biodegradação do pesticida Bifentrina

Um consórcio microbiano foi obtido empregando-se todas as linhagens de bactérias utilizadas neste trabalho. Todo o procedimento de cultivo em meio sólido e líquido e posterior extração foram descritas na Seção 3.15. A Figura 55 mostra os cromatogramas das análises por HPLC/UV-vis. Este estudo foi importante para avaliar o sinergismo dos microrganismos frente à biodegradação da Bifentrina.

Figura 55. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação de biodegradação da Bifentrina em consórcio com todas as bactérias isoladas da cultura da laranja. Condições de reação: 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC.



*Controle biótico: reação na ausência de Bifentrina.
**Controle abiótico: reação na ausência das bactérias do consórcio.
Condições de análise: HPLC/UV-vis com coluna Phenomenex C_{18} (0,46 cm x 25 cm; 5 µm), modo de eluição gradiente 20-95% acetonitrila e água *Milli-Q* em 55 min, com vazão de 1 mL min^{-1}. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 220 nm.

A concentração final de Bifentrina foi de 14,6 mg L^{-1}, sendo a porcentagem de biodegradação da Bifentrina de 51% e a porcentagem de recuperação do controle abiótico foi de 97%. Comparativamente, a porcentagem de biodegradação da Bifentrina com o consórcio foi maior que as porcentagens de biodegradação com as bactérias *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C), *B. aryabhattai/ Bacillus* sp. (2RF3C), *B. megaterium* (RF1C) e *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) individualmente, que variaram de 24 a 37% de biodegradação, como pode ser observado na Tabela 14.

No entanto, as bactérias identificadas como *B. pseudomycoides* (2RF2C), *B. pseudomycoides* (3RF2C), *B. pseudomycoides* (4RF1C) e *B. pseudomycoides* (4RF2C) mostraram porcentagem de biodegradação da Bifentrina maior que 51%, ou seja, entre 79 e 88%.

Tabela 14. Concentração final do pesticida Bifentrina determinado por HPLC/UV-vis, empregando as bactérias isoladas da cultura da laranja. Condições de reação: 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reações em triplicata.

Bactérias	Concentração final de BF[a] (mg L^{-1})*	Porcentagem de biodegradação da BF[a] (%)	Porcentagem de recuperação da BF[a] nos CA[b] (%)
Bacillus safensis/ Bacillus pumilus (2RF1C)	22,8 ± 0,3	24	97
Bacillus aryabhattai/ Bacillus sp. (2RF3C)	22,4 ± 0,9	25	98
Bacillus megaterium (RF1C)	20,1 ± 1,1	33	98
Bacillus amyloliquefaciens (RFD1C)	18,9 ± 0,9	37	97
Reação consórcio	14,6	51	97
Bacillus pseudomycoides (4RF1C)	6,3 ± 0,5	79	98
Bacillus pseudomycoides (2RF2C)	4,7 ± 1,3	84	98
Bacillus pseudomycoides (4RF2C)	4,3 ± 0,3	86	97
Bacillus pseudomycoides (3RF2C)	3,5 ± 0,3	88	98

[a]BF = Bifentrina
[b]CA = Controle abiótico da reação para cada triplicata. Reação na ausência de bactéria.
* Valor médio das triplicatas

4.12 Caracterização do Fipronil comercial

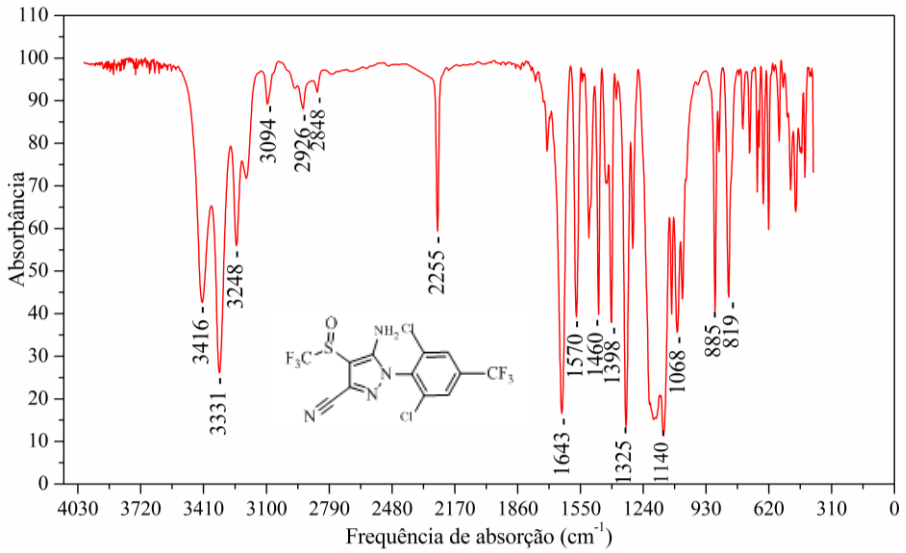
O pesticida comercial Fipronil empregado na agricultura e utilizado neste trabalho possui em sua composição de 25 g L^{-1} de Fipronil e 975 g L^{-1} de compostos inertes como dispersantes e antiespumantes. Essas informações foram obtidas de acordo com o rótulo do fabricante.

Assim, objetivando-se o composto puro para fazer a curva de calibração, foi realizada uma purificação do Fipronil empregando-se a técnica de cromatografia em coluna como descrito na Seção 3.13. Após o processo de purificação de 3 mL do Fipronil comercial, obteve-se 52,4 mg do composto puro. Uma vez obtido o Fipronil puro realizou-se a caracterização por p.f., IV, RMN de ^{1}H e RMN de ^{13}C. A Figura 56 mostra o espectro de Infravermelho do Fipronil.

O valor do ponto de fusão do Fipronil foi entre 195 ºC e 197 ºC, valor que corrobora o resultado obtido por Tang e colaboradores (2006).

A análise da rotação óptica (α_D) do Fipronil foi realizada e o valor foi de $[\alpha]^{25}_{589}$ -11,04º ($1x10^{-5}$ g/100 mL, $CHCl_3$). O fabricante não informou se o composto ativo do produto comercial é racêmico, enantiomericamente puro ou enantiomericamente enriquecido.

Figura 56. Espectro de Infravermelho do Fipronil.



As bandas entre 3.500 e 3.100 cm^{-1} foram observadas e são características de vibrações N-H presente em ligações de amina primária e secundária. Em 2.255 cm^{-1} observou-se uma banda referente ao grupo ciano (CN). As bandas entre 1.400 e 1.000 cm^{-1} corresponderam às ligações C-F, e as bandas entre 800 e 600 cm^{-1} às ligações C-Cl.

A banda entre 1040 e 1060 cm^{-1} correspondeu à vibração da ligação S=O. As bandas entre 1.600 e 1.450 corresponderam às vibrações de ligações aromáticas (C=C) e as ligações C-H de aromáticos corresponderam à frequência de absorção em aproximadamente 3.030 cm^{-1} com bandas de baixa intensidade.

As Figuras 57 e 58 mostram os espectros de RMN de ^{1}H e RMN de ^{13}C do Fipronil, respectivamente. No espectro de RMN de ^{1}H observou-se a presença de um singleto em δ 8,14 (s, 2H) referente aos hidrogênios presentes no anel aromático da estrutura do Fipronil, e um singleto em δ 6,97 (s, 2H) referente aos hidrogênios do grupo da amina primária presente no composto. O sinal em δ 2,05 correspondeu ao solvente deuterado C_3D_6O (acetona-d_6) e o sinal em δ 0,00 correspondeu ao sinal do padrão interno utilizado como referência (TMS). Os demais sinais foram correspondentes à água (δ 3,01) e impurezas presentes na amostra.

A Figura 58 mostra o espectro de RMN de ^{13}C do Fipronil, observam-se os sinais em δ 127,0 (C_3), δ 111,4 (C_4), δ 151,9 (C_5), δ 137,0 (C_6), δ 127,28 (C_7 e C_8) (q, J = 3,8 Hz), δ_{C-F} 127,4 (C_9 e C_{10}) (q, J = 4,2 Hz), δ_{C-F} 135,0 (C_{11}) (q, J = 34,2 Hz), δ_{C-F} 122,9 (C_{12}) (q, J = 273,2 Hz). A Figura 59 mostra a expansão dos quartetos em δ_{C-F} 135,0 (C_{11}) (q, J = 34,2 Hz), δ_{C-F} 122,9 (C_{12}) (q, J = 273,2 Hz). Não foram observados

os sinais dos carbonos ligados diretamente ao grupo sulfóxido.

Figura 57. Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, C_3D_6O) do Fipronil.

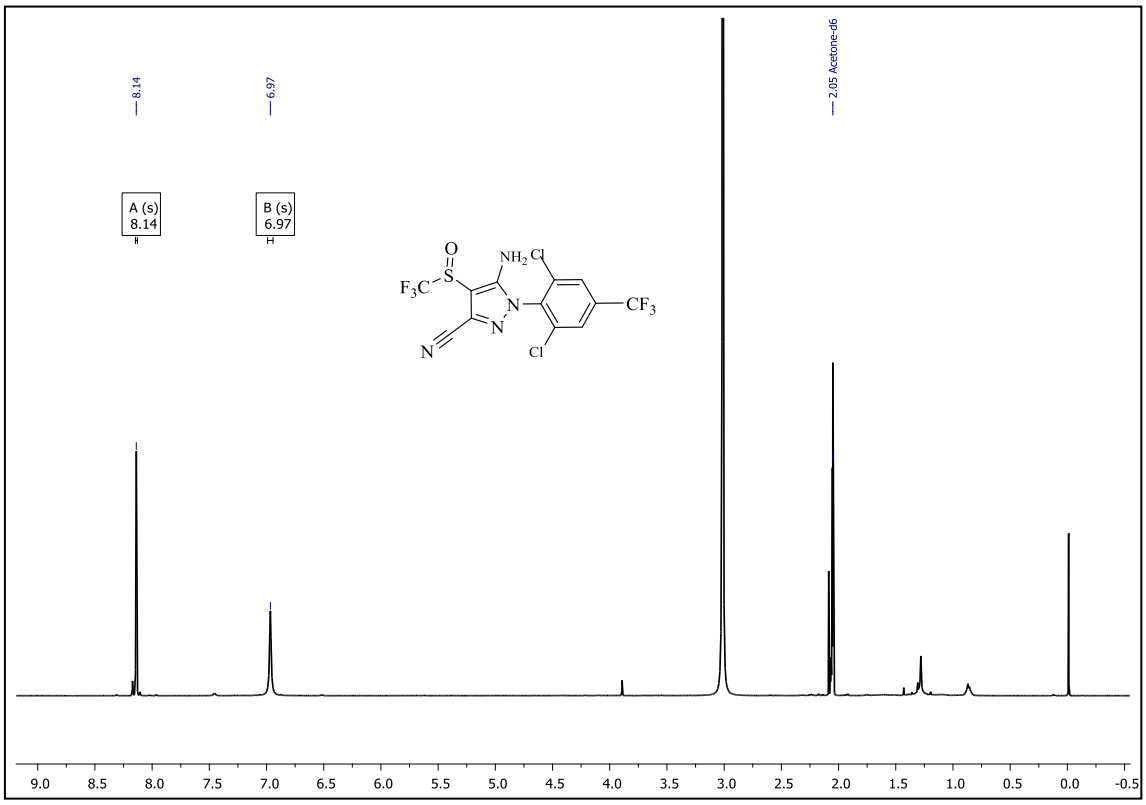


Figura 58. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, C_3D_6O) do Fipronil.

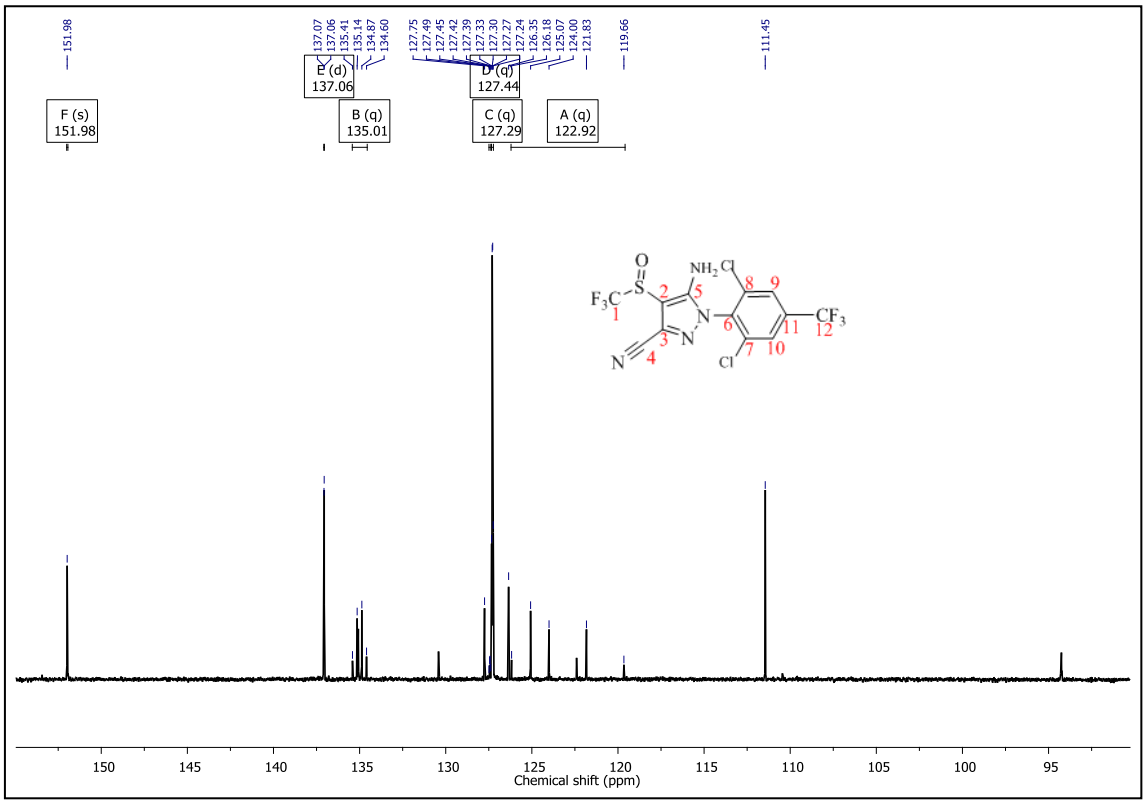
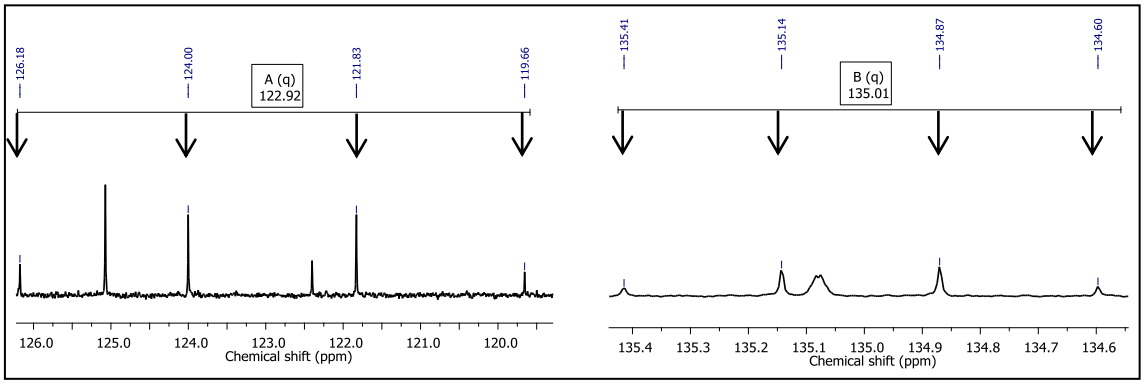


Figura 59. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, C_3D_6O) do Fipronil.

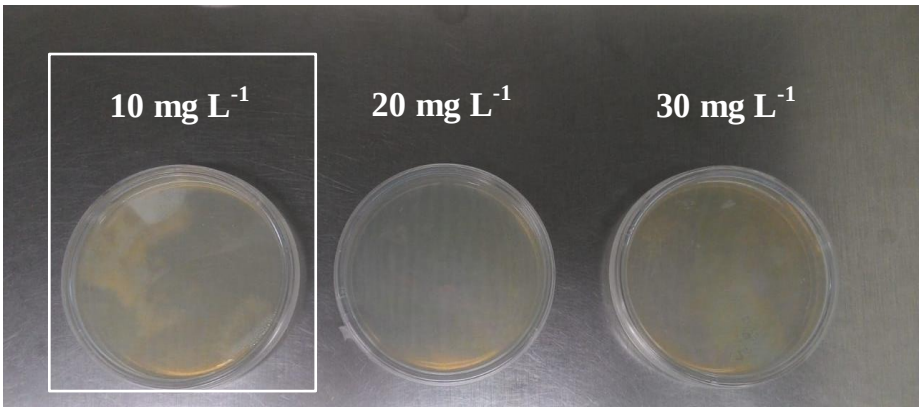


4.13 Cultivo das bactérias em meio sólido na presença de Fipronil

As 8 linhagens das bactérias do gênero *Bacillus* empregadas neste trabalho foram cultivadas em placas de Petri com meio Agar contendo diferentes concentrações do Fipronil (10, 30 e 100 mg L^{-1}). Neste estudo, foi observado que todas as bactérias se desenvolveram na concentração de 10 mg L^{-1} e as linhagens de *B. pseudomycoides* (2RF2C, 3RF2C, 4RF1C e 4RF2C) não se desenvolveram na concentração de 30 mg L^{-1}, diferentemente do pesticida Bifentrina em que todas as bactérias se desenvolveram e, ainda, nenhuma se desenvolveu na concentração de 100 mg L^{-1} do pesticida.

A Figura 60 mostra o cultivo da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) nas concentrações de 10, 20 e 30 mg L^{-1} de Fipronil. Contudo, a bactéria apenas se desenvolveu na placa contendo 10 mg L^{-1} de Fipronil, com 24 horas de crescimento à temperatura controlada em estufa de 32 ºC. Desta forma, para o cultivo dos microrganismos em meio líquido a concentração empregada foi de 10 mg L^{-1} de Fipronil.

Figura 60. Cultivo da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) em placas de Petri contendo meio Nutriente *Broth* e Agar na presença de diferentes concentrações de Fipronil (10, 20 e 30 mg L^{-1}).

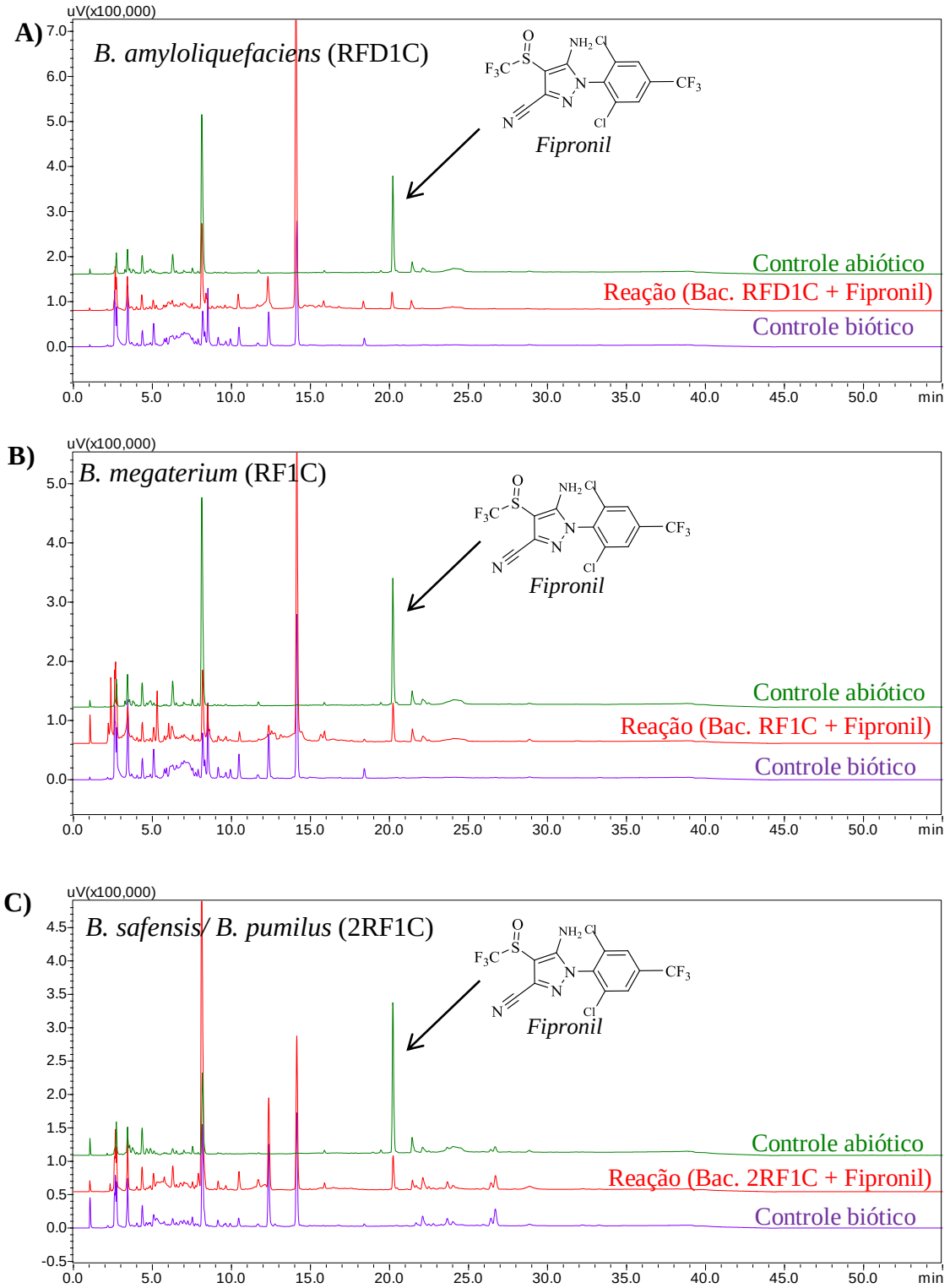


4.14 Cultivo das bactérias em meio líquido na presença de Fipronil

A partir do resultado de crescimento em meio sólido realizou-se o crescimento das 8 linhagens bacterianas em meio líquido de Nutriente *Broth* na presença de 10 mg L^{-1} de Fipronil para se analisar uma possível biodegradação ou biotransformação do pesticida Fipronil.

As concentrações das bactérias empregadas nos experimentos realizados foi de 10^6 UFC mL^{-1} (Seção 3.3.1). Na Figura 61A-H encontram-se os cromatogramas das análises das amostras provenientes das reações das 8 linhagens de bactérias com o pesticida Fipronil por HPLC/UV-vis. A reação de *controle biótico* correspondeu ao meio de cultivo bacteriano na ausência do pesticida e o *controle abiótico* ao meio de cultivo com o Fipronil.

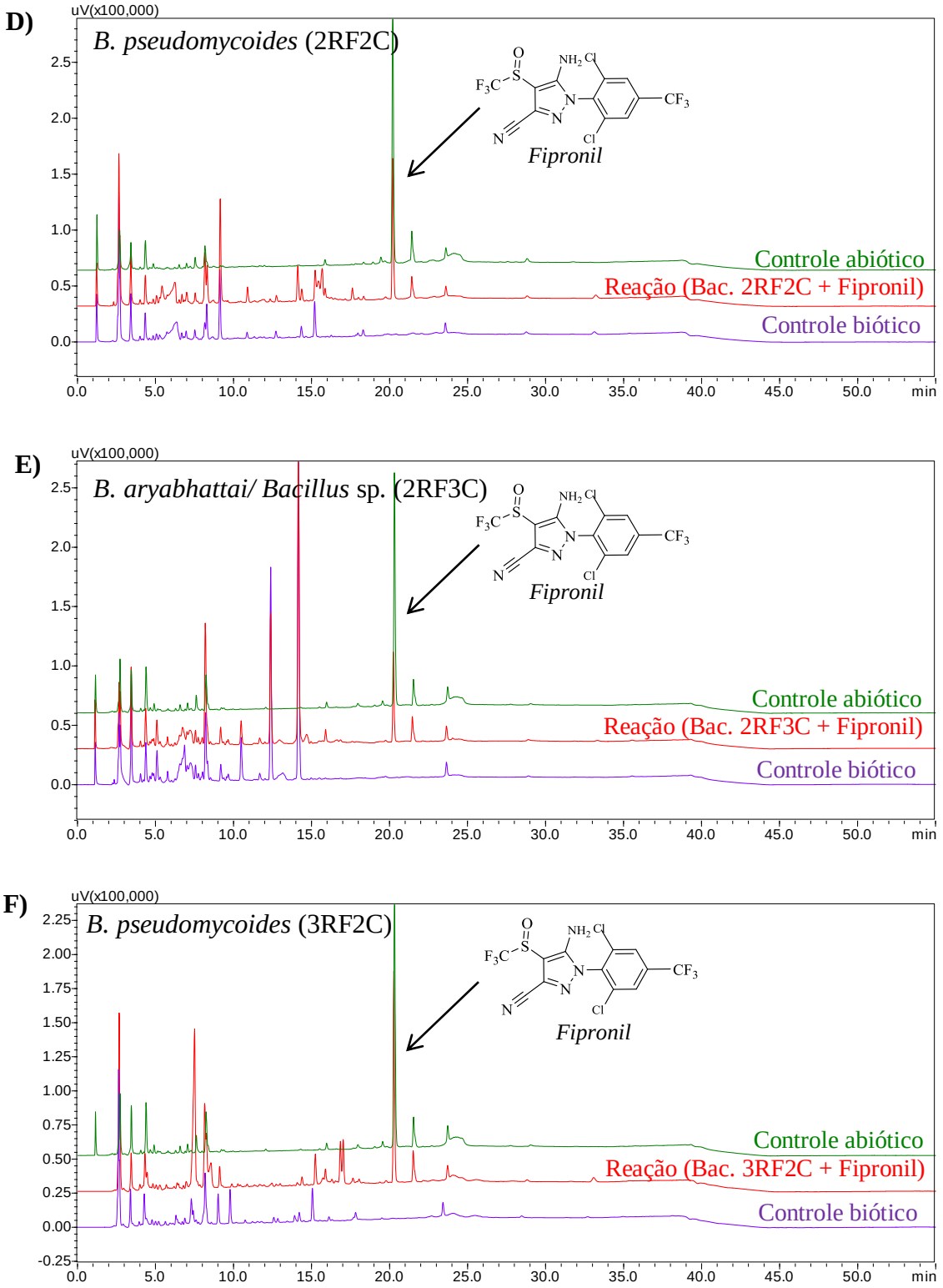
Figura 61. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação do Fipronil com as bactérias isoladas da cultura da laranja. Condições de reação: 10 mg L^{-1} de Fipronil, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reações em triplicata.



Condições de análise: HPLC/UV-vis com coluna Phenomenex C_{18} (0,46 cm x 25 cm; 5 µm), modo de eluição gradiente 20-95% acetonitrila e água *Milli-Q* em 55 min, com vazão de 1 mL min^{-1}. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 220 nm.

Continua...

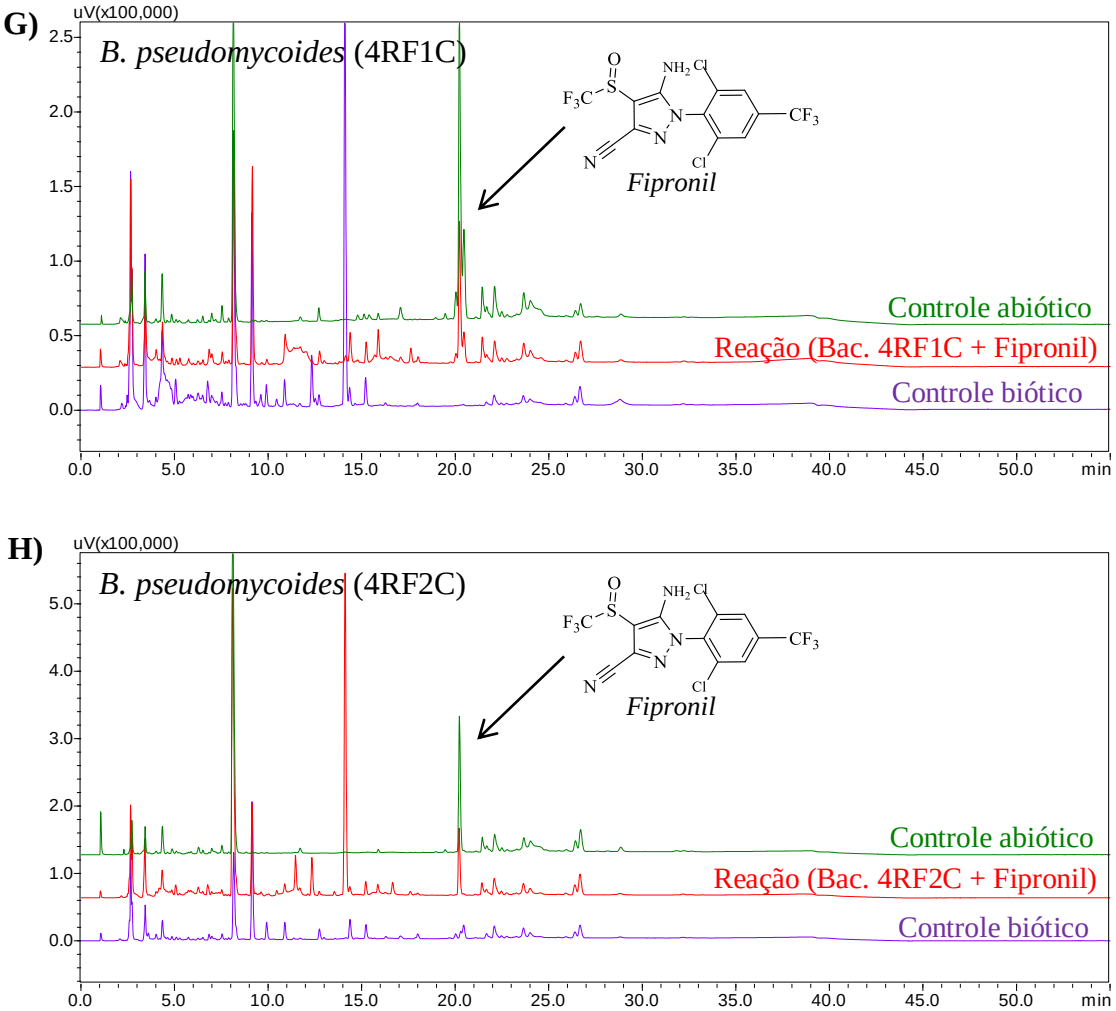
Continuação da Figura 61...



Condições de análise: HPLC/UV-vis com coluna Phenomenex C_{18} (0,46 cm x 25 cm; 5 µm), modo de eluição gradiente 20-95% acetonitrila e água *Milli-Q* em 55 min, com vazão de 1 mL min^{-1}. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 220 nm.

Continua...

Continuação da Figura 61...



Condições de análise: HPLC/UV-vis com coluna Phenomenex C_{18} (0,46 cm x 25 cm; 5 µm), modo de eluição gradiente 20-95% acetonitrila e água *Milli-Q* em 55 min, com vazão de 1 mL min^{-1}. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 220 nm.

As concentrações finais de Fipronil presentes nas amostras das reações das bactérias foram medidas por HPLC/UV-vis, ao se compararem as áreas dos picos com a curva de calibração, sendo encontradas na Tabela 15. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A porcentagem de recuperação do Fipronil das reações de controle abiótico também é mostrada na Tabela 15.

Tabela 15. Concentração final do pesticida Fipronil determinado por HPLC/UV-vis, empregando as bactérias isoladas da cultura da laranja. Condições de reação: 10 mg L^{-1} de Fipronil, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reações em triplicata.

Bactéria	Concentração final de Fipronil (mg L^{-1})*	Porcentagem de biodegradação da FP[a] (%)	Porcentagem de recuperação da FP[a] nos CA[b] (%)
B. amyloliquefaciens (RFD1C)	0,7 ± 0,4	93	95
B. megaterium (RF1C)	2,1 ± 0,4	79	98
B. safensis/ B. pumilus (2RF1C)	4,9 ± 0,03	51	96
B. pseudomycoides (2RF2C)	2,4 ± 0,2	76	98
B. aryabhattai/ Bacillus sp. (2RF3C)	0,9 ± 0,3	91	98
B. pseudomycoides (3RF2C)	3,9 ± 0,9	61	98
B. pseudomycoides (4RF1C)	2,9 ± 0,9	71	97
B. pseudomycoides (4RF2C)	3,9 ± 0,3	61	95

[a]FP = Fipronil
[b]CA = Controle abiótico da reação para cada triplicata. Reação na ausência de bactéria.
*Valor médio das triplicatas

Analisando-se os dados da Tabela 15 foi possível observar que as bactérias *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) e *B. aryabhattai/ Bacillus* sp. (2RF3C) apresentaram a menor concentração de Fipronil em 5 dias de reação, ou seja, foram os microrganismos responsáveis pelo maior consumo do pesticida em meio líquido. Em porcentagem, tais valores foram de 93 e 91% de biodegradação ou biotransformação obtidos pelas bactérias *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) e *B. aryabhattai/ Bacillus* sp. (2RF3C) sobre o Fipronil, respectivamente.

As bactérias identificadas como *B. pseudomycoides* apresentaram concentrações que variaram entre 2,4 e 3,9 mg L^{-1}. A bactéria *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) apresentou a maior concentração de Fipronil 4,9 ± 0,03 mg L^{-1} depois do período reacional em meio líquido, ou seja, foi o microrganismo com menor porcentagem de biodegradação do pesticida Fipronil com 51%. A bactéria *B. megaterium* (RF1C) apresentou um valor intermediário de concentração final do pesticida, com uma porcentagem de 79% de biodegradação do Fipronil (Tabela 15) quando comparada com as demais bactérias.

O método de extração e recuperação foi eficiente, pois a porcentagem em todos os casos de Fipronil foi igual ou superior a 95%.

4.15 Determinação da massa celular das bactérias do gênero *Bacillus* das reações com o Fipronil em 5 dias de reação

Após o procedimento de extração, a massa celular bacteriana que foi separada do meio líquido por centrifugação, foi seca à temperatura ambiente e então foi determinada

por gravimetria para todas as bactérias.

A Tabela 16 mostra os valores obtidos das massas de bactérias das reações em triplicata e do *controle biótico* (indicado como CB) para cada bactéria empregada no experimento de biodegradação do Fipronil.

Tabela 16. Massa celular bacteriana seca obtida nos experimentos de biodegradação do Fipronil em meio líquido após a extração.

Bactérias	Massa celular bacteriana seca (g)	
	Reação*	CB*
B. amyloliquefaciens (RFD1C)	0,17 ± 0,1	1,0
B. megaterium (RF1C)	0,10 ± 0,03	1,1
B. safensis/ B. pumilus (2RF1C)	0,26 ± 0,11	1,0
B. pseudomycoides (2RF2C)	0,37 ± 0,17	1,3
B. aryabhattai/ Bacillus sp. (2RF3C)	0,13 ± 0,03	1,4
B. pseudomycoides (3RF2C)	0,42 ± 0,16	1,2
B. pseudomycoides (4RF1C)	0,47 ± 0,05	1,0
B. pseudomycoides (4RF2C)	0,12 ± 0,004	1,5

*Corresponde à reação entre a bactéria utilizada e o Fipronil (10 mg L^{-1}).
[a]CB = Controle biótico da reação para cada triplicata. Reação na ausência de Fipronil.

Na Tabela 16 é possível observar que a massa bacteriana seca das reações com o Fipronil apresentaram valores abaixo dos controles bióticos em 5 dias de reação. A bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) apresentou a maior média de valor de massa bacteriana seca (0,47 g) enquanto a bactéria *B. pseudomycoides* (RF1C) apresentou o menor valor com 0,10 g de massa bacteriana seca.

A bactéria *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) foi a que melhor biodegradou o Fipronil (93% de biodegradação) e apresentou uma média de massa bacteriana seca de 0,17 g. Já a bactéria *Bacillus safensis/ Bacillus pumilus* (2RF1C) biodegradou 51% do Fipronil em 5 dias de reação e apresentou uma massa bacteriana de 0,26 g.

Assim, concluiu-se que não houve uma relação entre a quantidade de massa bacteriana seca e a capacidade de biodegradação do Fipronil pelas bactérias empregadas neste estudo. Contudo, a presença do Fipronil durante o crescimento certamente influenciou na população microbiana, uma vez que no controle biótico a massa seca obtida foi superior em todos os casos.

Como é de conhecimento, o Fipronil é uma substância tóxica e certamente afeta o crescimento microbiano. Inclusive, como foi mencionado anteriormente (Seção 4.13), nenhuma das bactérias cresceu em meio sólido quando foram cultivadas na concentração de 20 e 30 mg L^{-1} de Fipronil, possivelmente devido à sua elevada toxicidade.

É interessante se observar ainda que as massas bacterianas obtidas das reações entre as bactérias e a Bifentrina foi maior do que as massas bacterianas obtidas das reações com o Fipronil, inclusive a concentração da Bifentrina empregada foi maior que a concentração do Fipronil. Tanto a Bifentrina quanto o Fipronil possuem toxicidade Classe II, no qual são produtos classificados como altamente tóxicos (ANVISA[a], 2019; ANVISA[b], 2019).

4.16 Biodegradação do Fipronil pelas bactérias *Bacillus amyloliquefaciens* (RFD1C) e *Bacillus aryabhattai*/ *Bacillus* sp. (2RF3C)

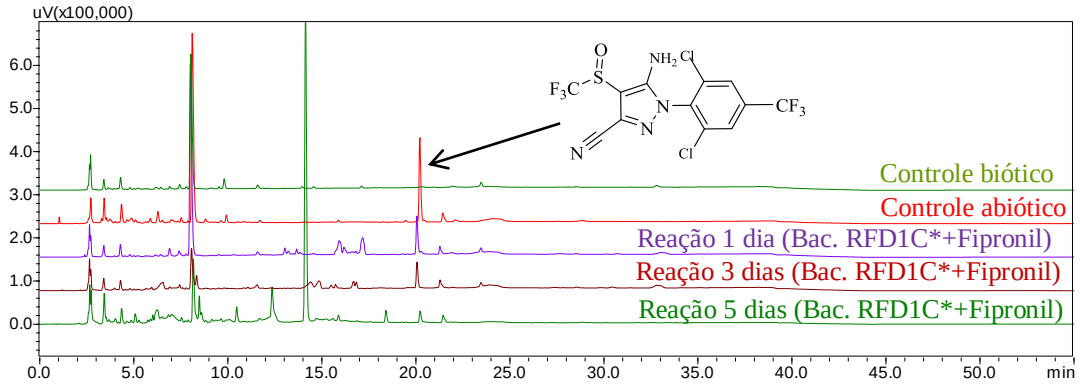
Foi realizado um experimento para avaliar o consumo/ biotransformação do Fipronil ao longo de 5 dias de reação foi realizado (Seção 3.14) com as bactérias que apresentaram o maior percentual de consumo/ biotransformação do pesticida (Tabela 15) neste estudo: *Bacillus amyloliquefaciens* (RFD1C) e *Bacillus aryabhattai*/ *Bacillus* sp. (2RF3C).

O intervalo de tempo das reações foi de 1, 3 e 5 dias. Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 17. Foi possível se observar que, com apenas 1 dia de reação, 70% do Fipronil foi consumido pela bactéria *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) enquanto que a bactéria *B. aryabhattai*/ *Bacillus* sp. (2RF3C) consumiu apenas 22%. As Figuras 62 e 63 mostram os cromatogramas das análises obtidas por HPLC/UV-vis das reações com as bactérias *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) e *B. aryabhattai*/ *Bacillus* sp. (2RF3C), respectivamente.

Tabela 17. Determinação da concentração de Fipronil no período de 1, 3 e 5 dias empregando as bactérias *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) e *B. aryabhattai/ Bacillus* sp. (2RF3C). Condições de reação: 10 mg L^{-1} de Fipronil, 130 rpm, 32 ºC, reações em triplicata.

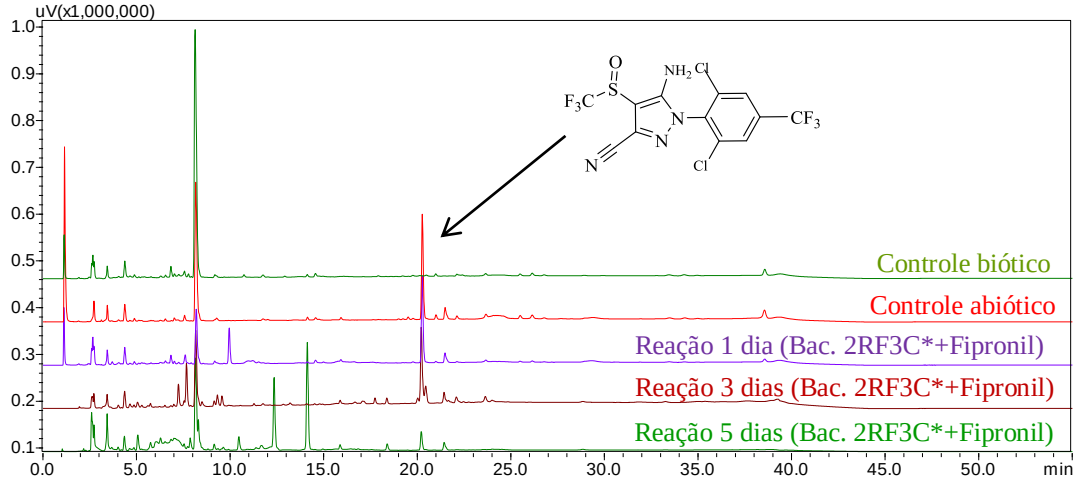
	Concentração de Fipronil (mg L^{-1})					
Bactéria	1 dia	Biod.*(%)	3 dias	Biod.*(%)	5 dias	Biod.*(%)
B. amyloliquefaciens (RFD1C)	3,0 ± 0,03	70	2,0 ± 2,0	80	0,7 ± 0,4	93
B. aryabhattai/ *Bacillus* sp. (2RF3C)	7,8 ± 0,1	22	4,6 ± 0,2	54	0,9 ± 0,3	91

Figura 62. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação do Fipronil com a bactéria *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) no intervalo de 1, 3 e 5 dias. Condições de reação: 10 mg L^{-1} de Fipronil, 130 rpm, 32 ºC, reações em triplicata.



*Bac. RFD1C: *B. amyloliquefaciens*
Condições de análise: HPLC/UV-vis com coluna Phenomenex C_{18} (0,46 cm x 25 cm; 5 µm), modo de eluição gradiente 20-95% acetonitrila e água *Milli-Q* em 55 min, com vazão de 1 mL min^{-1}. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 220 nm.

Figura 63. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação do Fipronil com a bactéria *B. aryabhattai/ Bacillus* sp. (2RF3C) no intervalo de 1, 3 e 5 dias. Condições de reação: 130 rpm, 32 ºC, 10 mg L^{-1} de Fipronil.



*Bac. 2RF3C: *B. aryabhattai/ Bacillus* sp.
Condições de análise: HPLC/UV-vis com coluna Phenomenex C_{18} (0,46 cm x 25 cm; 5 µm), modo de eluição gradiente 20-95% acetonitrila e água *Milli-Q* em 55 min, com vazão de 1 mL min^{-1}. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 220 nm.

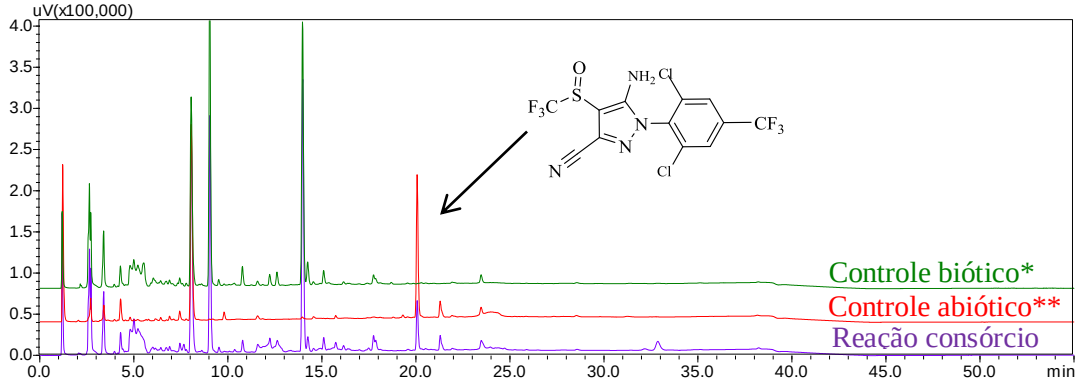
4.17 Consórcio contendo as bactérias do gênero *Bacillus* para a reação de biodegradação do pesticida Fipronil

Um consórcio microbiano empregado com todas as linhagens de bactérias utilizadas neste trabalho (Seção 3.15). O objetivo desse estudo foi verificar o comportamento de sinergismo com um maior número possível de bactérias que foram isoladas para promoverem a biodegradação do Fipronil.

O experimento mostrou que a porcentagem de biodegradação do Fipronil foi de 81% em 5 dias de reação. A Figura 64 mostra os cromatogramas das análises obtidas por HPLC/UV-vis. Essa porcentagem de biodegradação do pesticida Fipronil foi inferior às porcentagens obtidas para as bactérias *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) e *B. aryabhattai/ Bacillus* sp. (2RF3C) que apresentaram as maiores porcentagens de biodegradação, ou seja, 93% e 91%, respectivamente, como mostra a Tabela 18.

A porcentagem de recuperação do pesticida no controle abiótico foi de 95% e as bactérias isoladas das folhas da laranja foram eficientes no processo de biodegradação do Fipronil, pois em curto período de tempo apresentaram sempre elevadas porcentagens de biodegradação.

Figura 64. Cromatogramas obtidos por HPLC/UV-vis da reação em consórcio do Fipronil com todas as bactérias isoladas da cultura da laranja. Condições de reação: 10 mg L^{-1} de Fipronil, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC.



*Controle biótico: reação na ausência de Fipronil.
**Controle abiótico: reação na ausência das bactérias do consórcio.
Condições de análise: HPLC/UV-vis com coluna Phenomenex C_{18} (0,46 cm x 25 cm; 5 µm), modo de eluição gradiente 20-95% acetonitrila e água *Milli-Q* em 55 min, com vazão de 1 mL min^{-1}. Cromatogramas obtidos no comprimento de onda de 220 nm.

Tabela 18. Concentração final do pesticida Fipronil determinado por HPLC/UV-vis, empregando as bactérias isoladas da cultura da laranja. Condições de reação: 10 mg L^{-1} de Fipronil, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC, reações em triplicata.

Bactérias	Concentração final de FP[a] (mg L^{-1})*	Porcentagem de biodegradação do FP[a] (%)	Porcentagem de recuperação do FP[a] nos CA[b] (%)
B. safensis/ B. pumilus (2RF1C)	4,9 ± 0,03	51	96
B. pseudomycoides (3RF2C)	3,9 ± 0,9	61	98
B. pseudomycoides (4RF2C)	3,9 ± 0,3	61	95
B. pseudomycoides (4RF1C)	2,9 ± 0,9	71	97
B. pseudomycoides (2RF2C)	2,4 ± 0,2	76	98
B. megaterium (RF1C)	2,1 ± 0,4	79	98
Reação consórcio	1,9	81	95
B. aryabhattai/ Bacillus sp. (2RF3C)	0,9 ± 0,3	91	98
B. amyloliquefaciens (RFD1C)	0,7 ± 0,4	93	95

[a]FP = Fipronil
[b]CA = Controle abiótico da reação para cada triplicata. Reação na ausência de bactéria.
* Valor médio das triplicatas

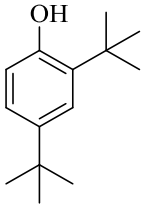
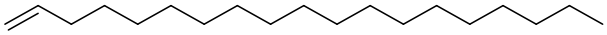
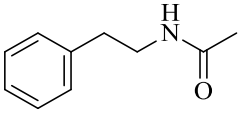
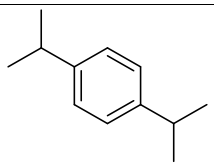
4.18 Identificação por CG-EM dos compostos produzidos pelas bactérias na presença e ausência dos pesticidas Bifentrina e Fipronil

Após o procedimento de extração, foram obtidos os extratos das reações de biodegradação da Bifentrina e do Fipronil com as bactérias *B. megaterium* (RF1C), *B. amyloliquefaciens* (RFD1C), B. *safensis/ B. pumilus* (2RF1C), *B. pseudomycoides* (2RF2C), *B. aryabhattai/ Bacillus* sp. (2RF3C), *B. pseudomycoides* (3RF2C), *B. pseudomycoides* (4RF1C) e *B. pseudomycoides* (4RF2C). Os extratos foram analisados por CG-EM para que possíveis produtos de biodegradação fossem identificados (Seção 3.22). As condições de análises estão descritas na Seção 3.22.

A Tabela 19 apresenta os compostos identificados nas amostras com as bactérias e a Bifentrina, os quais apresentaram similaridades iguais ou superiores a 90% com a biblioteca do equipamento – NIST107/ NIST05s. A Tabela 20 apresenta os principais compostos identificados nas amostras na ausência da Bifentrina, apresentando similaridade igual ou superior a 90% com a biblioteca do equipamento – NIST05/ NIST05s/ NIST21. Portanto, foram descritos os compostos com similaridades maiores ou superiores de 90% com a biblioteca.

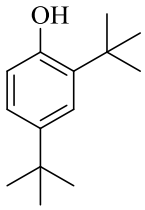
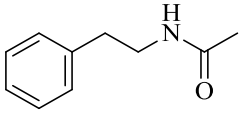
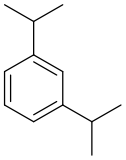
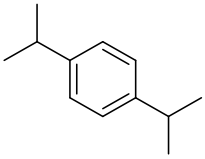
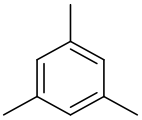
Para as bactérias *B. megaterium* (RF1C) e *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) não foi possível observar metabólitos nessas linhagens com similaridade igual ou superior à 90% para as reações na presença e na ausência da Bifentrina.

Tabela 19. Metabólitos identificados por análises de CG-EM (IE, 70 eV) das amostras com as bactérias na presença do pesticida Bifentrina.

Metabólitos	Biblioteca	Similaridade	Tempo de retenção (min)	Bactéria
 2,4-di-*terc*-butilfenol	NIST107.LIB	95%	14,4	*B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C), *B. aryabhattai/ Bacillus* sp. (2RF3C), *B. pseudomycoides* (3RF2C)
 1-nonadeceno	NIST05s.LIB	96%	19,9	*B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C), *B. aryabhattai/ Bacillus* sp. (2RF3C), *B. pseudomycoides* (3RF2C)
 *N*-fenetilacetamida	NIST05s.LIB	93%	15,3	*B. pseudomycoides* (2RF2C), *B. pseudomycoides* (4RF1C), *B. pseudomycoides* (4RF2C)
 1,4-diisopropilbenzeno	NIST05.LIB	92%	9,7	*B. pseudomycoides* (4RF1C)

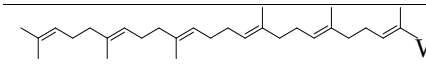
Condições de análise: As análises em CG-EM em aparelho Shimadzu/ CG-2010plus equipado com um injetor Shimadzu/ AOC-5000 e detector de massas (Shimadzu MS2010plus) com impacto eletrônico (IE, 70 eV) com coluna capilar de sílica fundida (DB-5MS 5%-fenil-95%-dimetil arileno siloxano (Agilent J&W Advanced 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno), 0,25 mm de espessura de filme). Gás hélio com vazão de 0,75 mL min^{-1} e pressão 46,5 kPa, temperatura do injetor de 250 ºC, temperatura inicial da coluna de 90 ºC e elevada a 280 ºC na taxa de 6 ºC min^{-1}, tempo total de análise de 40,17 min, injetando-se 1 µL com razão de divisão de fluxo 5,0. A temperatura da fonte de íon foi de 200 ºC e da interface de 270 ºC. Os íons monitorados de 4 a 40 min na faixa de *m/z* 40 a 500.

Tabela 20. Metabólitos identificados por análises de CG-EM (IE, 70 eV) das amostras com as bactérias na ausência do pesticida Bifentrina.

Metabólitos	Biblioteca	Similaridade	Tempo de retenção (min)	Bactéria
 2,4-di-*terc*-butilfenol	NIST05.LIB	95%	14,4	*B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C), *B. aryabhattai/ Bacillus* sp. (2RF3C), *B. pseudomycoides* (3RF2C)
1-nonadeceno	NIST05s.LIB	93%	19,9	*B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C), *B. aryabhattai/ Bacillus* sp. (2RF3C), *B. pseudomycoides* (3RF2C)
 *N*-fenetilacetamida	NIST05s.LIB	93%	15,3	*B. pseudomycoides* (2RF2C), *B. pseudomycoides* (4RF1C), *B. pseudomycoides* (4RF2C)
 1,3-diisopropilbenzeno	NIST05.LIB	90%	7,1	*B. pseudomycoides* (4RF1C)
 1,4-diisopropilbenzeno	NIST05.LIB	92%	7,7	*B. pseudomycoides* (4RF1C)
 1,3,5-trimetilbenzeno	NIST21.LIB	94%	4,3	*B. pseudomycoides* (4RF1C)
(*E*)-hexacos-9-eno	NIST05s.LIB	93%	26,4	*B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C), *B. aryabhattai/ Bacillus* sp. (2RF3C), *B. pseudomycoides* (3RF2C)
1-eicoseno	NIST05s.LIB	92%	29,2	*B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C), *B. aryabhattai/ Bacillus* sp. (2RF3C)

Continua...

...continuação da Tabela 20.

Metabólitos	Biblioteca	Similaridade	Tempo de retenção (min)	Bactéria
 esqualeno	WILEY8.LIB	90%	34,5	*B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C)

Condições de análise: As análises em CG-EM em aparelho Shimadzu/ CG-2010plus equipado com um injetor Shimadzu/ AOC-5000 e detector de massas (Shimadzu MS2010plus) com impacto eletrônico (IE, 70 eV) com coluna capilar de sílica fundida (DB-5MS 5%-fenil-95%-dimetil arileno siloxano (Agilent J&W Advanced 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno), 0,25 mm de espessura de filme). Gás hélio com vazão de 0,75 mL min^{-1} e pressão 46,5 kPa, temperatura do injetor de 250 ºC, temperatura inicial da coluna de 90 ºC e elevada a 280 ºC na taxa de 6 ºC min^{-1}, tempo total de análise de 40,17 min, injetando-se 1 µL com razão de divisão de fluxo 5,0. A temperatura da fonte de íon foi de 200 ºC e da interface de 270 ºC. Os íons monitorados de 4 a 40 min na faixa de *m/z* 40 a 500.

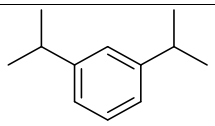
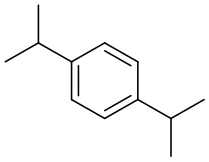
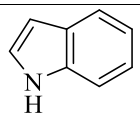
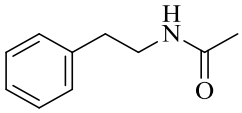
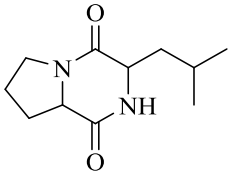
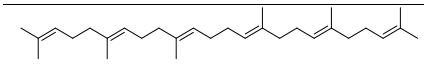
Todas as amostras das reações com as bactérias na presença e ausência do pesticida Fipronil foram analisadas por CG-EM. As condições de análises estão descritas na Seção 3.22. A Tabela 21 apresenta os principais metabólitos identificados nas amostras das reações das bactérias na presença do Fipronil. A Tabela 22 mostra os compostos identificados nas amostras das reações das bactérias na ausência do Fipronil. As similaridades dos compostos identificados foram iguais ou superiores a 90% com as bibliotecas NIST 05, NIST 05s, WILEY8 e NIST 107.

Tabela 21. Metabólitos identificados por análises de CG-EM (IE, 70 eV) das amostras com as bactérias na presença do pesticida Fipronil.

Metabólitos	Biblioteca	Similaridade	Tempo de retenção (min)	Bactéria
Esqualeno	NIST 05.LIB	91%	34,1	*B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C)/ *B. megaterium* (RF1C)
N-fenetilacetamida	NIST 05s.LIB	93%	15,2	*B. pseudomycoides* (4RF1C)/ *B. pseudomycoides* (4RF2C)
5-hexil-di-hidrofurano-2-(3*H*)-ona	NIST 05s.LIB	97%	14,0	*B. pseudomycoides* (4RF1C)
1,3-diisopropilbenzeno	NIST 05s.LIB	90%	7,4	*B. pseudomycoides* (4RF2C)
1,4-diisopropilbenzeno	NIST 05 s.LIB	91%	7,7	*B. pseudomycoides* (4RF1C)
1*H*-indol	WILEY8.LIB	90%	10,7	*B. pseudomycoides* (4RF2C)/ *B. amyloliquefaciens* (RFD1C)

Condições de análise: As análises em CG-EM em aparelho Shimadzu/ CG-2010plus equipado com um injetor Shimadzu/ AOC-5000 e detector de massas (Shimadzu MS2010plus) com impacto eletrônico (IE, 70 eV) com coluna capilar de sílica fundida (DB-5MS 5%-fenil-95%-dimetil arileno siloxano (Agilent J&W Advanced 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno), 0,25 mm de espessura de filme). Gás hélio com vazão de 0,75 mL min^{-1} e pressão 46,5 kPa, temperatura do injetor de 250 ºC, temperatura inicial da coluna de 90 ºC e elevada a 280 ºC na taxa de 6 ºC min^{-1}, tempo total de análise de 40,17 min, injetando-se 1 µL com razão de divisão de fluxo 5,0. A temperatura da fonte de íon foi de 200 ºC e da interface de 270 ºC. Os íons monitorados de 4 a 40 min na faixa de *m/z* 40 a 500.

Tabela 22. Metabólitos identificados por análises de CG-EM (IE, 70 eV) das amostras com as bactérias na ausência do pesticida Fipronil.

Metabólitos	Biblioteca	Similaridade	Tempo de retenção (min)	Bactéria
 1,3-diisopropilbenzeno	NIST 05s.LIB	91%	7,1	*B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C)
 1,4-diisopropilbenzeno	NIST 05s.LIB	93%	7,7	*B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C)/ *B. pseudomycoides* (4RF2C)
 1*H*-indol	WILEY8.LIB	95%	10,6	*B. amyloliquefaciens* (RFD1C)/ *B. pseudomycoides* (3RF2C)
 *N*-fenetilacetamida	NIST 05s.LIB	95%	16,9	*B. pseudomycoides* (3RF2C)/ *B. pseudomycoides* (4RF1C)/ *B. pseudomycoides* (4RF2C)
 Ciclo-(Pro-Leu)	NIST 107.LIB	90%	22,7	*B. pseudomycoides* (3RF2C)
 Esqualeno	NIST 05.LIB	91%	34,4	*B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C)

Condições de análise: As análises em CG-EM em aparelho Shimadzu/ CG-2010plus equipado com um injetor Shimadzu/ AOC-5000 e detector de massas (Shimadzu MS2010plus) com impacto eletrônico (IE, 70 eV) com coluna capilar de sílica fundida (DB-5MS 5%-fenil-95%-dimetil arileno siloxano (Agilent J&W Advanced 30 m x 0,25 mm de diâmetro interno), 0,25 mm de espessura de filme). Gás hélio com vazão de 0,75 mL min^{-1} e pressão 46,5 kPa, temperatura do injetor de 250 ºC, temperatura inicial da coluna de 90 ºC e elevada a 280 ºC na taxa de 6 ºC min^{-1}, tempo total de análise de 40,17 min, injetando-se 1 µL com razão de divisão de fluxo 5,0. A temperatura da fonte de íon foi de 200 ºC e da interface de 270 ºC. Os íons monitorados de 4 a 40 min na faixa de *m/z* 40 a 500.

Dentre os compostos identificados por CG-EM o metabólito 2,4-di-*terc*-butilfenol foi identificado nos extratos das reações de biodegradação das bactérias *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C), *B. aryabhattai*/ *Bacillus* sp. (2RF3C) e *B. pseudomycoides* (3RF2F) na presença e na ausência da Bifentrina.

Em um estudo recente, o metabólito 2,4-di-*terc*-butilfenol foi relatado na literatura no trabalho de Al-Samman e colaboradores (2019), no qual foram estudados o extrato aquoso e o extrato metanólico dos frutos da planta *Emblica officinalis* que é amplamente utilizada no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas. Neste estudo, o material vegetal seco foi submetido à extração com água e metanol (60 mL) e empregou-se a extração assistida por ultrassom (UAE) e os componentes dos extratos foram analisados por GC-MS/MS e ainda investigaram-se os efeitos *in vitro* contra estirpes bacterianas e fúngicas de tais componentes (AL-SAMMAN; KAHKASHAN; SIDDIQUE, 2019).

Na fase aquosa proveniente do extrato do fruto da *E. officinalis* foram identificados por GC/MS-MS os compostos 2,4-di-*terc*-butilfenol e heptasiloxano-1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-tetradecametil e na fase orgânica o composto fenol-3,5-bis-(1,1-dimetiletila) (AL-SAMMAN; KAHKASHAN; SIDDIQUE, 2019).

A atividade antibacteriana foi avaliada por ensaio de difusão em Agar pela técnica de poço e as bactérias foram inoculadas em meio de caldo de peptona (10 g), NaCl (10 g) e extrato de levedura (5 g), Agar (20 g) em 1.000 mL de água destilada, por 24 h e a 37 ºC. A Ciprofloxacina foi empregada como controle positivo com diferentes concentrações (25, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg mL^{-1}) e DMSO (2%) como controle negativo. As concentrações dos extratos aquoso e metanólico tanto para as atividades antibacterianas quanto para antifúngicas foram de 25, 50, 100, 250, 500 e 1.000 µg mL^{-1}. A zona de inibição foi determinada pela concentração na qual não houve crescimento visível no meio de cultura (AL-SAMMAN, KAHKASHAN, SIDDIQUE, 2019).

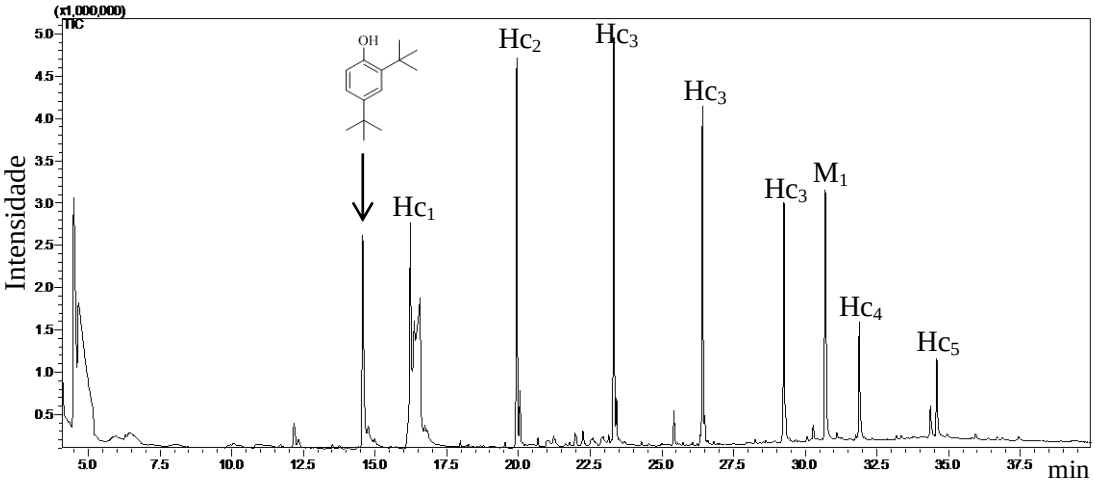
Para a atividade antifúngica, as culturas de fungos foram inoculadas em meio contendo sacarose (30,0 g mL^{-1}), $NaNO_3$ (2,0 g mL^{-1}), K_2HPO_4 (1,0 g mL^{-1}), $MgSO_4.7H_2O$ (0,5 mg mL^{-1}), KCl (0,5 mg mL^{-1}), $FeSO_4$ (0,01 mg mL^{-1}) e Agar (20 mg mL^{-1}), mantidas a 37 °C por 96 h. A Anfotericina foi empregada como controle positivo em diferentes concentrações (25, 50, 100, 250, 500 e 1.000 µg mL^{-1}) para comparar as atividades dos extratos nas mesmas concentrações e DMSO (2%) como controle negativo (AL-SAMMAN; KAHKASHAN; SIDDIQUE, 2019).

Como resultado, observou-se que na concentração de 50 µg mL^{-1} do extrato aquoso as bactérias *Salmonella typhi*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus pumilis* e *Bacillus polymyxa* apresentaram uma zona de inibição entre 4,1 e 8,2 mm e na concentração de 100 µg mL^{-1}. Os fungos *Neuspora crassa* e *Candida albicans* apresentaram uma zona de inibição de 2,1 ± 0,1 e 2,8 ± 0,2 mm, respectivamente. Já para o extrato metanólico na concentração de 50 µg mL^{-1}, as bactérias *P. mirabilis* e *B. pumilis* apresentaram uma zona de inibição de 6,2 ± 0,8 e 3,2 ± 0,6 mm, respectivamente e, na concentração de 250 µg mL^{-1}, os fungos *N. crassa* e *C. albicans* apresentaram uma zona de inibição de 2,5 ± 0,1 e 4,2 ± 0,1 mm, respectivamente (AL-SAMMAN; KAHKASHAN; SIDDIQUE, 2019).

Tais resultados mostram que os extratos do fruto da *E. officinalis* foram eficientes contra bactérias e fungos ainda que em baixas concentrações. Embora no extrato aquoso tenha sido identificado o metabólito 2,4-di-*terc*-butilfenol, vale ressaltar que o resultado da atividade foi atribuído a todos os componentes presentes no extrato.

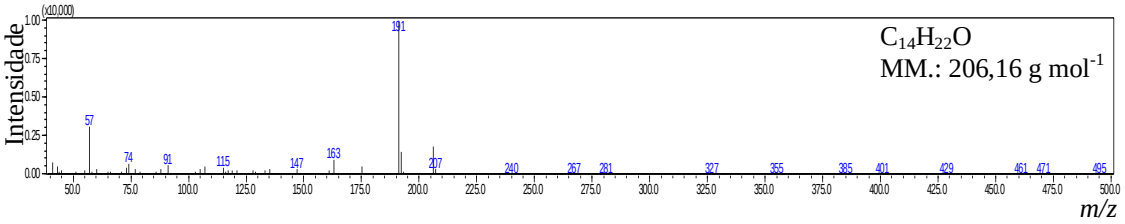
A Figura 65 mostra o cromatograma obtido por CG-EM do 2,4-di-*terc*-butilfenol e sua estrutura é destacada e a Figura 66 o seu respectivo espectro de massas. Na Figura 65 também estão mostrados hidrocarbonetos (representados por Hc) e um metabólito presente na amostra (representado por M_1) que mostraram similaridades entre 88 e 96% com as bibliotecas Nist05, Nist05s, Nist21, Nist107 e Wiley8. No Apêndice A encontram-se os códigos, estruturas, similaridades, tempos de retenção e seus respectivos espectros de massas.

Figura 65. Cromatograma obtido por CG-EM (IE, 70 eV) do extrato da reação da bactéria *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) na ausência da Bifentrina onde se identificou o metabólito 2,4-di-*terc*-butilfenol. Tempo de retenção: 14,4 min.



Descrição: Hc_1: 1-heptadeceno, Hc_2: 1-nonadeceno, Hc_3: 1-eicoseno, Hc_4: (*E*)-hexacos-9-eno, Hc_5: esqualeno, M_1: 2,4-bis(2-fenilpropan-2-il)fenol.

Figura 66. Espectro de massas obtido pelas análises das amostras por CG-EM para o metabólito 2,4-di-*terc*-butilfenol (IE, 70 eV).



O composto 1,3,5-trimetilbenzeno é um hidrocarboneto aromático e foi identificado no extrato da reação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) na ausência da Bifentrina. Este metabólito também já foi identificado em extrato de planta e fungo e possivelmente desempenha importante função tanto na planta quanto no fungo, como no trabalho de Nafis e colaboradores (2019) em que foi isolado de *Cannabis sativa*, uma planta medicinal encontrada no norte de Marrocos. A extração do óleo das folhas de *C. sativa* foi realizada por hidrodestilação durante 3 h. Obteve-se um rendimento de 2,7% de óleo essencial com base no material vegetal seco. A análise do óleo essencial foi feita por CG-EM (NAFIS *et al.*, 2019).

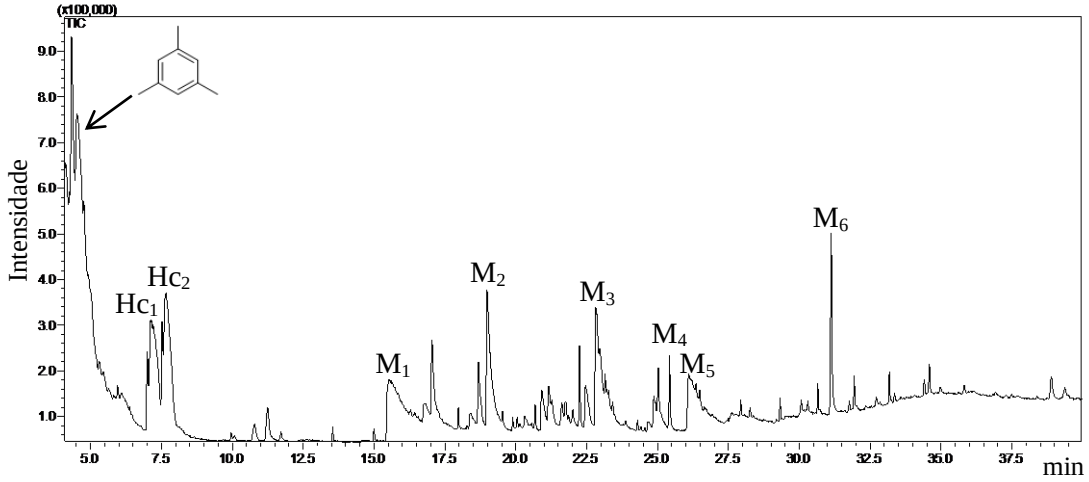
Em outro estudo, o 1,3,5-trimetilbenzeno foi identificado no extrato do fungo *Penicillium expansum* isolado de maçãs deterioradas. O fungo foi cultivado em 40 mL de meio caldo de dextrose de batata com 1% de fenilalanina, posteriormente um mililitro de suspensão de esporos (10^7 esporos mL^{-1}) foi inoculado em um frasco Erlenmeyer de 250 mL mantido sob agitação (180 rpm), a 25 ºC e em 16, 24 e 32 h de

cultivo em pH 5 e 9. Após o processo de extração, as análises dos compostos voláteis foram realizadas em CG-EM (KIM *et al*., 2019).

A Figura 67 mostra o cromatograma obtido na análise por CG-EM do composto 1,3,5-trimetilbenzeno proveniente do extrato da reação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) na ausência de Bifentrina e a Figura 68 mostra seu respectivo espectro de massas.

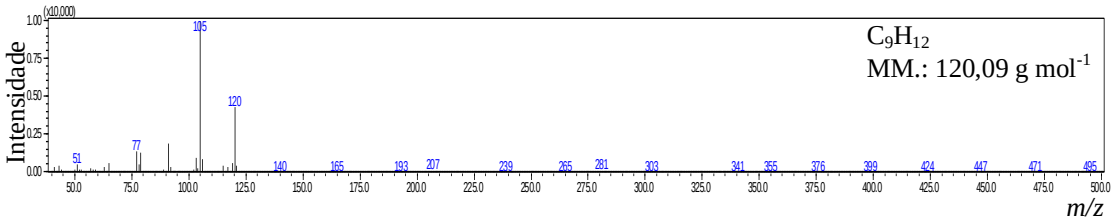
Na Figura 67 também estão mostrados hidrocarbonetos (representados por Hc) e metabólitos presentes na amostra (representados por M) que mostraram similaridades entre 81 e 91% com as bibliotecas Nist05, Nist05s e Wiley8. No Apêndice B encontram-se os códigos, estruturas, similaridades, tempos de retenção e seus respectivos espectros de massas.

Figura 67. Cromatograma obtido por CG-EM (IE, 70 eV) do extrato da reação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) na ausência da Bifentrina onde se identificou o metabólito 1,3,5-trimetilbenzeno. Tempo de retenção: 4,3 min.



Hc: hidrocarboneto e M: metabólito. Descrição: Hc_1: 1,3-diisopropilbenzeno, Hc_2: 1,4-diisopropilbenzeno, M_1: *N*-fenetilacetamida, M_2: butirato de fenetilo, M_3: ciclo-(Pro-Leu), M_4: estearato de metila, M_5: 2-(fenetilamino)-1-feniletan-1-ona, M_6: ácido 2-(((2-etil-hexil)oxi)carbonil)benzoico (derivado do ácido ftálico)

Figura 68. Espectro de massas obtido pelas análises das amostras por CG-EM para o metabólito 1,3,5-trimetilbenzeno (IE, 70 eV).

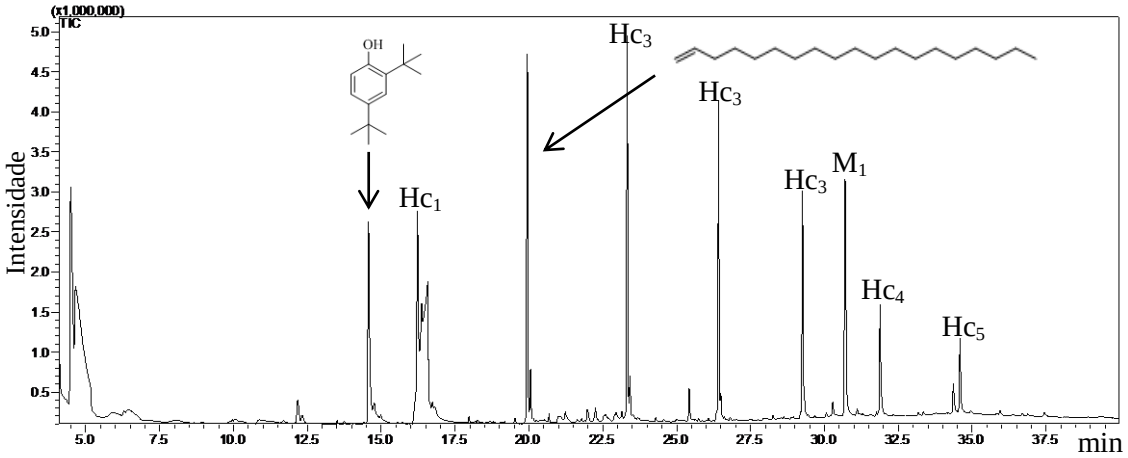


O composto 1-nonadeceno é um hidrocarboneto que já foi identificado em extrato dos frutos de *Xylopia emarginata*, planta de ocorrência em brejos e matas ciliares dos estados da Bahia, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Goiás e São Paulo (MOREIRA *et al.*, 2015).

Além disso, um estudo de degradação do pesticida Clorpirifós por actinomicetos do gênero *Streptomyces* isolados do solo de plantação de café na Índia indicou a presença do 1-nonadeceno no extrato proveniente da degradação. O experimento foi realizado utilizando-se o pesticida como única fonte de carbono variando sua concentração de $2x10^5$, $4x10^5$, $6x10^5$, $8x10^5$ e $1x10^6$ ppm em meio sólido de Agar, caseína e amido por 14 dias a 30 ºC. Posteriormente, foi realizada a degradação do pesticida Clorpirifós, no qual os actinomicetos foram inoculados em meio de cultura líquido *Broth* com 19 ppm de Clorpirifós, por 14 dias a 30 ºC. Realizou-se a extração com acetato de etila e então o extrato foi analisado por CG-EM. Os resultados demonstraram que 3 das 29 cepas de actinomicetos isoladas foram capazes de degradar o clorpirifós e a concentração final do pesticida foi de 3, 6 e 18 ppm nessas cepas. Além disso, nas análises do extrato obtido foram encontrados 12 metabólitos, dentre eles o 1-nonadeceno (SUNITHA; ONKARAPPA, 2018).

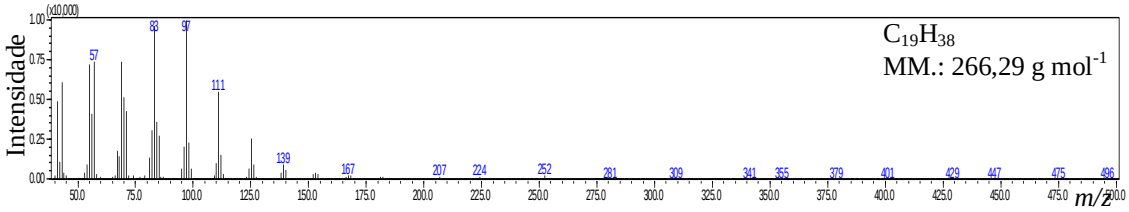
A Figura 69 mostra o cromatograma obtido na análise por CG-EM do composto 1-nonadeceno proveniente do extrato da reação da bactéria *B. safensis/ B. pumilus* na ausência de Bifentrina e a Figura 70 mostra seu respectivo espectro de massas. Na Figura 69 também estão mostrados hidrocarbonetos (representados por Hc) e um metabólito presente na amostra (representado por M_1) que mostraram similaridades entre 88 e 94% com as bibliotecas Nist05, Nist05s, Nist21, Nist107 e Wiley8. No Apêndice A encontram-se os códigos, estruturas, similaridades, tempos de retenção e seus respectivos espectros de massas.

Figura 69. Cromatograma obtido por CG-EM (IE, 70 eV) do extrato da reação da bactéria *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) na ausência da Bifentrina onde se identificou o metabólito 1-nonadeceno. Tempo de retenção: 19,9 min.



Hc: hidrocarboneto e M: metabólito. Hc: hidrocarboneto e M: metabólito. Descrição: Hc_1: 1-heptadeceno, Hc_3: 1-eicoseno, Hc_4: (*E*)-hexacos-9-eno, Hc_5: esqualeno, M_1: 2,4-bis(2-fenilpropan-2-il)fenol.

Figura 70. Espectro de massas obtido pelas análises das amostras por CG-EM para o metabólito 1-nonadeceno (IE, 70 eV).



Os hidrocarbonetos (*E*)-hexacos-9-eno e o 1-eicoseno foram encontrados nas amostras das reações das bactérias *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C), *B. aryabhattai/ Bacillus* sp. (2RF3C) e *B. pseudomycoides* (3RF2F) na ausência de Bifentrina.

Liu e colaboradores (2012) relataram a identificação do (*E*)-hexacos-9-eno em óleo essencial de flores de duas variedades de *Plumeria rubra*, planta conhecida como jasmim-manga. Os óleos essenciais extraídos por hidrodestilação assistida por micro-ondas foram analisados por cromatografia a gás com detector por ionização de chama e CG-EM. Além disso, os óleos extraídos apresentaram atividade antimicrobiana com as bactérias *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e o fungo *Aspergillus niger*, resultando em um halo de inibição entre 6,8 a 21,3 mm e valores mínimos de concentrações inibitórias entre 2,8 a 46,5 mg mL^{-1}.

O composto 1-eicoseno foi identificado em um estudo de Joshia e colaboradores (2013) no óleo essencial das folhas da planta *Swertia cordata*, coletadas na Índia. As folhas foram cortadas (5 kg) e passaram por um processo de destilação a vapor. O óleo

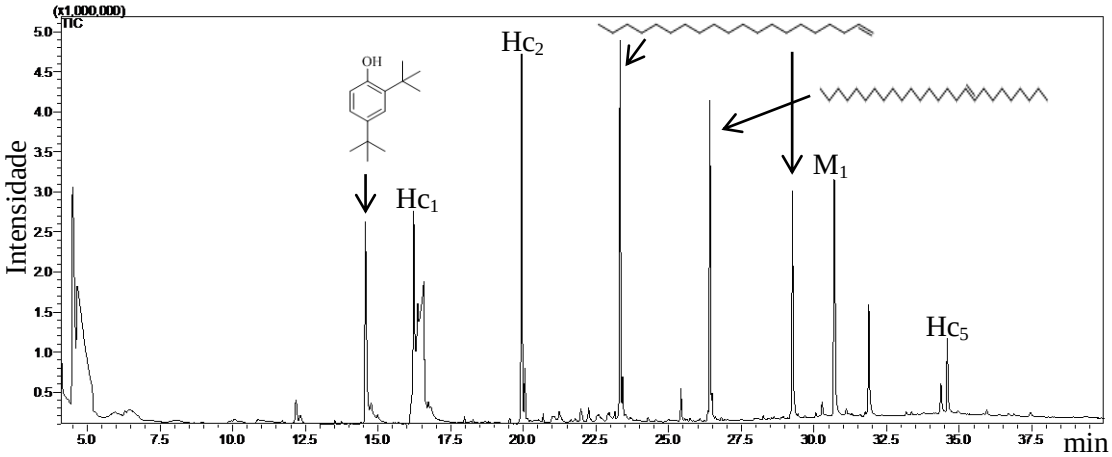
extraído foi analisado por CG-EM e o principal composto encontrado foi o ácido palmítico (8,34%). O 1-eicoseno representou 0,32% da composição do óleo. Além disso, o óleo extraído foi testado quanto à sua atividade antimicrobiana com as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus mycoides*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris* e os fungos *Candida albicans* e *Aspergillus niger* pelo método de difusão em disco, mostrando-se inibição significativa no crescimento de *B. mycoides* e *C. albicans* com um halo de inibição de 10 ± 0,6 e 8 ± 1,1 mm, respectivamente, numa concentração de 125 µg mL^{-1} de óleo extraído (JOSHIA *et al*., 2013).

É possível que o (*E*)-hexacos-9-eno e o 1-eicoseno, presentes nos extratos das reações das bactérias *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C), *B. aryabhattai*/ *Bacillus* sp. (2RF3C) e *B. pseudomycoides* (3RF2F) na ausência de Bifentrina, sejam responsáveis pela proteção contra outros microrganismos, podendo estar associados à interação dessas bactérias com a cultura de laranja.

A Figura 71 mostra o cromatograma obtido na análise por CG-EM dos compostos (*E*)-hexacos-9-eno e 1-eicoseno identificados nos extratos das reações das bactérias *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C), *B. aryabhattai*/ *Bacillus* sp. (2RF3C) e *B. pseudomycoides* (3RF2F) na ausência de Bifentrina. As Figuras 72 e 73 mostram os espectros de massas para os compostos (*E*)-hexacos-9-eno e 1-eicoseno, respectivamente.

Na Figura 71 também estão mostrados hidrocarbonetos (representados por Hc) e um metabólito presente na amostra (representado por M_1) que mostraram similaridades entre 88 e 94% com as bibliotecas Nist05, Nist05s, Nist21, Nist107 e Wiley8. No Apêndice A encontram-se os códigos, estruturas, similaridades, tempos de retenção e seus respectivos espectros de massas.

Figura 71. Cromatograma obtido por CG-EM (IE, 70 eV) do extrato da reação da bactéria *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) na ausência da Bifentrina onde se identificou os metabólitos (*E*)-hexacos-9-eno e 1-eicoseno. Tempo de retenção do (*E*)-hexacos-9-eno: 26,4 min. Tempo de retenção do 1-eicoseno: 23,3, 26,3 e 29,2 min.



Hc: hidrocarboneto e M: metabólito. Descrição: Hc_1: 1-heptadeceno, Hc_2: 1-nonadeceno, Hc_4: (*E*)-hexacos-9-eno, Hc_5: esqualeno, M_1: 2,4-bis(2-fenilpropan-2-il)fenol.

Figura 72. Espectro de massas obtido pelas análises das amostras por CG-EM para o metabólito (*E*)-hexacos-9-eno (IE, 70 eV).

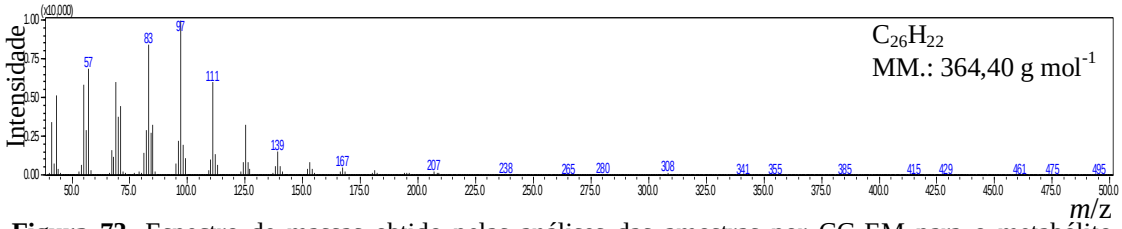
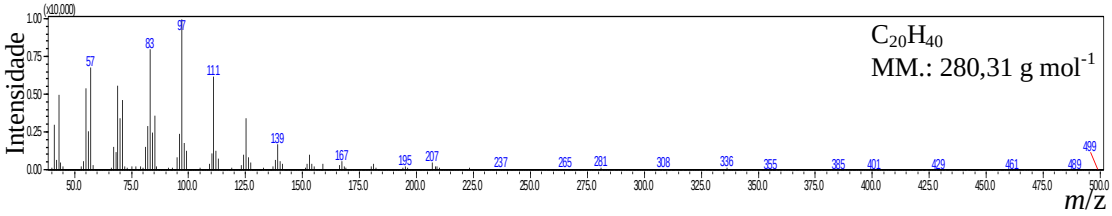


Figura 73. Espectro de massas obtido pelas análises das amostras por CG-EM para o metabólito 1-eicoseno (IE, 70 eV).

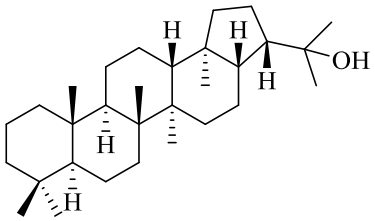


O esqualeno foi identificado nos extratos das bactérias *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) e *B. megaterium* (RF1C) que foram cultivadas na presença do pesticida Fipronil e no extrato da bactéria *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) cultivadas na ausência dos pesticidas Bifentrina e Fipronil. Em um trabalho de Benelli (2010) no qual foram analisados diferentes extratos de bagaço de laranja e de óleo comercial por CG-EM, identificou-se cinquenta e sete compostos, dentre eles o esqualeno (REDDY; COUVREUR, 2009; BENELLI, 2010).

Em bactérias o esqualeno é geralmente convertido em hopanóides pentacíclicos

como o hopan-22-ol (Figura 74). Os hopanóides são empregados para regular membranas lipídicas e reduzir a sua permeabilidade (DEWICK, 2002; DONK, 2016).

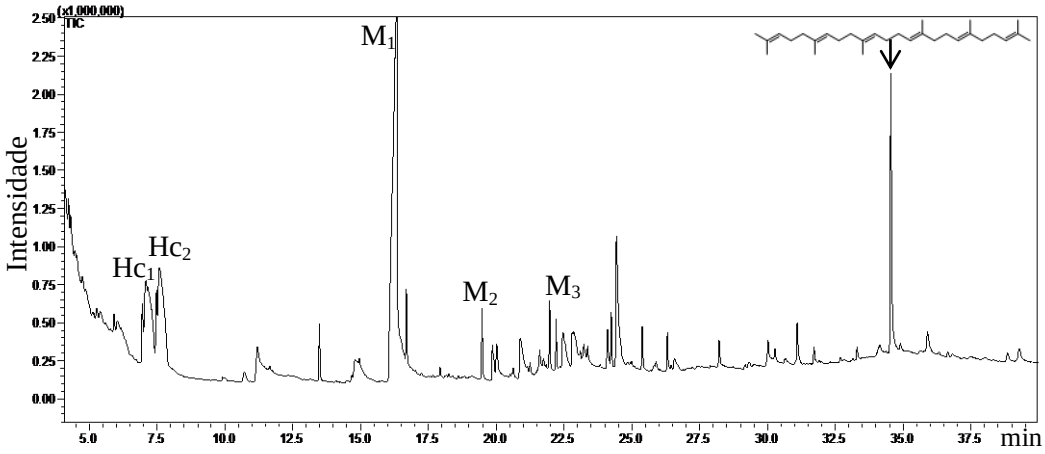
Figura 74. Estrutura do terpeno hopanóide, hopan-22-ol ($C_{30}H_{52}O$), encontrado em membranas lipídicas de bactérias.



Como mencionado, os microrganismos empregados neste trabalho foram isolados das folhas da cultura da laranja, dessa forma é possível que as bactérias *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) e *B. megaterium* (RF1C) tenham sido capazes de sintetizar o esqualeno para que posteriormente fosse biossintetizado em triterpenos, como os hopanóides. Assim, possivelmente pode existir uma associação envolvendo plantas e microrganismos via metabolismo secundário, produzindo compostos úteis às espécies envolvidas.

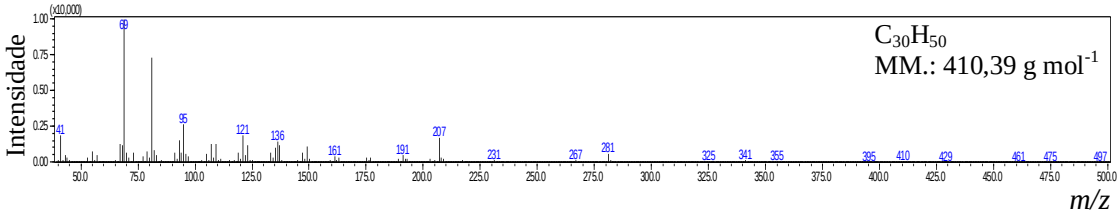
A Figura 75 mostra o cromatrograma obtido por CG-EM para o esqualeno e a Figura 76 seu respectivo espectro de massas. Na Figura 75 também estão mostrados hidrocarbonetos (representados por Hc) e metabólitos presentes na amostra (representados por M) que mostraram similaridades entre 73 e 92% com as bibliotecas Nist05 e Wiley8. No Apêndice C encontram-se os códigos, estruturas, similaridades, tempos de retenção e seus respectivos espectros de massas.

Figura 75. Cromatograma obtido por CG-EM (IE, 70 eV) do extrato da reação da bactéria *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) na presença do Fipronil onde se identificou o metabólito esqualeno. Tempo de retenção: 34,5 min.



Hc: hidrocarboneto e M: metabólito. Descrição: Hc_1: 1,3-diisopropilbenzeno, Hc_2: 1,4-diisopropilbenzeno, M_1: N^2, N^2, N^4, N^4-tetrametilpirimidina-2,4-diamina, M_2: estearato de metila, M_3: ciclo-(Pro-Leu).

Figura 76. Espectro de massas obtido pelas análises das amostras por CG-EM para o metabólito esqualeno (IE, 70 eV).



O composto *N*-fenetilacetamida foi detectado com similaridade acima de 90% com a biblioteca NIST 05s do equipamento nas análises na presença e na ausência do Fipronil, e mostrou-se presente nos microrganismos *B. pseudomycoides* (3RF2C), *B. pseudomycoides* (4RF1C) e *B. pseudomycoides* (4RF2C). Para as reações com a Bifentrina, a *N*-fenetilacetamida foi identificada nas análises na presença e na ausência da Bifentrina com as bactérias *B. pseudomycoides* (2RF2C), *B. pseudomycoides* (4RF1C) e *B. pseudomycoides* (4RF2C).

O cromatograma deste composto encontra-se na Figura 77 e seu respectivo espectro de massas na Figura 78. Na Figura 77 também estão mostrados hidrocarbonetos (representados por Hc) e metabólitos presentes na amostra (representados por M) que mostraram similaridades entre 69 e 92% com as bibliotecas Nist 05 e Wiley8. No Apêndice D encontram-se os códigos, estruturas, similaridades, tempos de retenção e seus respectivos espectros de massas.

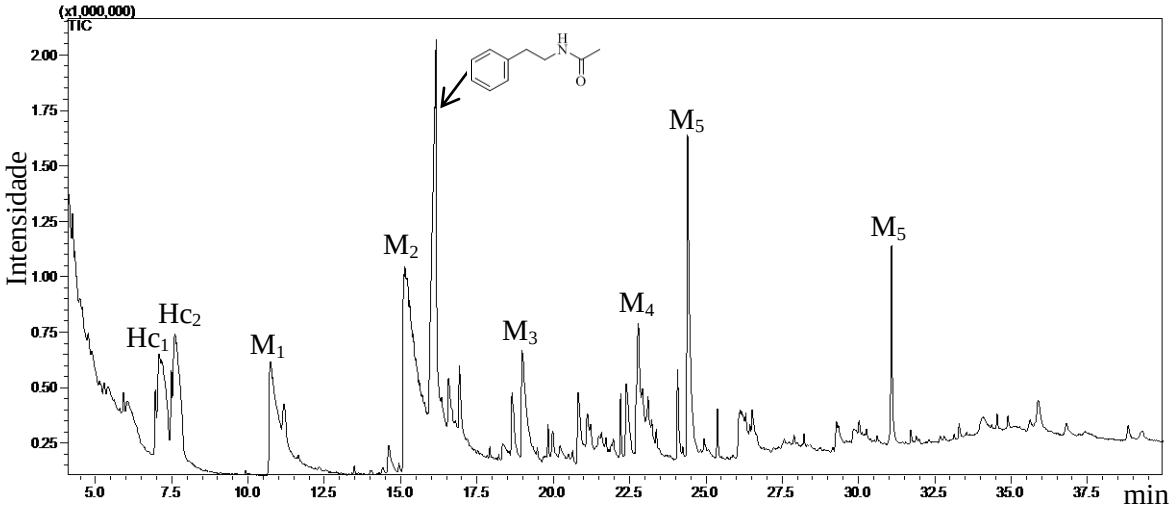
A *N*-fenetilacetamida também foi identificada em bactérias do gênero *Bacillus*

no estudo de Wen-ju e colaboradores (2008), no qual isolaram, identificam e fizeram a caracterização biológica de metabólitos secundários produzidos pelo microrganismo de ambiente marinho *Bacillus subtilis* (WEN-JU *et al.*, 2008).

Em outro estudo, Biasetto *et al.* (2019) estudaram o extrato bruto obtido do fungo endofítico *Schizophyllum commune* isolado de folhas saudáveis da árvore *Alchornea glandulosa*. O fungo *S. commune* foi inoculado em 52 frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 1,2 g de amido de batata, 6,0 g de dextrose e 300 mL de água *Milli-Q*. Então o fungo foi inoculado e incubado a 25 ± 2 ºC por 28 dias. As culturas foram combinadas, filtradas e extraídas com acetato de etila, o solvente foi evaporado produzindo 960 mg de extrato bruto (BIASETTO *et al*., 2019).

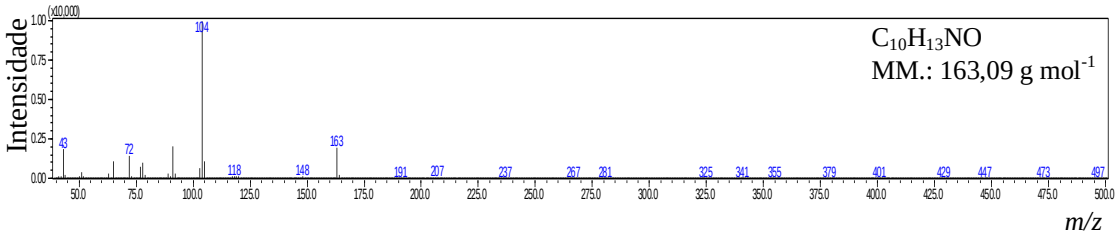
Dentre as substâncias identificadas e caracterizadas por espectrometria de massas, o metabólito *N*-fenetilacetamida apresentou atividades antifúngica e inibitória da acetilcolinesterase. Esta enzima é responsável pelo funcionamento das sinapses colinérgicas presentes no sistema nervoso central e periférico. Dessa forma, tais atividades biológicas mostram que a *N*-fenetilacetamida, assim como os outros compostos, apresentaram importantes funções na proteção da planta como também no mecanismo de defesa para os organismos que vivem associados à planta (BIASETTO *et al*., 2019).

Figura 77. Cromatograma obtido por CG-EM (IE, 70 eV) do extrato da reação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF2C) na presença do Fipronil onde se identificou o metabólito *N*-fenetilacetamida. Tempo de retenção: 16,9 min.



Hc: hidrocarboneto e M: metabólito. Descrição: Hc_1: 1,3-diisopropilbenzeno, Hc_2: 1,4-diisopropilbenzeno, M_1: 1H-indol, M_2: *N*-fenetilacetamida, M_3: *N*-fenetil pivalamida, M_4: ciclo-(Pro-Leu), M_5: ácido 2-(((2-etil-hexil)oxi)carbonil)benzoico (derivado do ácido ftálico).

Figura 78. Espectro de massas obtido pelas análises das amostras por CG-EM para o metabólito *N*-fenetilacetamida (IE, 70 eV).



O composto 5-hexil-di-hidrofurano-2-(3*H*)-ona foi identificado com similaridade de 97% na reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e o Fipronil.

Esse composto foi detectado no óleo essencial da *Achillea ageratum*, uma espécie de planta com flor amarela e que possui propriedades antissépticas e antitérmicas (PUERTA; SÁENZ; GARCIA, 1996).

Em um estudo realizado por Puerta, Sáenz e Garcia (1996) foram analisados por CG-EM os constituintes do óleo essencial da *Achillea ageratum* e a 5-hexil-di-hidrofurano-2-(3*H*)-ona apresentou 0,54% de sua composição total. Além disso, o óleo da planta foi empregado em ensaios de atividade antibacteriana com os microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium* e *Escherichia coli*. Os resultados mostraram que, quando se utilizaram 10 µL de óleo

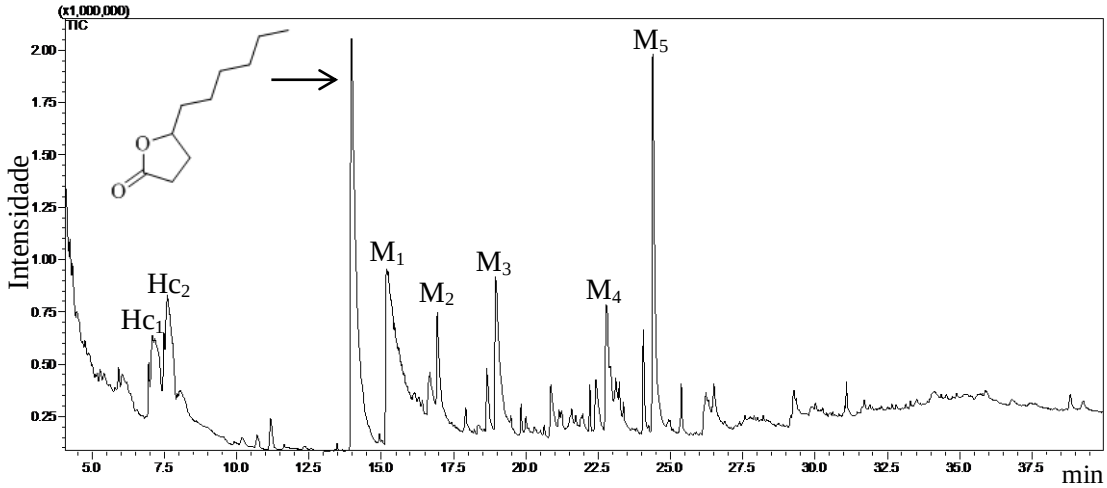
essencial, os microrganismos que apresentaram o maior halo de inibição foram *Bacillus subtilis* (13,0 ± 0,57 mm), *Bacillus cereus* (12,0 ± 0,06 mm), *Escherichia coli* (12,0 ± 0,57 mm), *Bacillus megaterium* (10,0 ± 0,05 mm) e *Staphylococcus aureus* (8,0 ± 0,05 mm) (PUERTA; SÁENZ; GARCIA, 1996).

Outro ensaio realizado por Puerta, Sáenz e Garcia (1996) foi o da concentração mínima inibitória, ou seja, a menor concentração de um produto químico responsável por limitar o crescimento de uma bactéria. Assim, os resultados demonstraram que todos os microrganismos (*S. aureus*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. megaterium* e *E. coli*) foram sensíveis às concentrações do óleo essencial da planta *Achillea ageratum*. Todos os microrganismos do gênero *Bacillus* foram inibidos por 2,5 mg mL^{-1} de óleo de *Achillea*, em seguida a *S. aureus* apresentou o valor de 5,0 mg mL^{-1} e a *E. coli* apresentou o maior valor de 8,0 mg mL^{-1} (PUERTA; SÁENZ; GARCIA, 1996).

Tais resultados demonstraram que o óleo de *Achillea ageratum* provavelmente é um bom agente para essas bactérias Gram-positivas (PUERTA; SÁENZ; GARCIA, 1996).

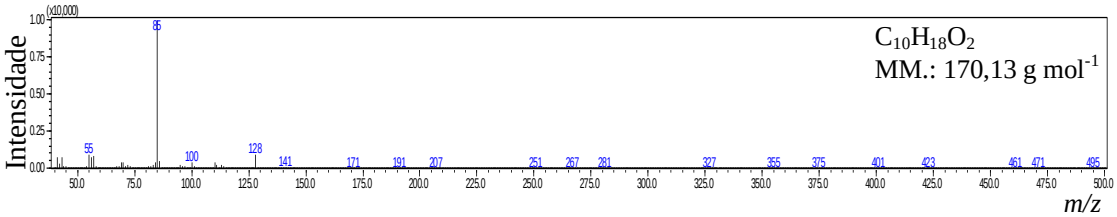
É interessante destacar que além de o composto 5-hexil-di-hidrofurano-2-(3*H*)-ona ser detectado também no presente trabalho com similaridade de 97% ele foi encontrado nos extratos das reações da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C). O cromatograma do metabólito 5-hexil-di-hidrofurano-2-(3*H*)-ona encontra-se na Figura 79 e seu respectivo espectro de massas encontra-se na Figura 80. Na Figura 79 também estão mostrados hidrocarbonetos (representados por Hc) e metabólitos presentes na amostra (representados por M) que mostraram similaridades entre 72 e 92% com as bibliotecas Nist05 e Nist05s. No Apêndice E encontram-se os códigos, estruturas, similaridades, tempos de retenção e seus respectivos espectros de massas.

Figura 79. Cromatograma obtido por CG-EM (IE, 70 eV) do extrato da reação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) na presença do Fipronil onde se identificou o metabólito 5-hexil-di-hidrofurano-2-(3*H*)-ona. Tempo de retenção: 14,0 min.



Hc: hidrocarboneto e M: metabólito. Descrição: Hc_1: 1,3-diisopropilbenzeno, Hc_2: 1,4-diisopropilbenzeno, M_1: *N*-fenetilacetamida, M_2: butirato de fenetilo, M_3: *N*-fenetil pivalamida, M_4: ciclo-(Pro-Leu), M_5: ácido 2-(((2-etil-hexil)oxi)carbonil)benzóico (derivado do ácido ftálico).

Figura 80. Espectro de massas obtido pelas análises das amostras por CG-EM para o metabólito 5-hexil-di-hidrofurano-2-(3H)-ona (IE, 70 eV).



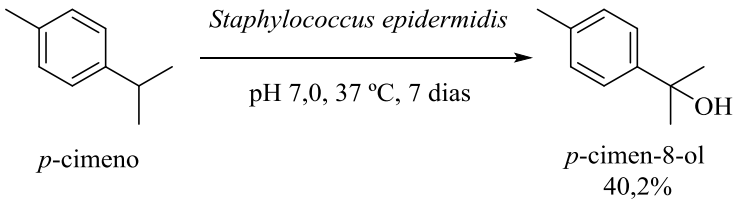
Os compostos 1,3-diisopropilbenzeno e 1,4-diisopropilbenzeno são hidrocarbonetos aromáticos que foram identificados nas amostras das bactérias *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C), *B. pseudomycoides* (4RF1C) e *B. pseudomycoides* (4RF2C) na presença e na ausência dos pesticidas Bifentrina e Fipronil. Hidrocarbonetos podem ser utilizados em transformações microbianas, pois favorecem o crescimento, além de serem muitas vezes intermediários para produzir outros produtos (JACQUES *et al*., 2007).

No trabalho de Javidnia e colaboradores (2009) foi feito um estudo de biotransformação microbiana de monoterpenos como α-pineno, β-pineno, mirceno e *p*-cimeno por sete bactérias (*Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella peneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella typhi*) e dois fungos (*Aspergillus niger* e *Candida albicans*).

Os resultados mostraram que alguns microrganismos foram capazes de transformar os monoterpenos em derivados oxigenados com bons rendimentos. O microrganismo *S. epidermidis* apresentou um rendimento de 40,2% na biotransformação do monoterpeno *p*-cimeno em *p*-cimen-8-ol, como mostra a Figura 81 (JAVIDNIA *et al.*, 2009).

A reação foi realizada em um frasco de 100 mL com 30 mL de meio de cultura líquido em pH 7,0 e adicionou-se 300 µL de uma solução contendo a bactéria *S. epidermidis* e 300 µL do monoterpeno *p*-cimeno. A reação foi mantida em temperatura controlada de 37 ºC no período de 7 dias. Decorrido o tempo foi feita uma extração líquido-líquido e foram realizadas análises por CG e CG-EM (JAVIDNIA *et al.*, 2009).

Figura 81. Biotransformação do monoterpeno *p*-cimeno por *Staphylococcus epidermidis*. Condições reacionais: pH 7,0, T = 37 ºC, 7 dias.

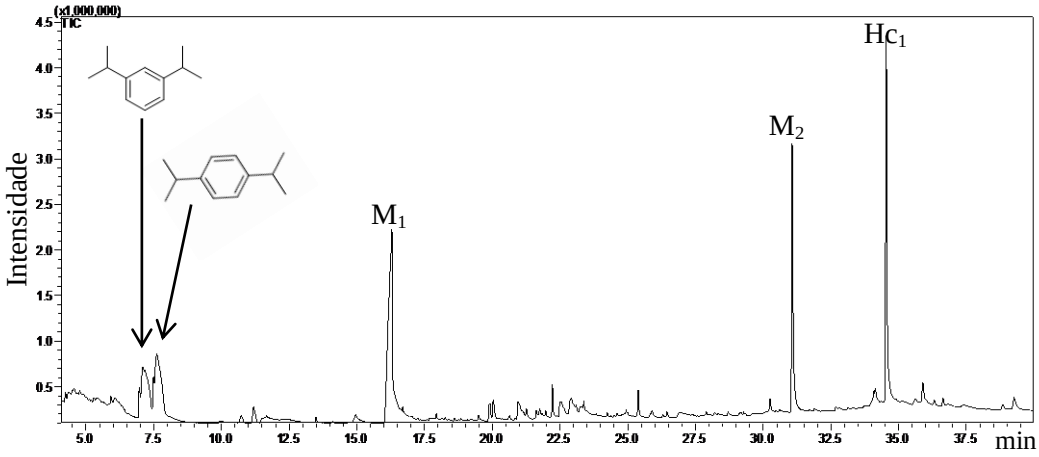


Fonte: JAVIDNIA *et al.*, 2009.

Dessa forma, é possível que os compostos 1,3-diisopropilbenzeno e 1,4-diisopropilbenzeno produzidos pelas bactérias *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C), *B. pseudomycoides* (4RF1C) e *B. pseudomycoides* (4RF2C) sejam empregados tanto como fonte de carbono para o crescimento microbiano, bem como, produtores de metabólitos como os terpenoides.

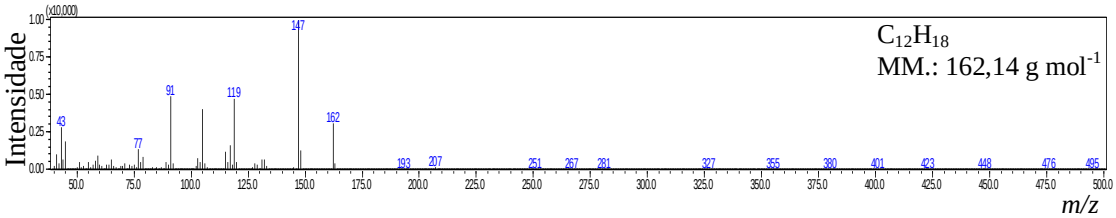
O cromatograma dos compostos identificados é mostrado na Figura 82 e o respectivo espectro de massas na Figura 83. Os dois metabólitos, por serem isômeros constitucionais apresentaram espectros de massas similares. Na Figura 82 também está mostrado um hidrocarboneto (representado por Hc_1) e metabólitos presentes na amostra (representados por M) que mostraram similaridades entre 73 e 92% com as bibliotecas Wiley 8, Nist05 e Nist05s. No Apêndice F encontram-se os códigos, estruturas, similaridades, tempos de retenção e seus respectivos espectros de massas.

Figura 82. Cromatograma obtido por CG-EM (IE, 70 eV) do extrato da reação da bactéria *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) na ausência do Fipronil onde se identificou os metabólitos 1,3-diisopropilbenzeno e 1,4-diisopropilbenzeno. Tempo de retenção do 1,3-diisoproprilbenzeno: 7,1 min. Tempo de retenção do 1,4-diisopropilbenzeno: 7,7 min.



Hc: hidrocarboneto e M: metabólito. Descrição: M_1: N^2, N^2, N^4, N^4-tetrametilpirimidina-2,4-diamina, M_2: ácido 2-(((2-etil-hexil)oxi)carbonil)benzóico, Hc_1: esqualeno.

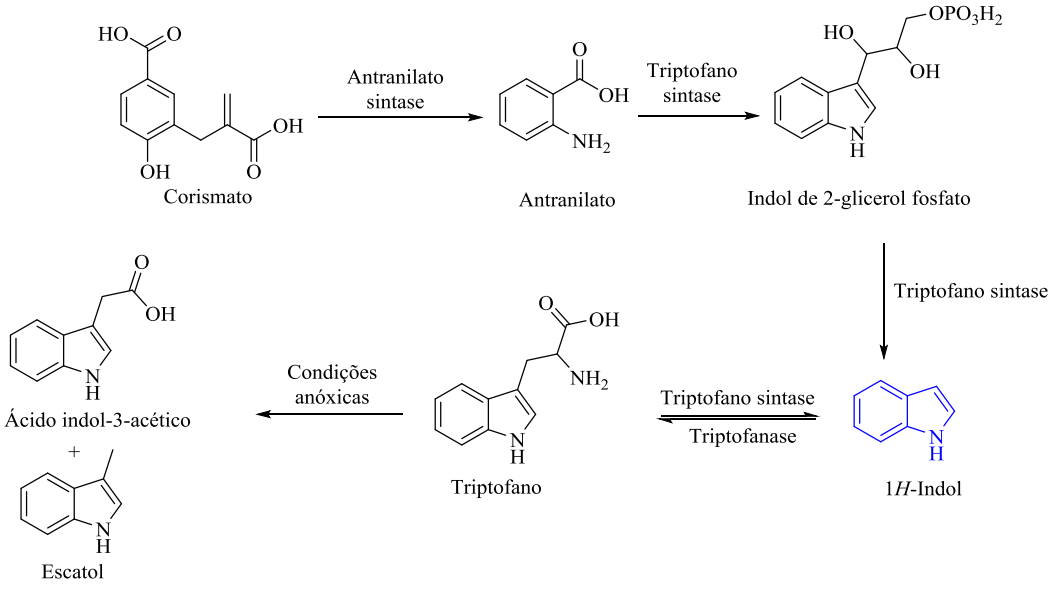
Figura 83. Espectro de massas obtido pelas análises das amostras por CG-EM para os metabólitos 1,3-diisopropilbenzeno e 1,4-diisopropilbenzeno (IE, 70 eV).



O 1*H*-indol é um composto aromático heterocíclico nitrogenado e apresenta atividades biológicas anticancerígena, antiviral, antimicrobiana, anti-inflamatória, anti-HIV e antidiabética (SHARMA *et al*., 2010). Além disso, tanto microrganismos quanto plantas podem produzir o indol na presença do fosfato de indol-3-glicerol e triptofano através da enzima triptofanase (MA; ZHANG; QU, 2018).

O corismato é convertido em antranilato pela ação da enzima antranilato sintase. Posteriormente o antranilato é convertido em indol de 2-glicerol fosfato que é convertido em 1*H*-indol pela ação da enzima triptofano sintase, que então é convertido em outros produtos como o ácido indol-3-acético e escatol. Esse processo é mostrado de forma simplificada na Figura 84 (MA; ZHANG; QU, 2018).

Figura 84. Resumo da síntese enzimática do 1*H*-indol em bactérias.



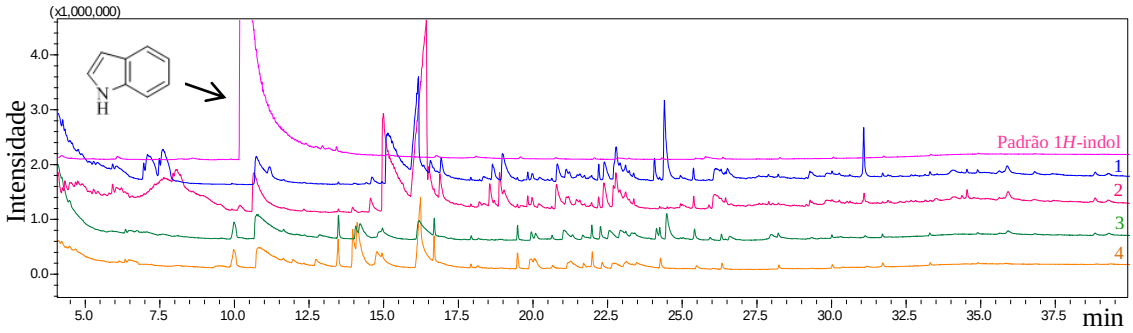
Fonte: MA, ZHANG, QU, 2018.

Além de ser encontrado em bactérias, o 1*H*-indol também está presente em muitas plantas como o algodão e o milho, podendo ser utilizado para a proteção contra insetos (MA; ZHANG; QU, 2018). Assim, é possível que o 1*H*-indol seja proveniente do próprio metabolismo dos microrganismos.

Por meio das análises de CG-EM foi verificado que o 1-*H*-indol foi identificado nas amostras com as bactérias *B. pseudomycoides* (4RF2C) e *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) na presença do Fipronil e nas amostras com as bactérias *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) e *B. pseudomycoides* (3RF2C) na ausência do pesticida.

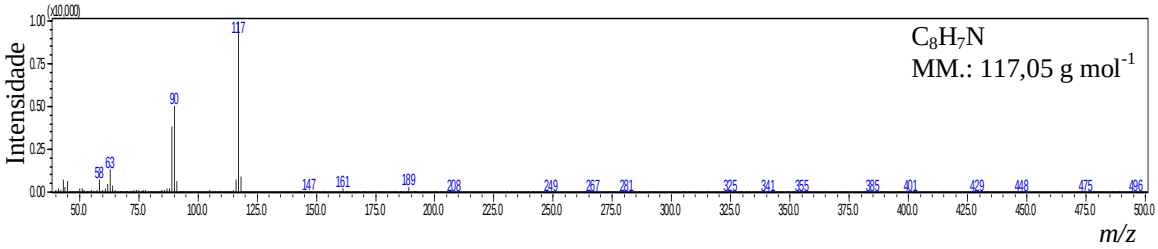
O composto 1*H*-indol foi identificado nas amostras em que sua porcentagem de similaridade com a biblioteca WILEY8 foi igual ou superior a 90%. Uma amostra do padrão de 1*H*-indol foi analisado por CG-EM e confirmou-se pelo espectro de massas a presença do composto produzido pelas bactérias descritas (Figuras 85 e 86).

Figura 85. Comparação do composto padrão 1*H*-indol com as amostras das reações das bactérias *B. pseudomycoides* (3RF2C), *B. pseudomycoides* (4RF2C) e *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) na presença e ausência do pesticida Fipronil. Tempo de retenção do 1*H*-indol: 10,7 min.



Linha 1: Reação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF2C).
Linha 2: controle biótico da reação da bactéria *B. pseudomycoides* (3RF2C)
Linha 3: Reação da bactéria *B. amyloliquefaciens* (RFD1C).
Linha 4: controle biótico da reação da bactéria *B. amyloliquefaciens* (RFD1C). Reação na ausência de Fipronil.

Figura 86. Espectro de massas obtido pelas análises das amostras por CG-EM para o metabólito 1*H*-indol (IE, 70 eV).



A ciclo-(Pro-Leu) foi encontrada na análise da reação na ausência do pesticida Fipronil e compõe a classe de compostos da 2,5-dicetopiperazina. A 2,5-dicetopiperazina é um dipeptídeo cíclico obtido a partir da condensação de dois aminoácidos, sendo produzida por inúmeros organismos, como as bactérias. As bactérias possuem um mecanismo de comunicação conhecido como *quórum-sensing* (QS), no qual emprega moléculas para regular genes específicos. A 2,5-dicetopiperazina é uma das moléculas da comunicação bacteriana via QS (DEWICK, 2002).

Muitos estudos na literatura relataram a identificação da ciclo-(Pro-Leu) em bactérias. Chen e colaboradores (2018) identificaram a ciclo-(Pro-Leu) em um extrato de *Bacillus coagulans* que foi isolada do peixe corvina amarela (*Pseudosciaena crocea*). O microrganismo *B. coagulans* foi incubado por 3 dias em um agitador rotativo a 37 ºC para que 30 L de caldo de fermentação fossem obtidos. Em seguida o caldo foi filtrado, concentrado e extraído com acetato de etila e *n*-butanol. Posteriormente, foi feita uma purificação do extrato por cromatografia em coluna com sílica gel, Sephadex LH-20 e

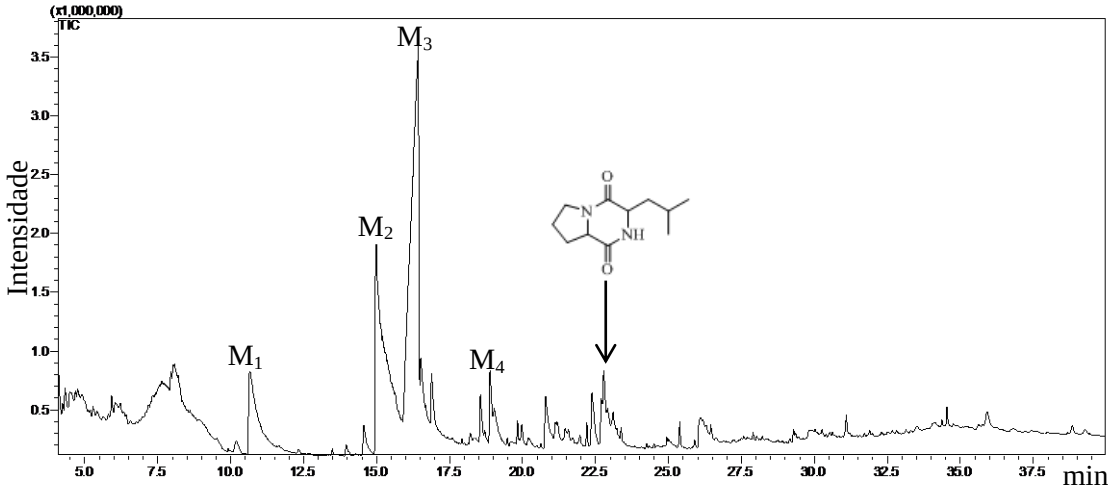
HPLC preparativa no qual foram produzidos 12 compostos, dentre eles a ciclo-(Pro-Leu) (CHEN *et al.*, 2018).

Em outro estudo, Wang e colaboradores (2016) isolaram a ciclo-(Pro-Leu) do microrganismo *B. amyloliquefaciens*, além das 2,5-dicetopiperazinas ciclo-(Ala-Val), ciclo-(Pro-Val) e ciclo-(Pro-Fen). Através deste estudo verificou-se que as 2,5-dicetopiperazinas inibiram a formação de biofilmes, além de reduzir a produção de polissacarídeos, proteínas, DNA, etc.

Neste estudo foram empregados 20 L de cultura da bacteria *B. amyloliquefaciens* que foram extraídos com acetato de etila e acidificado (5%). O extrato foi concentrado e ressuspenso em 50 mL de metanol e *n*-butanol. Empregou-se a técnica de cromatografia em coluna com sílica gel, obtendo-se diferentes frações. Posteriormente as estruturas dos compostos foram identificadas por RMN e CG-EM (WANG *et al.*, 2016).

A Figura 87 mostra o cromatograma da ciclo-(Pro-Leu) e a Figura 88 seu respectivo espectro de massas. Na Figura 87 também estão mostrados metabólitos presentes na amostra (representados por M) que mostraram similaridades entre 70 e 93% com as bibliotecas Wiley 8, Nist 107 e Nist05s. No Apêndice G encontram-se os códigos, estruturas, similaridades, tempos de retenção e seus respectivos espectros de massas. Uma possível proposta de fragmentação da ciclo-(Pro-Leu) é mostrada na Figura 89, mostrando os íons obtidos no espectro de massas (BENÍTEZ, COLMENARES, MONTOYA, 2012).

Figura 87. Cromatograma obtido por CG-EM (IE, 70 eV) do extrato da reação da bactéria *B. pseudomycoides* (3RF2C) na ausência do Fipronil onde se identificou o metabólito ciclo-(Pro-Leu). Tempo de retenção: 22,7 min.



Hc: hidrocarboneto e M: metabólito. Descrição: M_1: 1*H*-indol, M_2: *N*-fenetilacetamida, M_3: 3-metóxi-2,5,6-trimetilfenol, M_4: *N*-fenetil pivalamida.

Figura 88. Espectro de massas da ciclo-(Pro-Leu) (IE, 70 eV).

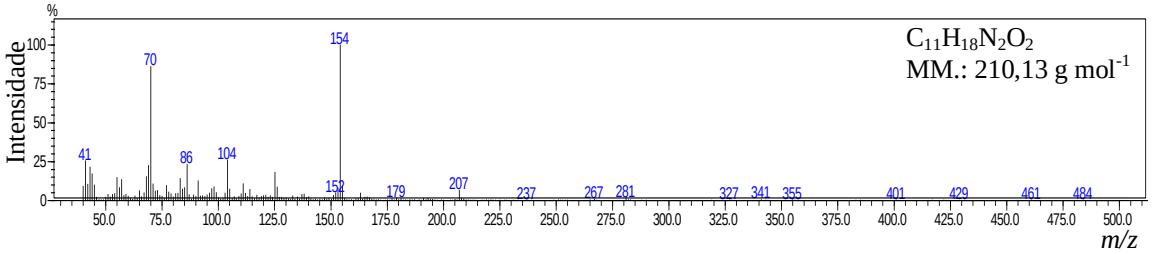
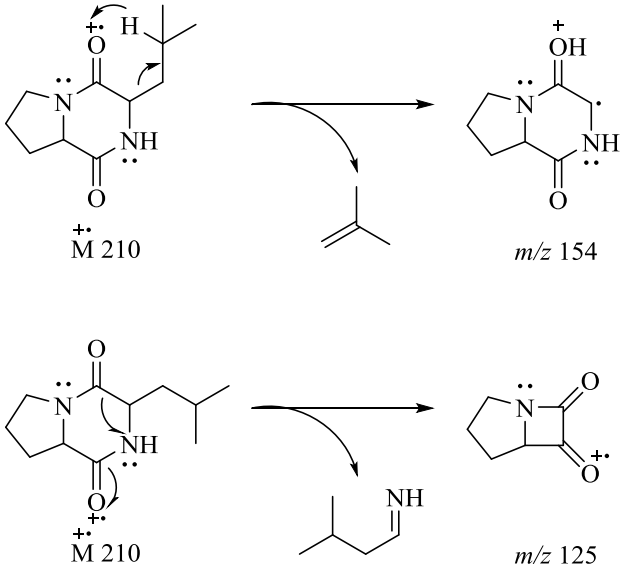


Figura 89. Proposta de fragmentação da ciclo-(Pro-Leu) (IE, 70 eV).



Fonte: BENÍTEZ, COLMENARES, MONTOYA, 2012.

4.19 Compostos identificados por cromatógrafo líquido de ultra performance acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução (UPLC-HRMS)

Devido às dificuldades de se identificar possíveis produtos de biodegradação da Bifentrina e Fipronil por HPLC/UV-vis e CG-EM, realizaram-se as análises das amostras por UPLC-HRMS.

Foi possível encontrar um produto de biotransformação do Fipronil. Analisou-se a amostra da reação com a bactéria *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) com a concentração de 10 mg L^{-1} do pesticida, na qual foi mantida por 5 dias a 130 rpm e a 32 ºC. Verificou-se uma biodegradação de 93% do Fipronil. A análise realizada foi no modo positivo [M-H^+] onde o produto de biotransformação do Fipronil identificado foi o composto Fipronil-sulfona ($C_{12}H_4C_{l2}F_6N_4O_2S$ $[M+H]^+$: 452,940896 Da).

A Figura 90 mostra o cromatograma da reação e a Figura 91 mostra o espectro de íons totais da análise. A Figura 92 mostra os espectros de massas comparando-se o espectro experimental com o teórico, sendo a intensidade do sinal de $1{,}95 \times 10^6$ e um desvio de aproximadamente 6 ppm do valor da massa teórica.

Figura 90. Cromatograma obtido por UPLC-HRMS da reação do Fipronil com a bactéria *B. amyloliquefaciens* (RFD1C). Condições de reação: 10 mg L^{-1} de Fipronil, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC.

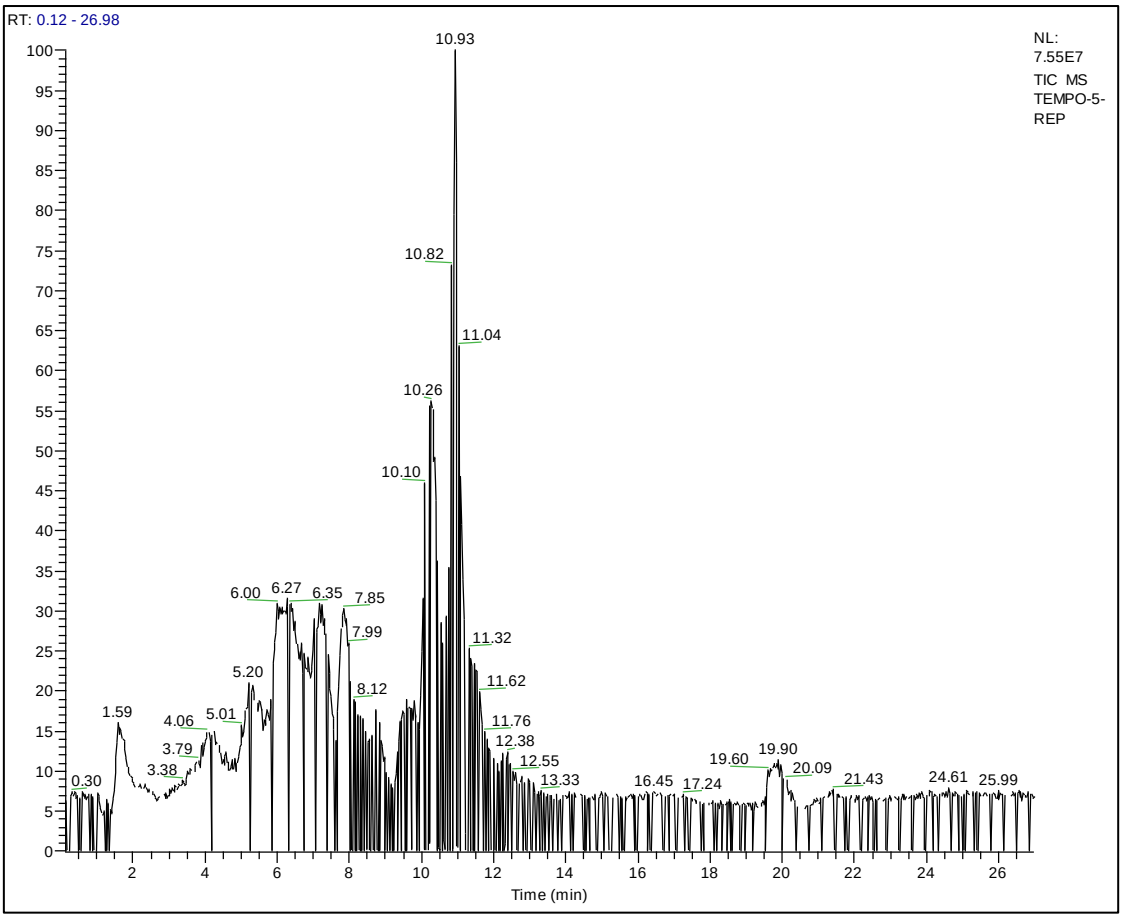


Figura 91. Espectro de íons totais obtido por UPLC-HRMS da reação do Fipronil com a bactéria *B. amyloliquefaciens* (RFD1C). Condições de reação: 10 mg L^{-1} de Fipronil, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC.

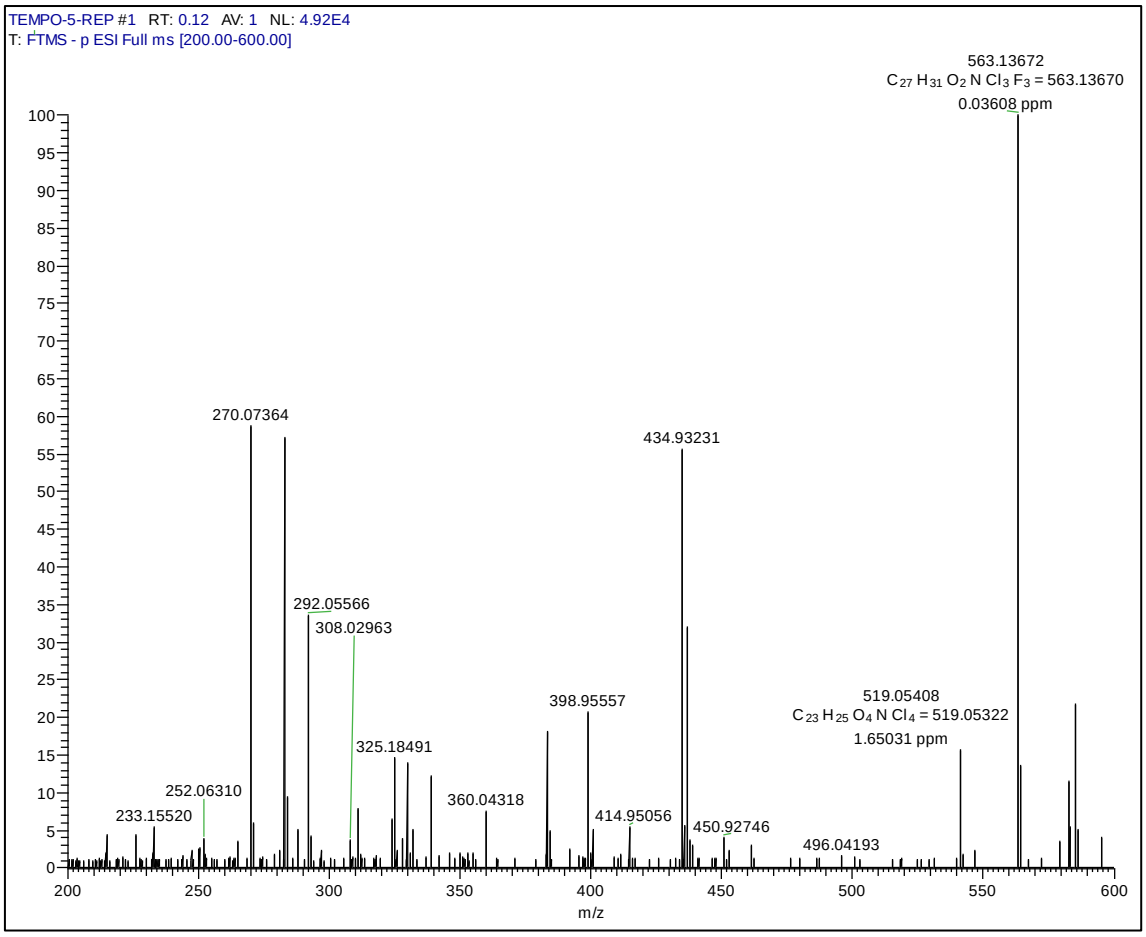
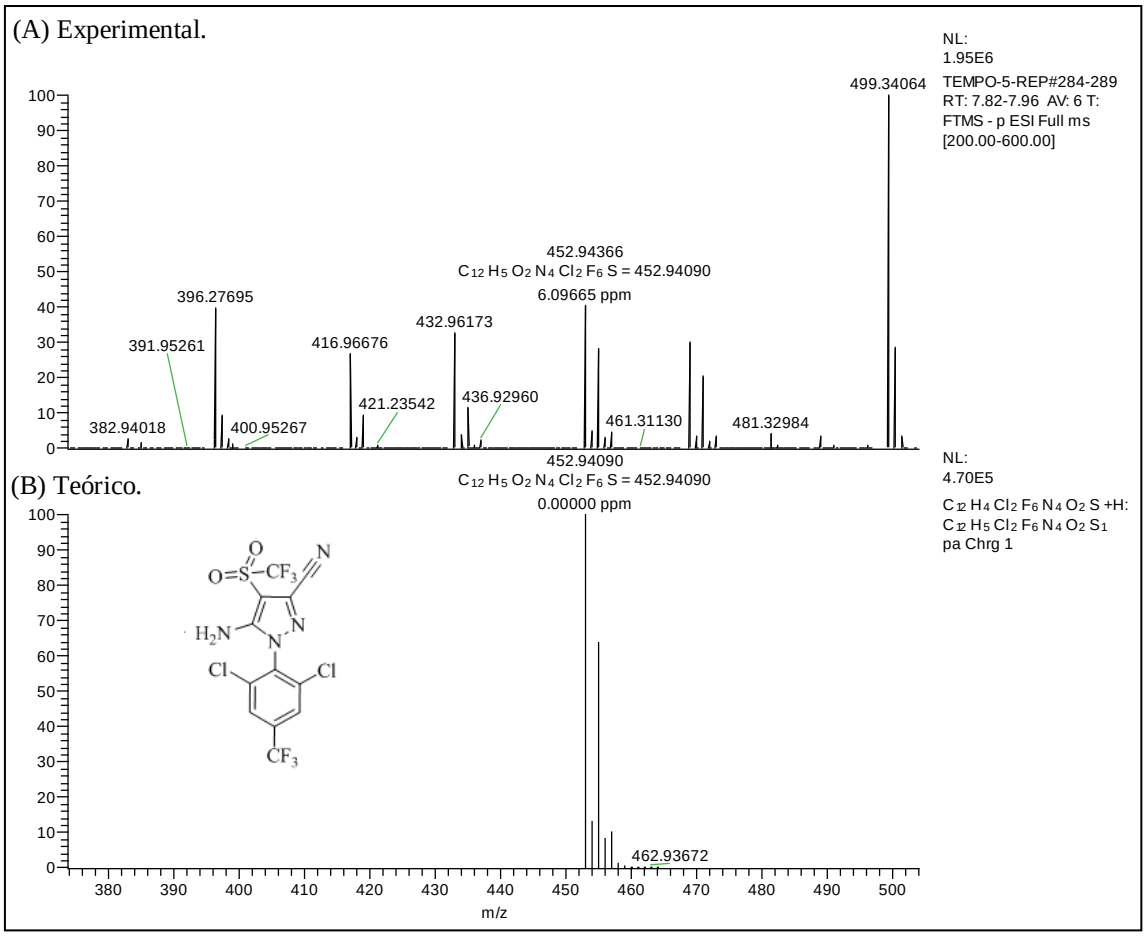
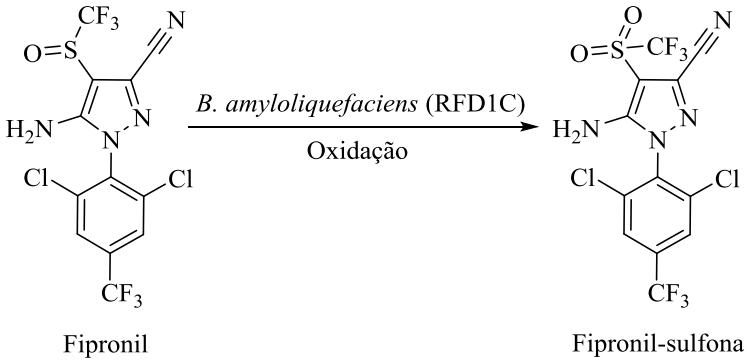


Figura 92. Espectro de massas obtido por UPLC-HRMS para o composto de biotransformação do Fipronil com a bactéria *B. amyloliquefaciens* (RFD1C). (A) Experimental. (B) Teórico.



Assim, foi possível propor uma rota de biotransformação para o Fipronil, como mostra a Figura 93. Enzimas presentes na bactéria *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) foram capazes de promover a oxidação do Fipronil adicionando um átomo de oxigênio no átomo de enxofre da molécula Fipronil-sulfona.

Figura 93. Proposta de biotransformação do Fipronil promovida pela bactéria *B. amyloliquefaciens* (RFD1C).



Em um estudo recente sobre a toxicidade do Fipronil em bactérias *Escherichia coli*, Bhatti e colaboradores (2019) verificaram que a exposição da bactéria *E. coli* ao pesticida Fipronil numa concentração de 100 µmol L^{-1} levou à produção de espécies reativas de oxigênio e perda da viabilidade e potencial de membrana do microrganismo. Observaram ainda a bioacumulação pela bactéria e a biotransformação do pesticida em Fipronil-sulfona e Fipronil-sulfeto (BHATTI *et al*., 2019).

A análise por HPLC/UV-vis da reação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) com a Bifentrina mostrou que houve uma biodegradação de 79%. A análise por UPLC-HRMS foi realizada para essa amostra e o cromatograma da reação encontra-se na Figura 94 e o cromatograma de íons totais da análise encontra-se na Figura 95. A amostra analisada foi da reação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) com a Bifentrina na concentração de 30 mg L^{-1} na qual foi mantida por 5 dias, a 130 rpm e a 32 ºC.

Figura 94. Cromatograma obtido por UPLC-HRMS da reação da Bifentrina com a bactéria *B. pseudomcyoides* (4RF1C). Condições de reação: 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC.

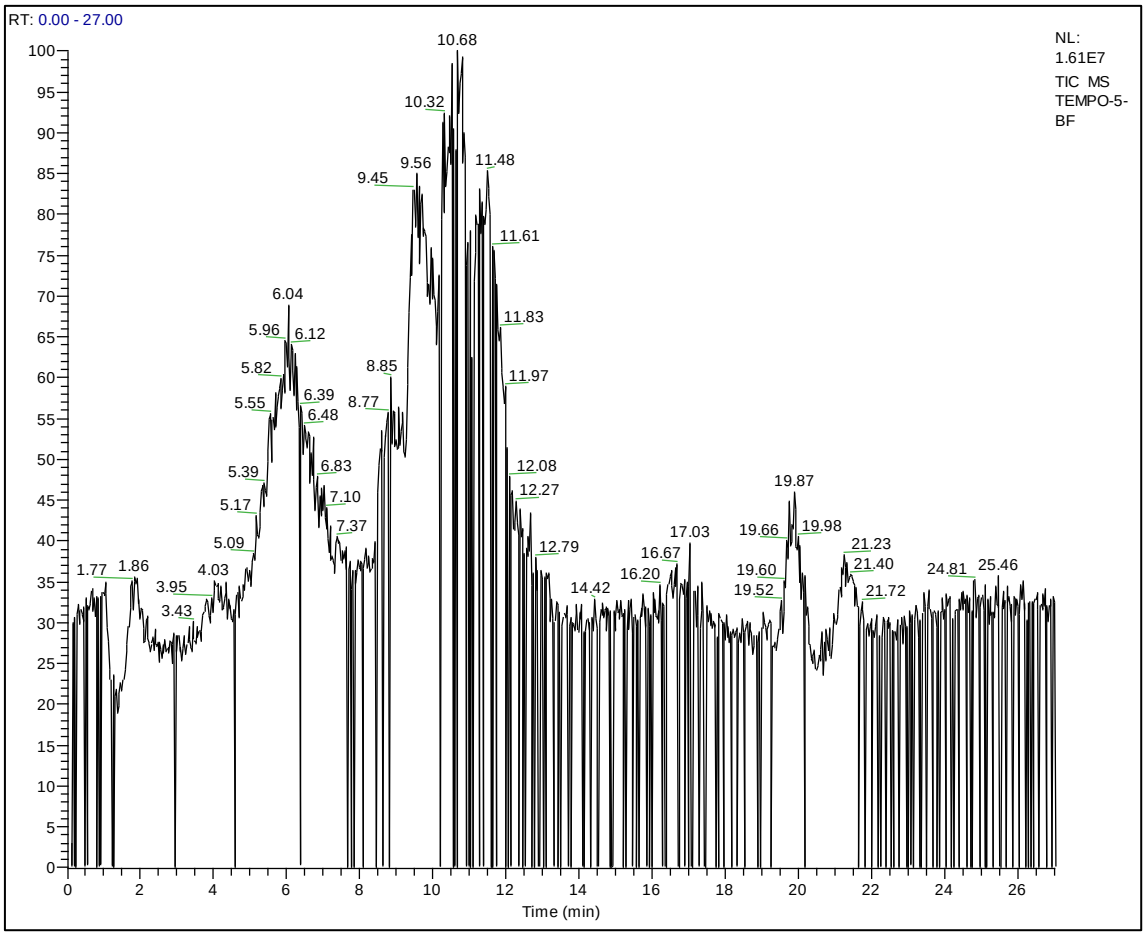
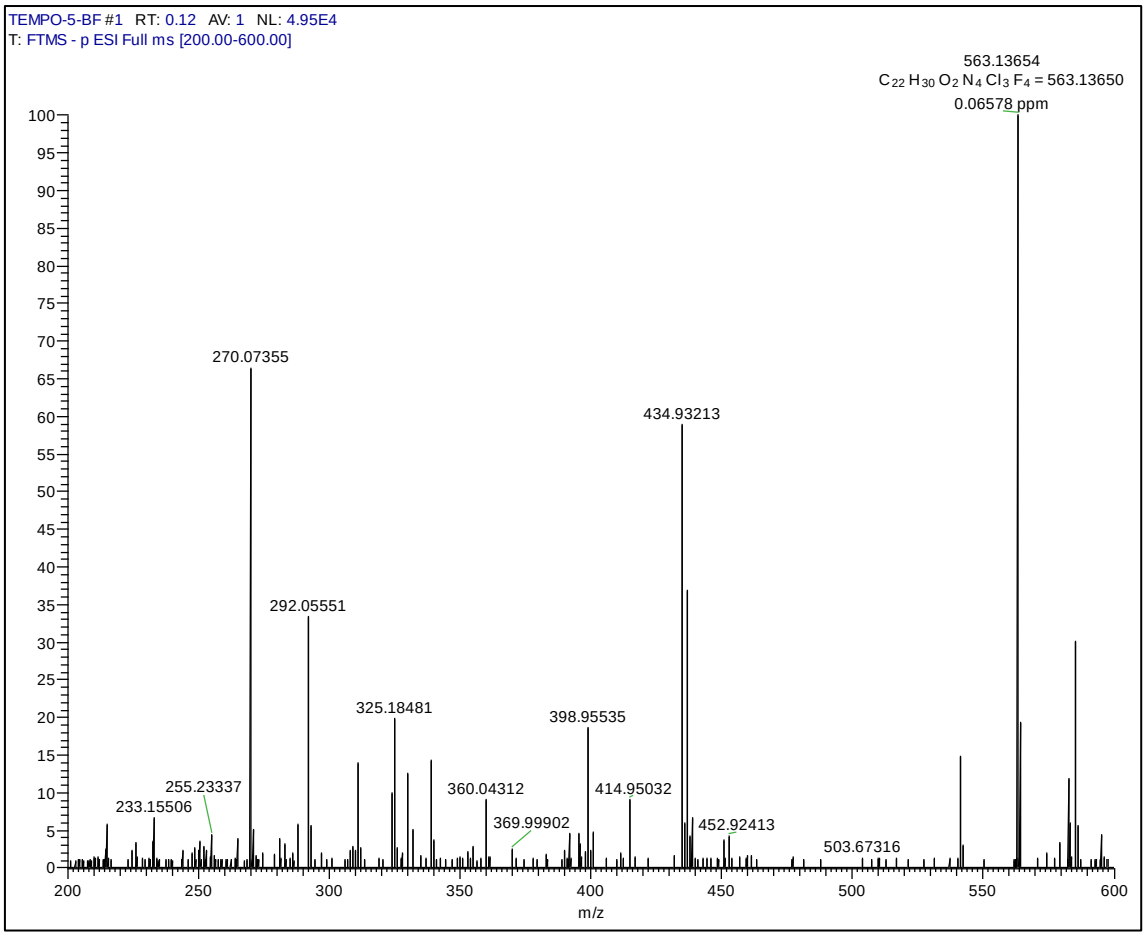


Figura 95. Espectro de íons totais obtido por UPLC-HRMS da reação da Bifentrina com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C). Condições de reação: 30 mg L^{-1} de Bifentrina, 5 dias, 130 rpm, 32 ºC.



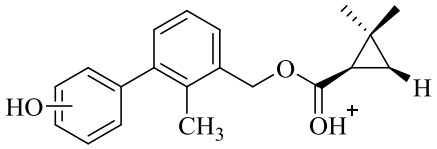
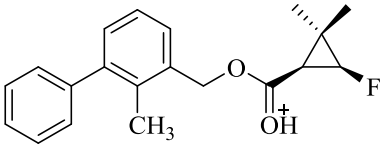
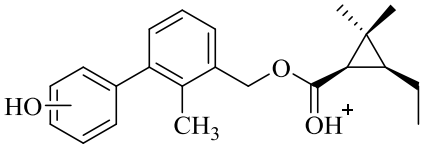
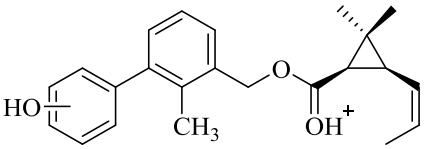
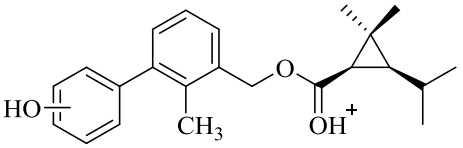
Através da análise realizada por UPLC-HRMS foram verificados produtos que podem ser de biodegradação da Bifentrina provenientes de reações de hidroxilação no anel aromático, perda de halogênios (desalogenação), reação de redução cujas estruturas sugeridas estão na Tabela 23 e os seus respectivos espectros de massas encontram-se no Apêndice H. A massa teórica e a massa experimental apresentaram desvios entre 14,4 e 17,2 ppm. No entanto, não foi possível obter padrões para confirmar essas estruturas propostas.

Nesta análise do extrato da reação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) com a Bifentrina obteve-se o espectro de íons totais no intervalo de *m/z* 200-600, não sendo possível se observar a formação do álcool **BF-OH** proveniente da hidrólise da Bifentrina. Contudo, em todas as estruturas propostas na Tabela 23, foram sugeridos metabólitos provenientes de modificações no anel aromático e na cadeia lateral olefínica da Bifentrina.

Desta forma, conclui-se que a biodegradação da Bifentrina pela bactéria *B.*

pseudomycoides (4RF1C) ocorreu, entretanto, o grande desafio é a identificação dos metabólitos de biodegradação produzidos.

Tabela 23. Estruturas propostas provenientes da biodegradação/biotransformação da Bifentrina.

	Estrutura	Massa teórica (g mol^{-1})	Massa da análise (g mol^{-1})	Desvio (ppm)
1		311,16417	311,16955	17,2
2		313,15983	313,16516	17,0
3		339,19547	339,20095	16,1
4		351,19547	351,20053	14,4
5		353,21112	353,21658	15,4

4.20 Recuperação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil e limite de detecção

Por meio do experimento em quintuplicata foi possível avaliar a porcentagem de recuperação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil, bem como calcular o desvio padrão para essas amostras. Na Tabela 24 encontram-se os valores das concentrações para os pesticidas. Os dados mostram que a porcentagem de desvio padrão do método foi de 4% e 3% para a Bifentrina e o Fipronil, respectivamente.

As análises foram realizadas por HPLC/UV-vis. Os limites de detecção foram de 0,4 e 0,05 mg L^{-1} para os pesticidas Bifentrina e Fipronil, respectivamente.

Tabela 24. Recuperação e limite de detecção dos pesticidas Bifentrina e Fipronil por HPLC/UV-vis.

Composto	Concentração do pesticida (mg L^{-1})	Concentração determinada (mg L^{-1})	Porcentagem de recuperação	Porcentagem de desvio do método	Limite de detecção (mg L^{-1})
Bifentrina	30	28,7 ± 1,1	96%	4%	0,4
Fipronil	10	9,6 ± 1,1	96%	3%	0,05

5. Conclusões

5.1 Considerações finais

Neste trabalho estudou-se a biodegradação do pesticida Bifentrina com 8 linhagens de bactérias isoladas de folhas da laranja. Uma triagem foi feita com as bactérias *B. amyloliquefaciens* (RFD1C), *B. megaterium* (RF1C), *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C), *B. pseudomycoides* (2RF2C), *B. aryabhattai*/ *Bacillus* sp. (2RF3C), *B. pseudomycoides* (3RF2C), *B. pseudomycoides* (4RF1C) e *B. pseudomycoides* (4RF2C), na presença dos pesticidas. Verificou-se que as linhagens de bactérias *Bacillus pseudomycoides* apresentaram o melhor percentual de biodegradação entre 79 e 88%, enquanto as demais apresentaram um percentual entre 25 e 38% de biodegradação.

Através das análises dos dados obtidos dos cromatogramas das reações das bactérias foram observadas bandas de possíveis produtos de biodegradação da Bifentrina para a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C), sendo selecionada para uma reação em replicata. Por meio desta reação e empregando-se a técnica de cromatografia em coluna foi possível separar o composto 4-hidroxibenzoato de metila, um possível metabólito secundário produzido pela bactéria na presença da Bifentrina.

Os metabólitos 2,4-di-*terc*-butilfenol, 1-nonadeceno, *N*-fenetilacetamida e 1,4-diisopropilbenzeno foram identificados por CG-EM com similaridade superior a 90% nas reações das bactérias *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C), *B. aryabhattai*/ *Bacillus* sp. (2RF3C), *B. pseudomycoides* (3RF2F), *B. pseudomycoides* (4RF1C) e *B. pseudomycoides* (4RF2C) na presença da Bifentrina.

Os compostos 2,4-di-*terc*-butilfenol, 1-nonadeceno, *N*-fenetilacetamida, 1,4-diisopropilbenzeno, 1,3,5-trimetilbenzeno, (*E*)-hexacos-9-eno e 1-eicoseno foram identificados nas amostras das bactérias *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C), *B. aryabhattai*/ *Bacillus* sp. (2RF3C), *B. pseudomycoides* (3RF2F), *B. pseudomycoides* (2RF2C), *B. pseudomycoides* (4RF1C) e *B. pseudomycoides* (4RF2C) na ausência da Bifentrina, também com similaridade >90% em relação aos padrões registrados nas bibliotecas do equipamento (NIST21/ NIST05s).

Objetivando-se confirmar os possíveis produtos de biodegradação da Bifentrina, realizou-se a hidrólise da Bifentrina obtendo-se os produtos 2-metil-[1,1'-bifenil]-3-metanol (álcool **BF-OH**) e o ácido-(1*R*,3*R*)-3-((*Z*)-2-cloro-3,3,3-trifluoroprop-1-en)-2,2-dimetilciclopropanílico (ácido **BF-COOH**). Posteriormente, foram analisados por HPLC/UV-vis e as bandas foram comparadas com as obtidas pela reação da Bifentrina

com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C). Não foram observados tais metabólitos na reação. Possivelmente (a) reações de conjugação podem ter ocorrido no sistema, (b) os produtos podem ter sido completamente metabolizados (degradados) ou (c) serem muito polares, não tendo sido extraídos da fase aquosa.

Empregando-se as mesmas condições de reação da Bifentrina com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C), foi feita uma reação com o álcool **BF-OH** para avaliar a sua degradação. Verificou-se que a porcentagem de degradação do álcool **BF-OH** foi de 14 e 17% para 3 e 5 dias de reação, respectivamente. A baixa degradação pode ser devida à concentração elevada do álcool **BF-OH** ou à falta de enzimas específicas. Portanto, a bactéria não foi capaz de degradar significativamente o composto nessa concentração. Outro experimento foi realizado empregando-se uma menor concentração (15 mg L^{-1}) de álcool **BF-OH** em 5 dias de reação e 10 mg L^{-1} de álcool **BF-OH** em 15 dias de reação com a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C). Verificou-se que a porcentagem de biodegradação do álcool **BF-OH** foi de 15 e 17% em 5 e 15 dias reação, respectivamente.

Foram realizadas reações entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e o álcool **BF-OH** (10 mg L^{-1}) na presença do pesticida Bifentrina (30 mg L^{-1}) e foi observado que em 10 dias de reação a bactéria foi capaz de biodegradar 76% da Bifentrina e 44% do álcool **BF-OH**. Concluiu-se assim que na presença da Bifentrina a bactéria foi capaz de biodegradar em maior porcentagem o álcool **BF-OH**, possivelmente devido à produção de enzimas nessas condições.

Por meio do estudo da biodegradação do pesticida Fipronil empregando-se 8 linhagens de bactérias do gênero *Bacillus* verificou-se que as bactérias *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) e *B. aryabhattai/ Bacillus* sp. (2RF3C) apresentaram o melhor consumo de Fipronil em 5 dias de reação, ou seja, foram os microrganismos responsáveis pela maior degradação do pesticida em meio líquido.

Nas análises por CG-EM foram detectados os compostos esqualeno, *N*-fenetilacetamida, 5-hexil-di-hidrofurano-2-(3*H*)-ona, 1,3-diisopropilbenzeno, 1,4-diisopropilbenzeno, 1*H*-indol e ciclo-(Pro-Leu). Esses compostos apresentaram uma similaridade com a biblioteca do equipamento igual ou superior a 90%. Todos esses compostos apresentam alguma função específica para os microrganismos e alguns também são encontrados em plantas. Portanto, deve existir uma relação entre planta e microrganismo e a produção de metabólito.

Nas reações de consórcio bacteriano, em que foram utilizadas todas as bactérias,

verificou-se uma porcentagem de consumo do pesticida Fipronil de 81%, enquanto para o pesticida Bifentrina a porcentagem foi de 51%.

Nas análises por UPLC-HRMS foi observado o produto de biotransformação Fipronil-sulfona na reação entre a bactéria *B. amyloliquefaciens* (RFD1C) e o Fipronil. E, na reação entre a bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) e a Bifentrina observou-se possíveis metabólitos de biotransformação da Bifentrina.

5.2 Conclusão

Por meio deste estudo de biodegradação dos pesticidas Bifentrina e Fipronil por bactérias isoladas da cultura da laranja foi possível concluir que os microrganismos empregados mostraram-se capazes de realizar reações tanto de biodegradação quanto de biotransformação dos pesticidas estudados (Bifentrina e Fipronil). Assim, as bactérias empregadas neste estudo demonstraram-se capazes de desempenhar uma importante função ambiental de remediação desses pesticidas. Conclui-se, portanto, que este estudo inédito teve uma relevância frente à importância de biodegradação de agroquímicos por bactérias isoladas das folhas da laranja, contribuindo para a área ambiental, uma vez que microrganismos selvagens tem potencial para eliminar agentes tóxicos lançados no meio ambiente por ação antropogênica.

6. Referências Bibliográficas

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, J.; GAJENDIRAN, A. Biodegradation of fipronil and its metabolite fipronil sulfone by *Streptomyces rochei* strain AJAG7 and its use in bioremediation of contaminated soil. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, Maryland Heights, v. 155, p. 90-100, 2019.

AKONE, S. H.; MÁNDI, A.; KURTÁN, T.; HARTMANN, R.; LIN, W.; DALETOS, G.; PROKSCH, P. Inducing secondary metabolite production by the endophytic fungus *Chaetomium* sp. through fungal-bacterial co-culture and epigenetic modification. **Tetrahedron**, Oxford, v. 72, n. 13, p. 6340-6347, 2016.

AL-SAMMAN, A. M. M. A.; KAHKASHAN; SIDDIQUE, N.A. Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS/MS) analysis, ultrasonic assisted extraction, antibacterial and antifungal activity of *Emblica officinalis* fruit extract. **Pharmacognosy Journal**, Bangalore, v. 11, n. 2, p. 315-323, 2019.

ANJOS, C. S. **Biodegradação dos pesticidas esfenvalerato, espirodiclofeno, tiametoxam e imidacloprido por linhagens bacterianas isoladas do cerrado reflorestado e citricultura da laranja**. 2018. 271 f. (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

ANVISA. **B26 Bifentrina**. Brasília, 2019a. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/B26%2B%25E2%2580%2593%2BBifentrina.pdf/77c89cd6-4c54-40d0-b968-af0907faaa12. Acesso em 10 out. 2019.

ANVISA. **F43 Fipronil**. Brasília, 2019b. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/117782/F43+%E2%80%93+Fipronil/cee42727-46ab-44a2-b88e-10ea4e8faab9. Acesso em 10 out. 2019.

BENELLI, P. **Agregação de valor ao bagaço de laranja (*Citrus sinensis* L. Osbeck) mediante obtenção de extratos bioativos através de diferentes técnicas de extração**. 2010. 233 f. (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

BENÍTEZ, M. C. C.; COLMENARES, A. J. D.; MONTOYA, J. C. V. Derivados naturales de 2,5-dicetopiperazina a partir de la biomasa del hongo Pleurotus djamor, nativo del nor-occidente del pacífico colombiano. **Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas**, Calle, v. 24, p. 39-52, 2012.

BHATTI, S.; SATYANARAYANA, G. N. V.; PATEL, D. K.; SATISH, A. Bioaccumulation, biotransformation and toxic effect of Fipronil in *Escherichia coli*. **Chemosphere**, Oxford, v. 231, p. 207-215, 2019.

BIASETTO, C. R.; SOMENSI, A.; FIGUEIRO, F. S.; MORAES, L. A. B.; SILVA, G. H.; YOUNG, M. C. M.; BOLZANI, V. S.; ARAÚJO, A. R. Diketopiperazines and arylethylamides produced by *Schizophyllum commune*, an endophytic fungus in *Alchornea glandulosa*. **Eclética Química Journal**, Araraquara, v. 44, n. 3, p. 36-42, 2019.

BIROLLI, W. G.; VACONDIO, B.; ALVARENGA, N.; SELEGHIM, M. H. R.; PORTO, A. L. M. Enantioselective biodegradation of the pyrethroid (±)-lambda-cyhalothrin by marine-derived fungi. **Chemosfere**, Oxford, v. 197, p. 651-660, 2018.

BRASIL. **Decreto nº 4.074, de 4 de janeiro de 2002.** Regulamenta a Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, DF: Presidência da República, [2002]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/decreto/2002/d4074.htm. Acesso em: 31 jul. 2019.

BRASIL. **Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989.** Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, DF: Presidência da República, [1989]. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L7802.htm. Acesso em 31 jul. 2019.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial traz publicação de defensivos agrícolas, com genéricos e produtos mais modernos.** Brasília, 2019. Disponível em: http://www.agricultura.gov.br/noticias/diario-oficial-traz-publicacao-de-defensivos-agricolas-com-genericos-e-produtos-mais-modernos. Acesso em: 25 set. 2019.

CHEN, L.; GUO, Q.; MA, J.; KANG, W. Chemical constituents of *Bacillus coagulans* LL1103. **Chemistry of Natural Compounds**, New York, v. 54, n. 2, 2018.

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**, Amsterdam, v. 102, p. 8110–8116, 2011.

CHEN, S.; LUO, J.; HU, M.; GENG, P.; ZHANG, Y. Microbial detoxification of bifenthrin by a novel yeast and its potencial for contamined soils treatment. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 2, 2012.

CITRON, C. A.; DICKSCHAT, J. S. Microbial terpenes: a perspective on their chemistry and biosynthesis. **Synlett**, Stuttigart, v. 25, p. 766–782, **2014.**

CONAB**. Safra brasileira de cana-de-açúcar.** Brasília, 2019a. Disponível em: https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana. Acesso em: 01 ago. 2019.

CONAB. **Boletim da safra de grãos.** Brasília, 2019b.Disponível em: https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/graos/boletim-da-safra-de-graos. Acesso em: 01 ago. 2019.

CONAB**. Safra brasileira de café.** Brasília, 2019c.Disponível em: https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cafe. Acesso em: 01 ago. 2019.

COSTA, J. R. V.; ROSSI, J. R.; MARUCCI, S. C.; ALVES, E. C. C.; VOLPE, H. X. L.; FERRAUDO, A. S.; LEMOS, M. V. F.; DESIDÉRIO, J. A. Atividade tóxica de isolados de *Bacillus Thuringiensis* a larvas de *Aedes Aegypti* (l.) (díptera: culicidae). **Neotropical Entomology**, Dordrecht, v. 39, n. 5, p. 757-766, 2010.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural product:** a biosynthetic approach. 2. ed. New York: Wiley, 2002.

DHAKAL, D.; POKHREL, A. R.; SHRESTHA, B.; SOHNG, J. K. Marine rare actinobacteria: isolation, characterization, and strategies for harnessing bioactive compounds. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, n. 1106, p. 1-13, 2017.

DONK, W. A. Bacteria do it differently: an alternative path to squalene. **American Chemical Society Central Science**, Washington, v. 1, p. 64-65, 2015.

DOSSELAERE, F.; VANDERLEYDEN, J. A metabolic node in action: chorismate-utilizing enzymes in microorganisms. **Critical Reviews in Microbiology**, Oxfordshire, v. 27, n. 2, p. 75-131, 2001.

DZIONEK, A.; WOJCIESZYŃSKA, D.; GUZIK, U. Natural carriers in bioremediation: a review. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 23, p. 28-36, 2016.

EUROPEAN COMISSION. **Pesticides**. Brussels, 2019a. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides_en. Acesso em: 25 ago. 2019.

EUROPEAN COMISSION. **Bifenthrin**. Brussels, 2019b. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1026. Acesso em: 05 out. 2019.

EUROPEAN COMISSION. **Fipronil**. Brussels, 2019c. Disponível em: https://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=activesubstance.detail&language=EN&selectedID=1363. Acesso em: 05 out. 2019.

FARNHAM, A. W.; KHAMBAY, B. P. S. The pyrethrins and related compounds. Part XXXIX*- Structure-activity relationships of pyrethroidal esters with cyclic side chains in the alcohol component against resistant strains of housefly *(Musca doMestica)*. **Pesticide Science**, Oxford, v. 44, p. 269-275, 1995.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

GAJENDIRAN, A.; ABRAHAM, J. Biomineralisation of fipronil and its major metabolite, fipronil sulfone, by *Aspergillus glaucus* strain AJAG1 with enzymes studies and bioformulation. **Biotech**, Kamplenborg, v. 7, n. 212, p. 1-15, 2017.

GOUMA, S.; FRAGOEIRO, S.; BASTOS, A. C.; MAGAN, N. **Microbial Biodegradation and Bioremediation**. Bacterial and Fungal Bioremediation Strategies. 1 ed. Rourkela Odisha: Elsevier, p. 301–323, 2014.

GUO, P.; WANG, B.; HANG, B.; LI, L.; ALI, S. W.; HE, J.; LI, S. Pyrethroid-degrading *Sphingobium* sp. JZ-2 and the purification and characterization of a novel pyrethroid hydrolase. **International Biodeterioration & Biodegradation**, London, v. 63, n. 8, p. 1107-1112, 2009.

HERNANDÉZ, M. L. O.; SALINAS, E. S.; GONZÁLES, E. D.; GODÍNEZ, M. L. C. Pesticide biodegradation**:** mechanisms, Genetics and Strategies to Enhance the Process. *In*: HERNANDÉZ, M. L. O.; SALINAS, E. S.; GONZÁLES, E. D.; GODÍNEZ, M. L. C. **Biodegradation:** life of science. London: Ed. InTech, 2013. p. 251-287.

IBAMA. Boletins anuais de produção, importação, exportação e vendas de agrotóxicos no Brasil. Brasília, 2017. Disponível em: https://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos#boletinsanuais. Acesso em: 31 jul. 2019.

IUPAC GOLD BOOK. Biodegradation, 1997a. Disponível em: https://goldbook.iupac.org/terms/view/B00656. Acesso em: 10 jan. 2019.

IUPAC GOLD BOOK. Biodegradation, 1997b. Disponível em: https://goldbook.iupac.org/terms/view/B00667. Acesso em: 10 jan. 2019.

JACQUES, R. J. S.; BENTO, F. M.; ANTONIOLLI, Z. I.; CAMARGO, F. A. O. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1192-1201, 2007.

JAVIDNIA, K.; ARAM, F.; SOLOUKI, M.; REZA MEHDIOPOUR, A.; GHOLAMI, M.; MIRI, R. Microbial biotransformation of some monoterpene hydrocarbons. **Annals of Microbiology**, Heidelberg, v. 59, n. 2, p. 349-351, 2009.

JOSHIA, S.; MISHRA, D.; BISHT, G.; KHETWAL, K. S. *In vitro* antimicrobial activity of essential oil of *Swertia cordata* aerial parts. **The Natural Products Journal**, Sharjah, v. 3, p. 66-70, 2013.

KARROUCHI, K.; RADI, S.; RAMLI, Y.; TAOUFIK, J.; MABKHOT, Y. N.; AL-AIZARI, F. A.; ANSAR, M. Synthesis and pharmacological activities of pyrazole derivatives: a review. **Molecules**, Basel, v. 23, n. 1, p. 134, 2018.

KHAN, M. F.; ALAM, M. M.; VERMA, G.; AKHTAR, W.; AKHTER, M.; SHAQUIQUZZAMAN, M. The therapeutic voyage of pyrazole and its analogs: a review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, Issy les Moulineaux Cedex, v. 120, p. 170-201, 2016.

KIM, H. W.; LEE, S. M.; SEO, J.; KIM, Y. Effects of pH and cultivation time on the formation of styrene and volatile compounds by *Penicillium expansum*. **Molecules**, Basel, v. 24, n. 7, 1333-1347, 2019.

KUMAR, R.; SINGH, B.; GUPTA, V. K. Biodegradation of Fipronil by *Paracoccus* sp. in different types of soil. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 88, p. 781-787, 2012.

LIU, Y.; WANG, H.; WEI, S.; YAN, Z. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils extracted by microwave-assisted hydrodistillation from the flowers of two *Plumeria* species. **Analytical Letters**, New York, v. 45, p. 2389-2397, 2012.

MA, Q.; ZHANG, X.; QU, Y. Biodegradation and biotransformation of indole: advances and perspectives. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 9, n. 2625, p. 1-18, 2018.

MANDAL, K.; SINGH, B.; JARIYAL, M.; GUPTA, V. K. Bioremediation of fipronil by a *Bacillus firmus* isolate from soil. **Chemosphere**, Oxford, v. 101, p. 55-60, 2014.

MANDAL, K.; SINGH, B.; JARIYAL, M.; GUPTA, V. K. Microbial degradation of fipronil by *Bacillus thuringiensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Maryland Heights, v. 93, p. 87-92, 2013.

MOREIRA, I. C.; ROQUE, N. F.; CONTINI, K.; LAGO, J. H. G. Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopia emarginata* (*Annonaceae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 1, p. 55-58, 2007.

NAFIS, A.; KASRATI, A.; JAMALI, C. A.; MEZRIOUI, N.; SETZER, W.; ABBAD, A.; HASSANI, L. Antioxidant activity and evidence for synergism of *Cannabis sativa* (L.) essential oil with antimicrobial standards. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 137, p. 396-400, 2019.

NWANI, C. D.; LAKRA, W. S.; NAGPURE, N. S.; KUMAR, R.; KUSHWAHA, B.; SRIVASTAVA, S. K. Toxicity of the herbicide atrazine: effects on lipid peroxidation and activities of antioxidant enzymes in the freshwater fish *Channa Punctatus* (Bloch). **International Journal of Environmental Research and Public Health,** Basel, v. 7, n. 8, p. 3298-3312, 2010.

PANDEY, P.; PANT, G.; SIBI, G. Isolation and characterization of bifenthrin catabolizing bacterial strain *Bacillus cibi* from soil for pyrethroids biodegradation. **Online Journal of Biological Sciences**, Dubai, v. 14, ed. 3, p. 188-195, 2014.

PESQUISA indica que não há dose segura de agrotóxico. **Estadão**, Rio de Janeiro, 12 ago. 2019. Disponível em: https://sustentabilidade.estadao.com.br/noticias/geral,pesquisa-indica-que-nao-ha-dose-segura-de-agrotoxico,70002953956. Acesso em: 20 ago. 2019.

PIGNATI, W. A.; LIMA, F. A. N. S.; LARA, S. S.; CORREA, M. L. M.; BARBOSA, J. S. Distribuição espacial do uso de agrotóxicos no Brasil: uma ferramenta para a Vigilância em Saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 10, p. 3281-3293, 2017.

PUERTA, R.; SÁENZ, M. T.; GARCIA, M. D. Antibacterial activity and composition of the volatile vil from *Achillea Ageratum* L. **Phytotherapy Research**, Oxford, v. 10, p. 248-250, 1996.

RABINOVITCH, L.; OLIVEIRA, E. J. **Coletânea de procedimentos técnicos e metodologias empregadas para o estudo de *Bacillus* e gêneros esporulados aeróbios correlatos.** Rio de Janeiro: Montenegro Comunicação, 2015. *E*-book (160 p.). ISBN 978-85-67506-04-3. Disponível em: http://www.fiocruz.br/ioc/media/Coletanea%20de%20Procedimentos%20Tecnicos%20para%20Bacillus.PDF. Acesso em: 25 set. 2019.

REDDY, L. H.; COUVREUR, P. Squalene: a natural triterpene for use in disease management and therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 61, p. 1412–1426, 2009.

ROSS, M. K. **Pyrethroids**. *In*: ENCYCLOPEDIA of environmental health. Amsterdam: Elsevier, 2011. p. 702-708.

SAVI, G. D.; PIACENTINI, K. C.; BORTOLOTTO, T.; SCUSSEL, V. M. Degradation of bifenthrin and pirimiphos-methyl residues in stored wheat grains (*Triticum aestivum L.*) by ozonation. **Food Chemistry**, Amsterdam, v. 203, p. 246-251, 2016.

SHARMA, V.; KUMAR, P.; PATHAK, D. Biological importance of the indole nucleus in recent years: a comprehensive review. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, Hoboken, v. 47, p. 491-502, 2010.

SINGH, S.; GUPTA, R.; SHARMA, S. Effects of chemical and biological pesticides on plant growth parameter and rhizospheric bacterical community structure in *Vigna radiate*. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 291, p. 102-110, 2015.

SOGORB, M. A.; VILANOVA, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticidesthrough hydrolysis. **Toxicology Letters**, Shannon, v. 128, p. 215 – 228, 2002.

STIERLE, A.; STROBEL, G.; STIERLE, D. Taxol and taxane production by Taxomyces andreanae, an endophytic fungus of Pacific yew. **Science**, Washington, v. 260, n. 5105, p. 214–216, 1993.

SUNITHA, B. J.; ONKARAPPA, R. Chlorpyrifos degradation by *Actinomycetes* isolated from coffee plantation soil and residual analysis by GC-MS. **International Journal of Pharmacy and Biological Sciences**, New Delhi, v. 8, n. 1, p. 555-563, 2018.

SZCZEPANIEC, A.; CREARY, S. F.; LASKOWSKI, K. L.; NYROP, J. P.; RAUPP, M. J. Neonicotinoid insecticide imidacloprid causes outbreaks of spider mites on elm trees in urban landscapes. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 5, 2011.

TANG, R-Y.; ZHONG, P.; LIN, Q-L. A convenient conversion of pyrazolyl disulfide to sulfides by sodium dithionite and synthesis of sulfoxides. **Journal of Fluorine Chemistry**, Amsterdam, v. 127, 948-953, 2006.

UNIYAL, S.; PALIWAL, R.; SHARMA, R. K.; RAI, J. P. N. Degradation of fipronil by *Stenotrophomonas acidaminiphila* isolated from rhizospheric soil of *Zea mays*. **Biotechnology**, Hyderabad, v. 6, p. 48, 2016a.

UNIYAL, S.; PALIWAL, R.; VERMA, M.; SHARMA, R. K.; RAI, J. P. N. Isolation and Characterization of Fipronil degrading *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter oleivorans* from rhizospheric one of *Zea mays*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 96, p, 833-838, 2016b.

VERHOEF, S.; RUIJSSENAARS, H. J.; BONT, J. A. M., WERY, J. Bioproduction of *p*-hydroxybenzoate from renewable feedstock by solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 132, n. 49-56, 2007.

WANG, J-H.; YANG, C-Y.; FANG, S-T.; LU, J.; QUAN, C-S. Inhibition of biofilm in *Bacillus amyloliquefaciens* Q-426 by diketopiperazines. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Dordrecht, v. 32, n. 9, 2016.

WEN-JU, H.; XIAO-LING, L.; QIANG-ZHI, X.; XIAO-YU, L.; BING-HUA, J. Isolation, identification and biological characterization of secondary metabolites produced by a marine *Bacillus subtilis*. **Di-2 Jun-Yi Daxue**, Shangai, v. 29, n. 10, p. 1234-1238, 2008.

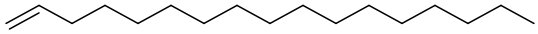
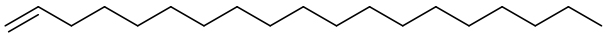
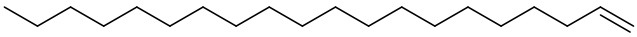
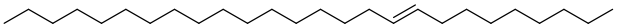
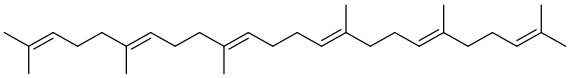
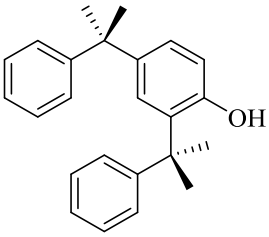
YAMADA, T.; KUZUYAMA, T.; KOMATSU, M.; SHIN-YA, K.; OMURA, S.; CANE, D. E.; IKEDA, H. Terpene synthases are widely distributed in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 112, n. 3, p. 857-862, 2014.

ZHANG, Q.; LIA S.; MAA, C.; WUA, N.; LIA, C.; YANG, X. Simultaneous biodegradation of bifenthrin and chlorpyrifos by *Pseudomonas* sp. CB2. **Journal of environmental science and health. Part B:** pesticides, food contaminants, and agricultural wastes, v. 53, n. 5, p. 304-312, 2018.

ZHAO, X.; SALGADO, V. L.; YEH, J. Z.; NARAHASHI, T. Differential actions of Fipronil and dieldrin insecticides on GABA-gated chloride channels in cockroach neurons. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Rockville, v. 306, n. 3, p. 914-924, 2003.

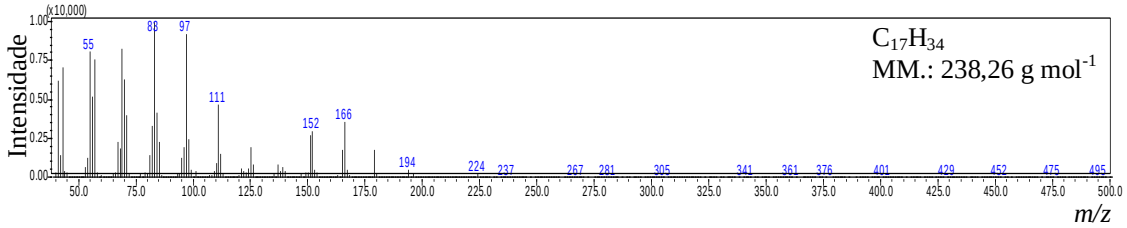
Apêndice

APÊNDICE A - Metabólitos identificados no extrato da reação da bactéria *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) na ausência da Bifentrina.

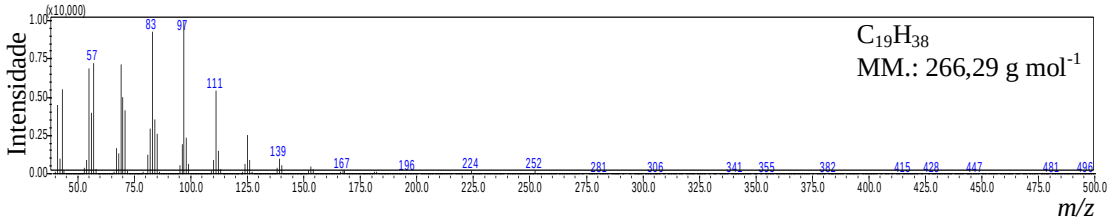
Código	Estrutura	Similaridade (%)	Biblioteca	Tempo de retenção (minutos)
Hc_1	 1-heptadeceno	88	Nist21	16,2
Hc_2	 1-nonadeceno	96	Nist05s	19,9
Hc_3	 1-eicoseno	94	Nist05	23,3, 26,3, 29,2
Hc_4	 (*E*)-hexacos-9-eno	90	Nist107	32,0
Hc_5	 esqualeno	90	Wiley8	34,5
M_1	 2,4-bis (2-fenilpropan-2-il) fenol	89	Nist05s	30,6

Espectros de massas dos metabólitos identificados no extrato da reação da bactéria *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) na ausência da Bifentrina.

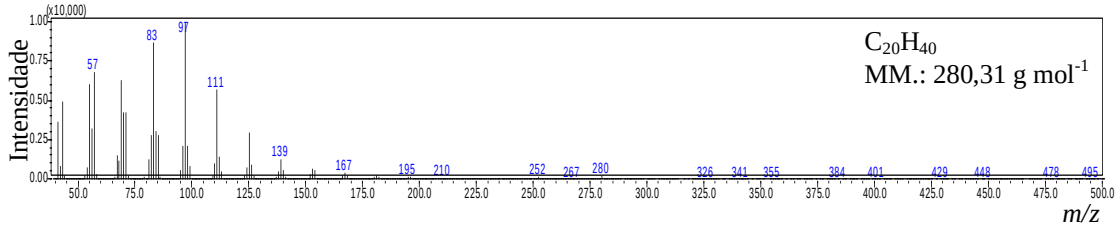
- Hc_1: heptadeceno



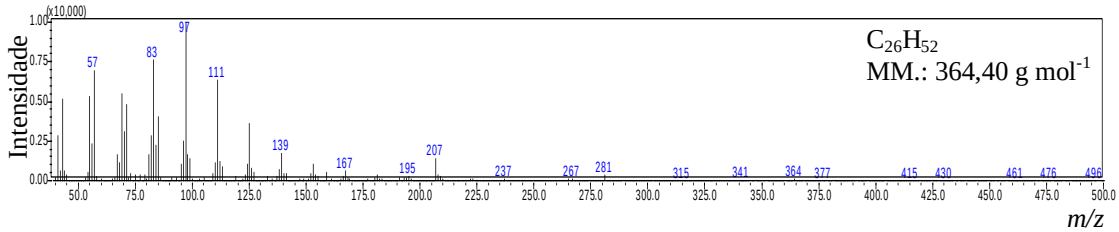
- Hc_2: 1-nonadeceno



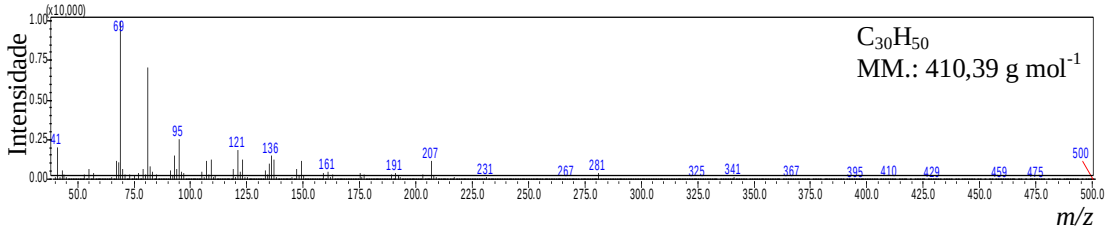
- Hc_3: 1-eicoseno



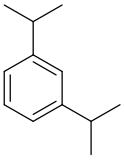
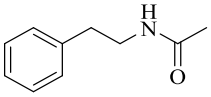
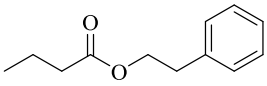
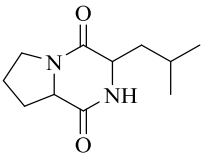
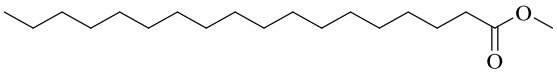
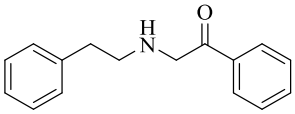
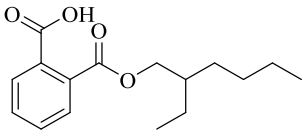
- Hc_4: (*E*)-hexacos-9-eno



- Hc_5: esqualeno

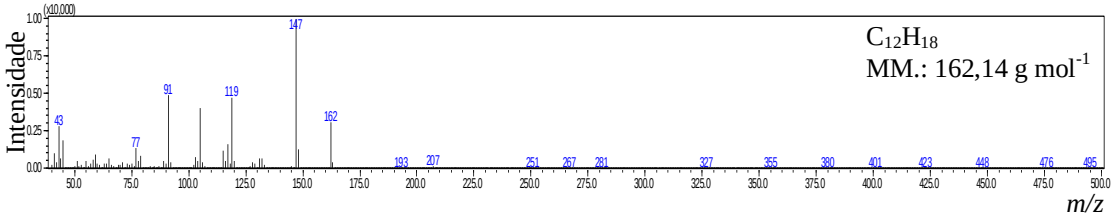


APÊNDICE B - Metabólitos identificados no extrato da reação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) na ausência da Bifentrina.

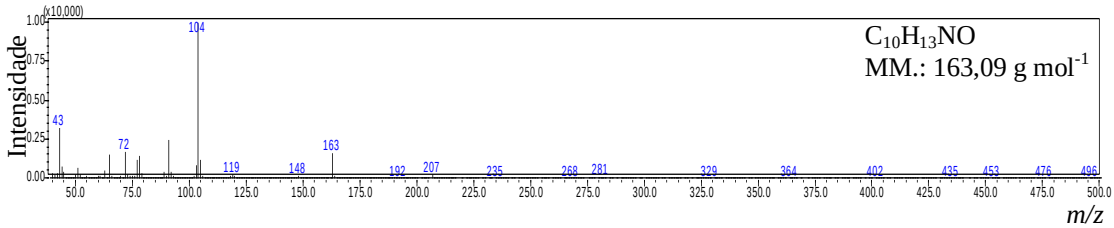
Código	Estrutura	Similaridade (%)	Biblioteca	Tempo de retenção (minutos)
Hc_1	 1,3-diisopropilbenzeno	90	NIST 05	7,1
Hc_2	1,4-diisopropilbenzeno	92	NIST 05	7,7
M_1	 *N*-fenetilacetamida	91	Nist05	15,6
M_2	 butirato de fenetilo	81	Nist05s	19,9
M_3	 ciclo-(Pro-Leu)	66	Nist05	22,8
M_4	 estearato de metila	85	Wiley8	25,4
M_5	 2-(fenetilamino)-1-feniletan-1-ona	85	Nist05	26,1
M_6	 ácido 2-(((2-etil-hexil)oxi)carbonil)benzóico	89	Nist05	31,1

Espectros de massas dos metabólitos identificados no extrato da reação da bactéria *B. psudomycoides* (4RF1C) na ausência da Bifentrina.

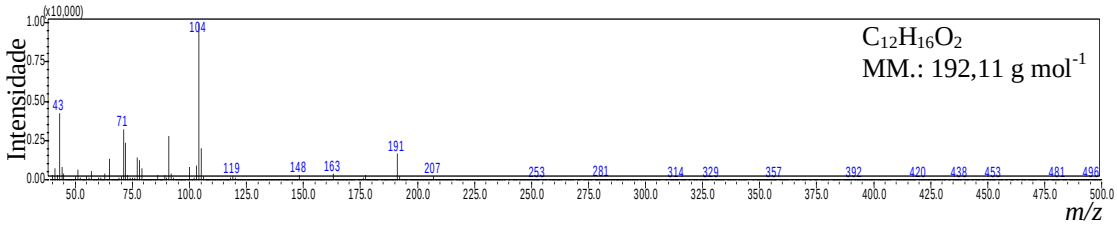
- Hc_1 e Hc_2: 1,3-diisoproprilbenzeno e 1,4-diisopropilbenzeno



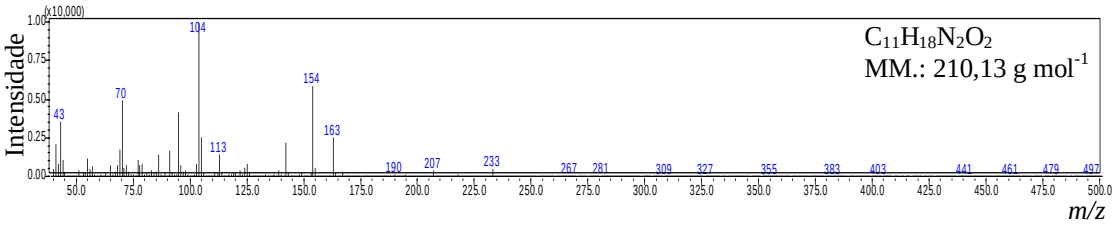
- M_1: *N*-fenetilacetamida



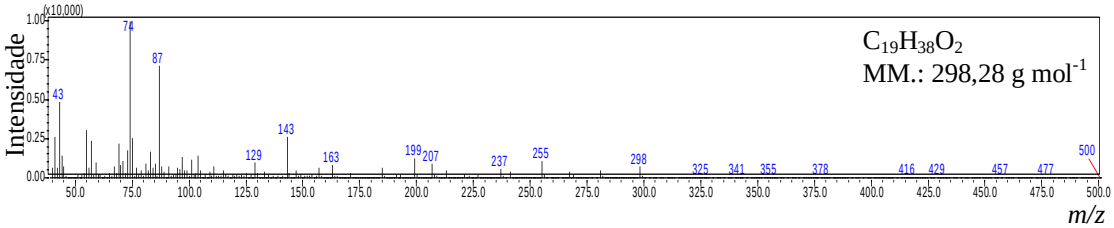
- M_2: butirato de fenetilo



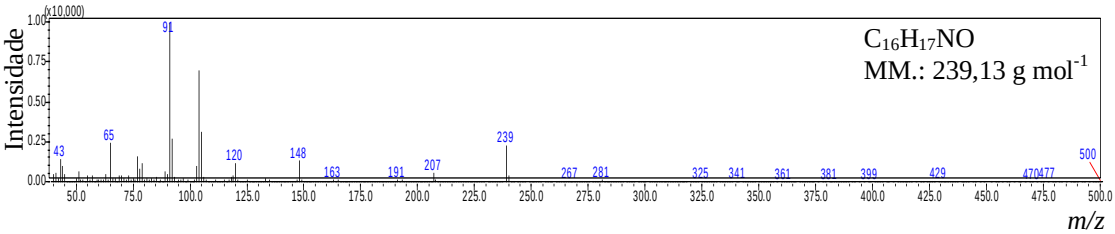
- M_3: ciclo-(Pro-Leu)



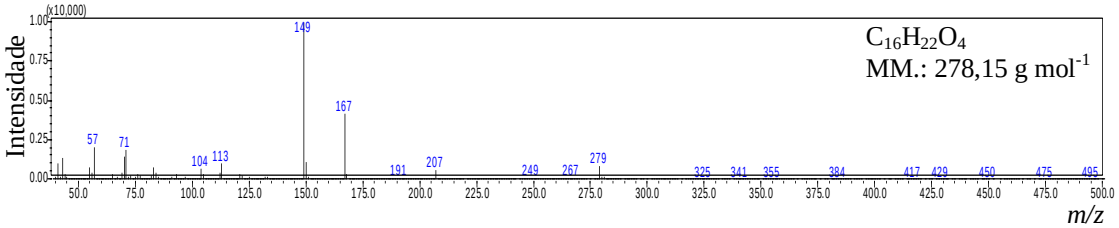
- M_4: estearato de metila



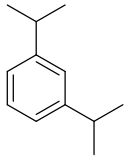
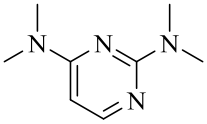
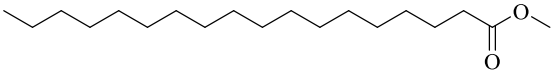
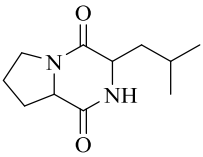
- M_5: 2-(fenetilamino)-1-feniletan-1-ona



- M_6: ácido 2-(((2-etil-hexil)oxi)carbonil)benzoico

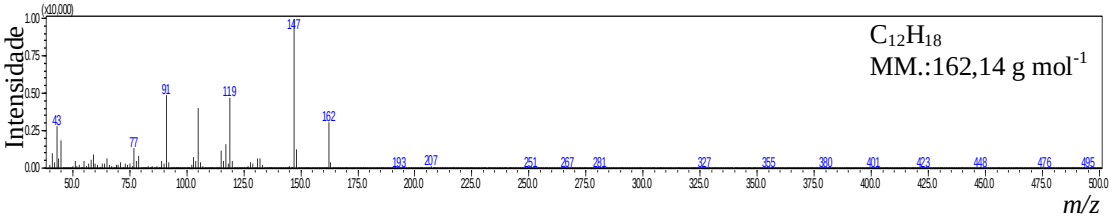


APÊNDICE C - Metabólitos identificados no extrato da reação da bactéria *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) na presença do Fipronil.

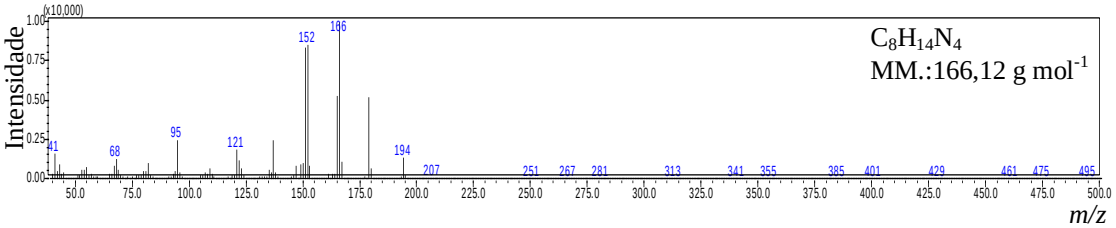
Código	Estrutura	Similaridade (%)	Biblioteca	Tempo de retenção (minutos)
Hc_1	 1,3-diisopropilbenzeno	90	NIST 05	7,1
Hc_2	1,4-diisopropilbenzeno	92	NIST 05	7,7
M_1	 N^2,N^2,N^4,N^4-tetrametilpirimidina-2,4-diamina	73	Wiley8	16,3
M_2	 estearato de metila	88	Wiley8	19,8
M_3	 ciclo-(Pro-Leu)	82	Wiley8	20,8

Espectros de massas dos metabólitos identificados no extrato da reação da bactéria *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) na presença do Fipronil.

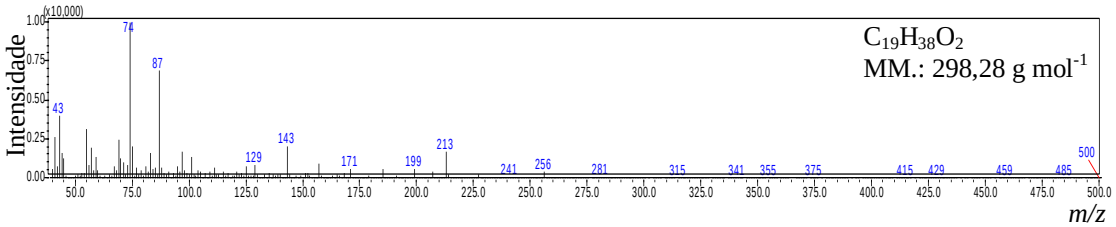
- Hc_1 e Hc_2: 1,3-diisopropilbenzeno e 1,4-diisopropilbenzeno



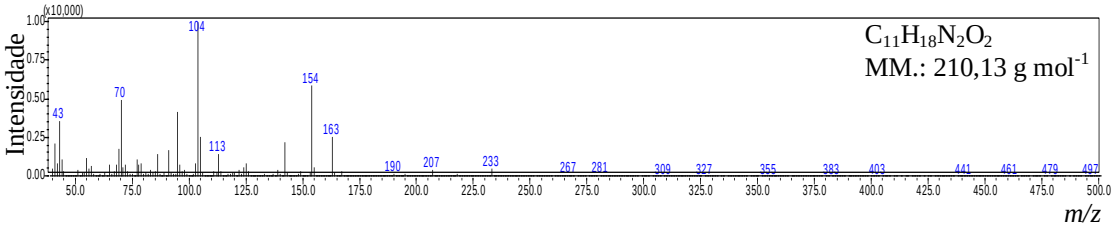
- M_1: N^2,N^2,N^4,N^4-tetrametilpirimidina-2,4-diamina



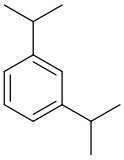
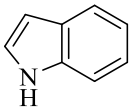
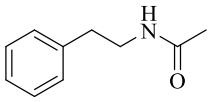
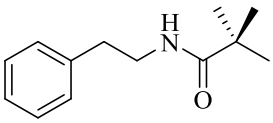
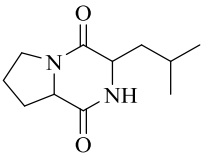
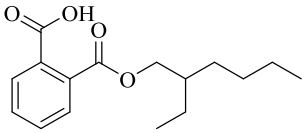
- M_2: estearato de metila



- M_3: ciclo-(Pro-Leu)

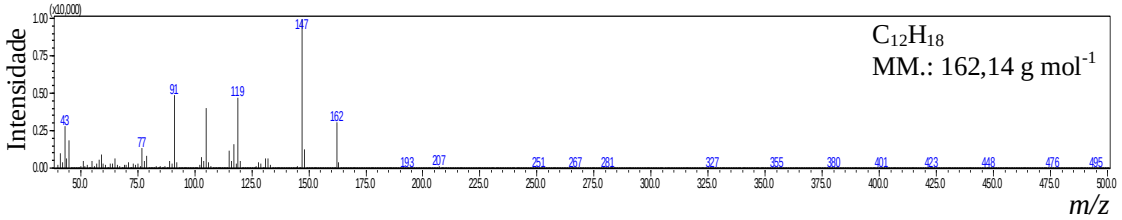


APÊNDICE D - Metabólitos identificados no extrato da reação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF2C) na presença do Fipronil.

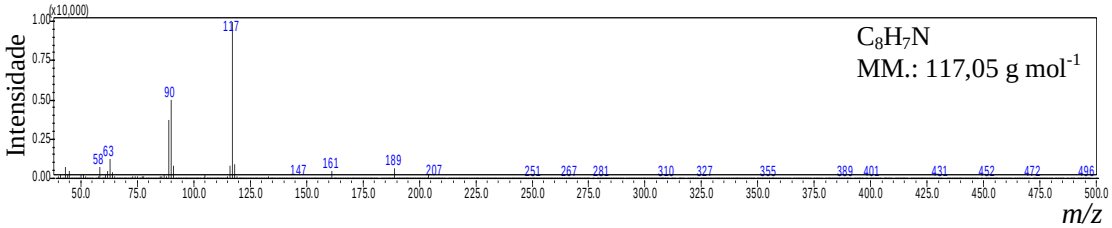
Código	Estrutura	Similaridade (%)	Biblioteca	Tempo de retenção (minutos)
Hc_1	 1,3-diisopropilbenzeno	90	NIST 05	7,1
Hc_2	1,4-diisopropilbenzeno	92	NIST 05	7,7
M_1	 1*H*-indol	73	Wiley8	16,3
M_2	 *N*-fenetilacetamida	88	Wiley8	19,8
M_3	 *N*-fenetil pivalamida	82	Wiley8	20,8
M_4	 ciclo-(Pro-Leu)	69	Nist05	22,8
M_5	 ácido 2-(((2-etil-hexil)oxi)carbonil)benzóico	89	Nist05	24,2, 31,0

Espectros de massas dos metabólitos identificados no extrato da reação da bactéria *B. psudomycoides* (4RF2C) na presença do Fipronil.

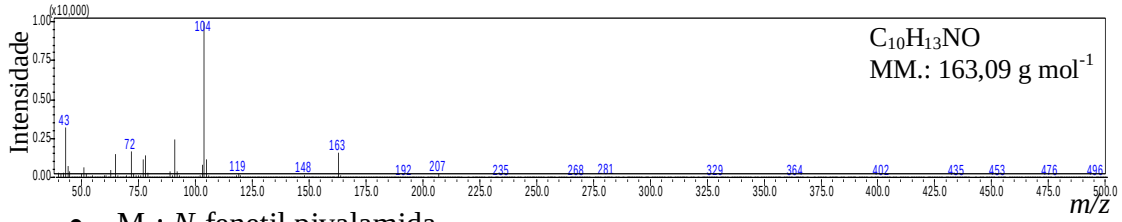
- Hc_1 e Hc_2: 1,3-diisopropilbenzeno e 1,4-diisopropilbenzeno



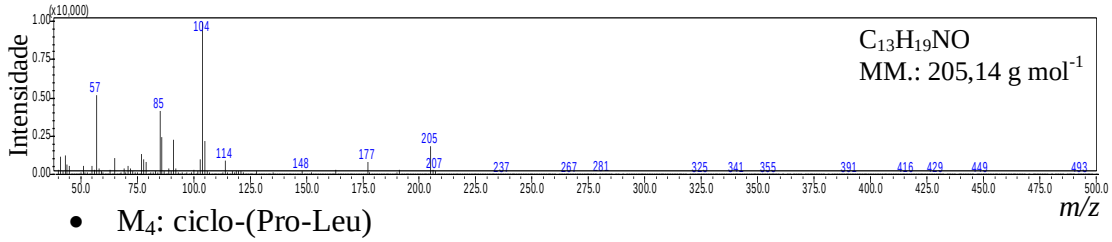
- M_1: 1*H*-indol



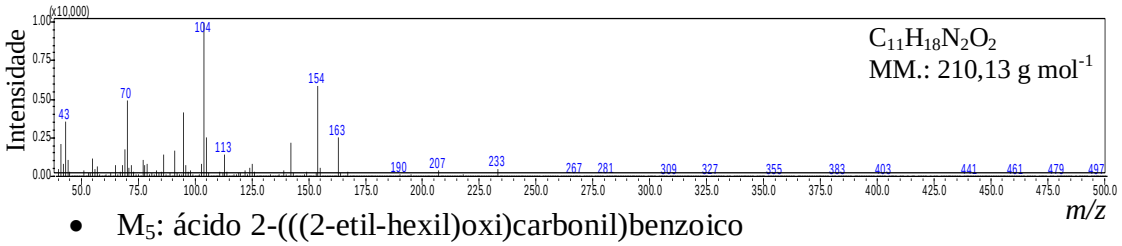
- M_2: *N*-fenetilacetamida



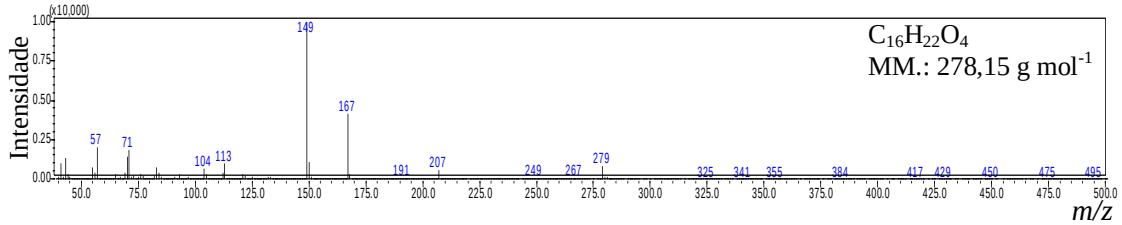
- M_3: *N*-fenetil pivalamida



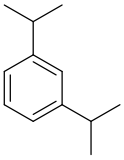
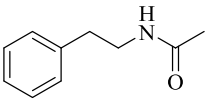
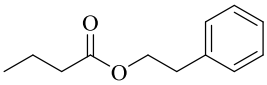
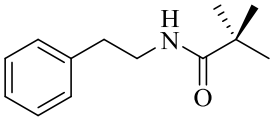
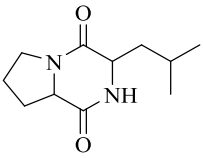
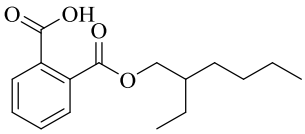
- M_4: ciclo-(Pro-Leu)



- M_5: ácido 2-(((2-etil-hexil)oxi)carbonil)benzoico

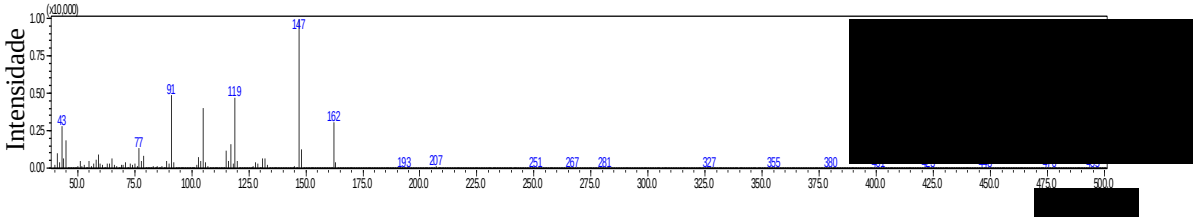


APÊNDICE E - Metabólitos identificados no extrato da reação da bactéria *B. pseudomycoides* (4RF1C) na presença do Fipronil.

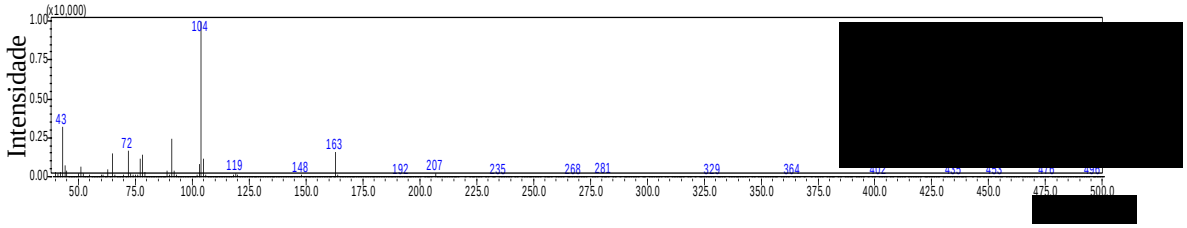
Código	Estrutura	Similaridade (%)	Biblioteca	Tempo de retenção (minutos)
Hc_1	 1,3-diisopropilbenzeno	90	NIST 05s	7,1
Hc_2	1,4-diisopropilbenzeno	91	NIST 05 s	7,7
M_1	 *N*-fenetilacetamida	92	Nist05	15,2
M_2	 butirato de fenetilo	81	Nist05s	17,0
M_3	 *N*-fenetil pivalamida	84	Nist05	19,0
M_4	 ciclo-(Pro-Leu)	75	Nist05	22,8
M_5	 ácido 2-(((2-etil-hexil)oxi)carbonil)benzoico	76	Nist05	24,4

Espectros de massas dos metabólitos identificados no extrato da reação da bactéria *B. psudomycoides* (4RF1C) na presença do Fipronil.

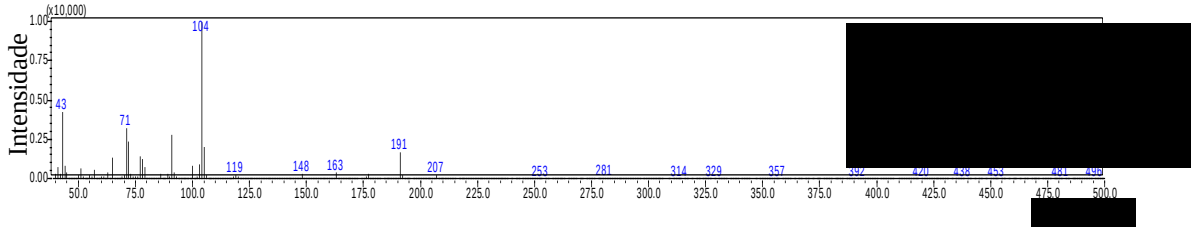
- Hc_1 e Hc_2: 1,3-diisopropilbenzeno e 1,4-diisopropilbenzeno



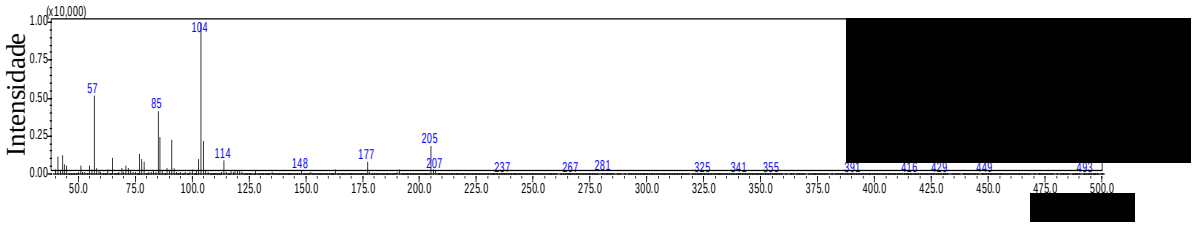
- M_1: *N*-fenetilacetamida



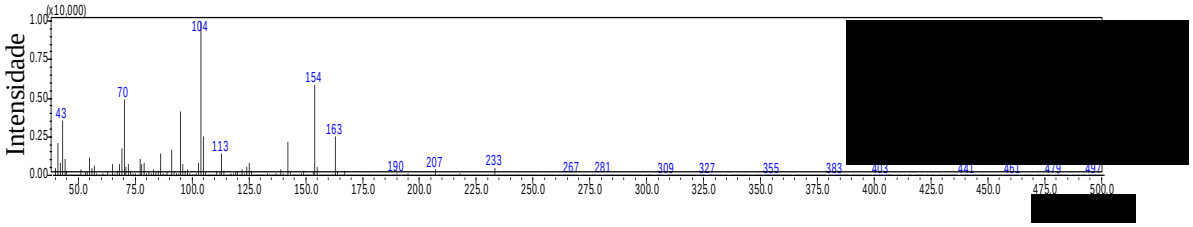
- M_2: butirato de fenetilo



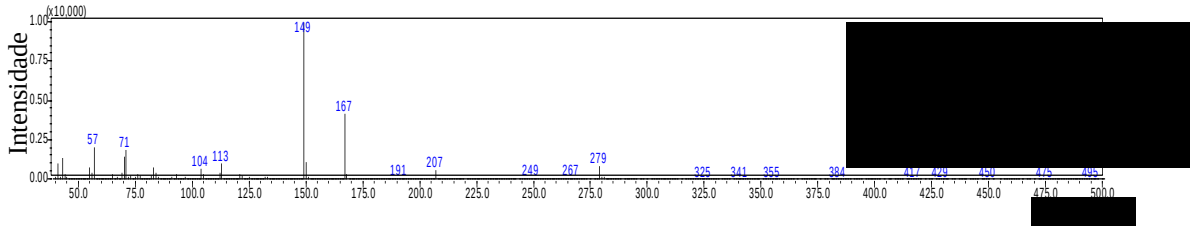
- M_3: *N*-fenetil pivalamida



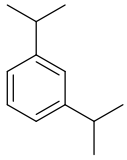
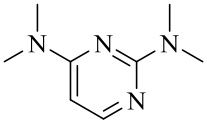
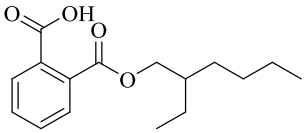
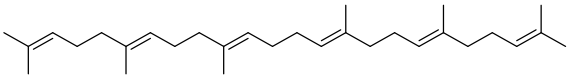
- M_4: ciclo-(Pro-Leu)



- M_5: ácido 2-(((2-etil-hexil)oxi)carbonil)benzoico

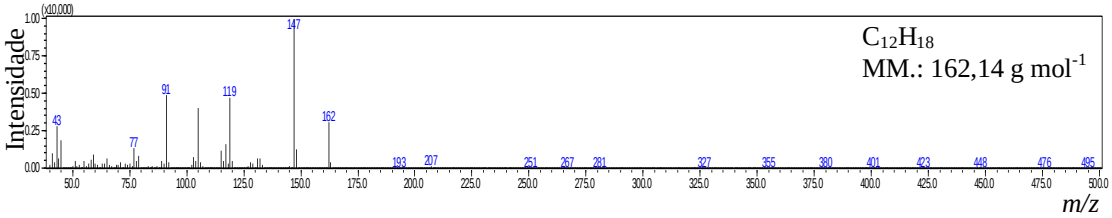


APÊNDICE F - Metabólitos identificados no extrato da reação da bactéria *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) na ausência do Fipronil.

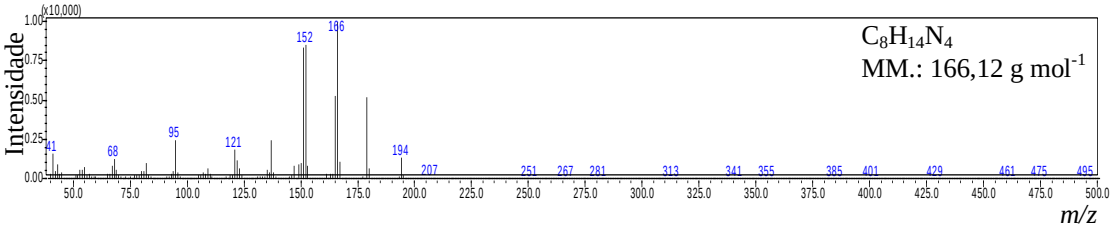
Código	Estrutura	Similaridade (%)	Biblioteca	Tempo de retenção (minutos)
Hc_1	 1,3-diisopropilbenzeno	91	Nist 05 s	7,1
Hc_2	1,4-diisopropilbenzeno	93	Nist 05 s	7,7
M_1	 N^2,N^2,N^4,N^4-tetrametilpirimidina-2,4-diamina	73	Wiley8	16,3
M_2	 ácido 2-(((2-etil-hexil)oxi)carbonil)benzóico	89	Nist 05	31,0
M_3	 esqualeno	92	Nist 05s	34,4

Espectros de massas dos metabólitos identificados no extrato da reação da bactéria *B. safensis/ B. pumilus* (2RF1C) na ausência da Bifentrina.

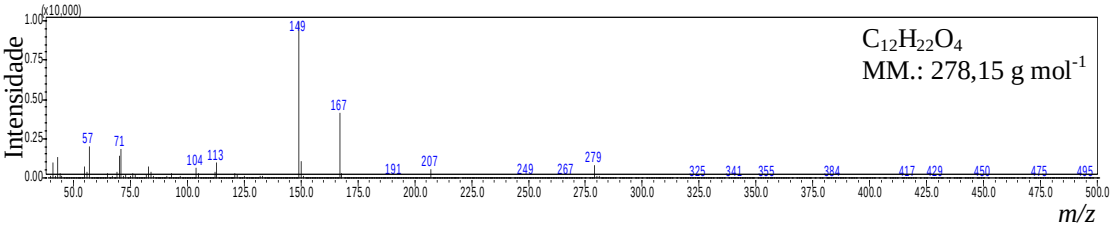
- Hc_1 e Hc_2: 1,3-diisopropilbenzeno e 1,4-diisopropilbenzeno



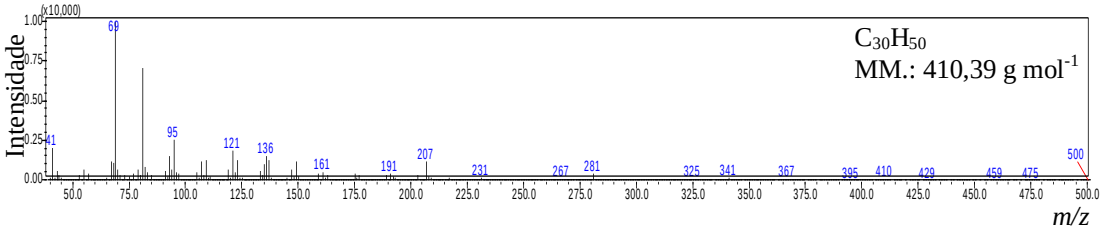
- M_1: N^2,N^2,N^4,N^4-tetrametilpirimidina-2,4-diamina



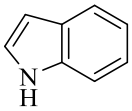
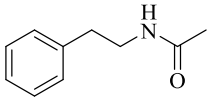
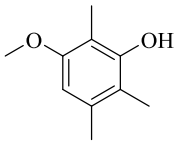
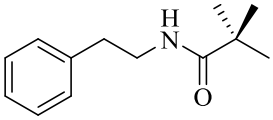
- M_2: ácido 2-(((2-etil-hexil)oxi)carbonil)benzoico



- Hc_1: esqualeno

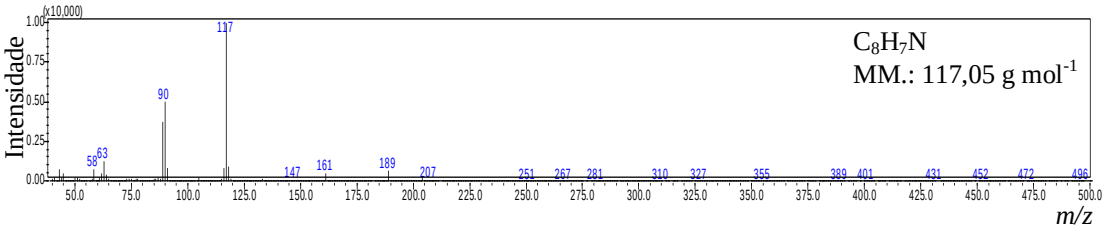


APÊNDICE G - Metabólitos identificados no extrato da reação da bactéria *B. pseudomycoides* (3RF2C) na ausência do Fipronil.

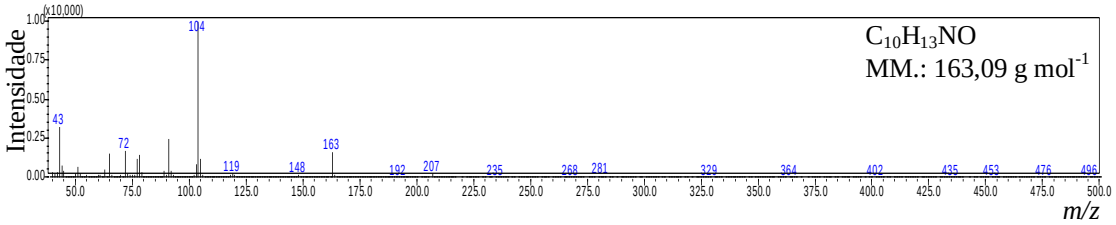
Código	Estrutura	Similaridade (%)	Biblioteca	Tempo de retenção (minutos)
M_1	 1*H*-indol	93	Wiley 8	10,6
M_2	 *N*-fenetilacetamida	93	Nist 107	15,0
M_3	 3-metoxi-2,5,6-trimetilfenol	70	Wiley 8	16,4
M_4	 *N*-fenetil pivalamida	82	Nist 05	18,9

Espectros de massas dos metabólitos identificados no extrato da reação da bactéria *B. psudomycoides* (3RF2C) na ausência do Fipronil.

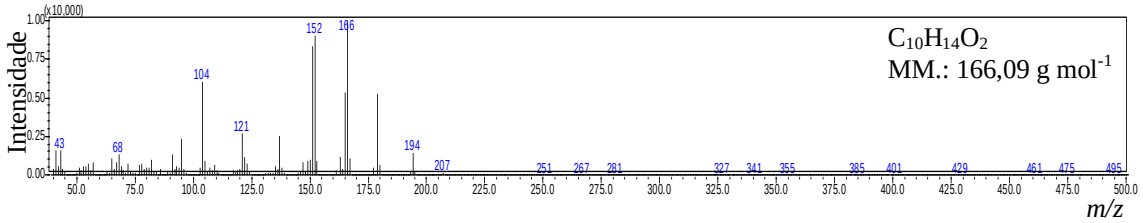
- M_1: 1*H*-indol



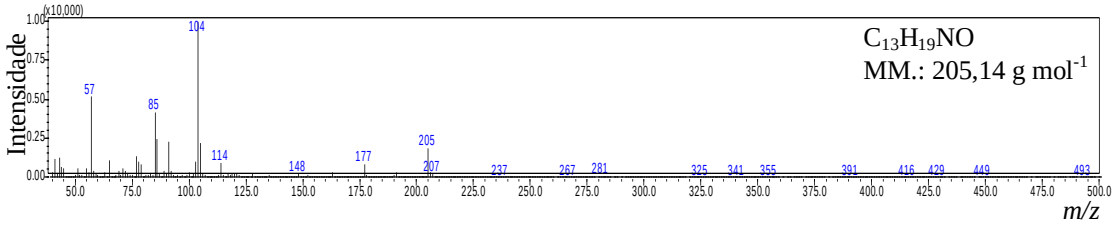
- M_2: *N*-fenetilacetamida



- M_3: 3-metóxi-2,5,6-trimetilfenol

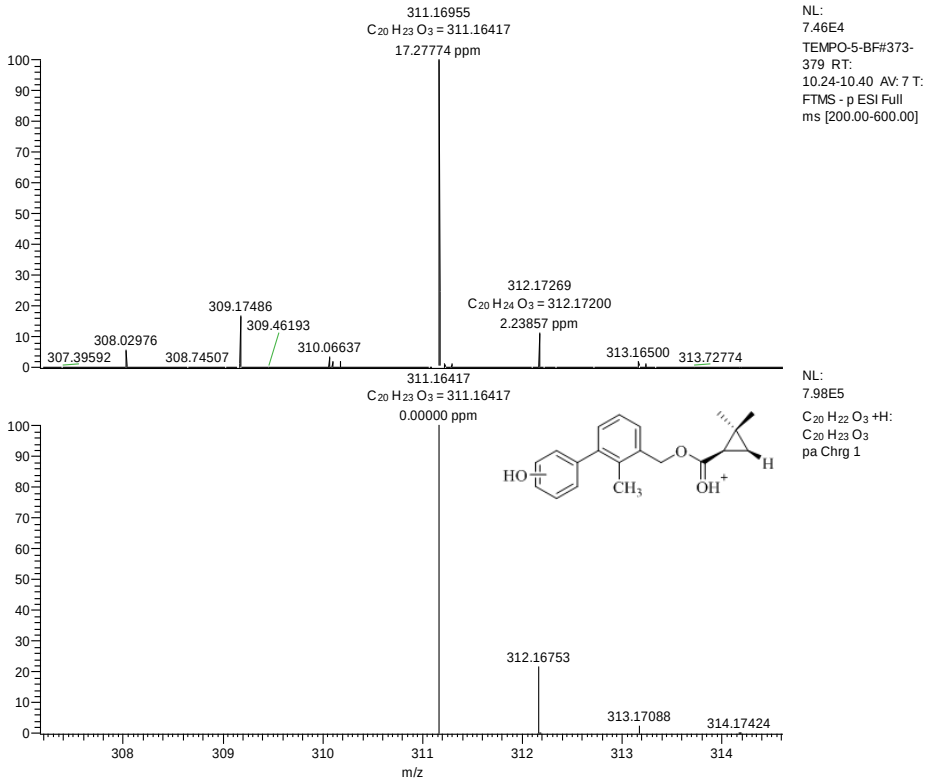


- M_4: *N*-fenetil pivalamida

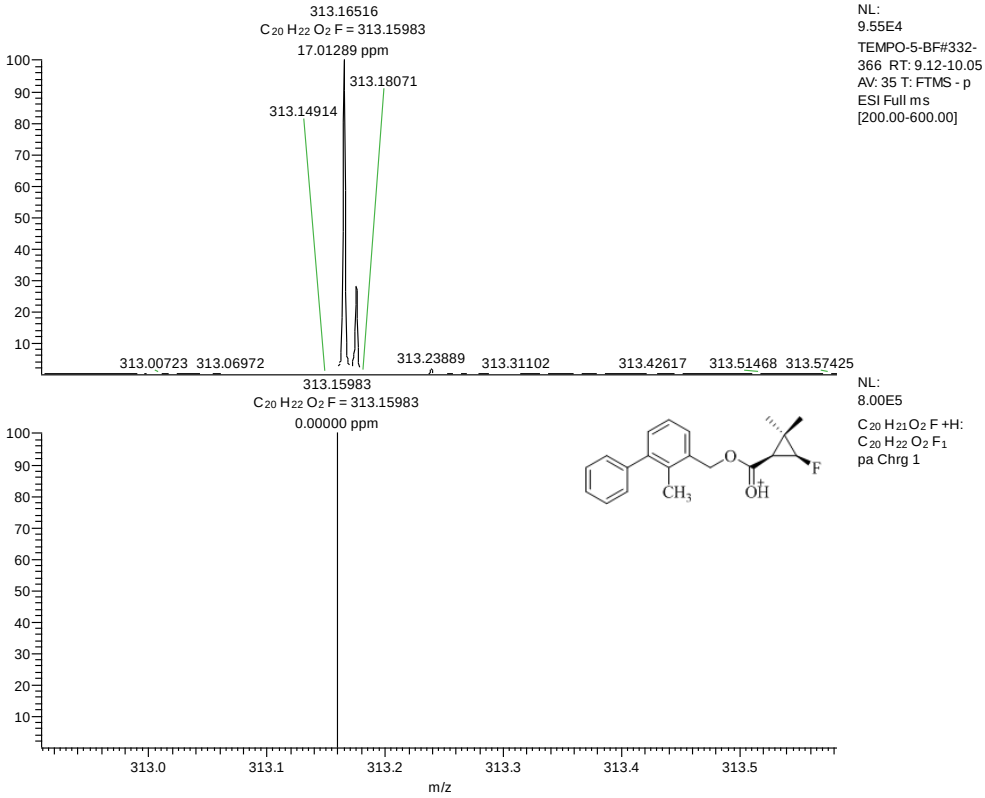


APÊNDICE H – Espectros de massas das estruturas propostas

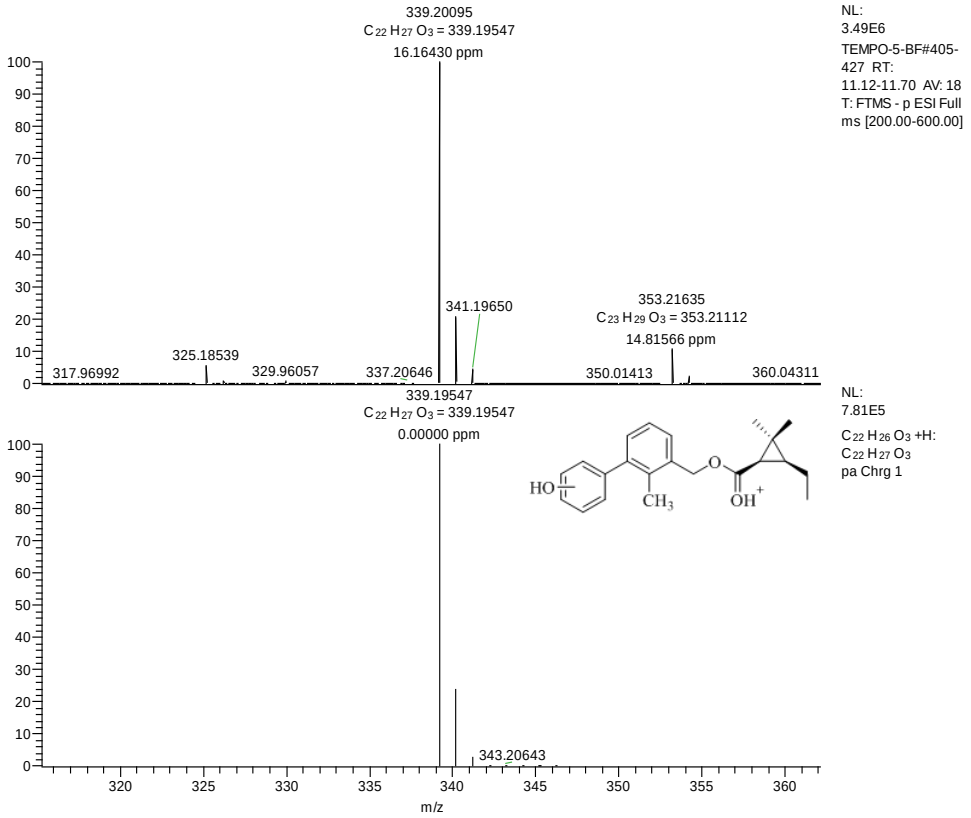
- Espectro de massas da estrutura 1.



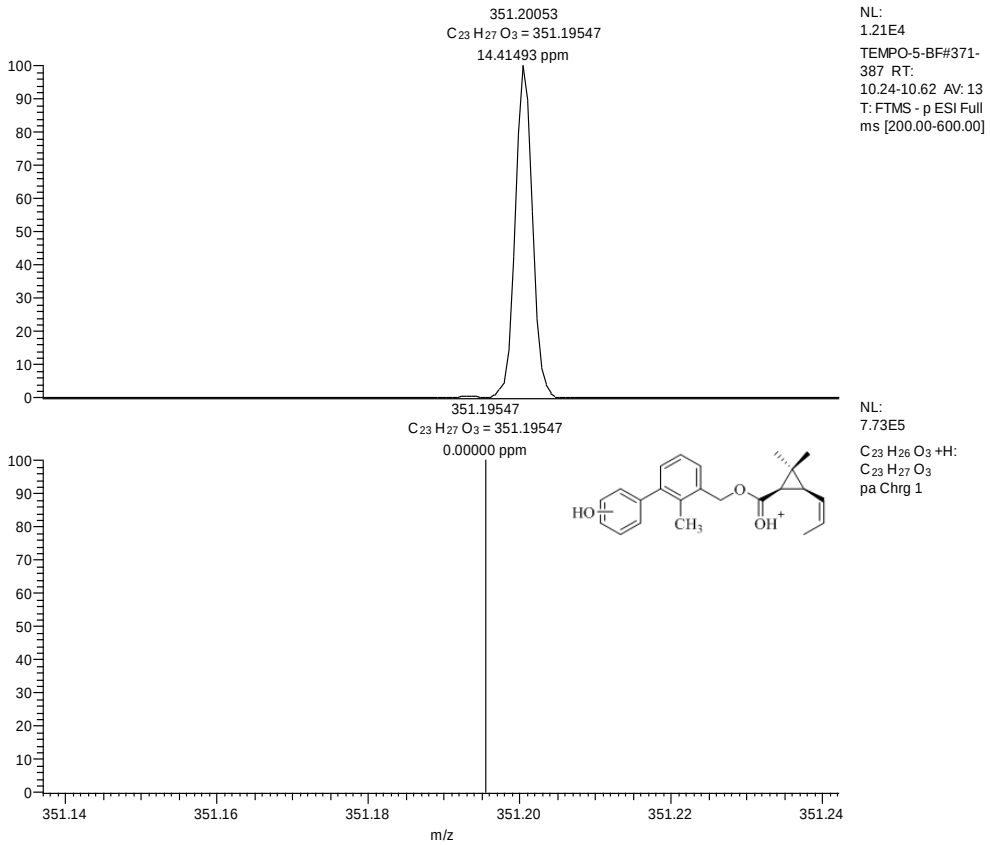
- Espectro de massas da estrutura 2.



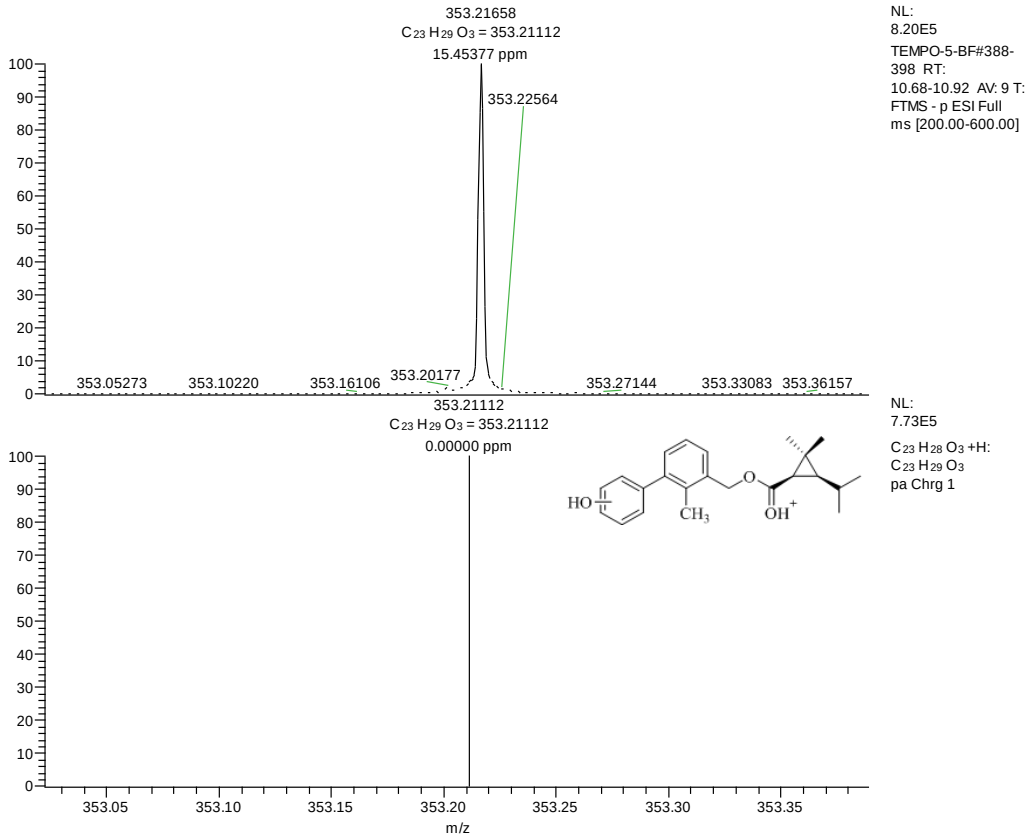
- Espectro de massas da estrutura 3.



Espectro de massas da estrutura 4.



- Espectro de massas da estrutura 5.



Condições de análise: UPLC-HRMS com coluna C_{18} (150 mm x 4,6 mm; 5 µm) ODS, modo de eluição gradiente 20-80% acetonitrila e acetato de amônio em 27 min, com vazão de 0,3 mL min^{-1}.