

KARINA OTA OLIVEIRA

Avaliação do potencial biotecnológico de micro-organismos da biodiversidade brasileira: biodegradação de herbicidas benzonitrilados

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof^a. Dra. Cíntia Duarte de Freitas Milagre

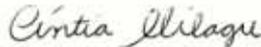
Araraquara
2015

KARINA OTA OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Química.

Araraquara, 26 de fevereiro de 2015.

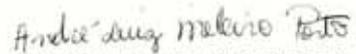
BANCA EXAMINADORA



Profª. Drª. CÍNTIA DUARTE DE FREITAS MILAGRE (Orientadora)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara.



Profª. Drª. DULCE HELENA SIQUEIRA SILVA
Instituto de Química / UNESP / Araraquara.



Prof. Dr. ANDRÉ LUIS MELEIRO PORTO
Instituto de Química / USP / São Carlos.

Dados Pessoais

Endereço: Av. Alberto Toloi, 185.
Apto 34, Bloco 02
Bairro: Quitandinha
Cidade: Araraquara-SP
CEP: 14800-105
Data de nascimento: 10/01/1990
Estado civil: solteira

Formação Acadêmica

Mestrado em Química (área de concentração: Química Orgânica)

Universidade Estadual Paulista - UNESP - Instituto de Química - Araraquara - SP

Projeto: Avaliação do potencial biotecnológico de micro-organismos da biodiversidade brasileira: biodegradação de herbicidas benzonitrilados

Descrição: Prospecção de micro-organismos da biodiversidade brasileira quanto à presença de enzimas conversoras de nitrilas, mais especificamente nitrilases (Nase), nitrila-hidratases (NHase), amidases e as hidroxinitrila liases (HNL) para aplicação das mesmas na biodegradação de herbicidas benzonitrilados tóxicos de uso regulamentado no Brasil.

Início: 07/2013 Término: 02/2015

Graduação em Farmácia

Universidade Paulista (UNIP) - São José Rio Preto - SP
Início: 01/2008 Término: 12/2012

Técnico em Química

Escola Técnica Estadual Elias Nechar - Catanduva-SP
Início: 06/2006 Término: 12/2007

Experiência profissional

Estágio Tecnológico de Desenvolvimento Industrial

Universidade Estadual Paulista UNESP - Instituto de Química - Araraquara - SP

Projeto: Avaliação do potencial biotecnológico de leveduras isoladas de substratos diversos, especialmente de insetos e seus recursos nutricionais. Bolsista CNPq DTI-3.

Início: 01/2013 Término: 10/2014

Analista do Laboratório de Desenvolvimento

Mustang Pluron Química LTDA - Catanduva - SP.

Descrição de Cargo: desenvolvimento de novos produtos e melhoria de formulação, testes de aplicação e testes de estabilidade, co-gestora da Assessoria da Qualidade pela ISO 9001 (abertura de relatório de Ação Preventiva, Não Conformidade e Ação Corretiva), co-gestora do Desenvolvimento pela ISO 9001, auxiliar administrativo em requisito regulamentar de produtos cosméticos e saneantes.

Início: 01/2010 Término: 12/2012

Auxiliar de laboratório

Usina Cerradinho - Catanduva - SP

Descrição de Cargo: análises de controle de Qualidade do processo de fabricação de açúcar e álcool. E na entressafra: Ordem de serviços da Mecânica, restauração e pintura de bombas helicoidais e centrífugas.

Início: 04/2008 Término: 01/2010

Estágio em técnico de Química

Mustang Pluron Química LTDA - Catanduva - SP.

Descrição de Cargo: controle de qualidade de produtos saneantes e cosméticos.

Início: 07/2007 Término: 02/08/07

Cursos e Atividades Complementares

2014 - **34ª Escola de Verão em Química** Prof. José Tércio B. Ferreira, "Organocatalysis: Concepts and Applications", Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos - SP.

2013 - **Advanced School on Bioorganic Chemistry**, Universidade Estadual Paulista UNESP, Instituto de Química, Araraquara - SP.

2012 - **Análises de Certificados de Calibração e Medição**, Soluções Metrológicas Integradas, Catanduva - SP.

2012 - **Preparatório de Analista de Laboratório de Microbiologia Industrial**, intensivo, CEP CURSOS, São Paulo- SP.

2012 - **Gestão de Materiais e Qualificação de Fornecedor**, FATEC, Catanduva - SP.

2012 - **Interpretação e Aplicação da norma ABNT - NBR 14725 - Classificação GHS, rotulagem e FISPQ**, INTERTOX, São Paulo - SP.

2012 - **Boas Práticas de Fabricação e Controle para indústria de produtos de Limpeza**, ABIPLA/SIPLA, São Paulo - SP.

2011 - **Curso H&C de Tecnologia em produtos de limpeza, Household & Cosméticos e Freedom**, São Paulo - SP.

2011 - **Química Verde**, Sinquisp e CRQ, São Paulo - SP.

2011 - **Treinamento em Engenharia de Tratamento de Águas Industriais**, Mustang Pluron Química e Engenheiro Plínio Pontes de Oliveira, Catanduva - SP.

2011 - **Gerenciando Erros Humanos em Operações Químicas**, Minicursos CRQ - IV, São Paulo - SP.
2011 - **Estabilidade Química de Produtos Cosméticos e Saneantes**, Minicursos CRQ - IV, São Paulo - SP.
2011 - **Formação de Auditor interno ISO 9001:2008, com base na NBR ISSO 19011**, Fundação Vanzoline, São Paulo - SP.
2010 - **Aspectos fundamentais sobre regularização, lançamento e qualidade de produtos saneantes**, Minicursos CRQ - IV- Araraquara- SP.
2010 - **Aplicação das Ferramentas da Qualidade na Indústria de Cosméticos**, Minicursos CRQ - IV, São Paulo - SP.
2010 - **Técnicas de Aplicação de Injetáveis**, Associação Farmacêuticos Riopretense (CRF), Rio Preto - SP.
2009 - **Controle das perdas industriais e fermentação**, Fermentec, Piracicaba- SP

Trabalhos apresentados em eventos científicos

2015 - **38ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - SBQ:**
Karina O. Oliveira, Cintia D. F. Milagre, “Biodegradação de herbicidas benzonitrilados” (trabalho submetido).
2014 - **VII Workshop on Biocatalysis and Biotransformations – Búzios /RJ:**
Luna S. Santos, Karina O. Oliveira, Cintia D. F. Milagre, “Enzymatic one-pot three component synthesis of 4-thiazolidinone in non-aqueous solvent”. **“Poster premiado”**
2013 - **Biotrans - Manchester/Inglaterra:**
Bruno S. Amaral, Karina O. Oliveira, Cintia D. F. Milagre, “Synthesis of alkyl and aryl α -substituted amides catalyzed by nitrile hydratases”.

Experiência internacional

1994 – 1998 e 2001- 2002
Japão, Ueda - Shi
Morei e estudei no Japão por 5 anos, tive a minha educação em uma cultura de organização, disciplina e tradição. Adquiri experiência de vida e aprendi a conviver com as diversidades.

Trabalho Social

Professora de Informática

Paróquia São Judas Tadeu, Catanduva-SP.

Início: 01/2006 Término: 01/ 2007

Dedico este trabalho inteiramente à minha família:
À minha irmã, Fabíola, pelo apoio e companheirismo;
Aos meus pais, que sempre estiveram comigo, me motivando;
E ao meu irmão, Mateus, meu xodó.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas oportunidades, pela fé e a esperança de um dia melhor.

Aos meus pais, Marina e Wilson, que me apoiaram e sempre me acolheram. À minha irmã gêmea, Fabíola, por estar comigo sempre e por compartilhar as minhas alegrias, conquistas, preocupações, enfrentando comigo todos os obstáculos dessa caminhada. Ao meu irmão Mateus, por ser o meu companheiro e amigo. Amo muito vocês.

À toda minha família, avós, tios e tias.

À Prof^ª. Dra. Cintia de Freitas Milagre, pela oportunidade, orientação, paciência e dedicação durante esse mestrado.

Ao Professor Humberto Milagre, pela atenção, ajuda e orientação.

Aos meus amigos que me apoiaram e me ajudaram a seguir em frente: Sr. Ribeiro, Eliane, Yuri, Gabriela, Mariana, Vanessa, Fernando, Samuel, Laura, Guilherme, Jaqueline, Samara, Daniel, Tais, e entre outros. Em especial ao Bruno que me apresentou a Professora Cíntia e foi um grande companheiro durante esse mestrado.

Aos amigos do Grupo Milagre, pelas discussões científicas e pela ajuda: Bruno, Luna, Raquel, Beatriz, Veridiana, Ana, Carol, Milena e João.

Ao Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca do CEIS (Centro de Estudo de Insetos Sociais) da UNESP de Rio Claro, por disponibilizar alguns micro-organismos utilizados nesse trabalho.

Ao grupo de Eletroquímica de Araraquara, em especial à Dra. Bianca Ferreira da Silva, pela ajuda com as análises no HPLC-MS/MS e pelo apoio.

Aos funcionários do IQ-UNESP, da biblioteca, técnicos, seção de pós-graduação pela ajuda e dedicação.

Ao CNPq pela bolsa de estudos (384996/2012-4), à FAPESP pelo apoio financeiro (processo 2010/02305-5) e ao Portal de Periódicos, CAPES.

“Prudência, Paciência e Persistência.”

Ribeiro Antonio Claudinei.

RESUMO

A biocatálise consiste no uso de enzimas (microbianas, vegetais ou animais) para catalisar transformações químicas, principalmente em compostos orgânicos. Em geral, as reações enzimáticas apresentam muitos atrativos quando comparadas às respectivas versões químicas clássicas, por utilizarem catalisadores potencialmente quimio-, regio- e estereosseletivos, biodegradáveis, oriundos de fontes renováveis que requerem condições brandas de reação (pH, temperatura e pressão) e solventes ambientalmente amigáveis (água, fluidos supercríticos, líquidos iônicos). Por isso, e associado às pressões de cunho sócio-econômico-ambiental sofridas pelas indústrias para a utilização de processos sustentáveis e mais eficientes, a busca por novos biocatalisadores tem aumentado consideravelmente. As enzimas envolvidas na conversão de nitrilas estão entre as mais utilizadas industrialmente. Além de seu valor sintético, estas enzimas exercem um papel fundamental em termos de proteção ambiental, pois têm sido empregadas com sucesso na biodegradação e biorremediação de áreas contaminadas com organonitrilas de origem antropogênica. Assim, neste trabalho realizou-se a prospecção de micro-organismos da biodiversidade brasileira quanto à presença de enzimas envolvidas no metabolismo de nitrilas, mais especificamente nitrilases (Nase), nitrila-hidratases (NHase), amidases e as hidroxinitrila liases (HNLase) através de ensaios colorimétricos. Nesse estudo foram encontrados 1 hit positivo para nitrila-hidratase/amidase, 8 para nitrilases e 3 micro-organismos com sistema enzimático indefinido dentre 29 micro-organismos analisados. Para a enzima hidroxinitrila liase, foram avaliados 76 micro-organismos e foram encontrados 27 hits positivos. Estes resultados foram confirmados por técnicas cromatográficas e espectrométricas. Os micro-organismos positivos das triagens colorimétricas foram aplicados no estudo de biodegradação do herbicida Totril[®]. As reações do estudo de biodegradação do herbicida Totril[®] foram acompanhadas por HPLC-MS/MS onde foram encontrados 5 produtos de biodegradação (ácido-3,5-di-iodo-4-hidroxibenzoico, ácido-3-iodo-4-hidroxibenzoico, 2,6-di-iodo fenol, 3,5-di-iodo-4-hidroxibenzonitrila e 3,5-di-iodo-4-hidroxibenzamida). Dentre esses 5 produtos de biodegradação, o 2,6-di-iodo fenol e o ácido-3-iodo-4-hidroxibenzoico, são produtos que não foram ainda relatados na literatura.

Palavras-chave: Biocatálise, nitrilases (Nase), nitrila-hidratases (NHase), amidases, hidroxinitrila liases (HNLase), ioxinil, octanoato de ioxinila, herbicida.

ABSTRACT

Biocatalysis is the use of enzymes (microbial, plant or animal) to catalyze chemical transformations, primarily of organic compounds. Generally, enzymatic reactions are much more attractive than the classical chemical alternatives, as they use catalysts that are potentially chemo-, region- and stereoselective, biodegradable, which come from renewable sources and that require mild reaction conditions in terms of pH, temperature and pressure and the use of environmentally friendly solvents (water, supercritical fluids, ionic liquids). Therefore and associated to the socioeconomic and environmental pressures exerted on industries to use sustainable and more efficient processes, the search for new biocatalysts has increased considerably. Nitriles converting enzymes are among the most widely ones used industrially. In addition to their synthetic value, these enzymes play a key role in protecting the environment as they have been successfully used in the biodegradation and bioremediation of areas contaminated by man-made organic nitriles. Thus, herein we intend to investigate microorganisms from Brazilian biodiversity in terms of enzymes involved in the metabolism of nitriles, more specifically nitrilases (Nase), nitrile hydratase (NHase), amidases and hydroxynitrile lyase (HNLase) through colorimetric assays. It was found 1 positive hit for nitrile hydratase/amidase, 8 for nitrilases and 3 microorganisms with undefined enzymatic system within the 29 evaluated microorganisms. Regarding the enzyme hydroxynitrile lyase, 76 microorganisms were evaluated and 27 positive hits were found. Those colorimetric assays were confirmed through chromatographic and spectrometrically techniques. The positive hits found in the colorimetric assay were applied in the study of biodegradation of Totril[®] herbicide. These reactions were monitored by HPLC-MS/MS and there were found 5 biodegradation products (3,5-diiodo-4-hydroxybenzoic acid, 3-iodo-4-hydroxybenzoic acid, 2,6-diiodophenol, 3,5-diiodo-4-hydroxybenzoxynitrile and 3,5-diiodo-4-hydroxybenzamide). Within these 5 products of biodegradation, 2,6-diiodophenol and 3-iodo-4-hydroxybenzoic acid haven't been reported in the literature yet.

Keywords: Biocatalysis, nitrilases (Nase), nitrile hydratase (NHase), amidases, hydroxynitrile lyase (HNLase), ioxynil, ioxynil octanoate, herbicide.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Vendas dos agrotóxicos entre 2010 e 2011 no Brasil. 28
- Figura 2**- Fórmula estrutural dos herbicida octanoato de ioxinila (**6**) e ioxinil (**7**). 31
- Figura 4** - Visão geral da estrutura tridimensional da HNLase. 42
- Figura 5** - a) Monitoramento das reações de conversão da mandelonitrila em benzaldeído e cianeto; b) respectivos controles microbianos e c) experimentos com os controles positivos dos produtos (apenas cianeto e cianeto/benzaldeído) nas concentrações usadas para o preparo da curva analítica. 44
- Figura 6** - Cromatogramas de GC-FID de: (a) reação de biocatálise, (b) experimento controle do substrato, (c) controle microbiano N2PVF3, (d) padrão comercial de mandelonitrila, (e) padrão comercial de álcool benzílico e (f) padrão comercial de benzaldeído. 46
- Figura 7** - Esquema de um HPLC – MS/MS: 1 pequenas gotículas de solvente e analito carregados negativamente, 2 essas gotículas são evaporadas, 3 até que se formam íons isolados e são transferidos para os analisadores de massas. 54
- Figura 8** - Monitoramento da biodegradação do octanoato de ioxinila (Totril[®]). 57
- Figura 9**- Monitoramento dos produtos de biodegradação da reação com MLH 60. 62
- Figura 10** - Monitoramento dos produtos de biodegradação da reação com MLH 31. 64
- Figura 11** - Monitoramento dos produtos de biodegradação da reação com MLH 54. 65
- Figura 12** - Monitoramento dos produtos de biodegradação da reação com MLH 61. 66

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Diversidades estruturais acessíveis através da manipulação de nitrilas. R e R' representam quaisquer grupos alquil ou aril.	19
Esquema 2 - Rotas enzimáticas envolvidas no metabolismo de nitrilas. Destacam-se em azul as enzimas de interesse deste projeto.	20
Esquema 3 - Reação catalisada pela Hidroxinitrila liase.	21
Esquema 4 - Proposta mecanística da reação catalisada pela hidroxinitrila liase.	22
Esquema 5 - Síntese da (<i>R</i>)-pantolactona a partir de uma cianidrina quiral catalisada pela HNLase.	22
Esquema 6 - Reação catalisada pela Nitrilase.	23
Esquema 7 - Proposta mecanística da reação de hidrólise de nitrilas por nitrilases.	24
Esquema 8 - Esquema retrossintético para a obtenção do Cefaclor a partir da resolução cinética da (\pm) mandelonitrila.	24
Esquema 9 - Reação catalisada pela Nitrila-hidratase.	25
Esquema 10 - Proposta mecanística para a reação de hidrólise da nitrila catalisada pela NHase.	25
Esquema 11 - Esquema sintético da obtenção da acrilamida a partir da acrilonitrila.	26
Esquema 12 - Reação catalisada pela Amidase.	26
Esquema 13 - Proposta da reação catalisada por amidases.	27
Esquema 14 - Análise retrossintética para a obtenção da (<i>S</i>)-2,2-dimetil ciclopropano carboxiamida, a partir da (\pm)-2,2-dimetil ciclopropano carboxiamida.	27
Esquema 15 - Reações monitoradas nos ensaios enzimáticos.	31
Esquema 16 - Reação catalisada pela enzima HNLase.	42
Esquema 17 - Reações envolvidas no ensaio colorimétrico para a enzima HNLase.	43
Esquema 18 - Reações enzimáticas em cascata para formação do álcool benzílico a partir da mandelonitrila cujas enzimas envolvidas são hidroxinitrila liase (HNLase) e oxi-redutase.	47
Esquema 19 - Reação catalisada pelas enzimas NHase, Amidase e Nitrilase e visão geral da estrutura tridimensional das mesmas.	48
Esquema 20 - Biotransformação do Ioxinil catalisada pelas enzimas nitrilase, nitrila-hidratase e amidase.	48
Esquema 21 - Fragmentação do octanoato de ioxinila na fonte de ionização no MS/MS e a sua síntese do a partir do ioxinil.	57

Esquema 22 - Ação das enzimas sugeridas e seus respectivos produtos de biodegradação. 60

Esquema 23 - Produtos *m/z* 263, 345, 388 e 389 formados a partir do produto de biodegradação *m/z* 370. 63

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Fluxograma para as triagens enzimáticas para atividade HNLase em microplaca	37
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Herbicidas benzonitrilados Diclobenil, Bromoxinil e Ioxinil, estruturas e nomes IUPAC.	29
Tabela 2 - Micro-organismos utilizados nos experimentos.	33
Tabela 3 - Resultado da atividade enzimática para HNLase.	45
Tabela 4 - Ensaio enzimático para detecção de nitrilase, nitrila-hidratase e amidase.	50
Tabela 5 - Produtos obtidos na degradação do Totril [®] monitorados por HPLC-MS/MS.	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEIS - Centro de Estudos de Insetos Sociais
GC-FID - Cromatografia em fase gasosa com ionização por detecção em chama
CID - Câmara de colisão
Da - Dalton
DEPA - Dietilfosforamida
DO - Densidade Ótica
EMS - Enhanced Mass Spectra
ESI - Electrospray Ionization
FDA - Food and Drug Administration
HNLase - Hidroxinitrila liase
HPLC-MS/MS - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas
IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry
LIT - Linear Ion Trap
MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MRM - Multiple Reaction Monitoring
MS/MS - Tandem Mass Spectrometry
 m/z - razão massa carga
Nase - Nitrilase
NB - Nutrient Broth
NHase - Nitrila-hidratase
nm - nanômetro
PI - Precursor Ion
Q - Quadrupolo
rpm - rotação por minuto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Processos biotecnológicos	18
1.2 Enzimas envolvidas no metabolismo de nitrilas	19
1.2.1 Hidroxinitrila liase (HNLase)	20
1.2.2 Nitrilases (Nase)	23
1.2.3 Nitrila-hidratases	24
1.2.4 Amidases	26
1.3 Biodegradação de herbicidas	28
2.OBJETIVOS	31
3.PARTE EXPERIMENTAL	32
3.1 Biocatalisadores	32
3.1.1 Armazenamento e preservação dos micro-organismos	34
3.2 Equipamentos	34
3.2.1 Detector de cianeto	34
3.2.2 Incubadora com agitação orbital	34
3.2.3 Centrífuga de bancada	34
3.2.4 Agitador digital	34
3.2.5 Espectrofotômetro multifuncional	34
3.2.6 Espectrofotômetro visível	34
3.2.7 Cromatografia em fase gasosa com ionização por detecção em chama (CG-FID)	35
3.2.8 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (HPLC-MS/MS)	35
3.3 Ensaio enzimático para a triagem de Hidroxinitrila liase	36
3.3.1 Medidas de segurança para o trabalho com cianeto	36
3.3.2 Procedimento para a triagem enzimática	36
3.3.3 Confirmação dos resultados de triagem para Hidroxinitrila liase (HNLase)	38

3.4 Ensaio de triagem enzimática para Nitrila-hidratase (NHase), Nitrilase (Nase) e Amidase	38
3.4.1 Meio de cultura MM2	39
3.5 Estudo de biodegradação do herbicida Totril [®]	39
3.5.1 Meio para indução enzimática	40
PARTE 1: Ensaios de triagens enzimáticas	41
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES DAS TRIAGENS ENZIMÁTICAS	42
4.1 Ensaio enzimático para a triagem de Hidroxinitrila liase	42
4.1.2 Confirmação dos resultados de triagem para Hidroxinitrila liase (HNLase)	46
4.2. Ensaio de triagem enzimática para Nitrila-hidratase, Nitrilase e Amidase	48
4.2.1 Confirmação dos resultados de triagem para Nitrila-hidratase, Nitrilase e Amidase	51
PARTE 2: Estudos de Biodegradação do Totril[®]	53
4.3 RESULTADOS DO ESTUDO DE BIODEGRADAÇÃO	54
4.3.1 Monitoramento dos produtos de biodegradação	54
4.3.2 Estudos de Biodegradação do Totril [®]	56
4.4 Atividade biológica de herbicidas e produtos de biodegradação	68
5. CONCLUSÃO	70
6. REFERÊNCIAS	71
7. ANEXOS – Espectros de massas	76

1. INTRODUÇÃO

1.1 Processos biotecnológicos

A sustentabilidade é fundamental para melhorar ou, pelo menos, manter a qualidade de vida na sociedade moderna. De acordo com a Organização das Nações Unidas (ONU), o desenvolvimento sustentável é o desenvolvimento que atende às necessidades da geração atual, sem esgotar os recursos naturais necessários à absorção das demandas das gerações futuras.^{1,2} Aplicada a processos químicos, a sustentabilidade está associada ao conceito de química verde, que tem a preocupação de reduzir e/ou eliminar a formação de produtos nocivos à saúde e ao meio ambiente. Nesse contexto a biotecnologia é uma alternativa para processos químicos mais sustentáveis, e é definida como "qualquer aplicação tecnológica que utilize sistemas biológicos, organismos vivos ou seus derivados, para fabricar ou modificar produtos ou processos para utilização específica".¹⁻³

A era da biotecnologia foi iniciada com a utilização de biocatalisadores (células íntegras e/ou enzimas isoladas de micro-organismos) em processos industriais. No entanto, mesmo sem a consciência da sua existência, o homem já utilizava micro-organismos na produção de gêneros alimentícios e bebidas, desde o início da civilização.⁴

Entre os processos biotecnológicos, a Biocatálise é uma tecnologia atraente para a manufatura de produtos químicos, farmacêuticos e agroquímicos com alto valor agregado, pois apresenta características importantes, capazes de diferenciá-la dos métodos tradicionais. Neste aspecto, destacam-se: condições brandas de reação (pressão, temperatura e pH), uso de solventes ambientalmente amigáveis (água e fluidos supercríticos), utilização de biocatalisadores oriundos de fontes renováveis (micro-organismos, plantas ou animais) que podem ser quimio-, regio- e estereosseletivos, além de serem biodegradáveis.⁴⁻⁸

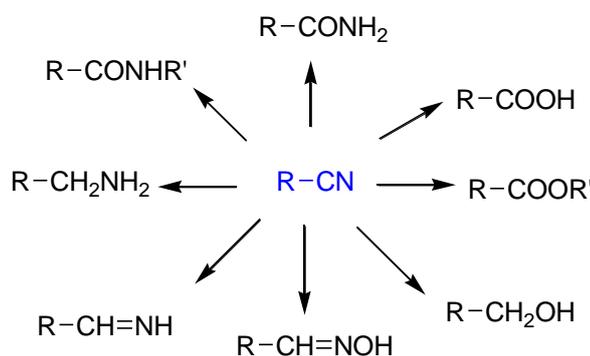
A busca por processos biotecnológicos tem apresentado um crescimento significativo, culminado na expansão do valor do mercado mundial de enzimas. Em 2010, o valor estimado foi de 3,3 bilhões e deve chegar a 4,4 bilhões até 2015, com um crescimento anual de 6,6%.⁹ Isto deve-se à adaptação da indústria aos novos conceitos de sustentabilidade e caracteriza-se como uma resposta às pressões de cunho

socioeconômico e ambiental sofridas nas últimas décadas. Outra força motriz desse crescimento é a biodiversidade de micro-organismos existentes na natureza e a necessidade de descobrir novos biocatalisadores para a síntese de blocos construtores quirais e seus produtos enantiomericamente puros, atendendo às exigências de agências regulamentadoras, como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Food and Drug Administration (FDA).⁵⁻¹⁰

1.2 Enzimas envolvidas no metabolismo de nitrilas

As nitrilas são compostos orgânicos que contêm o grupo ciano (CN), de ampla utilização na indústria química para a síntese de aminas, amidas, amidinas, ácidos carboxílicos, ésteres, aldeídos, cetonas e compostos heterocíclicos economicamente relevantes (Esquema 1). São empregados ainda como intermediários sintéticos para produtos agrícolas e farmacêuticos.¹¹⁻¹⁶

Esquema 1- Diversidades estruturais acessíveis através da manipulação de nitrilas. R e R' representam quaisquer grupos alquil ou aril.

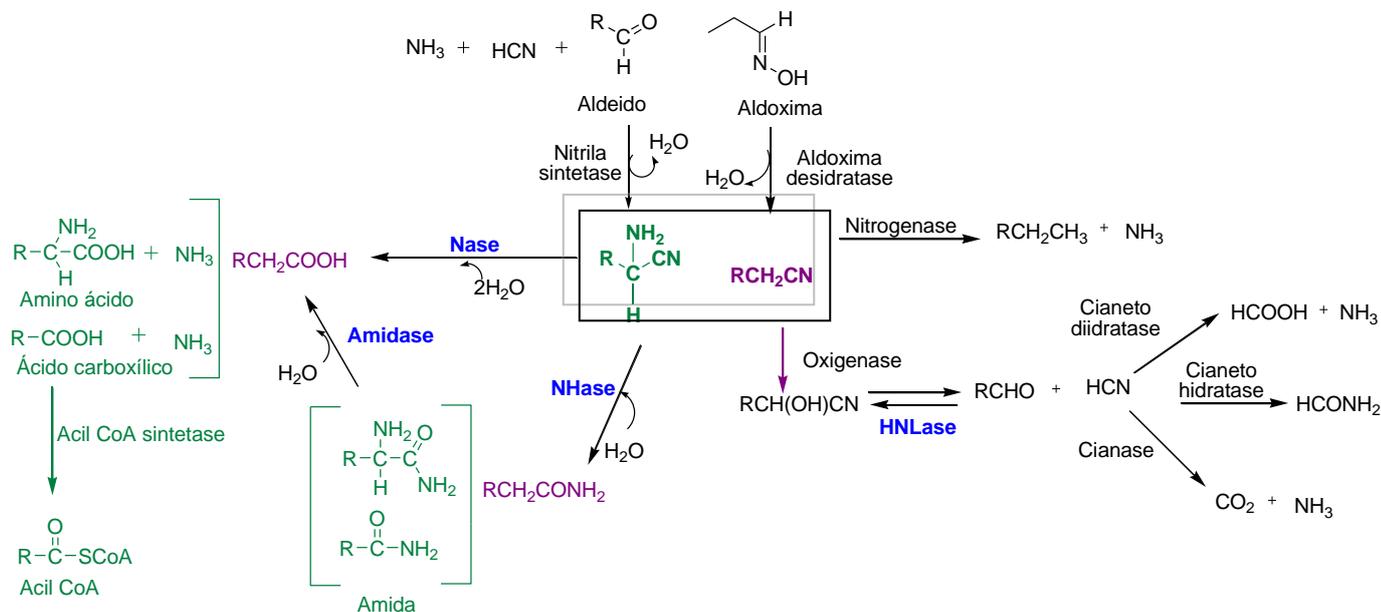


Fonte: adaptado de BANERJEE, A. et al.¹³ e OLIVEIRA, J. R.de.¹⁴

Na natureza as nitrilas são disponibilizadas através de biossíntese por plantas, fungos, bactérias, algas, insetos entre outros seres vivos, como forma de armazenamento de nitrogênio e carbono, ou como mecanismo de defesa (liberação de HCN).¹³

As nitrilas podem ser sintetizadas ou convertidas em seus derivados enzimaticamente.^{13, 18} As nitrilases, nitrila-hidratases, amidases e hidroxinitrila liase, enzimas de interesse na triagem de micro-organismos realizada nesse projeto, são exemplos de enzimas que realizam estas conversões. O Esquema 2 apresenta as rotas enzimáticas de biotransformação do grupo ciano em nitrilas orgânicas e inorgânicas.¹³

Esquema 2 - Rotas enzimáticas envolvidas no metabolismo de nitrilas. Destacam-se em azul as enzimas de interesse deste projeto.



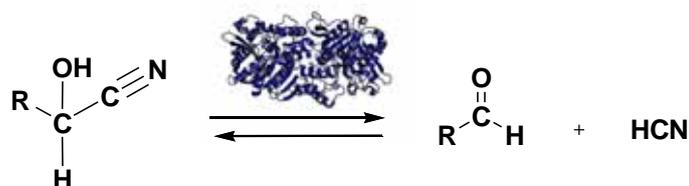
Fonte: adaptado de BANERJEE, A. et al.¹³

A hidrólise é a reação mais comum entre os micro-organismos para metabolizar o grupo ciano e também a via mais utilizada em processos de biodegradação e biorremediação. As nitrilases e amidases atuam por esta via. A nitrila-hidratase, por sua vez, atua na hidratação de nitrilas e hidroxinitrila liase realiza a clivagem e síntese da cianoidrina.^{13, 18, 19}

1.2.1 Hidroxinitrila liase (HNLase)

As liases são enzimas capazes de clivar ligações C-C, C-O, C-N, C-S, C-haletos, P-O gerando ligações duplas ou compostos cíclicos através de reações de eliminação, excluindo reações de hidrólise e oxidações. Alternativamente, estas enzimas também são capazes de adicionar grupos substituintes às ligações duplas. As hidroxinitrila liases (HNLase; EC 4.1.2.xx) pertencem à categoria das aldeído liases (dentro da subclasse C-C liases) e catalisam a condensação de cianeto a aldeídos formando cianoidrinas (Esquema 3).¹⁹⁻²¹

Esquema 3- Reação catalisada pela Hidroxinitrila liase.

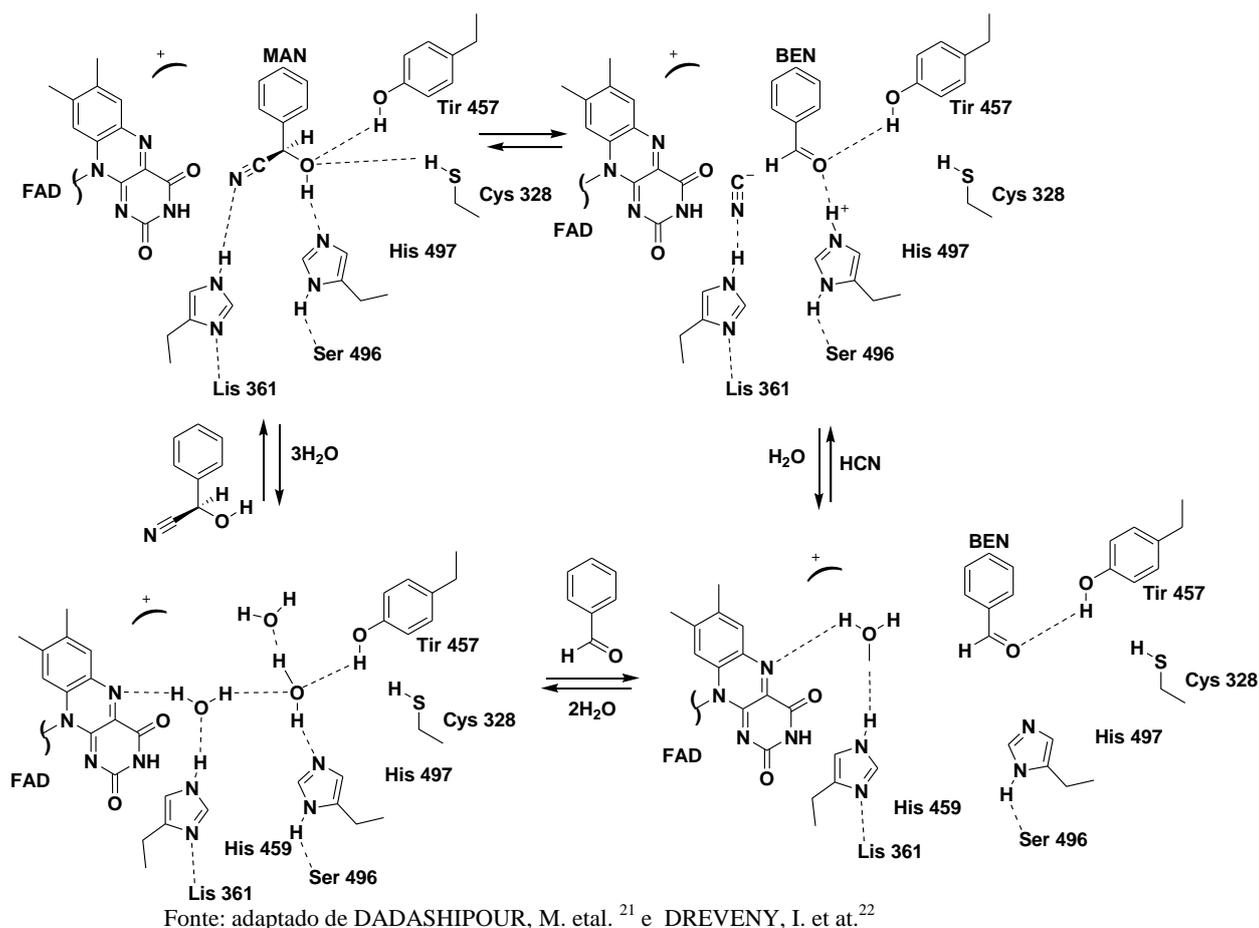


Fonte: adaptado do PDB (1DWP) utilizando o software Pymol.

As hidroxinitrilas liases são encontradas em plantas pertencentes à família *Pteridofitas*, como as samambaias, em micro-organismos como bactérias (*Chromobacterium violaceum*, algumas espécies de *Pseudomonas*) e/ou fungos (*A. sydowii*) e insetos (mariposa *Zygaena trifolii*). Essas enzimas são utilizadas pelas plantas como mecanismo de defesa contra predadores (fungos e herbívoros), através da liberação de ácido cianídrico (HCN).^{20, 21}

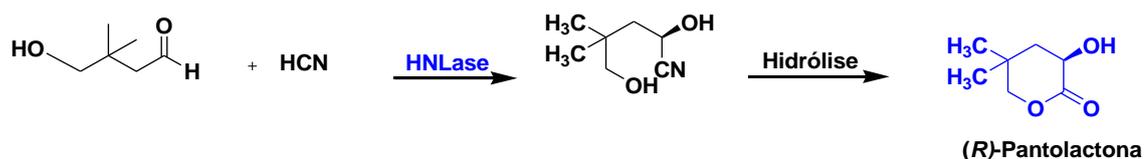
A proposta da reação de clivagem reversível da mandelonitrila catalisada por hidroxinitrila liase pode ocorrer via catálise ácida/básica através do resíduo His 497 (Esquema 4).^{21, 22} Os detalhes do mecanismo ainda não foram elucidados, mas é provável que o cianeto seja estabilizado pelo potencial eletrostático positivo no sítio ativo da enzima onde o aminoácido His 497 atue como uma base que abstrai o próton da hidroxila da mandelonitrila. De acordo com o modelo proposto, esta hidroxila está a uma distância razoável para que as faz três ligações de hidrogênio com os aminoácidos Cys 328 e Tyr 457 seja possível.^{21, 22} A segunda histidina do sítio ativo, His 459, é provavelmente a responsável pela protonação do íon cianeto clivado. O cianeto é estabilizado pelo potencial eletrostático positivo na região do centro ativo (indicado por uma carga positiva). Durante a reação o cofator desta enzima, FAD, mantém a integridade estrutural da mesma.^{21,22}

Esquema 4 - Proposta mecanística da reação catalisada pela hidroxinitrila liase.



Industrialmente as hidroxinitrila liases têm sido utilizadas para a obtenção de aldeídos e cetonas a partir de uma fonte de cianeto e também para a obtenção de uma cianoidrina quirais na reação reversa. Os intermediários obtidos são versáteis, podendo ser utilizados em produtos químicos e farmacêuticos, como por exemplo, na síntese da (*R*)-pantolactona, um intermediário sintético da vitamina B5 (Esquema 5).²³

Esquema 5- Síntese da (*R*)-pantolactona a partir de uma cianidrina quiral catalisada pela HNLase.

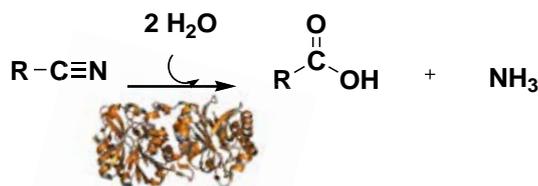


Fonte: adaptado de PSCHIEDT, B.; AVI, M. et al.²³

1.2.2 Nitrilases (Nase)

As nitrilases (EC 3.5.5.xx) são enzimas que catalisam a hidrólise de nitrilas diretamente nos respectivos ácidos carboxílicos (Esquema 6) e pertencem à classe das hidrolases.²⁴ Essas enzimas são encontradas na natureza em bactérias (*Rhodococcus*, *Nocardia*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*), fungos (*Fusarium*, *Gibberella*, *Aspergillus*, *Penicillium*), leveduras (*Candida*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Debaryomyces* e *Geotrichum*) e plantas (*Sinapis alba* e *Brassica rapa*).^{13,24}

Esquema 6 - Reação catalisada pela Nitrilase.



Fonte: adaptado do PDB (3KLC) utilizando o software Pymol.

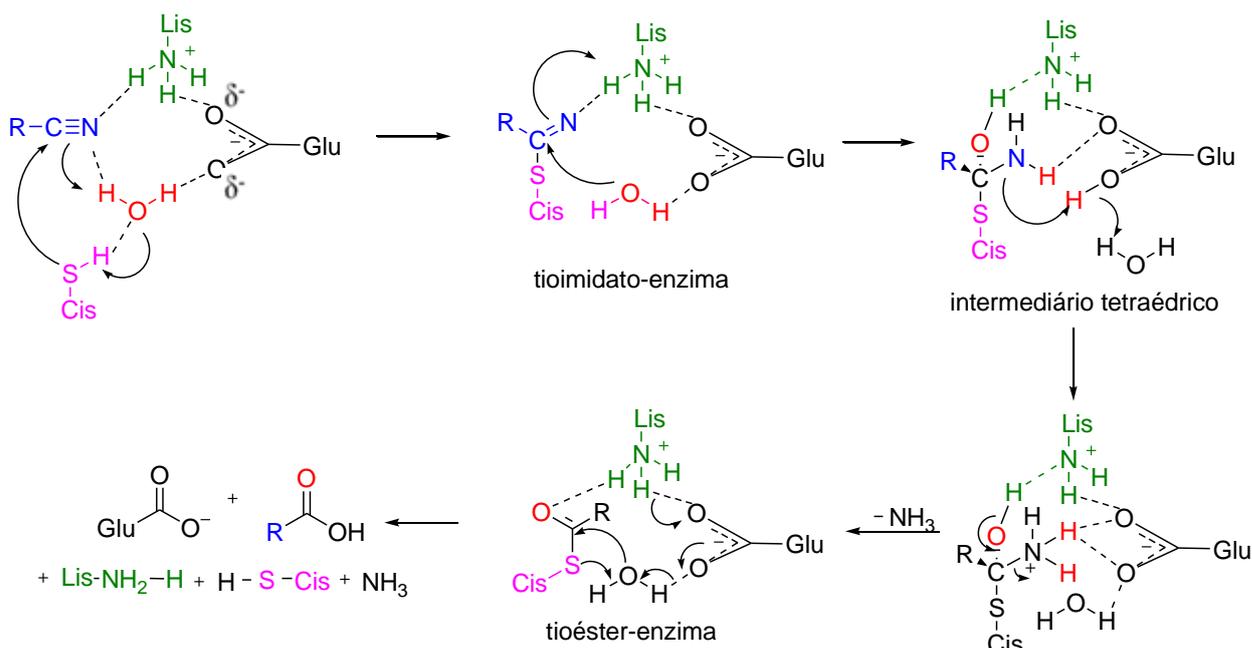
A proposta para a reação de hidrólise enzimática da nitrila catalisada pela nitrilase é apresentada no Esquema 7.

Na reação de hidrólise enzimática da nitrila estão envolvidos três resíduos de aminoácidos (tríade catalítica) no sítio ativo da enzima, o ácido glutâmico (Glu), cisteína (Cis), lisina (Lis), e uma molécula de água.^{14, 24}

Na primeira etapa da reação, um grupo sulfidrílico da cisteína realiza o ataque nucleofílico ao carbono eletrofílico do grupo ciano, formando assim um intermediário “tioimidato-enzima”. Esse intermediário posteriormente é hidrolisado por uma molécula de água para formar um intermediário tetraédrico.^{14, 24}

O nitrogênio do intermediário tetraédrico é protonado ao capturar um próton do ácido glutâmico. A protonação do nitrogênio tetraédrico favorece a eliminação da amônia e formação do complexo covalente tioéster-enzima. Assim o complexo tioéster-enzima é hidrolisado por uma molécula de água para formar o correspondente carboxilato.^{14, 24}

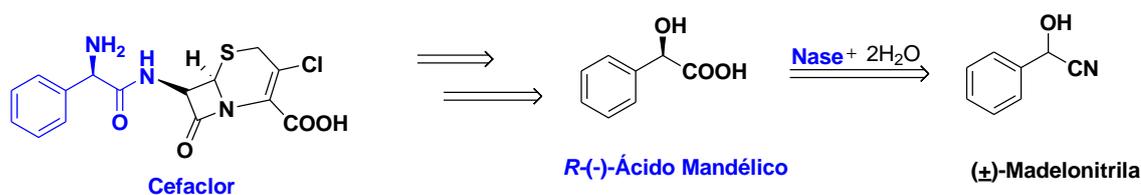
Esquema 7 - Proposta mecanística da reação de hidrólise de nitrilas por nitrilases.



Fonte: adaptado de MARTINKOVA, L. et al.²⁴

As nitrilases são também utilizadas em sínteses orgânicas assimétricas e em separações de misturas racêmicas. Um exemplo de uso em nível industrial é na produção do ácido *R*-(-)-mandélico a partir da mandelonitrila. O ácido *R*-(-)-mandélico é um bloco construtor quiral para a produção de produtos farmacêuticos como o antibiótico beta-lactâmico Cefaclor (Esquema 8).²⁵

Esquema 8 - Esquema retrossintético para a obtenção do Cefaclor a partir da resolução cinética da (\pm) mandelonitrila.



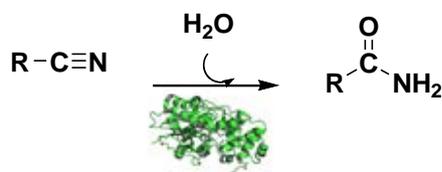
Fonte: adaptado de YAMAMOTO, K. et al.²⁵

1.2.3 Nitrila-hidratases

As nitrila-hidratases (EC 4.2.1.xx) pertencem a classe das liases (subclasse hidrolases) e catalisam a hidratação da nitrila para a respectiva amida (Esquema 9). Estas enzimas são dependentes de Fe^{+3} ou Co^{+3} como cofatores e por isso são classificadas em dois grandes grupos: NHases dependentes de ferro(III) e NHases dependentes de cobalto(III).²⁶ Elas já foram encontradas em fungos (*Candida guilliermondii*, *Candida*

famata e *Myrothecium verrucaria*) mas são normalmente produzidas em bactérias (*Nocardia* sp. NCIB 11216, *Rhodococcus* sp., *Pseudomonas fluorescens* e *Klebsiella ozaenae*).^{13,26,27}

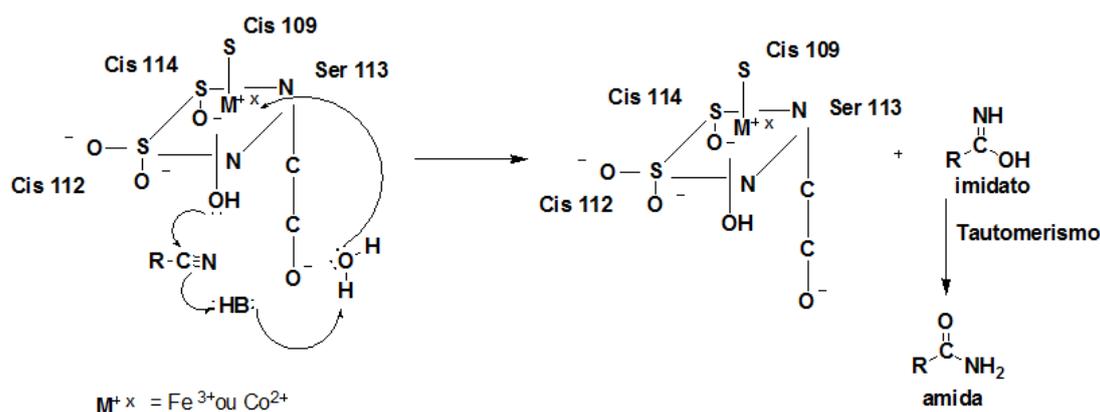
Esquema 9- Reação catalisada pela Nitrila-hidratase.



Fonte: adaptado do PDB (3 A8G) utilizando o software Pymol.

A presença dos íons metálicos no sítio ativo da enzima deve-se ao fato de serem ótimos catalisadores para hidratação da ligação $-\text{CN}$. São importantes também para reforçar a flexibilidade e estabilidade da subunidade da cadeia polipeptídica das NHases. Os ligantes tiolatos de cisteína (Cis 109, Cis 112 e Cis 114) e dois átomos de nitrogênio (Ser 113, Cis 112) estão coordenados ao metal na subunidade α da enzima. O Esquema 10 apresenta uma proposta mecanística para a reação de hidratação de nitrila catalisada pela enzima NHase.²⁶

Esquema 10 - Proposta mecanística para a reação de hidrólise da nitrila catalisada pela NHase.

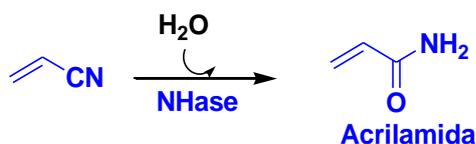


Fonte: adaptado de CHEN, J. et al.²⁶

O carbono do grupo ciano sofre um ataque nucleofílico do íon hidróxido que está coordenado ao metal do sítio catalítico da enzima, levando à formação de um imidato. Esse imidato por tautomerização forma a amida.^{14,26}

Como exemplo de aplicação industrial de nitrila-hidratases pode-se citar a síntese da acrilamida a partir da acrilonitrila (Esquema 11). A acrilamida é um polímero utilizado no tratamento de água potável e águas de reuso. É também utilizada na produção de colas, papel, cosméticos, entre outros. A produção da acrilamida consiste em um dos maiores processos biocatalíticos da indústria química, a Mitsubishi Rayon (anteriormente Nitto Chemicals), por exemplo, produz mais de 30 mil toneladas de acrilamida por ano.²⁸

Esquema 11- Esquema sintético da obtenção da acrilamida a partir da acrilonitrila.

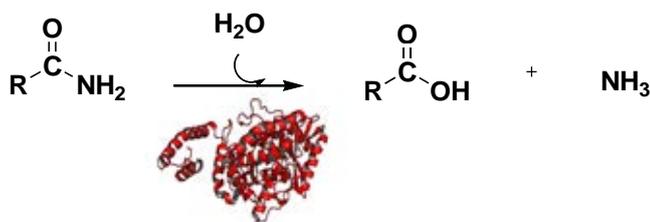


Fonte: adaptado de TORRELO, G. et al.²⁸

1.2.4 Amidases

As amidases (EC 3.5.1.4) são enzimas que catalisam a hidrólise de amidas aos correspondentes ácidos carboxílicos e amônia (Esquema 12). Essas enzimas são encontradas em bactérias (*Nocardia*, *Rhodococci* e *Arthrobacteria*), fungos e plantas.^{13,26}

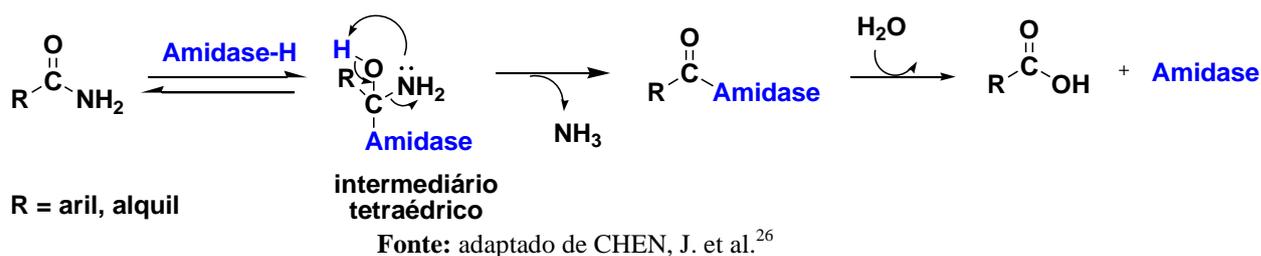
Esquema 12 - Reação catalisada pela Amidase.



Fonte: adaptado do PDB (3 A1K) utilizando o software Pymol.

A proposta das etapas da reação de hidrólise de amidas catalisadas por amidase é apresentada no esquema Esquema 13.

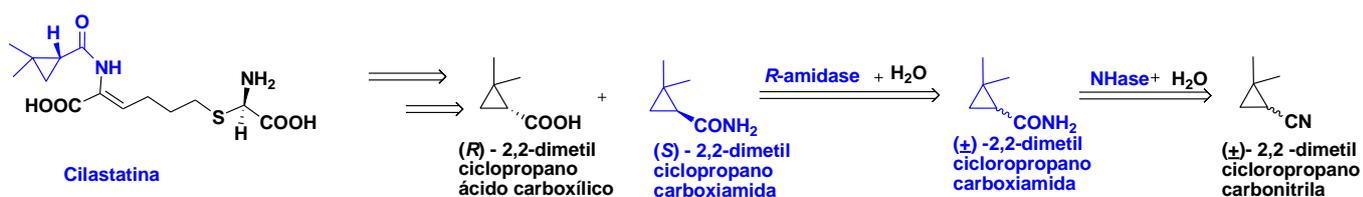
Esquema 13 - Proposta da reação catalisada por amidases.



A enzima atua realizando um ataque nucleofílico ao carbono ligado ao grupo amida, produzindo um intermediário tetraédrico que, por sua vez, é convertido em complexo acilo-enzima, liberando a molécula de amônia. Após essa etapa ocorre o ataque nucleofílico ao carbono carbonílico do complexo acilo-enzima por uma molécula de água, formando assim o ácido carboxílico.^{14,26}

Um exemplo de biotransformação catalisada por amidase é a resolução enzimática da (\pm)-2,2-dimetil ciclopropano carboxiamida fornecendo a (*S*)-2,2-dimetil ciclopropano carboxiamida. Nesse exemplo observa-se também a ação de outra enzima, a nitrilhidratase, que converte a nitrila em sua respectiva amida. O isômero (*S*)-2,2-dimetil ciclopropano carboxiamida (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) é um intermediário utilizado na produção do antibiótico Cilastatina, cujo mecanismo de ação consiste na inibição da enzima desidropeptidase renal.^{29,30}

Esquema 14 - Análise retrossintética para a obtenção da (*S*)-2,2-dimetil ciclopropano carboxiamida, a partir da (\pm)-2,2-dimetil ciclopropano carboxiamida.



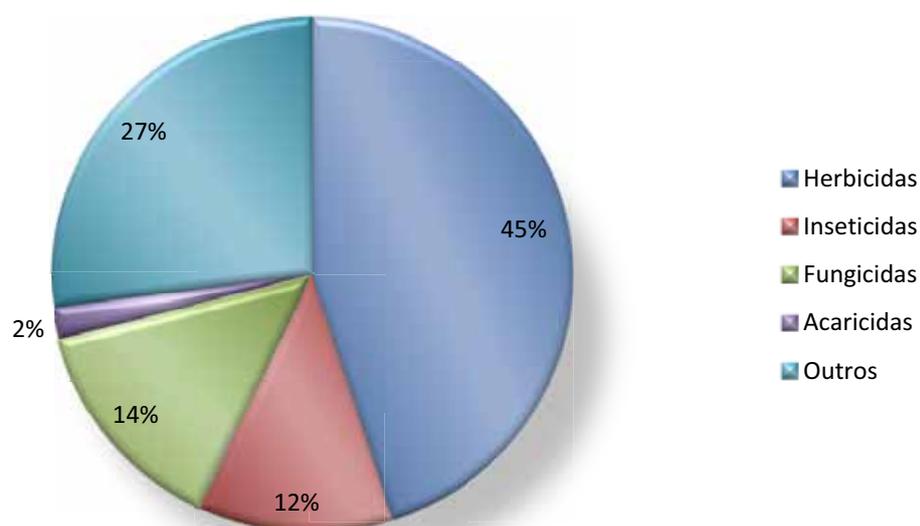
Fonte: adaptado de SHAW, N. M. et al.²⁹ e ZHENG, R. et al.³⁰

1.3 Biodegradação de herbicidas

A produção agrícola atual exige uma intensa utilização de pesticidas, com os quais se faz o controle químico de ervas daninhas, insetos e micro-organismos nocivos às culturas possibilitando assim, a produção e colheita em grande escala de alimentos com a participação reduzida do trabalho humano.³¹ Otimizar a produção de alimentos se faz necessário devido ao crescimento populacional, que de acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), dos atuais 6 bilhões deve expandir para 9 bilhões até 2050. Para que todos tenham acesso à comida, a oferta de alimentos precisa aumentar em 70% nos próximos 40 anos.³²

A utilização de pesticidas auxilia no aumento da produção agrícola. Com destaque para os herbicidas, uma classe de produtos químicos utilizados na agricultura para o controle de ervas daninhas. No Brasil esses produtos foram os agrotóxicos mais vendidos no período de 2010 a 2011, com uma participação de 45% sobre as vendas totais dos agrotóxicos (Figura 1).³²

Figura 1 - Vendas dos agrotóxicos entre 2010 e 2011 no Brasil.



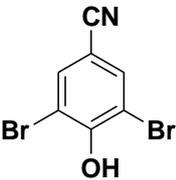
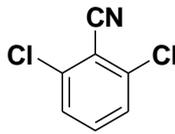
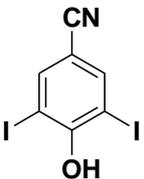
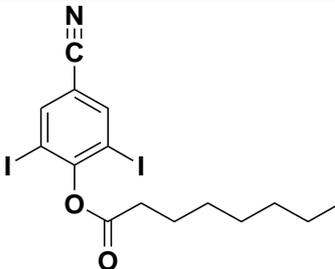
Fonte: adaptado de AGÊNCIA NACIONAL DE VIGIÂNCIA SANITÁRIA.³²

Apesar da importância do uso de herbicidas para o controle de ervas daninhas na agricultura, estes pesticidas oferecem riscos ao meio ambiente, uma vez que causam a poluição do solo e conseqüentemente a poluição da água nos lençóis freáticos.³³ Além

disso, em função de sua toxicidade, oferecem riscos ocupacionais à saúde humana, podendo causar: perda de peso, vômito, febre, dores de cabeça entre outros sintomas.³⁴

Os herbicidas benzonitrilados Bromoxinil, Diclobenil e Ioxinil no Brasil são ou foram amplamente utilizados nas culturas de cana-de-açúcar, macieira e cebola/ alho, respectivamente. São vendidos comercialmente com os nomes: Bucril®, Casoron 67, e Totril®. Abaixo seguem as estruturas químicas destes compostos e seus respectivos nomes IUPAC (Tabela 1).³³

Tabela 1 - Herbicidas benzonitrilados Diclobenil, Bromoxinil e Ioxinil, estruturas e nomes IUPAC.

Herbicidas (Nome comum)	Bromoxinil	Diclobenil
Estrutura		
Nome IUPAC	3,5-dibromo-4-hidroxibenzonitrila	2,6-diclorobenzonitrila
Herbicidas (Nome comum)	Ioxinil	Ioxinil (octanoato de ioxinila)
Estrutura		
Nome IUPAC	3,5-di-iodo-4-hidroxibenzonitrila	octanoato de 4-ciano-2,6-di-iodofenil

Fonte: adaptado de HOLTZE, M. S. et al.³³

No Brasil o Bromoxinil possui registro exclusivo para exportação,³⁵ o Totril® (octanoato de ioxinila e o ioxinil) é comercializado pela empresa alemã Bayer (Crop Science Division), enquanto o Diclobenil, por sua vez, teve sua monografia excluída em 2002 (Resolução RDC nº 347 de 16 de dezembro de 2002) sendo proibida sua utilização desde então. Entre os herbicidas citados acima, somente o Totril® tem autorização do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para comercialização e utilização em plantações de cebola e alho.³⁶

Na América do Sul o Brasil é maior produtor, sendo que a produção nacional de cebolas em 2013 foi de 1.519,0 mil toneladas, enquanto a produção de alho foi de 107,0 mil toneladas.^{37,38}

De acordo com os registros do Totril[®] na União Européia e Brasil, o octanoato de ioxinila e o ioxinil possuem o mesmo nome comum “ioxinil”. No entanto estes compostos são quimicamente distintos o que resulta em propriedades físico-químicas e biológicas diferentes. A presença da cadeia dos 8 átomos de carbonos na cadeia lateral do éster octanoato de ioxinila torna esse herbicida mais lipofílico, sugerindo sua maior absorção pelas folhas das ervas daninhas, além de menor mobilidade e susceptibilidade à lixiviação quando comparado ao Ioxinil.³⁹

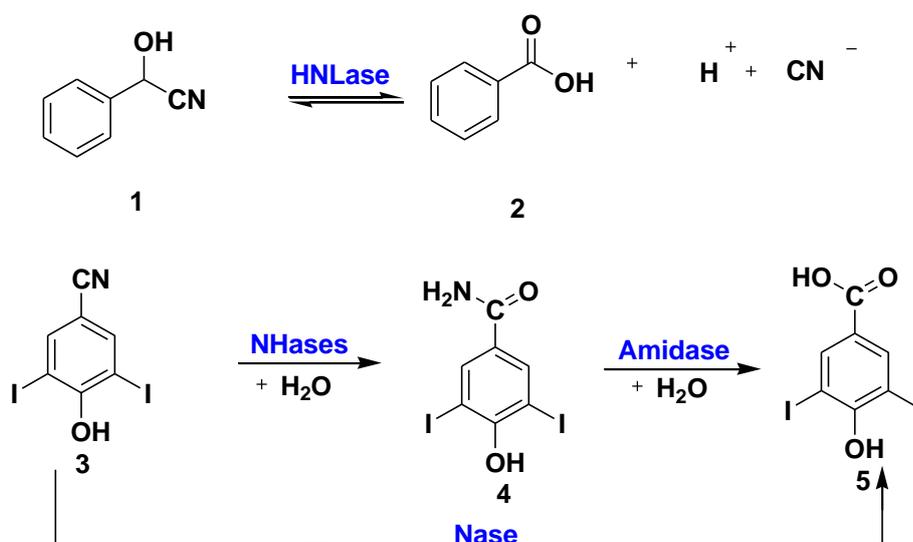
Estudos recentes demonstraram que a toxicidade do octanoato de ioxinila e do ioxinil também difere. O octanoato de ioxinila apresenta maior toxicidade, sendo quatro vezes mais potente do que o ioxinil na inibição da comunicação intercelular, mediada por junções comunicantes (ou junções “gap”) o que, conseqüentemente, torna-o mais nocivo às células podendo levar ao desenvolvimento de câncer. Esse estudo é particularmente importante dado ao fato de que estes compostos são muitas vezes considerados semelhantes no que diz respeito à avaliação de risco.⁴⁰

O comportamento do octanoato de ioxinila no solo ainda é pouco conhecido. Desta forma, verifica-se a necessidade de um estudo de sua biodegradação para averiguar se os produtos de biodegradações formados são mais ou menos tóxicos que o composto inicial, permitindo, assim, uma avaliação do impacto ambiental bem como a garantia da segurança dos alimentos.

2.OBJETIVOS

1) Realizar a bioprospecção de linhagens microbianas da biodiversidade brasileira quanto à presença das enzimas hidroxinitrila liases - HNLase (EC 4.1.2.xx), nitrilases - Nase (EC 3.5.5.xx), nitrila-hidratases - NHase (EC 4.2.1.xx) e amidases (EC 3.5.1.xx) através de ensaios de triagens enzimáticas colorimétricos e confirmar os resultados destes ensaios por técnicas cromatográficas e/ou espectrométricas (Esquema 15);

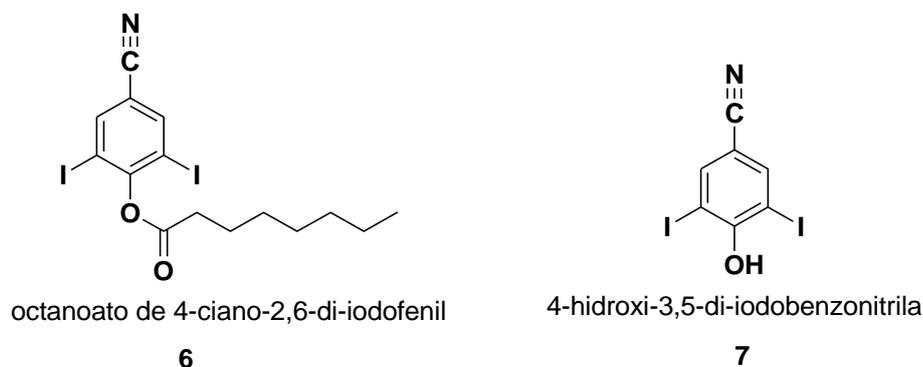
Esquema 15 - Reações monitoradas nos ensaios enzimáticos.



Fonte: a autora.

2) Estudar as rotas enzimáticas de biodegradação do herbicida benzonitrilado Octanoato de Ioxinila/ioxinil, regulamentado no Brasil pela ANVISA para uso em lavouras de cebola e alho (Figura 2);

Figura 2- Fórmula estrutural dos herbicida octanoato de ioxinila (6) e ioxinil (7).



3.PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Biocatalisadores

Entre os micro-organismos utilizados neste trabalho, uma parte são bactérias provenientes da Coleção de Micro-organismos do Laboratório de Biocatálise do IQ-UNESP (Milagre) MLH 01-MLH 63, dentre esses micro-organismos os MLH 31, 54, 60 e MLH 61 foram isolados do solo de uma Fazenda de Cebolas na cidade de São José do Rio Pardo, um dos maiores centros produtores de cebola do estado de São Paulo e que utiliza o herbicida Totril[®]. Os micro-organismos restantes são leveduras e foram obtidos da Coleção de Micro-organismos do Centro de Estudos de Insetos Sociais (CEIS), fornecidos pelo Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, do Instituto de Biociências da UNESP - Rio Claro, esses micro-organismos foram isolados de insetos sociais como abelhas e formigas, e dos seus respectivos ninhos (Tabela 2). Esses micro-organismos estão em fase de identificação e classificação taxonômica.

Tabela 2 - Micro-organismos utilizados nos experimentos.

Código	Coleção	Código	Coleção	Código	Coleção
N6PLF1	CEIS	MLH 08	Milagre	MLH 34	Milagre
TO375	CEIS	MLH 09	Milagre	MLH 35	Milagre
KFP246	CEIS	MLH 10	Milagre	MLH 36	Milagre
TO373	CEIS	MLH 11	Milagre	MLH 37	Milagre
N2PPSA2	CEIS	MLH 12	Milagre	MLH 38	Milagre
TO213	CEIS	MLH 13	Milagre	MLH 39	Milagre
TO210	CEIS	MLH 14	Milagre	MLH 40	Milagre
TO187	CEIS	MLH 15	Milagre	MLH 42	Milagre
N12PLA2	CEIS	MLH 16	Milagre	MLH 43	Milagre
TO1107	CEIS	MLH 17	Milagre	MLH 44	Milagre
TO354	CEIS	MLH 18	Milagre	MLH 45	Milagre
TO376	CEIS	MLH 19	Milagre	MLH 48	Milagre
TO813	CEIS	MLH 20	Milagre	MLH 49	Milagre
N2PVF2	CEIS	MLH 21	Milagre	MLH 51	Milagre
TO352	CEIS	MLH 22	Milagre	MLH 52	Milagre
N8PLF1	CEIS	MLH 23	Milagre	MLH 53	Milagre
N2PPSA4	CEIS	MLH 24	Milagre	MLH 54	Milagre
N2PVF3	CEIS	MLH 25	Milagre	MLH 55	Milagre
MLH 01	Milagre	MLH 26	Milagre	MLH 56	Milagre
MLH 02	Milagre	MLH 27	Milagre	MLH 57	Milagre
MLH 03	Milagre	MLH 28	Milagre	MLH 59	Milagre
MLH 04	Milagre	MLH 29	Milagre	MLH 60	Milagre
MLH 05	Milagre	MLH 30	Milagre	MLH 61	Milagre
MLH 06	Milagre	MLH 31	Milagre	MLH 62	Milagre
MLH 07	Milagre	MLH 32	Milagre	MLH 63	Milagre
		MLH 33	Milagre		

Fonte: a autora.

3.1.1 Armazenamento e preservação dos micro-organismos

Os micro-organismos foram repicados continuamente em tubo de ensaio com ágar inclinado e/ou placas de Petri em meio de cultura adequado (caldo nutriente - NB, Sabouraud ou Gymp) e armazenados à 4°C para uso de rotina. A viabilidade celular foi avaliada a cada seis meses e não foram verificados problemas quanto ao crescimento dos mesmos.

3.2 Equipamentos

3.2.1 Detector de cianeto

Identificação do equipamento: Scientific Corporation.

Modelo: Gas Badge Pro.

3.2.2 Incubadora com agitação orbital

Identificação do equipamento: Shaker da Tecnal.

Modelo: modelo TE 424.

3.2.3 Centrífuga de bancada

Identificação do equipamento: Centrífuga Excelsa[®] II

Modelo: 206 bl

3.2.4 Agitador digital

Identificação do equipamento: IKA[®]

Modelo: MS 3

3.2.5 Espectrofotômetro multifuncional

Identificação do equipamento: BioTek, USA

Modelo: Synergy 2 Multi-Mod

3.2.6 Espectrofotômetro visível

Identificação do equipamento: BEL PHOTONICS

Modelo: SP 1105

3.2.7 Cromatografia em fase gasosa com ionização por detecção em chama (CG-FID)

O cromatógrafo (CG-FID Shimadzu, Modelo 2010 Plus) operou a um fluxo constante de gás H₂ de 40 mL min⁻¹, ar sintético 400 mL min⁻¹ e N₂ 30 mL min⁻¹. A temperatura do injetor foi igual a 260°C e temperatura do detector 300 °C, as injeções foram feitas no modo “split”, com injeção de 1µL na concentração de, aproximadamente, 1mg/mL. A programação do forno foi 80°C - 3' (30°C/min - 280°C)-5' e o tempo total do método foi de 14,67 minutos. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida Restek Rtx®-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, 5% fenilmetilsiloxano).

3.2.8 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas (HPLC-MS/MS)

Para a realização das análises por HPLC-MS/MS (AB SCIEX, 3200 QTRAP) a eluição cromatográfica foi realizada em coluna Kinetex C18 5 µm (150 x 4.6 mm) sob temperatura de 40°C e foi empregado o seguinte gradiente de eluição em um sistema binário água (A) e acetonitrila (B): inicialmente foi aplicado 0,0 – 0,5 min (10% acetonitrila), 0,5 – 14,0 min (100% acetonitrila), 14,0 – 17,0 min (100 % acetonitrila), 17,0 – 17,5 min (100 – 10% acetonitrila) condicionando-se a coluna por mais 5 min (tempo total do método = 22 min). O fluxo da fase móvel foi mantido a 1000 µL/min e as alíquotas retiradas (20µL) da reação de biotransformação foram diluídas em Metanol/Água (1000:1).

A detecção por espectrometria de massas (3200 QTRAP) foi feita através do experimento de varredura de íons no modo *enhanced* (EMS, enhanced mass scan – utilizando o analisador íon trap linear). Dessa forma, uma amostra padrão do material de partida foi utilizada para a otimização das condições de ionização e parâmetros da fonte. A análise do padrão octanoato de ioxinila foi otimizada no massas via infusão direta (seringa automática com fluxo de 10uL/min) e na concentração de 500ppb (metanol e água 1:1). A ionização foi obtida com uma fonte de Turbo Ion Spray (*electrospray*) operando no modo negativo uma vez que, no modo positivo não foi possível verificar os compostos. Os parâmetros da fonte de ionização comum a todos os compostos de interesse foram: IonSpray: -4500 V, Temperatura: 550°C, Gás 1: 45 psi, Gas 2: 45 psi e Curtain Gas: 12 psi, Declustering Potential (DP): -40V e Entrance Potential (EP): -11V. Experimentos de íons fragmentos (EPI, enhanced product, íon utilizando novamente o

íon trap linear) também foram conduzidos para maiores informações estruturais dos possíveis produtos formados. A energia de colisão aplicada variou de 25 – 50V para os diferentes íons precursores analisados.

3.3 Ensaio enzimático para a triagem de Hidroxinitrila liase

3.3.1 Medidas de segurança para o trabalho com cianeto

Os ensaios enzimáticos relacionados à triagem das enzimas HLNase envolvem a liberação de cianeto. Todas estas reações foram realizadas em capela com exaustão eficiente e monitoradas com um detector de cianeto. Os resíduos destas reações foram neutralizados com solução aquosa de NaOH 1% e armazenados em frascos devidamente rotulados para posterior descarte, conforme recomendado pelo IQ-UNESP, nas normas de Gerenciamento de Resíduos Químicos.⁴¹

3.3.2 Procedimento para a triagem enzimática

O ensaio enzimático para a triagem de HNLase, foi realizado em duas etapas: Cultivo dos micro-organismos e Triagem enzimática:

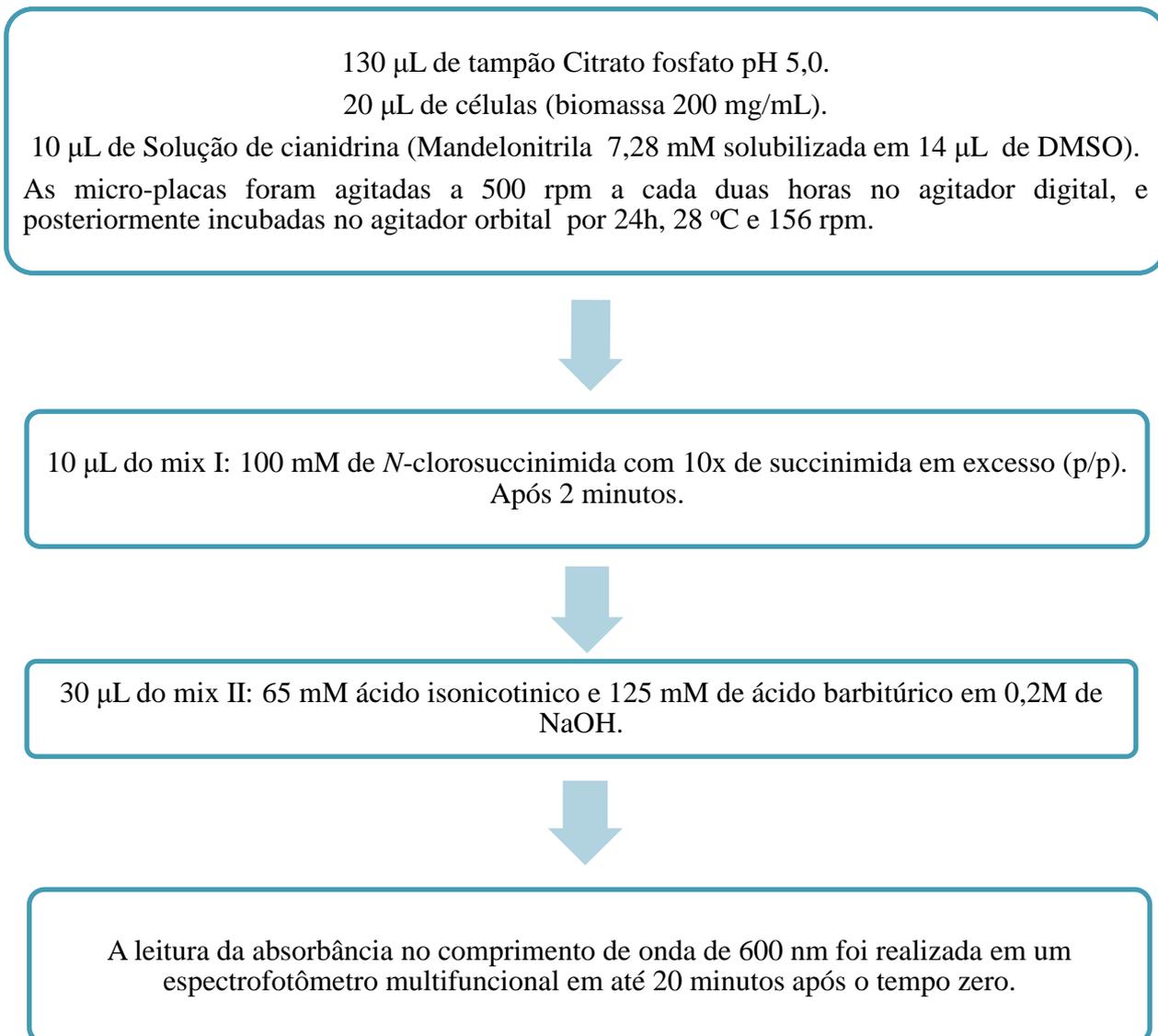
Cultivo dos micro-organismos

Os micro-organismos foram cultivados em 10 mL de meio de cultivo adequado e incubados por 24h a 28°C sob agitação orbital de 156 rpm. Após o crescimento dos micro-organismos o meio foi centrifugado por 10 minutos, 3000 rpm e 60rpm/s² de aceleração. O sobrenadante foi desprezado e a biomassa lavada e ressuspensa em tampão citrato-fosfato pH 5,0 (0,05M) em quantidade suficiente para atingir a concentração celular de 200 mg/mL.

Triagem enzimática

A triagem enzimática foi realizada através de ensaio colorimétrico por detecção indireta e em formato miniaturizado (microplaca de 96 poços, 200 µL de reação). Em cada poço da microplaca foram adicionados os reagentes conforme o Fluxograma 1.

Fluxograma 1 - Fluxograma para as triagens enzimáticas para atividade HNLase em microplaca



Fonte: ANDEXER, J .et al. (2006, p.4201) adaptado ref.⁴²

Experimentos Controle:

- Controle Positivo: 150 µL de tampão e 10 µL de cianeto de sódio 7,28 mM e benzaldeído 7,28 mM.
- Controle Negativo: 150 µL de tampão e 10 µL de mandelonitrila 7,28 mM (em 14 µL de DMSO).
- Controle microbiano: 140 µL de tampão e 20 µL de células (200 mg/mL).

3.3.3 Confirmação dos resultados de triagem para Hidroxinitrila liase (HNLase)

O micro-organismo N2PVF3, selecionado para esse experimento, foi inoculado em 10 mL de meio Gymp e incubado por 24h a 28°C sob agitação orbital de 156 rpm. Após o crescimento do micro-organismo o meio foi centrifugado por 10 minutos, 3000 rpm e 60rpm/s² de aceleração. O sobrenadante foi desprezado e a biomassa lavada e ressuspendida em tampão citrato-fosfato pH 5,0 (0,05 M) em quantidade suficiente para atingir a concentração celular de 200 mg/mL. Em um erlenmeyer de 50 mL foram adicionados 8,5 mL de tampão citrato-fosfato pH 5,0 (0,05 M), 1 mL de suspensão celular (200 mg/mL) e 0,5 mL de solução cianidrina (mandelonitrila 7,28 mM solubilizada em 14 µL de DMSO). A reação foi mantida a 28 °C sob agitação orbital de 156 rpm por 24h. Após esse período, o meio reacional foi centrifugado por 10 minutos, 3000 rpm e 60 rpm/s² de aceleração, o sobrenadante extraído com acetato de etila (3x), as frações orgânicas foram combinadas, seca sob MgSO₄ anidro e analisada por CG-FID (cromatografia em fase gasosa com ionização por detecção em chama - **Parte experimental 3.2.7**).

3.4 Ensaio de triagem enzimática para Nitrila-hidratase (NHase), Nitrilase (Nase) e Amidase

Os micro-organismos foram cultivados em 10 mL de meio MM2 em um erlenmeyer de 50 mL, induzidos com 100 µL de solução etanólica de Totril[®] (solução estoque: 20 µL de Totril[®] em 1 mL de etanol) e incubados por 24h, 28°C, 156 rpm sob agitação orbital. Os meios de cultivo microbiano foram centrifugados por 10 minutos, 3000 rpm e 60rpm/s² de aceleração. Esse procedimento de cultivo foi realizado em duplicata. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e a biomassa lavada e ressuspendida em tampão fosfato pH 7,2 (10 mM) em quantidade suficiente para atingir a concentração celular de 200 mg/mL. Os ensaios enzimáticos e os respectivos experimentos controle foram realizados em triplicata, em microplaca de 96 poços que foi incubada a 29°C em agitador orbital a 181 rpm, por 7 dias. A cada 24 horas foi realizada a leitura e o registro fotográfico do experimento. O volume final de cada poço da microplaca foi de 200 µL, utilizando as seguintes proporções:

- Controle do material de partida Ioxinil: 5 µL de solução de ioxinil 500 mM e 190 µL de tampão fosfato 10 mM + Azul de Bromotimol 0,01%.

- Controle do inibidor de amidase DEPA: 10 µL de solução DEPA 200 mM e 190 µL de tampão fosfato 10 mM + Azul de Bromotimol 0,01%.
- Controle microbiano: 20 µL de suspensão celular e 180 µL de tampão fosfato 10 mM + Azul de Bromotimol 0,01%.
- Ensaio sem DEPA: 20 µL de suspensão celular, 5 µL de solução de ioxinil 500 mM e 175 µL de tampão fosfato 10 mM + Azul de Bromotimol 0,01%.
- Ensaio com DEPA: 20 µL de suspensão celular, 5 µL de solução de ioxinil 500 mM, 10 µL de solução DEPA 200 mM e 165 µL de tampão fosfato 10 mM + Azul de Bromotimol 0,01%.

3.4.1 Meio de cultura MM2

FeCl ₃ x 6 H ₂ O -----	0,08 g/L
CaCl ₂ -----	0,05 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O -----	0,02 g/L
Na ₂ HPO ₄ x 7 H ₂ O -----	4,00 g/L
KH ₂ PO ₄ -----	2,00 g/L
Glicose -----	1,80 g/L



Ordem de adição dos reagentes
com agitação magnética.

3.5 Estudo de biodegradação do herbicida Totril®

O ensaio de biodegradação foi realizado em três etapas: (I) preparo do pré-inóculo, (II) indução enzimática do inóculo e (III) monitoramento das reações de biotransformação propriamente ditas.

I - Preparo do Pré-inóculo:

Em um erlenmeyer de 1L adicionou-se 350 mL de meio nutriente (NB), 10 g/L de glicose e 1 g/L de extrato de levedura. Os micro-organismos (MLH-31, MLH-54, MLH-60 e MLH-61) foram inoculados neste meio pré-esterilizado e incubados sob agitação orbital a 28°C, 24h e 156 rpm.

II - Etapa de indução enzimática:

Adicionou-se 250 mL de meio para indução em um erlenmeyer de 500 mL. Transferiu-se 8% do pré-inóculo para este meio de indução pré-esterilizado seguido da adição de 55 mM de isobutironitrila solubilizada em 2,5 mL de etanol. Esse meio foi incubado sob agitação orbital a 28°C, 24h e 156 rpm.

III - Reação de Biotransformação:

Experimento de biodegradação: a mistura resultante da etapa de indução enzimática foi centrifugada por 10 minutos, 3000 rpm e 60 rpm/s² de aceleração. O sobrenadante foi desprezado e a biomassa lavada com tampão Sorensen's 100 mM pH 7,5 e ressuspendida em 90 mL de tampão até atingir uma DO₆₁₀= 2. À mistura resultante da etapa de reação de biotransformação foram adicionados 0,1 mM do herbicida Totril® solubilizado em 4,5 mL de etanol. A reação de biotransformação foi extraída com acetato de etila e foi acompanhada por 7 dias. A identificação e monitoramento dos produtos de biodegradação foram realizados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas - HPLC-MS/MS (**Parte experimental 3.2.8**), do laboratório do grupo de Eletroquímica de Araraquara do IQ-UNESP.

Experimento controle negativo (controle substrato): 90 mL de tampão e 0,1 mM do herbicida Totril® (octanoato de ioxinila) em 4,5 mL de etanol.

Experimento controle microbiano: 90 mL de tampão e suspensão microbiana (OD₆₁₀= 2).

3.5.1 Meio para indução enzimática

NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O -----	1,03 g/L
KH ₂ PO ₄ -----	2,00 g/L
MgSO ₄ x 7 H ₂ O -----	0,50 g/L
FeSO ₄ x 7H ₂ O -----	0,03 g/L
CaCl ₂ -----	0,05 g/L
Extrato de levedura-----	0,10 g/L
Glicose-----	10 g/L
CoCl ₂ x 6H ₂ O -----	0,05 g/L



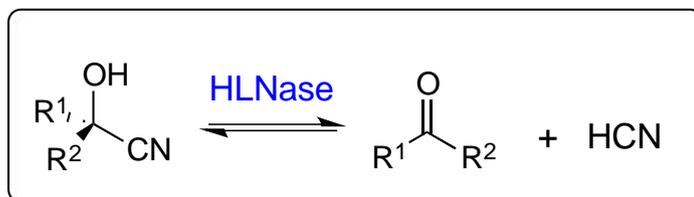
Ordem de adição dos reagentes.

PARTE 1: Ensaios de triagens enzimáticas

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES DAS TRIAGENS ENZIMÁTICAS

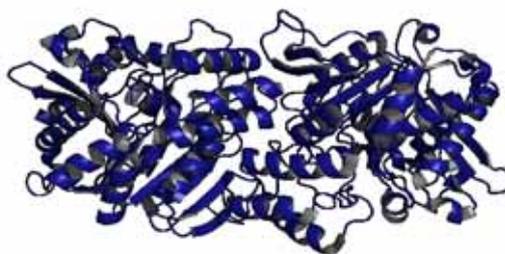
4.1 Ensaio enzimático para a triagem de Hidroxinitrila liase

Esquema 16 - Reação catalisada pela enzima HNLase.



Fonte: a autora.

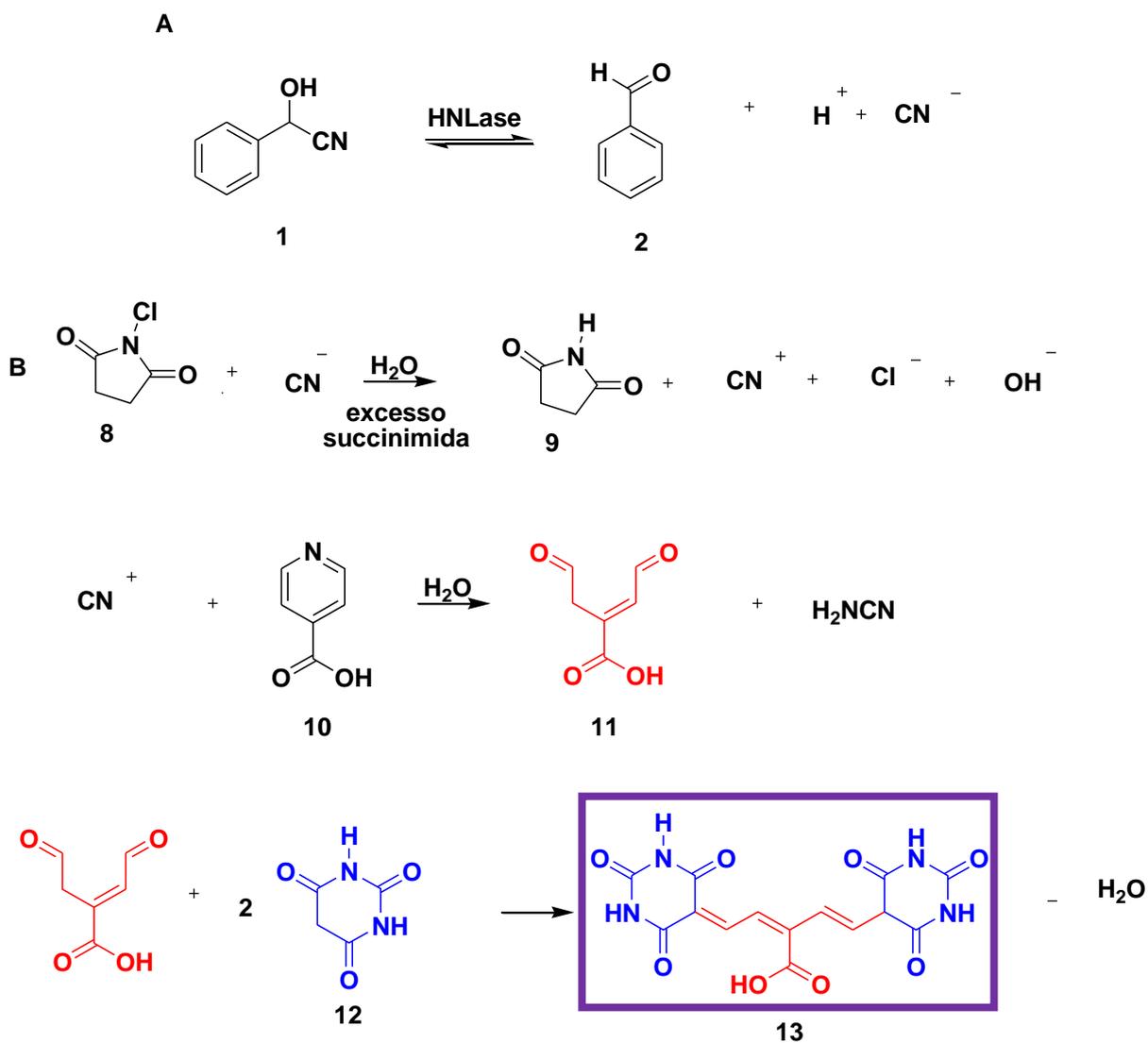
Figura 3 - Visão geral da estrutura tridimensional da HNLase.



Fonte: adaptado do PDB (1DWP) utilizando o software Pymol.

O ensaio de triagem para a HNLase envolveu duas partes, A e B, conforme apresentado no Esquema 17. A etapa A consiste na reação química catalisada pela HLNase, ou seja, clivagem da cianidrina **1** ao correspondente aldeído **2** com liberação de cianeto. A etapa B consiste na determinação indireta de cianeto através da formação de cromóforos. Assim os cianetos gerados na etapa A foram oxidados pela N-clorosuccinimida **8** (estabilizada em succinimida **9**). Os cátions de cianeto altamente instáveis reagiram com o ácido isonicotínico **10** formando o dialdeído **11** que foi condensado à duas moléculas de ácido barbitúrico **12** formando o cromóforo **13** que é detectado espectrometricamente a 600 nm.⁴²

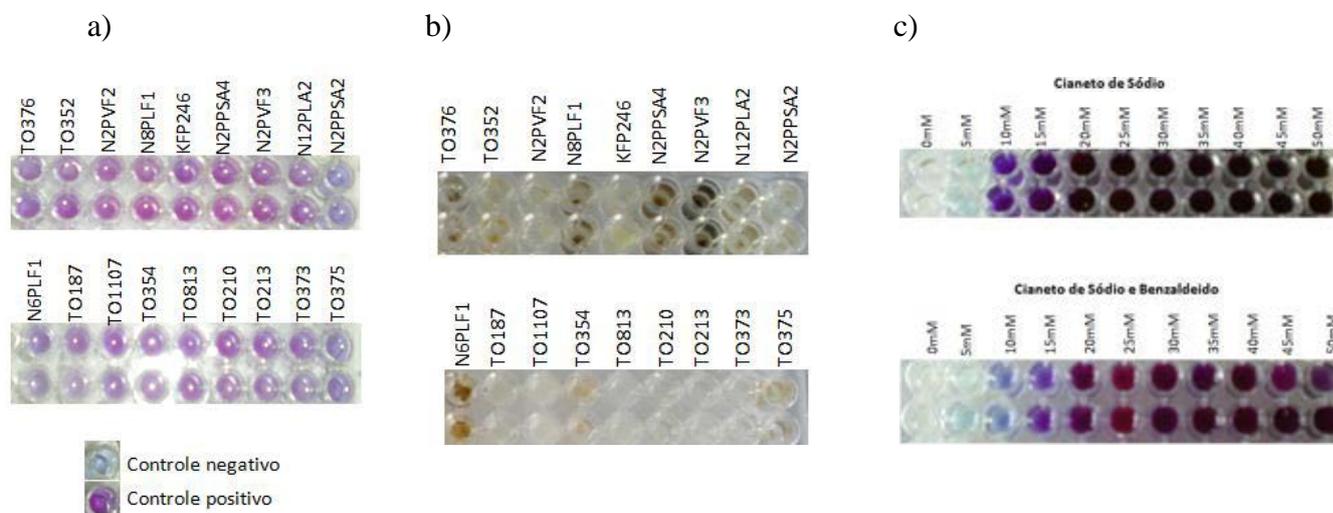
Esquema 17 - Reações envolvidas no ensaio colorimétrico para a enzima HNLase.



Fonte: adaptado de ANDEXER, J. et al.⁴²

A cor observada no experimento variou de azul claro a roxo indicando o aumento crescente da concentração de cianeto (Figura 4 a).

Figura 4 - a) Monitoramento das reações de conversão da mandelonitrila em benzaldeído e cianeto; b) respectivos controles microbianos e c) experimentos com os controles positivos dos produtos (apenas cianeto e cianeto/benzaldeído) nas concentrações usadas para o preparo da curva analítica.



Fonte: a autora.

No experimento dos controles microbianos não foi verificada a formação de cor, indicando que os micro-organismos avaliados não produzem cianeto ou algum produto de biodegradação que pudesse interferir na leitura do ensaio enzimático (Figura 4 b). No experimento de controle do substrato (mandelonitrila) foi observada uma coloração azul clara, pois em meio aquoso há uma reação espontânea de equilíbrio químico, reversível, da mandelonitrila formando benzaldeído e cianeto, principalmente em $\text{pH} > 6,0$. Com a finalidade de evitar o deslocamento do equilíbrio no sentido de formação da mandelonitrila as reações foram realizadas em $\text{pH} 5,5$ e a determinação da concentração de cianeto foi realizada através da diferença da leitura de absorbância entre a reação de catálise enzimática e a reação de equilíbrio químico espontânea do substrato.

Sabe-se que o benzaldeído e o cianeto, em determinadas concentrações, podem atuar como inibidores enzimáticos.⁴³ Entretanto, as concentrações de benzaldeído e cianeto utilizadas no experimento estão dentro do limite adequado para que não ocorra inibição enzimática. Para determinar a concentração de cianeto presente nas reações de biotransformação foram construídas duas curvas analíticas: uma contendo apenas o cianeto de sódio (produto responsável pela formação do cromóforo) e a outra contendo cianeto de sódio e benzaldeído, com o intuito de verificar a influência da presença de benzaldeído na formação e, posterior, leitura do cromóforo (Figura 4 c). Os resultados

obtidos nas duas curvas analíticas são semelhantes indicando que o benzaldeído não interfere neste experimento.

Neste ensaio enzimático, 27 micro-organismos apresentaram atividade positiva para hidroxinitrila liase. Os demais (49) micro-organismos, não apresentaram atividade enzimática conforme observa-se na Tabela 3. Estes resultados foram confirmados por análises cromatográficas e/ou espectrométricas.

Tabela 3 - Resultado da atividade enzimática para HNLase.

Código	[CN ⁻ mM]	Código	[CN ⁻ mM]	Código	[CN ⁻ mM]
		MLH 08	0,00	MLH 34	0,00
N6PLF1	0,00	MLH 09	0,00	MLH 35	0,00
TO375	0,00	MLH 10	0,00	MLH 36	0,00
KFP246	0,38	MLH 11	1,85	MLH 37	0,49
TO373	0,46	MLH 12	0,65	MLH 38	0,00
N2PPSA2	0,52	MLH 13	0,00	MLH 39	0,00
TO213	0,74	MLH 14	1,20	MLH 40	1,77
TO210	0,89	MLH 15	0,00	MLH 42	0,00
TO187	0,94	MLH 16	0,00	MLH 43	0,00
N12PLA2	1,86	MLH 17	0,00	MLH 44	0,00
TO1107	1,98	MLH 18	0,00	MLH 45	0,00
TO354	2,00	MLH 19	0,00	MLH 48	0,00
TO376	2,35	MLH 20	0,00	MLH 49	0,00
TO813	2,42	MLH 21	0,00	MLH 51	0,00
N2PVF2	3,08	MLH 22	0,00	MLH 52	0,00
TO352	3,31	MLH 23	0,00	MLH 53	0,00
N8PLF1	4,56	MLH 24	0,00	MLH 54	0,00
N2PPSA4	4,74	MLH 25	0,83	MLH 55	0,00
N2PVF3	4,78	MLH 26	6,80	MLH 56	7,98
MLH 01	0,94	MLH 27	5,92	MLH 57	0,00
MLH 02	0,00	MLH 28	8,78	MLH 59	0,00
MLH 03	0,00	MLH 29	0,00	MLH 60	0,00
MLH 04	0,00	MLH 30	0,00	MLH 61	0,00
MLH 05	0,00	MLH 31	0,00	MLH 62	0,00
MLH 06	0,00	MLH 32	0,00	MLH 63	0,00
MLH 07	0,00	MLH 33	0,00		

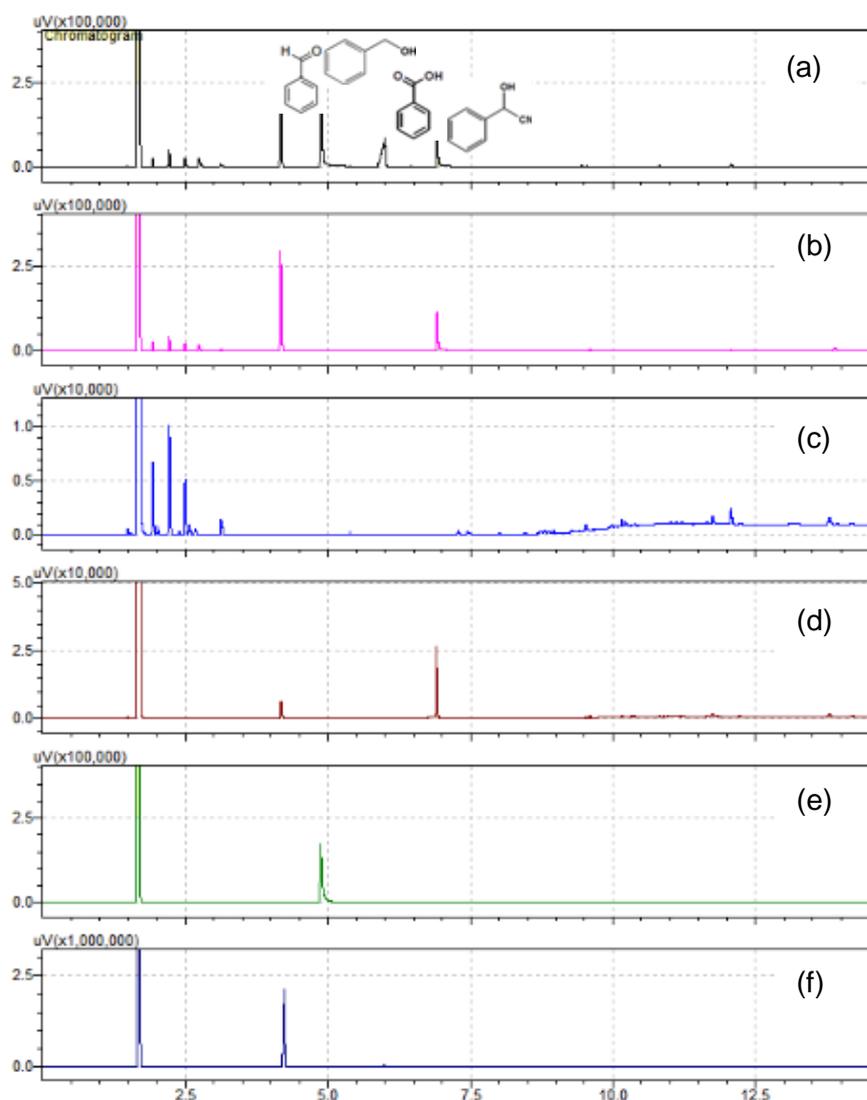
Fonte: a autora.

4.1.2 Confirmação dos resultados de triagem para Hidroxinitrila liase (HNLase)

O micro-organismo N2PVF3 foi selecionado para realizar a confirmação dos resultados via cromatografia por ter apresentado um valor intermediário na formação de íons cianeto (Tabela 3).

Nas análises por CG-FID foi possível observar que a reação levou à formação do benzaldeído e de um segundo produto que foi posteriormente identificado por GC-MS e co-injeção de padrão como sendo o álcool benzílico, conforme demonstrado na Figura 5.

Figura 5 - Cromatogramas de GC-FID de: (a) reação de biocatálise, (b) experimento controle do substrato, (c) controle microbiano N2PVF3, (d) padrão comercial de mandelonitrila, (e) padrão comercial de álcool benzílico e (f) padrão comercial de benzaldeído.

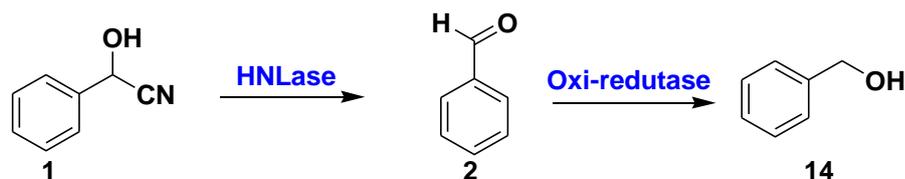


Fonte: a autora.

No ensaio colorimétrico em microplaca para a triagem enzimática da hidroxinitrila liase (HNLase), observou-se a reação reversível e espontânea da mandelonitrila formando benzaldeído e cianeto. Essa reação espontânea também foi observada no ensaio de confirmação dos resultados por CG-FID. Nesse ensaio, ao invés da determinação da concentração de cianeto, foi determinada a concentração do benzaldeído correlacionando-se os valores de área do produto obtido na reação de biocatálise ($t_R = 4,171$ min e área = 304123,7) com o controle do substrato mandelonitrila ($t_R = 4,172$ min e área 435755,4). A diferença entre os valores de área referentes ao benzaldeído formado na reação biocatalisada e o benzaldeído formado na reação controle, resultou em um valor negativo (- 131631,7). Este resultado pode ser racionalizado pela reação em cascata enzimática de formação do álcool benzílico (**3**) a partir do benzaldeído (**2**) (Esquema 18). Assim, a formação do benzaldeído (**2**) pela ação da enzima hidroxinitrila liase sobre a mandelonitrila (**1**) pôde ser comprovada, uma vez que verificou-se a diminuição da área da mandelonitrila na reação enzimática em relação ao controle do substrato (reação: $t_R = 6,916$ e área 243446,2/ controle mandelonitrila: t_R : 6,915 e área 247205,3).

Uma das maneiras de se obter o álcool benzílico (**14**) é através da reação de redução do benzaldeído pela enzima oxi-redutase (E. C. 1.xx). Os dados encontrados no ensaio de confirmação por CG-FID, sugerem que além da hidroxinitrila liase, pode estar presente na reação uma oxi-redutase. A presença de um segundo produto de catálise enzimática na reação é possível já que esses experimentos foram realizados com células microbianas íntegras e não com enzimas isoladas e as células possuem diversas enzimas necessárias à sua sobrevivência e manutenção. Desta forma, pode-se sugerir que o benzaldeído formado pela enzima hidroxinitrila liase foi convertido em álcool benzílico (Esquema 18).

Esquema 18 - Reações enzimáticas em cascata para formação do álcool benzílico a partir da mandelonitrila cujas enzimas envolvidas são hidroxinitrila liase (HNLase) e oxi-redutase.

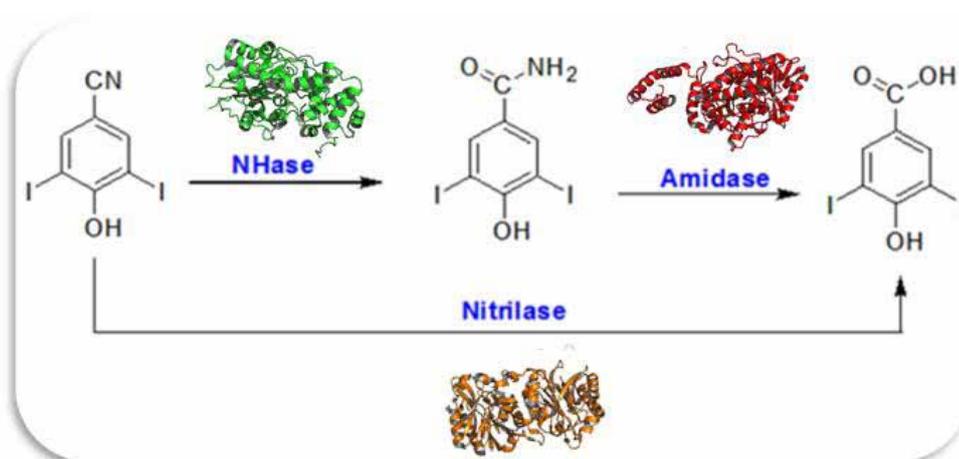


Fonte: a autora.

A partir desses dados pode-se concluir que as análises cromatográficas (CG-FID) e espectrométricas (GC-MS) para confirmação dos resultados obtidos nos ensaios enzimáticos por detecção colorimétrica foram eficientes pois, além de comprovarem a presença da enzima hidroxinitrila liase revelaram a ocorrência de reações enzimáticas em cascata desta com a oxi-redutase.

4.2. Ensaio de triagem enzimática para Nitrila-hidratase, Nitrilase e Amidase

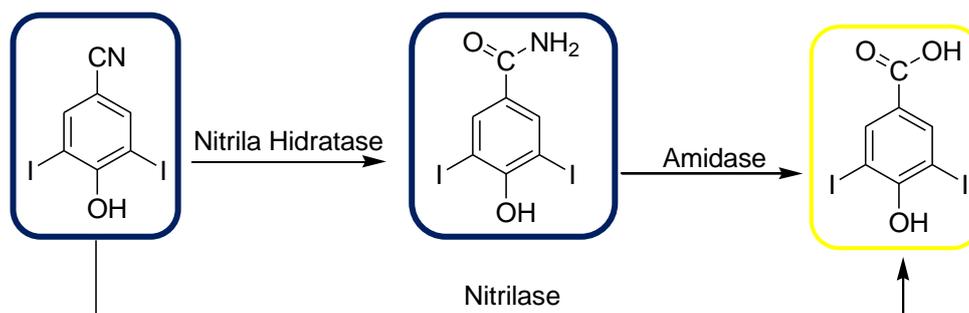
Esquema 19 - Reação catalisada pelas enzimas NHase, Amidase e Nitrilase e visão geral da estrutura tridimensional das mesmas.



Fonte: adaptado do PDB (3A8G, 3A1K, 3KLC) utilizando o software Pymol.

Este ensaio enzimático colorimétrico baseia-se na alteração de cor do meio em virtude da diminuição do pH, proveniente da formação de ácidos carboxílicos a partir de nitrilas catalisadas por nitrilases ou nitrilas hidratases/amidases, conforme apresentado no Esquema 20.

Esquema 20 - Biotransformação do Ioxinil catalisada pelas enzimas nitrilase, nitrila-hidratase e amidase.



Fonte: a autora.

Uma vez que o pH ótimo para as reações de hidratação e/ou hidrólise de compostos benzonitrilados é geralmente entre 7,0 e 7,5, o pH para o ensaio enzimático foi fixado em 7,2. O tampão fosfato 10 mM pH 7,2 foi escolhido por ser compatível com a atividade da maioria das nitrilases e nitrila-hidratases.⁴⁴

A concentração do tampão de 10 mM resulta em uma capacidade tamponante de moderada a fraca e, portanto, permitirá a visualização da viragem do indicador a partir de pequenas alterações no pH tornando o ensaio mais sensível.⁴⁴

A escolha do indicador foi conduzida pelos valores de pKa do mesmo. Sabe-se que em ensaios colorimétricos baseados em alterações de pH é desejável que o indicador e o tampão tenham a mesma afinidade por prótons, ou seja, os seus valores de pKa devem ser os mais próximos possíveis. Valores de pKa maiores que 0,3 unidades podem induzir a erros da ordem de 8% quando o pH varia em uma unidade.⁴⁴ Assim, o azul de bromotimol pKa 7,3 é um indicador adequado para os ensaios em tampão fosfato pKa 7,2.

Para verificar se a alteração de cor do azul escuro para o amarelo, relacionada à formação do ácido carboxílico do ioxinil, era devida à hidrólise catalisada por nitrilases ou pela ação de nitrila-hidratases seguida de hidrólise por amidases realizou-se, paralelamente, ensaios adicionando-se DEPA (dietilfosforamida) um conhecido inibidor de amidases.

Os resultados obtidos nos ensaios enzimáticos para detecção de nitrilase, nitrila-hidratase e amidase são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Ensaios enzimáticos para detecção de nitrilase, nitrila-hidratase e amidase.

Código do Micro-organismo	Controle microbiano	Ensaio sem DEPA	Ensaio com DEPA
MLH 29	Azul	Azul	Azul
MLH 30	Azul	Azul	Azul
MLH 31	Azul	Azul	Amarelo
MLH 32	Azul	Azul	Azul
MLH 33	Azul	Azul	Azul
MLH 34	Azul	Amarelo	Amarelo
MLH 35	Azul	Azul	Azul
MLH 36	Azul	Amarelo	Amarelo
MLH 37	Azul	Azul	Azul
MLH 38	Azul	Azul	Azul
MLH 39	Azul	Azul	Azul
MLH 40	Azul	Azul	Azul
MLH 42	Azul	Amarelo	Azul
MLH 43	Azul	Amarelo	Amarelo
MLH 44	Azul	Azul	Azul
MLH 45	Azul	Azul	Azul
MLH 48	Azul	Azul	Azul
MLH 51	Azul	Azul	Azul
MLH 52	Azul	Azul	Azul
MLH 53	Azul	Azul	Azul
MLH 54	Azul	Azul	Amarelo
MLH 55	Azul	Amarelo	Amarelo
MLH 56	Azul	Azul	Azul
MLH 57	Azul	Azul	Azul
MLH 59	Azul	Amarelo	Amarelo
MLH 60	Azul	Azul	Amarelo
MLH 61	Azul	Amarelo	Amarelo
MLH 62	Azul	Amarelo	Amarelo
MLH 63	Azul	Amarelo	Amarelo

Controle do ioxinil (3,5-diiodo-4-hidroxibenzonitrila): coloração azul; Controle do DEPA: coloração azul; Controle do derivado ácido do ioxinil (ácido 3,5-diiodo-4-hidroxibenzoico): coloração amarela.

Fonte: a autora.

Analisando a Tabela 4, é possível observar que no experimento relativo ao controle microbiano, para os 29 micro-organismos avaliados, não houve alteração de cor do meio. Este resultado indica que estes micro-organismos não excretam compostos com caráter ácidos em quantidades suficientes para o meio de cultura que poderiam gerar resultados falsos positivos. A partir desta análise conclui-se que este ensaio colorimétrico pode ser utilizado com confiança. Os micro-organismos MLH-29, 30, 32, 33, 35, 37-40, 44, 45, 48, 51-53 foram classificados como não produtores das enzimas nitrilase ou nitrila-hidratase/amidase uma vez que não foi observada nenhuma alteração de pH em função de formação de ácido carboxílico, ou seja, em todos os poços da microplaca a coloração manteve-se azul.

Nos ensaios para os micro-organismos MLH 34, 36, 43, 55, 59, 61, 62, 63 observou-se a alteração de cor do azul para o amarelo para ambos experimentos (com e sem adição de inibidor de amidase DEPA) indicando a formação de ácido carboxílico. Este resultado indica que o sistema enzimático responsável pela formação do ácido carboxílico, a partir de nitrila, nestes micro-organismos são nitrilases.

Já os micro-organismos MLH 31, MLH 54 e MLH 60 apresentaram resultado positivo apenas na presença do inibidor. Este resultado sugere a presença de nitrilases. O resultado negativo para o ensaio sem inibidor pode ser justificado por uma possível competição/supressão enzimática. O fato de ser uma célula íntegra e não enzimas isoladas pode desfavorecer a nitrilase na competição pelo substrato ou impedi-la de reconhecer o mesmo. Em contrapartida, para o micro-organismo MLH 42 os resultados sugerem a presença exclusiva do sistema nitrila hidrase/amidase.

Dentre os 29 micro-organismos analisados 8 apresentaram nitrilases, 1 apresentou nitrila-hidratase /amidase e 3 micro-organismos indicaram resultados indefinidos.

4.2.1 Confirmação dos resultados de triagem para Nitrila-hidratase, Nitrilase e Amidase

A confirmação dos resultados de triagem para Nitrila-hidratase, Nitrilase e Amidase foi realizada por meio dos experimentos de estudo de biodegradação do herbicida octanoato de ioxinila. Os micro-organismos escolhidos foram o MLH 60, 31, 54 e 61 já que estão entre os *hits* positivos do ensaio de triagem enzimática e com indefinição do sistema enzimático responsável pela conversão da nitrila em ácido carboxílico.

No experimento de biodegradação do herbicida (octanoato de ioxinila), monitorado por HPLC-MS, verificou-se a presença tanto da amida quanto do ácido carboxílico

correspondentes. Isso se deve à ação da nitrila-hidratase que convete o grupo nitrila em amida, e à ação da nitrilase que converte o grupo nitrila em ácido carboxílico. Através dos produtos de biodegradação formados, confirma-se a presença das enzimas nitrila-hidratase e nitrilase para o MLH 31, 54, 60 e 61, conforme foi observado no ensaio colorimétrico de triagem enzimática, validando assim os resultados obtidos.

PARTE 2: Estudos de Biodegradação do Totril®

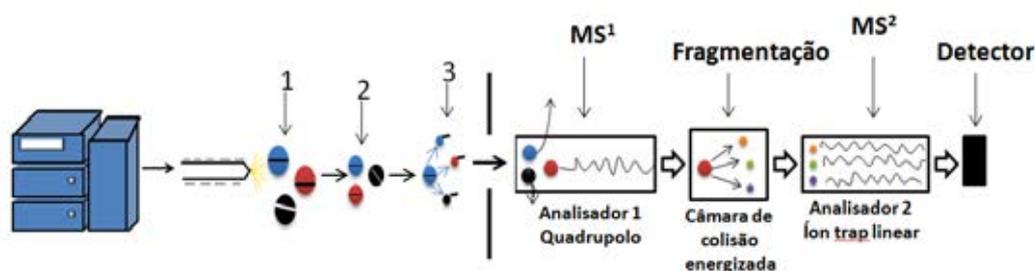
4.3 RESULTADOS DO ESTUDO DE BIODEGRADAÇÃO

4.3.1 Monitoramento dos produtos de biodegradação

A identificação e monitoramento dos produtos de biodegradação foram realizados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas - HPLC-MS/MS (**Parte experimental 3.2.8**), do laboratório do grupo de Eletroquímica de Araraquara do IQ-UNESP.

O HPLC-MS/MS é uma técnica analítica hifenada que combina a capacidade física de separação do HPLC (High Performance Liquid Chromatography) com a capacidade de análise da razão massa/carga de íons da Espectrometria de Massas (Figura 6).

Figura 6 - Esquema de um HPLC – MS/MS: 1 pequenas gotículas de solvente e analito carregados negativamente, 2 essas gotículas são evaporadas, 3 até que se formam íons isolados e são transferidos para os analisadores de massas.



Fonte: a autora.

Nessa técnica, após o processo de separação cromatográfica, o eluato da coluna cromatográfica adentra a fonte de ionização (neste caso, *eletrospray* -ESI) e sobre essa solução é aplicado um alto potencial. Como consequência, a amostra se ioniza em solução e deixa a fonte com auxílio de gás de nebulização (N_2) na forma de spray. As pequenas gotículas de solvente e analito carregados negativamente (análises no Modo negativo) (1 - Figura 6) são evaporadas (2-Figura 6) até que se tornam íons isolados (3 - Figura 6). Em seguida, os íons formados são transferidos para uma região de alto vácuo onde se encontram os analisadores de massas.⁴⁵

O equipamento utilizado trata-se de um equipamento híbrido, que contém dois analisadores diferentes: um primeiro analisador (Quadrupolo, Q1) e um segundo analisador que trata-se de um íon trap linear (LIT). Este último possui ainda a vantagem de operar como um simples quadrupolo (Q3). O analisador quadrupolo (Qq) possui a função tanto de escanear os íons quanto de filtrá-los para que somente um determinado

íon seja analisado. Já o analisador íon trap linear (LIT) possui a capacidade de acumular os íons por tempo (mseg), que pode ser ajustado para cada tipo de amostra. Posteriormente os íons são identificados pelo detector, placa fotomultiplicadora de elétrons, que transforma o sinal eletrônico em dados processados pelo computador. Os equipamentos que possuem analisadores sequenciais, possuem ainda uma câmara de colisão induzida (CID) onde, com auxílio de gás nitrogênio, pode-se viabilizar as análises de MS/MS. Os experimentos de íons fragmentos, por exemplo, são realizados da seguinte forma: um íon precursor é selecionado no quadrupolo (Q1), neste caso funcionando como um filtro para a passagem de um determinado m/z , em seguida esse íon entra na CID, onde sofre colisão com o gás nitrogênio (gás de colisão) com determinada energia (energia de colisão, CE) e se fragmenta. Os íons resultantes (denominados íons fragmentos) são então escaneados em Q3. Dessa forma são obtidos os experimentos de íons fragmentos. Quando o Q3 é utilizado como LIT, os íons fragmentos obtidos vão sendo acumulados, permitindo assim um aumento na intensidade do sinal quando comparada com o uso de Q3.⁴⁵

Para as análises dos experimentos com os micro-organismos MLH 31, MLH 54 e MLH 61, o analisador quadrupolo e íon trap linear foram associados a um software apropriado para o estudo de biotransformação (LightSight, AB Sciex), uma ferramenta que facilita a análise de produto de biodegradação de uma reação. O LightSight® Software tem um display de dados que faz a comparação entre as amostras controles e os experimentos dispensando a comparação visual. Com esse Software foram realizados experimentos de MRM (Multiple Reaction Monitoring – monitoramento de reações múltiplas), PI (Íon precursor) e EMS (Enhanced mass spectra, varredura de íons utilizando o ion trap linear).

No experimento de MRM o primeiro quadrupolo (Q1) monitora os íons-precusores na camara de colisão (CID) esses íons são fragmentados, e no terceiro quadrupolo (Q3) os íons fragmentos referentes a reação indicada são monitorados. No experimento de íons precusores (PI) o primeiro quadrupolo (Q1) faz uma varredura de íons em uma faixa de m/z (130-550 Da), a câmara de colisão fragmenta os íons dessa faixa pré selecionada e o terceiro (Q3) monitora um íon fragmento selecionado (m/z 126,9). Já no experimento EMS, o primeiro quadrupolo (Q1) e a câmara de colisão apenas transmitem os íons para o terceiro quadrupolo, que está operando como ion trap linear (LIT), onde se realiza uma varredura de íons com acúmulo.

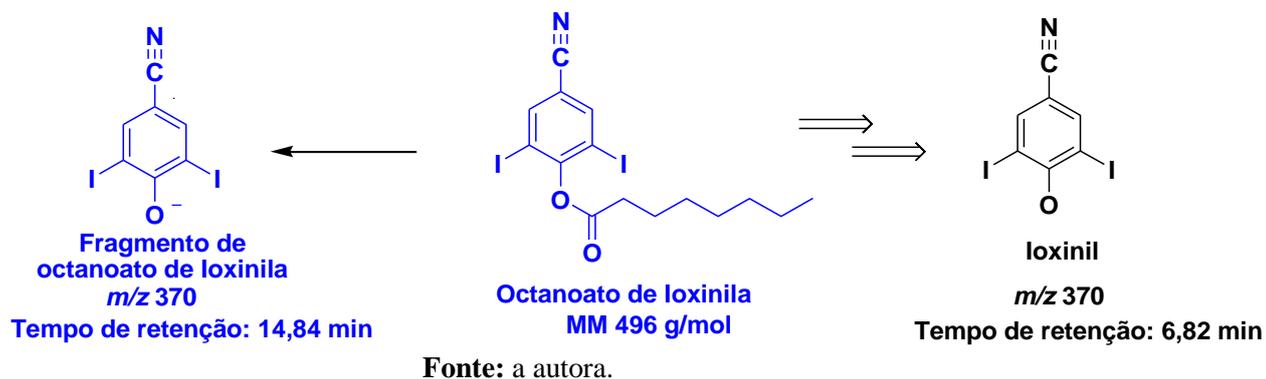
Todos os experimentos montados pelo software incluem dados dependentes, onde a fragmentação dos íons encontrados é realizada simultaneamente, promovendo assim a maior informação estrutural possível do composto encontrado. Dessa forma, após a montagem dos experimentos, partiu-se para a injeção das amostras, nas mesmas condições cromatográficas já otimizadas e realizadas anteriormente.

4.3.2 Estudos de Biodegradação do Totril®

No estudo de biodegradação de herbicida benzonitrilado foi utilizado o herbicida Totril® cujo princípio ativo é o octanoato de ioxinila em concentração de 33,5 % m/v segundo o fabricante (Bayer SA). Os micro-organismos MLH 31, 54, 60 e MLH 61 utilizados na biodegradação do herbicida foram isolados pelo grupo de Biocatálise IQ-UNESP no solo de uma Fazenda de Cebolas na cidade de São José do Rio Pardo, um dos maiores centros produtores de cebola do estado de São Paulo e que utiliza o herbicida Totril®. O MLH 60, primeiro micro-organismo utilizado na reação, foi identificado como *Bacillus cereus* com 100% de confiabilidade através de testes baseados em sequenciamento Sanger, realizados pela empresa Genotyping Biotecnologia e pela Dra. Weilan Gomes Paixão do Laboratório de Microbiologia do CEIS-UNESP Rio Claro, coordenado pelo Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca. Os laboratórios trabalharam de forma paralela e independente. Os micro-organismos restantes estão em fase de identificação e classificação taxonômica. A coleta de amostras de solo nesta região tão específica visou a pré-seleção de uma microbiota que já estivesse naturalmente adaptada aos compostos benzonitrilados.

O herbicida Totril® tem como princípio ativo o composto octanoato de oxinila. Entretanto as análises cromatográficas (GC-FID e LC-MS/MS) mostraram que o composto ioxinil (um dos materiais de partida para a síntese do octanoato de ioxinila) também está presente na formulação comercializada pela Bayer. O composto ioxinil possui tempo de retenção de 6,82 minutos e m/z 370, enquanto o octanoato de ioxinila apresenta um tempo de retenção correspondente a 14,84 min e o íon m/z 370 $[M - C_8H_{16}O]^-$ relativo à clivagem do éster na fonte de ionização (Esquema 21).

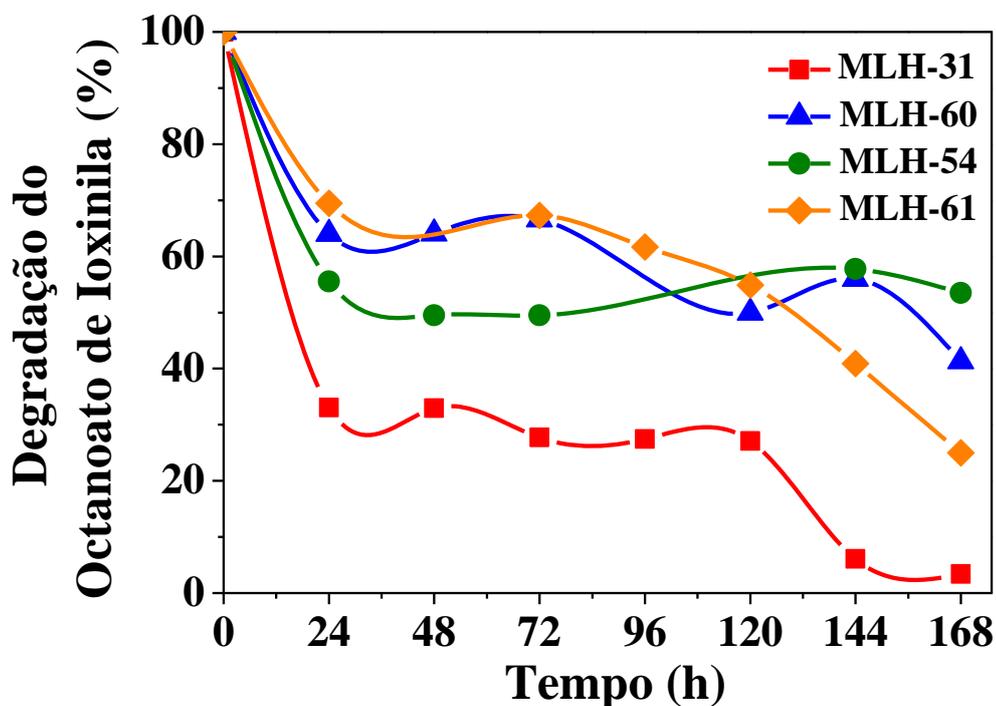
Esquema 21 - Fragmentação do octanoato de ioxinila na fonte de ionização no MS/MS e a sua síntese do a partir do ioxinil.



Além do experimento controle para verificar a estabilidade química do substrato nas condições reacionais foi realizado o experimento controle com os micro-organismos MLH 31, 54, 60 e 61. No experimento controle dos micro-organismos não verificou-se a formação de produto de biodegradações oriundos do octanoato de ioxinila.

As reações de biodegradação foram monitoradas durante as 168 horas de reação. A biodegradação do octanoato de ioxinila com MLH 60, 31, 54, 61 foi de 58,71%, 96,61%, 46,51% e 75,04% respectivamente (Figura 7). Na reação com o micro-organismo MLH 31 verificou-se a biodegradação quase completa do octanoato de ioxinila.

Figura 7 - Monitoramento da biodegradação do octanoato de ioxinila (Totril®).

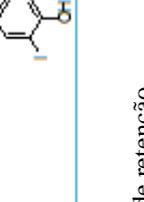


Fonte: a autora.

De acordo com a literatura, em um estudo de dissipação do octanoato de ioxinila no solo, verificou-se que em 14 dias esse herbicida já havia desaparecido quase por completo (99,0%).⁴⁶ A reação de biodegradação desse herbicida com o micro-organismo MLH 31, apontou a biodegradação de 96,61% em 7 dias. Quando esse mesmo resultado é comparado com estudos de biodegradação do ioxinil disponíveis na literatura, a biodegradação pelo MLH 31 sobre o octanoato de ioxinila é ainda melhor. Estudos distintos apontam valores de biodegradação iguais a: 60% em 3 dias, 40% em 6 dias e 99% em 19 dias.^{33,47,48}

Os produtos de degradação são apresentados na Tabela 5 (espectros de massas estão em anexo).

Tabela 5 - Produtos obtidos na degradação do Totril® monitorados por HPLC-MS/MS.

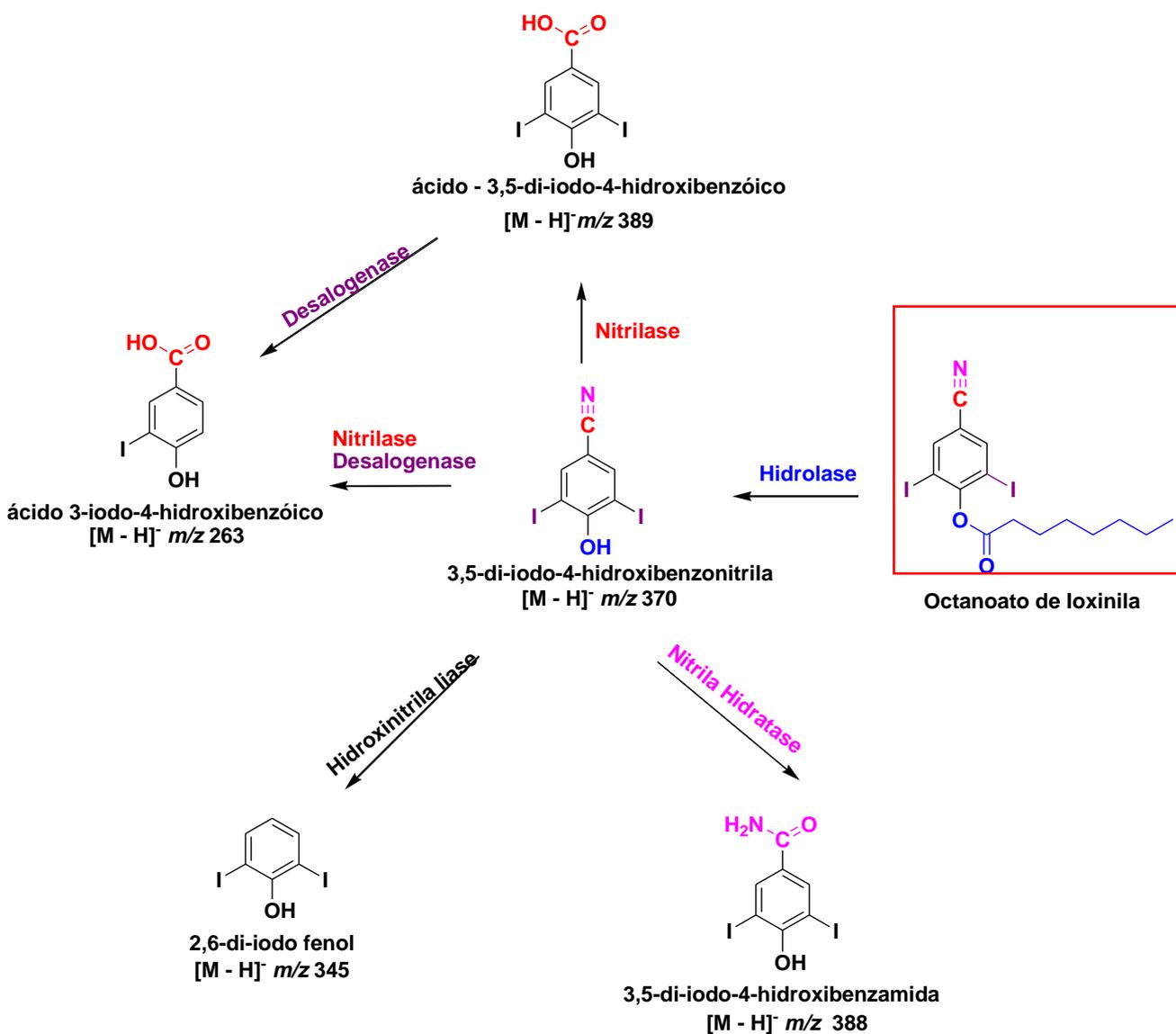
íon m/z	Estrutura	Nome	*tR (min)	Íons fragmento	Micro-organismos
388		3,5-di-iodo-4-hidroxi-benzamida	5,79	127,0	MLH 31, 54, 60 e 61
244*		3-iodo-4-hidroxi-benzonitrila	8,31	126,8	MLH 31, 54, 60 e 61
263		Ácido 3-iodo-4-hidroxi-benzóico	4,48	219,0; 126,8	MLH 31, 54, 60 e 61
389		Ácido 3,5-di-iodo-4-hidroxi-benzóico	5,31	345,0; 126,8	MLH 31, 54, 60 e 61
345		2,6-di-iodo-fenol	5,81	127,0	MLH 31 e 61
370		3,5-di-iodo-4-hidroxi-benzonitrila	6,82	243; 126,8; 116	MLH 31, 54, 60 e 61

* tR: Tempo de retenção

* Nesses experimentos verificou que o íon m/z 244 é um produto de degradação formado sem a ação das enzimas, uma vez que o mesmo também está presente nos experimentos controle dos substratos.

Os resultados obtidos sugerem a presença de 5 enzimas envolvidas na biodegradação do herbicida: Nitrilase (EC 3.5.5.xx), Desalogenase (E.C. 3.8.1.XX), Nitrila-hidratase (EC 4.2.1.xx), Hidrolase (E.C. 3.1.1.XX) e Hidroxinitrila liase (E.C. 4.1.2. xx). A enzima Nitrilase é responsável pela conversão da nitrila no ácido carboxílico correspondente, enquanto a Desalogenase promoveu a clivagem de um dos átomos de iodo no anel aromático. A presença da amida pode ser justificada pela presença de uma Nitrila-hidratase, enzima responsável pela hidratação de nitrilas em amidas, a hidrolase pela hidrólise do éster caprílico e a Hidroxinitrila liase pela clivagem da ligação C-C entre o anel aromático e a nitrila. As enzimas sugeridas e seus respectivos produtos de biodegradação são apresentados no Esquema 22.

Esquema 22 - Ação das enzimas sugeridas e seus respectivos produtos de biodegradação.

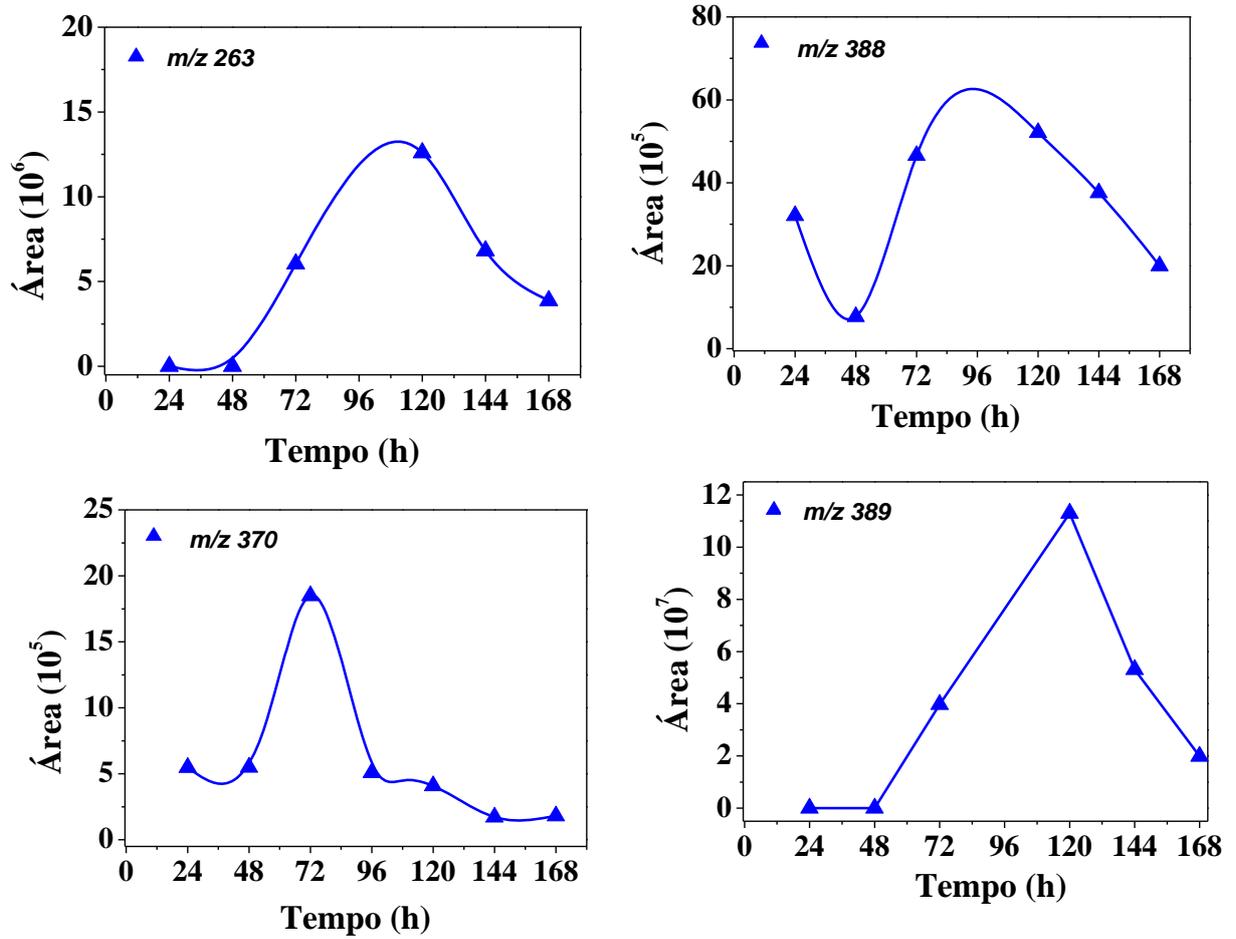


Fonte: a autora.

A biodegradação do herbicida octanoato de ioxinila gerou o produto de biodegradação de m/z 370, que possui a mesma estrutura do ioxinil (material de partida para a síntese do octanoato de ioxinila). Para diferenciar o produto de biodegradação de m/z 370 do ioxinil presente no herbicida, verificou-se o aumento da área referente ao produto de biodegradação de m/z 370 na reação de biotransformação frente à área do experimento controle Totril®. Este aumento também foi observado no controle Totril®, porém na amostra de reação biocatalítica esse aumento foi maior que no controle do substrato, indicando assim a presença e atuação da enzima hidrolase.

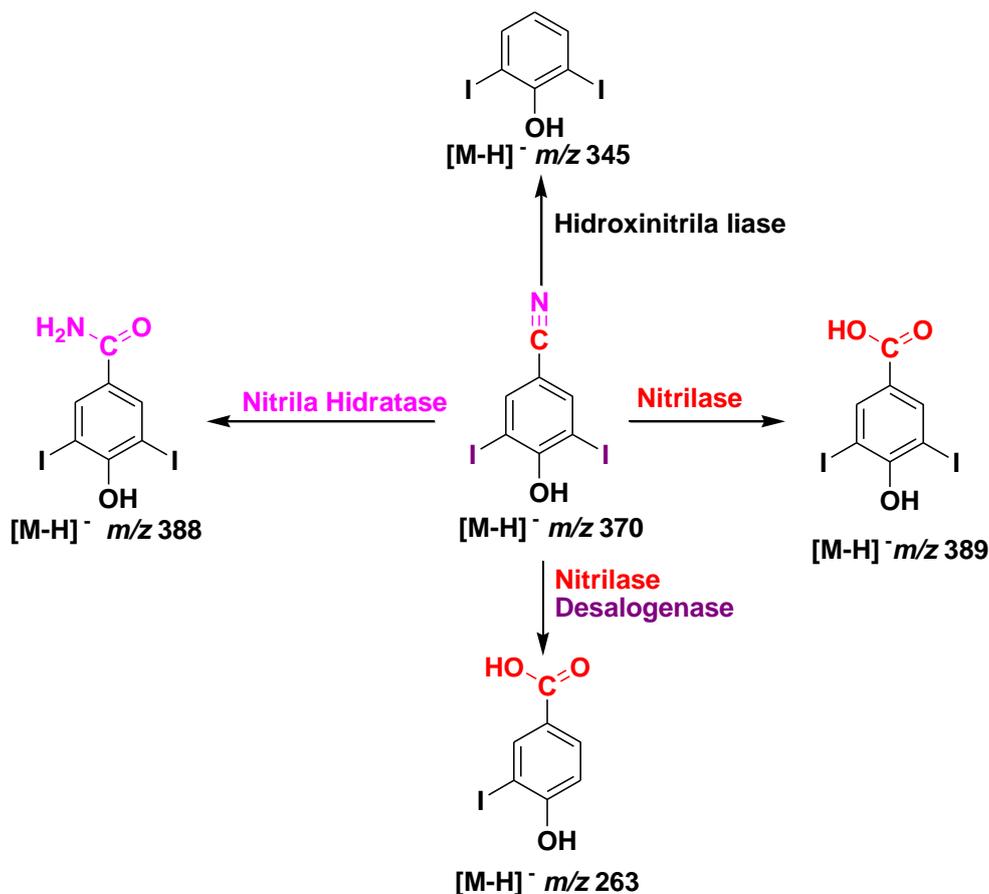
Nas reações de biodegradação do octanoato de ioxinila pelos micro-organismos MLH 60, 31, 54 e 61, as concentrações dos íons produtos foram estimadas pela área. Na reação com MLH 60 os íons m/z : 263, 388 e 389 correspondem a produtos e as concentrações desses íons apresentaram um comportamento em comum (Figura 8): concentração máxima em 120h, observando-se após esse período um decréscimo até o término da reação. O produto de biodegradação íon m/z 370, foi o único que não apresentou o comportamento descrito acima. A concentração máxima do íon m/z 370 foi em 72h, observando-se após esse período um decréscimo até o final da reação. Esses dados sugerem que os produtos de biodegradações de m/z 388, 263 e 389 formados, são oriundos do íon m/z 370 a partir de 120 horas (Esquema 23).

Figura 8- Monitoramento dos produtos de biodegradação da reação com MLH 60.



Fonte: a autora.

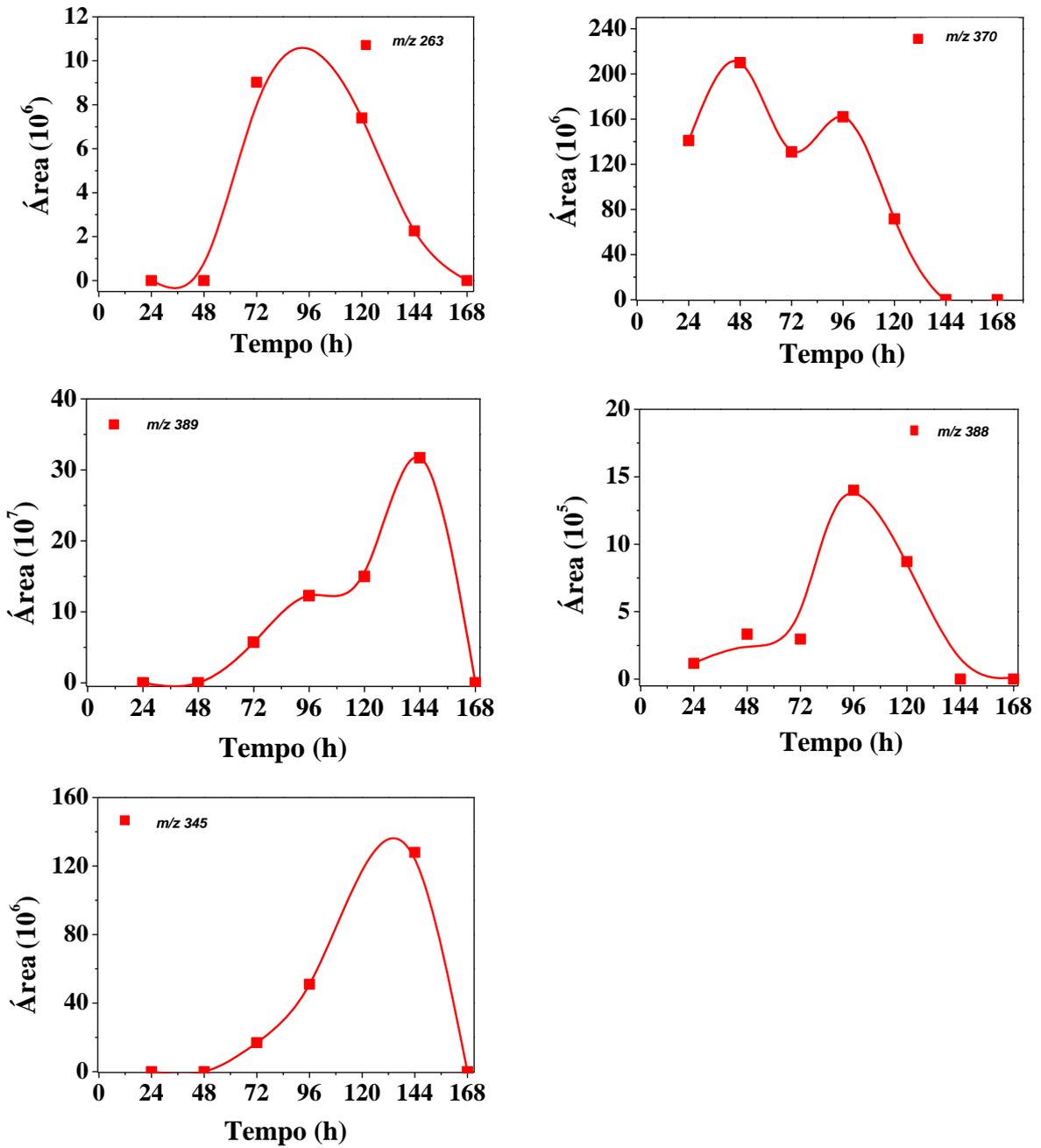
Esquema 23 - Produtos m/z 263, 345, 388 e 389 formados a partir do produto de biodegradação m/z 370.



Fonte: a autora.

A reação com MLH 31 apresentou os íons m/z : 263, 345, 388 e 389 como produtos. O íon m/z 263 apresentou uma concentração máxima em 72 horas, observando-se após esse período um decréscimo até o final da reação. Os íons m/z 345 e 389 apresentaram uma concentração máxima em 144 horas e o íon m/z 388 uma concentração máxima em 96 horas, observando-se após esses períodos um decréscimo até o final da reação. Já o íon m/z 370 não apresentou o mesmo comportamento e sua concentração máxima foi em 48 horas, após esse período verificou-se um decréscimo até o final da reação, porém com um pequeno aumento na sua concentração em 96 horas (Figura 9). Esses resultados sugerem que os produtos de biodegradação formados são procedentes do íon m/z 370 a partir de 72h (íon m/z 263) e 144 horas (íons m/z 345 e 389) (Esquema 23).

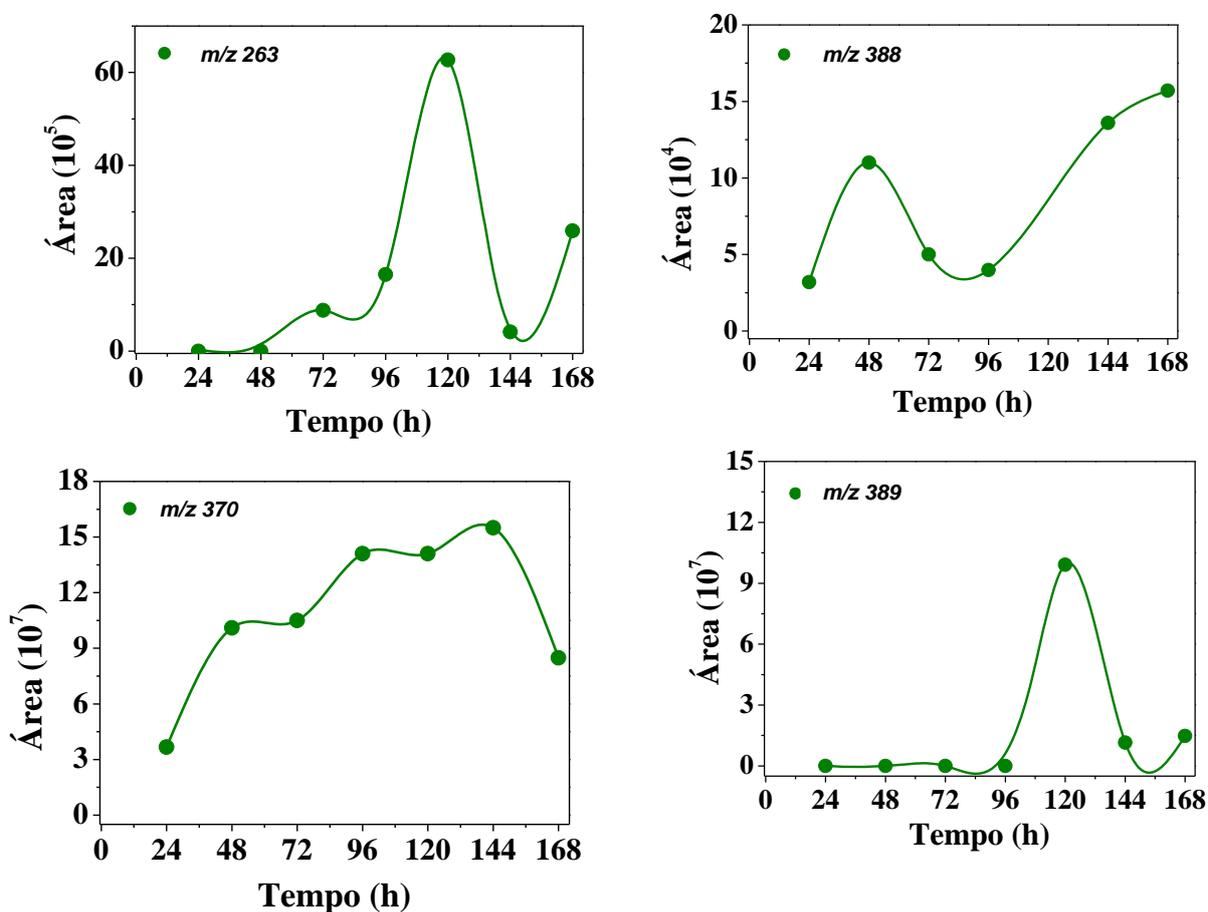
Figura 9 - Monitoramento dos produtos de biodegradação da reação com MLH 31.



Fonte: a autora.

Os experimentos com o MLH 54 apresentaram os íons m/z : 263, 388 e 389 como produtos. Os íons m/z : 263 e 389 exibiram uma concentração máxima em 120 horas, observando-se após esse período um decréscimo até 144 horas, e o íon m/z 388 apresentou a sua concentração máxima em 48 horas, observando-se após esse período um decréscimo na sua concentração, a qual voltou a subir após 168 horas com o final da reação. Já o íon de m/z 370 apresentou uma concentração máxima em 144 horas e verificou-se um decréscimo na sua concentração em 72, 120 e 168 horas (Figura 10). Isso sugere que a partir de 120 horas os íons m/z 263 e 389 são procedentes do íon m/z 370, e o íon m/z 388 a partir de 48 e 168 horas (Esquema 23).

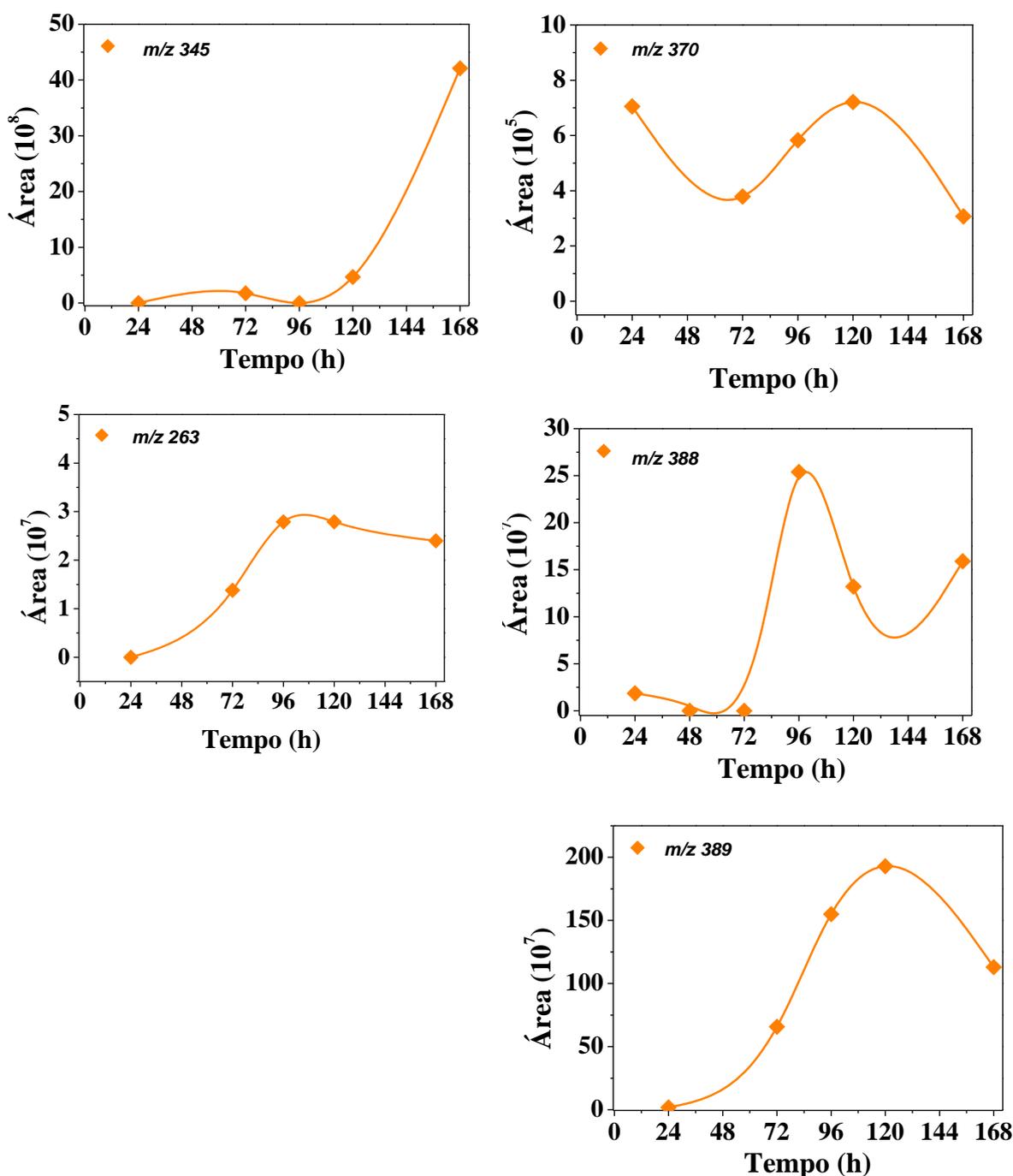
Figura 10 - Monitoramento dos produtos de biodegradação da reação com MLH 54.



Fonte: a autora.

Por fim, a reação com MLH 61 apresentou os produtos de íons m/z : 263, 345, 388 e 389. O aumento das concentrações dos íons de m/z 263 e 389 iniciou-se a partir de 24 horas e o íon de m/z 345 a partir de 72 horas, permanecendo até o final da reação. O íon de m/z 370 a partir de 24 horas apresentou um decréscimo na concentração o que ocorreu novamente a partir de 120 horas, permanecendo até o final da reação (Figura 11). Isso sugere que os produtos de m/z 263 e 389 a partir de 24 horas são oriundos do íon m/z 370 e o produto de m/z 345 a partir de 72 horas (Esquema 23).

Figura 11 - Monitoramento dos produtos de biodegradação da reação com MLH 61.



Em relação ao íon m/z 263 verificou-se que as enzimas desalogenases atuam quando o produto de biodegradação é dialogenado e não monoalogenado já que realizaram a clivagem de um iodo apenas. Não observou-se a ação dessas enzimas no produto de m/z 388 indicando sua especificidade para o substrato diiodado.

O produto da clivagem da nitrila do anel aromático não foi observado nas reações com MLH 54 e 60. Este resultado pode ser racionalizado pelo fato de o substrato estericamente impedido não se encaixar no sítio ativo da enzima hidroxinitrila liase.⁴⁷ Uma outra hipótese seria a ausência da enzima hidroxinitrila liase nos microorganismos MLH-60 e 54. Esta hipótese é sustentada pelos resultados obtidos nos ensaios de triagem enzimática colorimétrica para hidroxinitrila liase descritos na Parte 1 desta Dissertação.

As reações de biodegradação com MLH 31 e MLH 61 apresentaram o produto resultante da clivagem na nitrila do anel aromático. Este resultado poderia sugerir a presença da enzima hidroxinitrila liase como foi proposto inicialmente, porém ao confrontar esses resultados com os resultados obtidos nas triagens enzimáticas para a hidroxinitrila liase, não observou-se a presença dessa enzima. Com isso, pode-se sugerir que o produto de biodegradação de m/z 345 foi oriundo de uma descarboxilação a partir do produto de m/z 389.

4.4 Atividade biológica de herbicidas e produtos de biodegradação

A atividade biológica de herbicidas e produtos de biodegradação foi avaliada em estudos prévios descritos na literatura. Os trabalhos publicados avaliaram a toxicidade desses compostos com base na inibição de sementes germinativas de alface (*Lactuca sativa*) e na inibição de uma enzima da família do citocromo P450 (CYP73) extraída de *Helianthus tuberosus*. Outros estudos publicados avaliaram a capacidade desses compostos em estimular o crescimento da planta everilha.^{48,49,50,51}

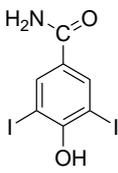
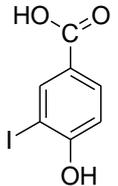
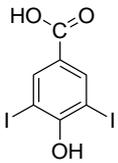
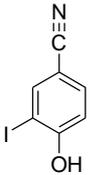
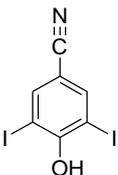
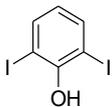
Nos ensaios de toxicidade utilizando *L. sativa*, os produtos de biodegradação 3,5-di-iodo-4-hidroxibenzamida (**15** Tabela 4) e o Ácido 3,5-di-iodo-4-hidroxibenzóico (**17** Tabela 4) em uma concentração de 0,5 mM, exerceram menor efeito de inibição nas sementes germinativas (87% e 67% respectivamente) comparados ao Ioxinil (**19** Tabela 4) que apresentou uma inibição de 100%. Os dados obtidos a partir desse ensaio comprovaram que os produtos de biodegradações gerados na biodegradação são menos tóxicos que o Ioxinil.^{48,49}

As enzimas do complexo citocromo P450 formam uma super família de hemoproteínas que estão envolvidas na biotransformação de vários compostos de origem endógena e exógena. No ensaio realizado para avaliar a toxicidade do produto de biodegradação 3-iodo-4-hidroxibenzonitrila (**16** Tabela 4), utilizou-se a enzima CYP73 isolada de uma planta conhecida como girassol batateiro (*Helianthus tuberosus*). A inibição da enzima CYP73 possivelmente contribui para a fitotoxicidade de herbicidas hidroxibenzonitrilados uma vez que essas enzimas estão envolvidas na metabolização de diversos xenobióticos, proporcionando uma ferramenta importante para a detoxificação de contaminantes ambientais. No ensaio verificou-se que a constante de inibição (K_i) do Ioxinil foi de 2 μ M enquanto que para o produto de biodegradação **18** (Tabela 4), a constante foi de 196 μ M, indicando uma maior toxicidade do Ioxinil.⁵⁰

De acordo com a literatura o primeiro passo na detoxificação de compostos hidroxibenzonitrilados ocorre pela ação das enzimas nitrilase que hidrolisam o grupo nitrila em ácido carboxílico. A substituição de uma função nitrila por um carboxilato suprime completamente a inibição da CYP73. O produto de biodegradação 3-iodo-4-hidroxibenzonitrila (**18** Tabela 4), sob a ação da enzima nitrilase gera o Ácido 3-iodo-4-hidroxibenzóico (**16** Tabela 4), desta forma, pode-se concluir que esse produto de biodegradação é menos tóxico do que aquele possuindo o grupo nitrila, e consequentemente, menos tóxico que o Ioxinil.⁵⁰

No estudo sobre os compostos que exercem atividade de crescimento da planta ervilha, verificou-se que o composto 2,6-di-iodo fenol (**20** Tabela 4) é um promotor de crescimento da ervilha na concentração de 1,0-50 μM . Porém na concentração de 250-100 μM , esse composto (**20** Tabela 4) torna-se tóxico para a planta. Observou-se também que a substituição do hidrogênio na posição 4 do composto 2,6-di-iodo fenol (**20** Tabela 4) por um ácido carboxílico ou por uma nitrila anula completamente esta atividade.⁵¹

Tabela 4. Produto de biodegradações de biodegradação do Octanoato de Ioxinila (Totril®)

<p>15</p> 	<p>16</p> 	<p>17</p> 
<p>3,5-di-iodo-4-hidroxi-benzamida</p>	<p>Ácido 3-iodo-4-hidroxi-benzoico</p>	<p>Ácido 3,5-di-iodo-4-hidroxi-benzoico</p>
<p>18</p> 	<p>19</p> 	<p>20</p> 
<p>3-iodo-4-hidroxi-benzonitrila</p>	<p>3,5-di-iodo-4-hidroxi-benzonitrila</p>	<p>2,6-di-iodo fenol</p>

Fonte: a autora.

5. CONCLUSÃO

A bioprospecção de linhagens microbianas da biodiversidade brasileira quanto à presença das enzimas hidroxinitrila liases, nitrila, nitrila-hidratase e amidase através de ensaios de triagens enzimáticas colorimétricos foi bem sucedida. Entre os micro-organismos avaliados, 27 exibiram atividade hidroxinitrila liase, 8 apresentaram atividade nitrilase (MLH 34, 36, 43, 55, 59, 61, 62, 63), 1 atividade nitrila-hidratase/amidase (MLH 42) e 3 micro-organismos apresentaram um sistema enzimático indefinido (MLH 31, MLH 54 e MLH 60). Estes resultados foram confirmados através de ensaios com análise por métodos espectrométricos/cromatográficos e são importantes para a classificação enzimática destes micro-organismos e sua posterior aplicação biotecnológica.

O estudo das rotas enzimáticas para a biodegradação do octanoato de ioxinila foi realizado com os micro-organismos MLH 31, 54, 61 e MLH-60 (*Bacillus cereus*). Ao longo de 7 dias de monitoramento, detectou-se 5 produtos de biodegradação (ácido-3,5-di-iodo-4-hidroxibenzoico, ácido-3-iodo-4-hidroxibenzoico, 2,6-di-iodo fenol, 3,5-di-iodo-4-hidroxibenzonitrila e 3,5-di-iodo-4-hidroxibenzamida), que foram identificados e caracterizados por HPLC-MS/MS. Dentre esses verificou-se que os produtos 2,6-di-iodo fenol e ácido-3-iodo-4-hidroxibenzoico não foram ainda relatados na literatura. As enzimas envolvidas na formação destes produtos de biodegradação são: nitrilase, nitrila-hidratase, desalogenase e hidrolase. Segundo os dados da literatura, os produtos de biodegradação aqui descritos são menos tóxicos quando comparados ao herbicida Totril®.

6. REFERÊNCIAS

- 1 HOYOS, P.; PACE, V.; HERNÁIZ, M. J.; ALCÁNTARA, A. R. Biocatalysis in the pharmaceutical industry. A Greener Future. **Curr. Green Chem.**, v. 1, n. 2, p. 155-181, 2014.
- 2 WOHLGEMUTH, R. The locks and keys to industrial biotechnology. **New Biotech.**, v. 25, n. 4, p. 204-213, 2009.
- 3 SHELDON, R. A. Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, n. 4, p. 1437-1451, 2012.
- 4 OLIVEIRA, L. G. de; MANTOVANI, S. M. Transformações biológicas: contribuições e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 32, n. 3, p. 742-756, 2009.
- 5 SOLANO, D. M.; HOYOS, P.; HERNÁIZ, M. J.; ALCÁNTARA, A. R.; SÁNCHEZ-MONTERO, J. M. Industrial biotransformations in the synthesis of building blocks leading to enantiopure drugs. **Bioresour. Technol.**, v. 115, p. 196-207, 2012.
- 6 RAN, N.; ZHAO, L.; CHEN, Z.; TAO, J. Recent applications of biocatalysis in developing green chemistry for chemical synthesis at the industrial scale. **Green Chem.**, v. 10, n. 4, p. 361-372, 2008.
- 7 REETZ, M. T. Biocatalysis in organic chemistry and biotechnology: past, present, and future. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 135, n. 34, p. 12480-12496, 2013.
- 8 CLOUTHIERZAB, M.; PELLETIER, J. N. Expanding the organic toolbox: a guide to integrating biocatalysis in synthesis. **Chem. Soc. Rev.**, v. 41, n. 4, p. 1585-1605, 2012.
- 9 BINOD, P.; PALKHIWALA, P.; GAIKAIWARI, R.; NAMPOOTHIRI, K.-M.; DUGGAL, A.; DEY, K.; PANDEY, A. Industrial enzymes - present status and future perspectives for India. **J. Sci. Res.**, v. 72, p. 271-286, 2013.
- 10 STRAATHOF, A. J. J.; PANKE, S.; SCHIMID, A. The production of fine chemicals by biotransformations. **Curr. Opin. Chem. Biotechnol.**, v. 13, n. 6, p. 548-556, 2002.
- 11 OLIVEIRA, J. R. de; MIZUNO, C. M.; SELEGHIM, M. H. R.; JAVAROTI, D. C. D.; REZENDE, M. O. O.; LANDGRAF, M. D.; SETTE, L. D.; PORTO, A. L. M. Biotransformation of phenylacetonitrile to 2-hydroxyphenylacetic acid by marine fungi. **Mar. Biotechnol.**, v. 15, n. 1, p. 97-103, 2013.
- 12 OLIVEIRA, J. R. de; SELEGHIM, M. H.; PORTO, A. L. M. Biotransformation of methylphenylacetonitriles by Brazilian marine fungal strain *aspergillus sydowii* CBMAI 934: eco-friendly reactions. **Mar. Biotechnol.**, v. 16, n. 2, p. 156-160, 2014.
- 13 BANERJEE, A.; SHARMA, R.; BANERJEE, U. C. The nitrile-degrading enzymes: current status and future prospects. **App. Microbiol. Biotechnol.**, v. 60, n. 1/2, p. 33-44, 2002.

- 14 OLIVEIRA, J. R. de **Hidrólise enzimática de nitrilas pelo fungo de origem marinha *Aspergillus sydowii* CBMAI 934**. 2012. 170 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2012.
- 15 ISHIGE, T.; HONDA, K.; SHIMIZU, S. Whole organism biocatalysis. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 9, n. 2, p. 174-180, 2005.
- 16 TAO, J.; XU, J.-H. Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 13, n. 1, p. 43-50, 2009.
- 17 RANTEK, P. W.; MAURICE, N. G.; JOSEPH, B.; WADHER, B. J. Nitrile converting enzymes: an eco-friendly tool for industrial biocatalysis. **Biotechnol. Appl. Biochem.**, v. 60, n. 5. p. 459-481, 2013.
- 18 MARTÍNCOVA, L.; VEJVODA, V.; KREN, V. Selection and screening for enzymes of nitrile metabolism. **J. Biotechnol.**, v. 133, p. 318-326, 2008.
- 19 LANGERMANN, J.; WAPENHENSCH, S. Cyanohydrins in biocatalytic active Static emulsions (BASE) with suppression of the non- enzymatic side reaction. **Adv. Synth. Catal.**, v. 356, n. 14/15, p. 2989-2997, 2014.
- 20 SHARMA, M.; SHARMA, N. N.; BHALLA, T. C. Hydroxynitrile lyase: at the interface of biology and chemistry. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 37, n. 3, p. 279-294, 2005.
- 21 DADASHIPOUR, M.; ASANO, Y. Hydroxynitrile lyases: insights into biochemistry, discovery, and engineering. **ACS Catal.**, v. 1, n. 9, p. 1121-1149, 2011.
- 22 DREVENY, I.; ANDRYUSHKOVA, A. S.; GLIEDER, A.; GRUBER, K.; KRATKY, C. Substrate binding in the FAD-dependent hydroxynitrile lyase from almond provides insight into the mechanism of cyanohydrin formation and explains the absence of dehydrogenation activity. **Biochemistry**, v. 48, n. 15, p. 3370-3377, 2009.
- 23 PSCHIEDT, B.; AVI, M.; GAISBERGER, R.; HARTNER, F. S.; SKRANC, W.; GLIEDER, A. Screening hydroxynitrile lyases for (*R*)-pantolactone synthesis. **J. Mol. Catal., B: Enzym.**, v. 52/53, p. 183-188, 2008.
- 24 MARTINKOVA, L.; KREN, B. Biotransformation with nitrilases. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 14, n. 2, p. 130-137, 2010.
- 25 YAMAMOTO, K.; OISHI, K.; FUJIMATSU, I.; KOMATSU, K. Production of *R*-(-)-mandelic acid from mandelonitrile by *Alcaligenes faecalis* ATCC 8750. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 57, n. 10, p. 3028-3032, 1991.
- 26 CHEN, J.; ZHENG, R.-C.; ZHENG, Y.-G.; SHEN, Y.-C. Microbial transformation of nitriles to high-value acids or amides. **Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.**, v. 113, p. 33-77, 2009.

- 27 SYED, M. A.; AHMAD, S. A.; KUSNIN, N.; SHUKOR, M. Y. A. Purification and characterization of amidase from acrylamide-degrading bacterium *Burkholderia* sp. Strain DR.Y27. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 11, n. 2, p. 329-336, 2012.
- 28 TORRELO, G.; HANEFELD, U.; HOLLMANN, G. Biocatalysis. **Catal. Lett.**, v. 145, p. 309-345, 2015.
- 29 SHAW, N. M.; ROBINS, K. T.; KIENER, A. Lonza: 20 years of biotransformations. **Adv. Synth. Catal.**, v. 345, n. 4, p. 425-435, 2003.
- 30 ZHENG, R.-C.; YANG, Z.-Y.; LI, C.-C.; ZHENG, Y.-G.; SHEN, Y.-C. Industrial production of chiral intermediate of cilastatin by nitrile hydratase and amidase catalyzed one-pot, two-step biotransformation. **J. Mol. Catal., B: Enzym.**, v. 102, p. 161-166, 2014.
- 31 OLIVEIRA JUNIOR, R. S. Introdução ao controle químico. In: CONSTANTIN, J.; INOUE, M. H. **Biologia e manejo de plantas daninhas**. Curitiba: Omnipax, 2011. Cap. 6, p. 125-140.
- 32 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Seminário volta a discutir o mercado de agrotóxico**. 2012. Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/Seminário volta a discutir mercado de agrotóxicos em 2012](http://portal.anvisa.gov.br/Seminário%20volta%20a%20discutir%20mercado%20de%20agrotóxicos%20em%202012)>. Acesso em: 01 out. 2014.
- 33 HOLTZE, M. S.; SORENSEN, S. R.; SORENSEN, J.; AAMAND, J. Microbial degradation of the benzonitrile herbicides dichlobenil, bromoxynil, and ioxynil in soil and subsurface environments - insights into degradation pathways, persistent metabolites and involved degrader organisms. **Environ. Pollut.**, v. 154, n. 2, p. 155-168, 2008.
- 34 SILVA, J. M.; NAVATO-SILVA, E.; FARIA, H. P.; PINHEIRO, T. M. M. Agrotóxico e trabalho: uma combinação perigosa para a saúde do trabalhador rural. **Ciênc. Saúde Colet.** v. 10, n. 4, p. 891-903, 2005.
- 35 AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Índice monográfico do bromoxinil**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d42ca40047458afb9485d43fbc4c6735/b15.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 01 out. 2014.
- 36 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **AGROFIT: Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Brasília, DF, 2003. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 01 out. 2014.
- 37 REZENDE, G. M. de; COSTA, N. D. **Cultivo de cebola no Nordeste**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2007. (Sistemas de produção, 3). Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Cebola/CultivoCebolaNordeste/socioeconomia.htm>>. Acesso em: 01 out. 2014.

- 38 VILELA, N. J. **Produção de hortaliças no Brasil**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2013. Disponível em:
<http://www.cnph.embrapa.br/paginas/hortalicas_em_numeros/producao_hortalicas.pdf>. Acesso em: 01 out. 2014.
- 39 EUROPEAN COMMISSION. **Directorate General for Health and Food Safety. Review report for the active substance ioxynil**. 2004. Disponível em:
<http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/existactive/list_ioxynil.pdf>. Acesso em: 01 out. 2014.
- 40 LEITHE, E.; KJENSETH, A.; BRUUN, J.; SOLVEIG, S.; RIVEDAL, E. Inhibition of connexin 43 gap junction channels by the endocrine disruptor ioxynil. **Toxicol. Toxicol. Appl. Pharm.**, v. 247, p. 10-17, 2010.
- 41 UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA. Instituto de Química. **Gerenciamento de resíduos químicos: normas gerais 2002**. Araraquara, 2002. Disponível em:
<<http://www.iq.unesp.br/Home/normas-residuos.pdf>> Acesso em: 01 out. 2014.
- 42 ANDEXER, J.; GUTERL, J.; POHL, M.; EGEERT, T. A high-throughput screening assay for hydroxynitrile lyase activity. **Chem. Commun.**, v. 48, n. 40, p. 4201-4203, 2006.
- 43 NITTO CHEMICAL INDUSTRY. (Japan). Tamura Koji. **Method of producing optically active alpha-hydroxy acid or alpha-hydroxyamide**. EP 0711836A1, 9 Nov. 1994, 8 Nov. 1995.
- 44 BANERJEE, A.; KAUL, P.; SHARMA, R.; BANNERJEE, U.C. A high-throughput amenable colorimetric assay for enantioselective screening of nitrilase-producing microorganisms using pH sensitive indicators. **J. Biomol. Screen.**, v. 8, n. 5, p. 559-565, 2003.
- 45 DINIZ, M. E. R. **Uso da técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray (ESI-MS) para o estudo do mecanismo de reações orgânicas e avaliação do perfil de fragmentação de bis-hidroxiiminas aromáticas**. 2011. 108 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.
- 46 HU, J. Y.; DONG, B. Z.; ZHEN, Z. H. Residue determination and dissipation of ioxynil octanoate in maize and soil. **J. Environ. Sci. Health., A**, v. 47, n. 5, p. 385-389, 2012.
- 47 FRKOVÁ, Z.; BADAWI, N.; JOHANSEN, A.; SCHULTZ-JENSEN, N.; BESTER, K.; SORENSEN, S. R.; KARLSON, U. G. Degradation of three benzonitrile herbicides by *Aminobacter* MSH1 versus soil microbial communities: pathways and kinetics. **Pest. Manag. Sci.**, v. 70, n. 8, p. 1291-1298, 2014.
- 48 VESELÁ, A. B.; FRANC, M.; PELNATOVÁ, H.; KUBÁČ, D.; VEJVODA, V.; ŠULC, M.; BHALLA, T. C.; MACKOVÁ, M.; LOVECKÁ, P.; JANŮ, P.; DEMNEROVÁ, K.; MARTÍNKOVÁ, L. Hydrolysis of benzonitrile herbicides by soil actinobacteria and metabolite toxicity. **Biodegradation**, v. 21, n. 5, p. 761-770, 2010.

49 VESELÁ, A. B.; PELANTOVÁ, H.; ŠULC, M.; MACKOVÁ, M.; LOVECKÁ, P.; THIMOVÁ, M.; PASQUARELLI, F.; PIČMANOVÁ, M.; PÁTEK, M.; BHALLA, C. T.; MARTÍNKOVÁ, L. Biotransformation of benzonitrile herbicides via the intrile hydratase-amidase pathway in rhodococci. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 39, n. 12, p. 1811-1819, 2012.

50 SCHALK, M.; PIERREL, M.-A.; ZIMMERLIN, A.; BATARD, Y.; DURST, F.; WERCK-REICHHART, D. Xenobiotics: substrate and inhibitors of the plant cytochrome P450. **Environ. Sci. Pollut. Res.**, v. 4, n. 4, p. 229-234, 1997.

51 WAIN, R.L.; TAYLOR, H. F. Phenols as plant growth regulators. **Nature**, v. 207, p. 167-169, 1965.

7. ANEXOS – Espectros de massas

Figura A 1: Espectro de massas ESI(-)-MS da reação de biodegradação do octanoato de ioxinila

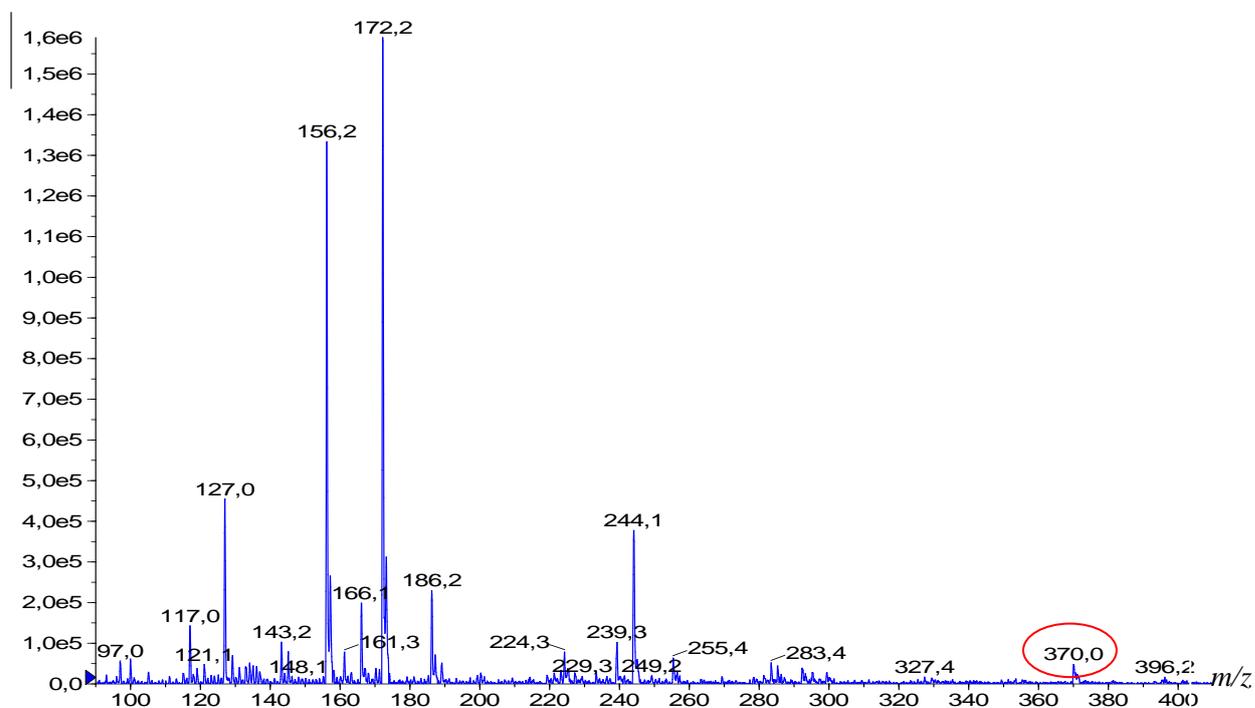


Figura A 2. Espectro de ESI(-)-MS/MS do íon m/z 370.

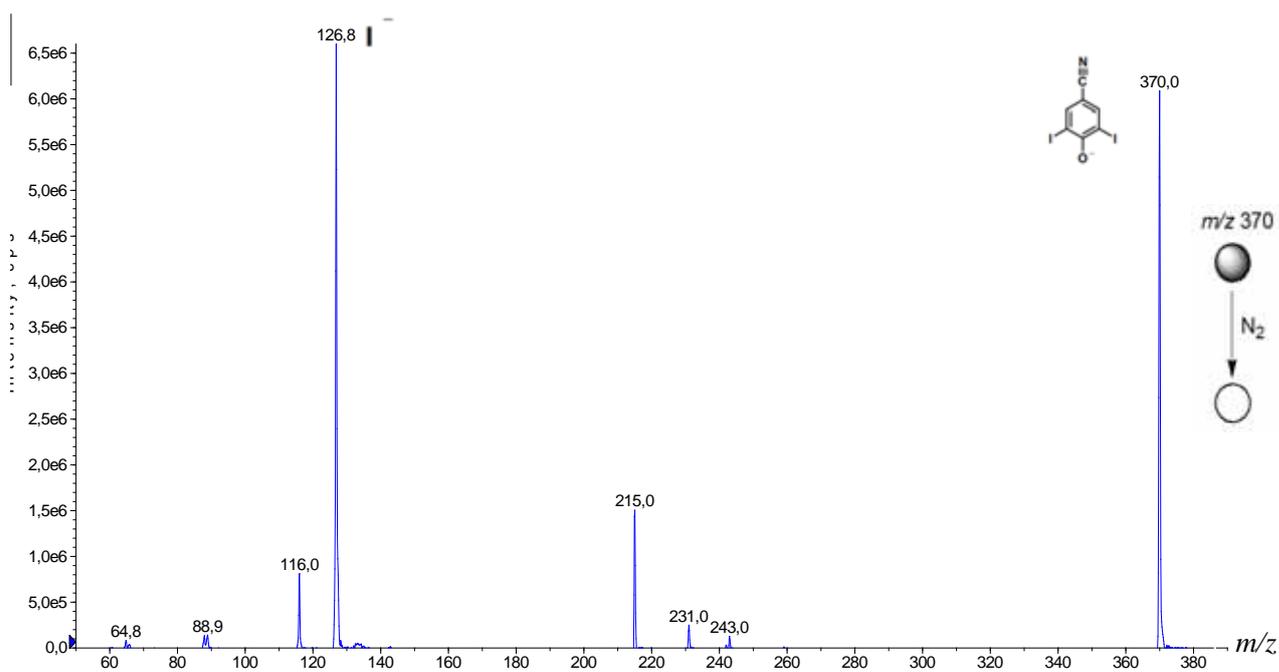


Figura A 3: Espectro de massas ESI(-)-MS da reação de biodegradação do octanoato de ioxinila

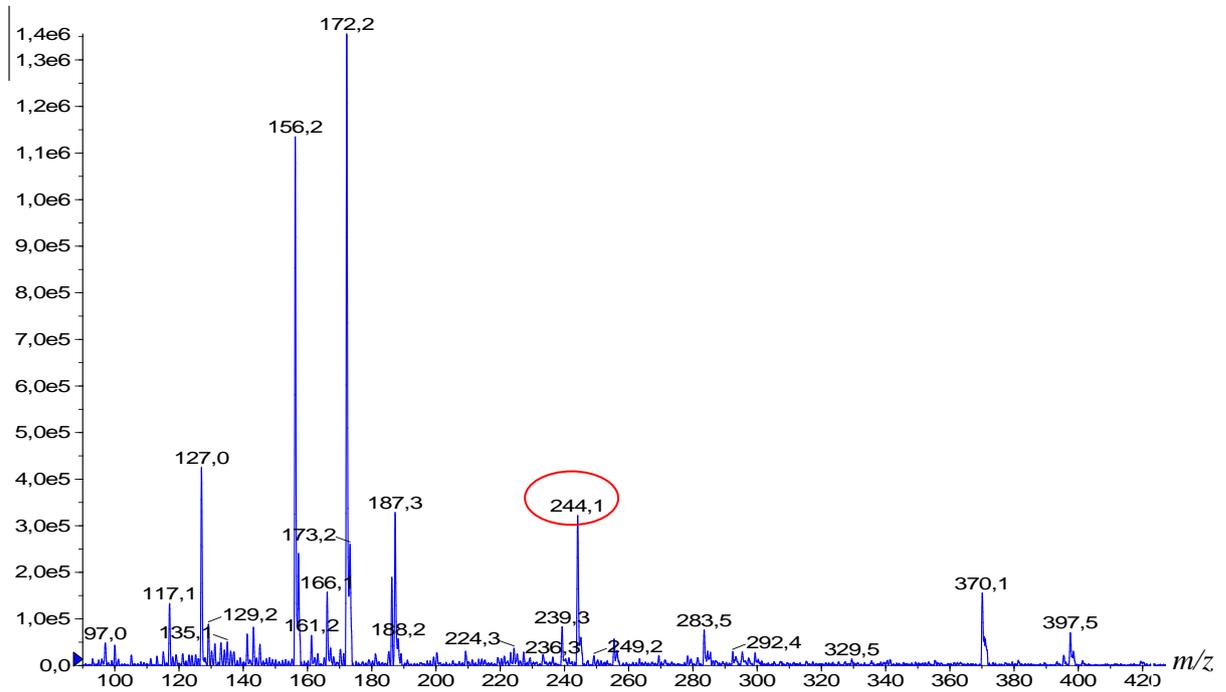


Figura A 4. Espectro de íons fragmentos do íon m/z 244.

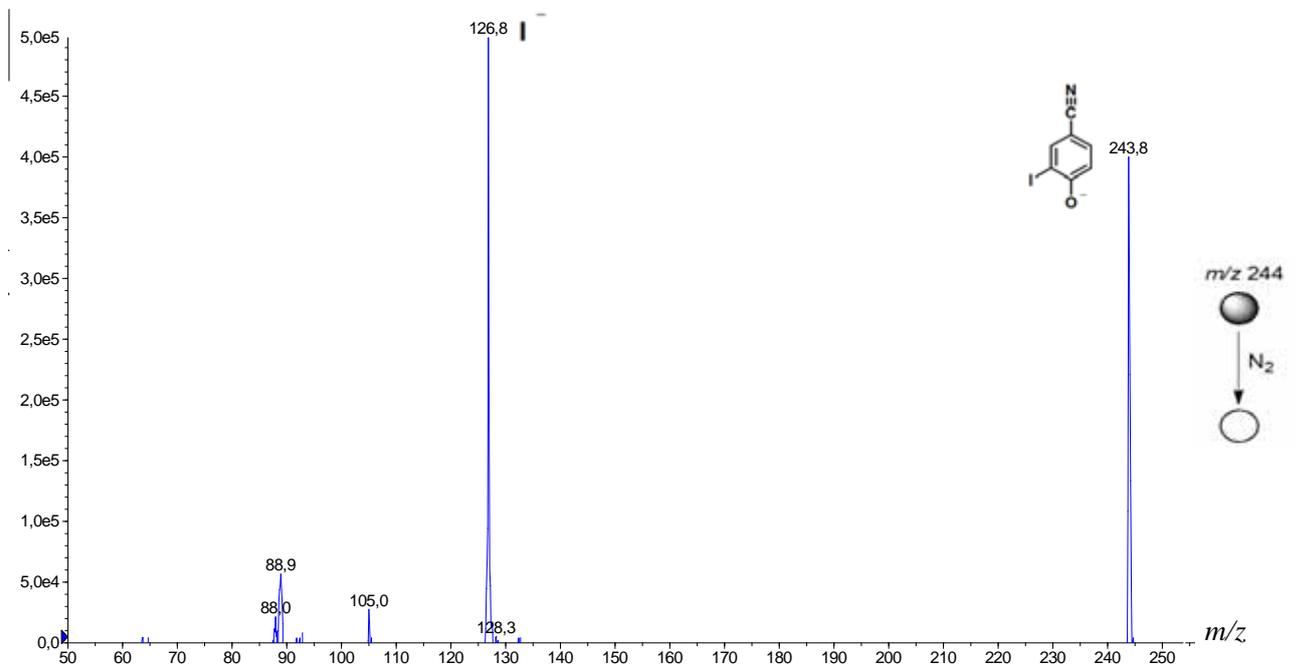


Figura A 5: Espectro de massas ESI(-)-MS da reação de biodegradação do octanoato de ioxinila

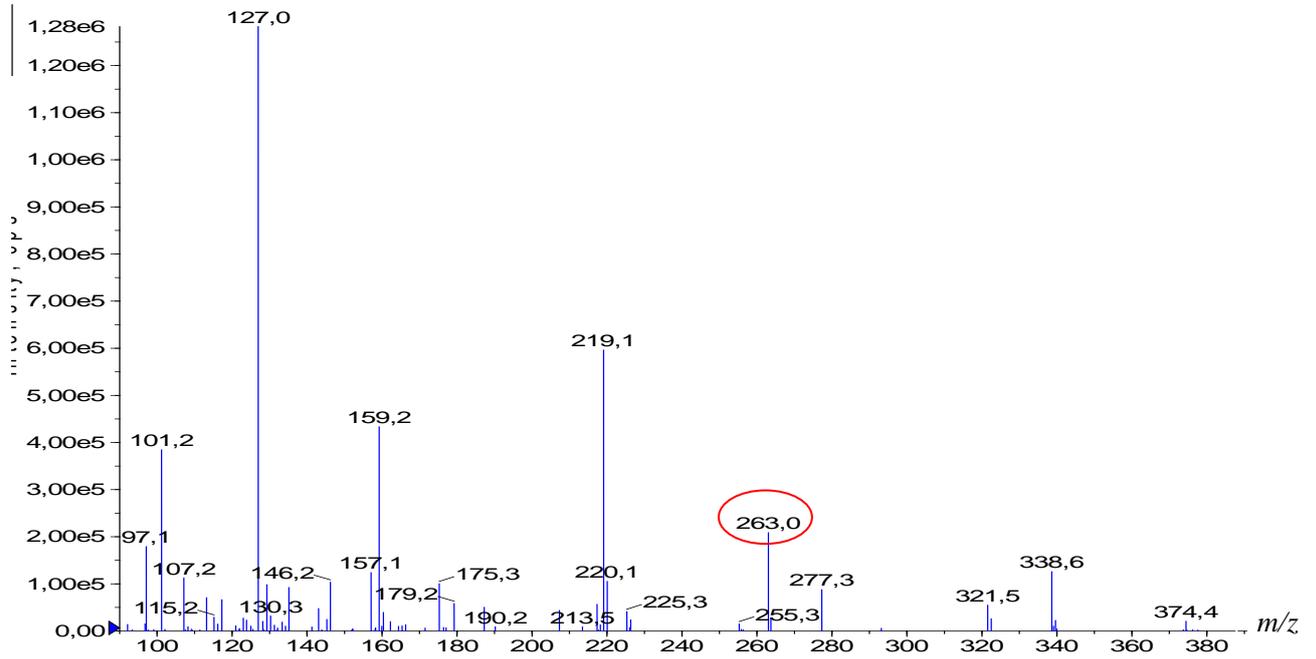


Figura A 6. Espectro de íons fragmentos do íon m/z 263.

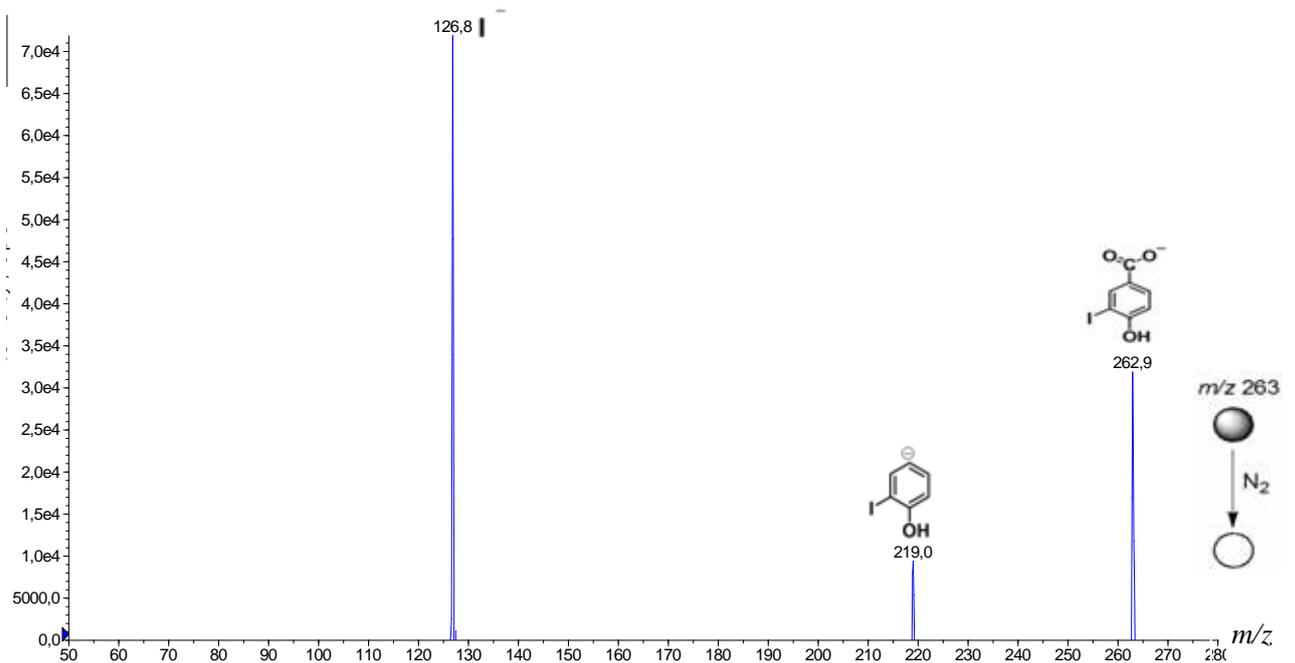


Figura A 7: Espectro de massas ESI(-)-MS da reação de biodegradação do octanoato de ioxinila.

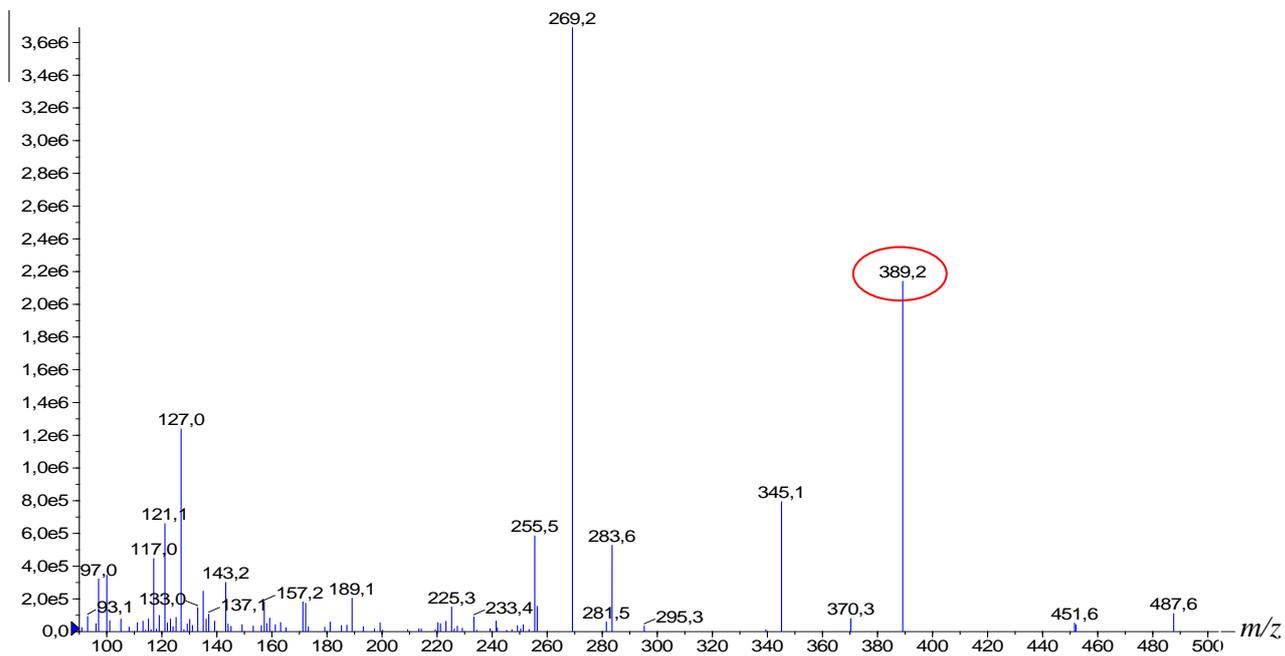


Figura A 8. Espectro de íons fragmentos do íon m/z 389.

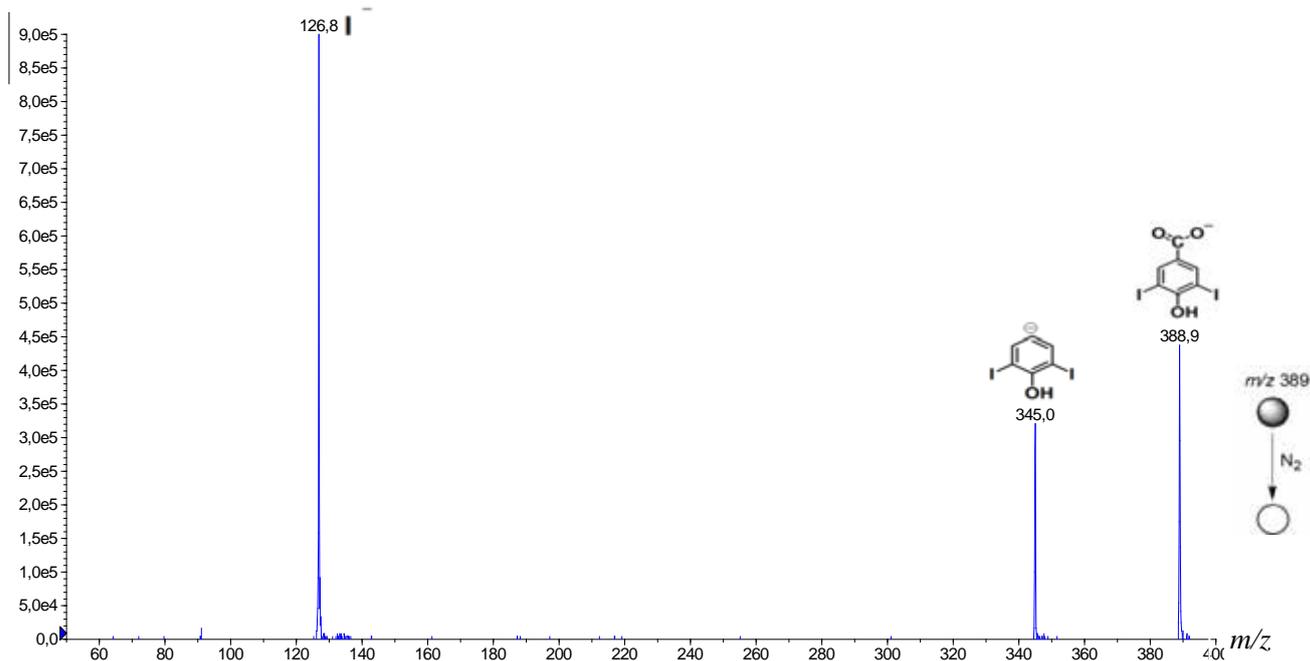


Figura A 9: Espectro de massas ESI(-)-MS da reação de biodegradação do octanoato de ioxinila

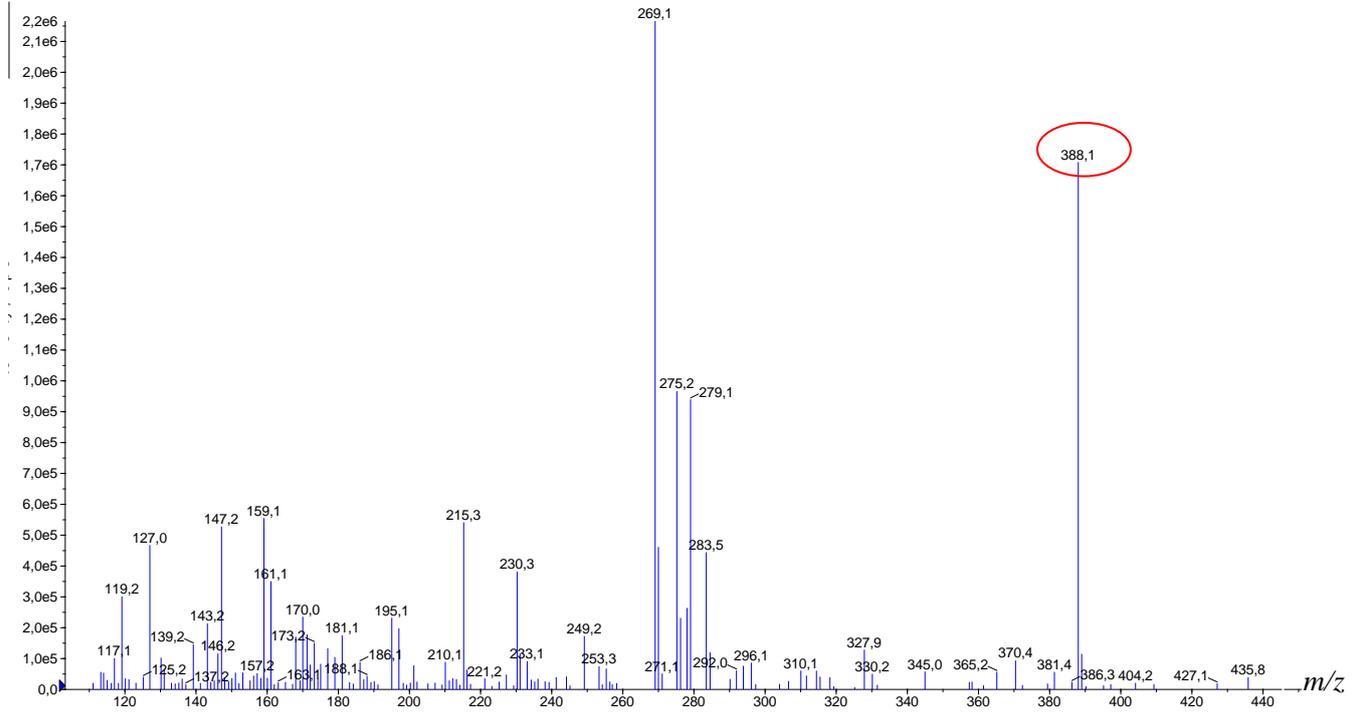


Figura A 10. Espectro de íons fragmentos do íon m/z 388.

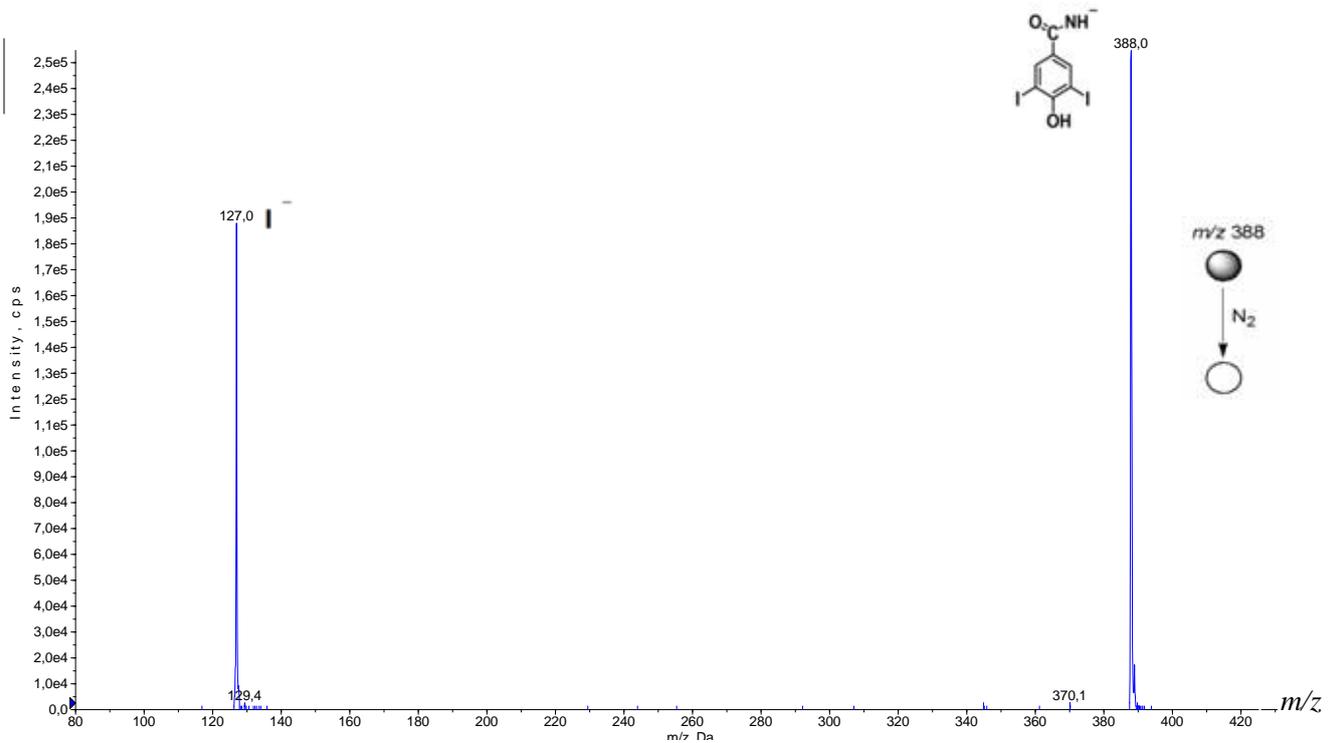


Figura A 11: Espectro de massas ESI(-)-MS da reação de biodegradação do octanoato de ioxinila

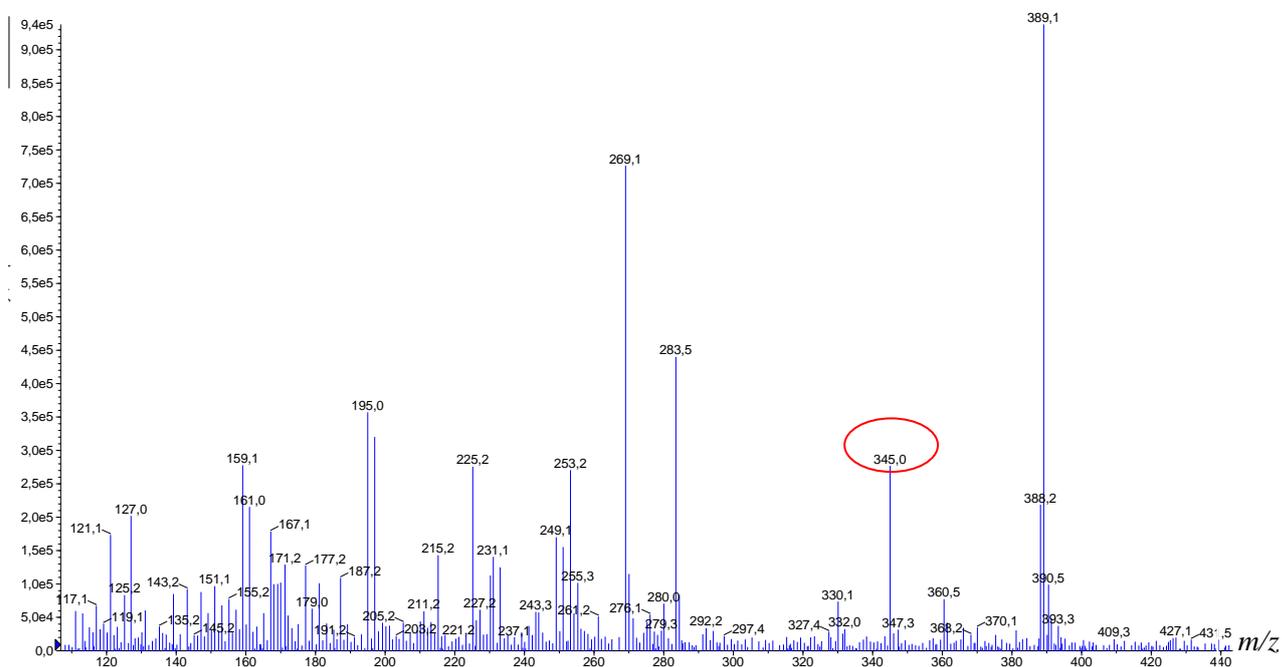


Figura A 12. Espectro de íons fragmentos do íon m/z 345.

