

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS
ANALÍTICAS EM GC-MS APLICADAS À BIODEGRADAÇÃO
DE POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES E ÓLEO
ESSENCIAL DE PIMENTAS”**

Eliane May de Lima*

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTORA EM CIÊNCIAS, área de concentração: QUÍMICA ORGÂNICA.

Orientador: Moacir Rossi Forim

*** bolsista CNPq**

**São Carlos - SP
2019**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Química

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Eliane May de Lima, realizada em 26/02/2019:

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim
UFSCar

Profa. Dra. Regina Vincenzi Oliveira
UFSCar

Prof. Dr. Clóvis Wesley Oliveira de Souza
UFSCar

Prof. Dr. Oldair Donizeti Leite
UTFPR

Prof. Dr. Andre Luiz Meleiro Porto
IQSC/USP

Dedico esse trabalho primeiramente a Deus, depois ao meu marido Jardel e a minha mãe Seli.

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.
(Marthin Luther King)*

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar eu agradeço ao Deus Criador do céu, da terra, do mar e das fontes das águas. Sem Ele nada eu poderia fazer.

Ao meu orientador Dr. Moacir Rossi Forim, pela confiança, compreensão, apoio, ensinamentos, disponibilidade e dedicação.

A minha mãe, Seli, por todo o amor dedicado durante esses anos. Ela que é uma mãe carinhosa e atenciosa, sempre pronta a me ouvir nos momentos de angústia e orar por mim quando mais precisei.

Ao meu marido Jardel, por toda paciência ao longo de quatro anos que ficamos separados por mais de 400 Km, sendo as ligações por Skype o nosso maior consolo.

À minha irmã Cibeli, que sempre me apoiou em todos os momentos e foi minha companheira na luta pela conquista dessa formação, embora estivéssemos em universidades diferentes.

À minha irmã Jaqueline, uma excelente educadora, além de me apoiar nos momentos difíceis, a ela eu devo as melhores dicas que me ajudaram a obter êxito na avaliação didática do meu concurso de docente.

À minha amiga Thayana que sempre esteve presente nos momentos mais difíceis do meu doutorado, me trazendo conforto e esperança em todos os momentos.

Aos meus colegas Bruno e Ednilson Niculau por me auxiliar quando tive dúvidas sobre a técnica de GC-MS.

Às minhas colegas Flávia e Clara que me auxiliaram no desenvolvimento de partes importante da minha pesquisa.

A Família do irmão Nahor Neves e do irmão José Carlos Maroldi que me acolheram em suas casas, me fazendo sentir o conforto de uma família nesse tempo que estive longe da minha família biológica.

A professora Regina que me ajudou em muitos momentos durante esse curso de doutorado.

Ao Luís, a Karen, a Hocelayne, a Waléria, Marília, o Airton, a Ana, a Dorái, a Barbara pela companhia e ajuda prestada em todos os momentos que precisei.

Aos amigos e colegas de curso, por todos os momentos que passamos juntos.

A todos os professores das disciplinas que cursei que me fizeram aprender mais sobre a ciência Química, principalmente sobre a parte que eu mais apreciei que é a Química Orgânica.

Aos meus colegas do Instituto Federal do Paraná, Campus Capanema, por todo o apoio no momento da escrita da minha tese.

À coordenação e ao programa da pós-graduação da UFSCar pelo excelente trabalho que possibilitaram todo o crescimento e aprendizado que trago comigo hoje.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, pela bolsa concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processos nº 2013/13649-5 e 2011/11860-5), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq processos nº 477051/2012-0, 403302/2013-7, 309344/2015-8) e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP). Meu agradecimento a CAPES, FAPESP e FINEP.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível. Muito obrigada!

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- AhR - receptor aril-hidrocarboneto (do inglês *Aryl hydrocarbon receptor*)
- B[a]A – dibenzo[a]antraceno
- B[a]P – dibenzo[a]pireno
- B.O.D – do inglês *Biochemical Oxygen Demand*
- CA10 - carbazol 1,9a-dioxigenase
- CAR - carbazol
- CB - clorobifenila
- CDD – clorodibenzo-*p*-dioxina
- CDF – clorodibenzofurano
- CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
- Cor – Coroneno
- D[a,h]A – dibenzo[a,h]antraceno
- DBF63 - DF 4,4a-dioxigenase
- DCDD – diclorodibenzo-*p*-dioxina
- DCDF – diclorodibenzofurano
- DD - dibenzo-*p*-dioxina
- DF - dibenzofurano
- DMF – *N,N'*-dimetilformamida
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DNA - deoxyribonucleic acid
- DL₅₀ - dose letal mediana
- DO – densidade ótica
- EDCs – Químicos desreguladores endócrinos do inglês *Endocrine Disrupting Chemicals*
- ELISA – do inglês *Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay*
- ERO - espécies reativas de oxigênio
- Fen – Fenantreno
- Flua – Fluoranteno
- Flu – Fluoreno
- GC-MS – do inglês *Gas Chromatography–Mass Spectrometry*
- HMDS – Hexametildisilazano
- HPA – hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

HRCG-HRMS – do inglês *High Resolution Gas chromatography– High Resolution Mass Spectrometry*

HS – *headspace*

HSA - análise de *headspace*

HS-SPME - *headspace* por microextração em fase sólida

HxCDD – Hexaclorodibenzo-*p*-dioxina

IUPAC - International Union of Pure and Applied Chemistry

K_{ow} - coeficiente de partição octanol-água

K_{oa} - coeficiente de partição octanol-ar

LD – limite de detecção

LQ – limite de quantificação

MMA - Ministério do Meio Ambiente

MS/MS – massa/massa

MS – meio salino

MSglic – meio salino contendo glicose

MStw – meio salino contendo *Tween*® 80

NEPACCO – do inglês *Northeastern Pharmaceutical and Chemical Company*

NM – não mencionado

Orbitrap - *Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping*

PCA – do inglês *Principal Component Analysis*

PCB – Bifenilas policloradas (do inglês *polychlorinated biphenyl*)

PCDDs – dibenzodioxinas policloradas (do inglês *polychlorinated dibenzodioxins*)

PCDFs – dibenzofuranos policlorados (do inglês *polychlorinated dibenzofurans*)

PCDD/Fs - dibenzodioxinas e dibenzofuranos policlorados (do inglês *polychlorinated dibenzodioxins/ dibenzofurans*)

PI – Padrão interno

Pir – pireno

POPs – Poluentes orgânicos persistentes

PYRdHD - *cis*-4,5-di-hidro-4,5-di-hidroxi pireno

RMN – Ressonância magnética nuclear

SHU – do inglês *Scoville Heat Units*

SIM – do inglês *Select Ion Monitoring*

SRM – do inglês *Selected Reaction Monitoring*

1,2,3,4 – TCDD – 1,2,3,4-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina

TCDD – tetraclorodibenzo-*p*-dioxina

TEF – fator de toxicidade equivalente (do inglês *Toxicity Equivalency Factors*)

TEQ - Toxicidade equivalente

TOF – do inglês *Time-of-flight*

TrCDD – triclorodibenzo-*p*-dioxina

UI – ultra inerte

VOCs - compostos orgânicos voláteis do inglês *volatile organic compounds*

YNB – do inglês *yeast nitrogen base*

WHO - Organização mundial da saúde (do inglês *World Health Organization*)

LISTA DE TABELAS

TABELA 1.1: Análises ambientais executadas pela técnica GC-MS.....	7
TABELA 1.2: Análise de produtos naturais pela técnica de GC-MS	9
TABELA 2.1: Congêneres de PCBs, número de isômeros e massa molecular (Fonte: PENTEADO e VAZ, 2001).....	26
TABELA 2.2: Marcas das misturas de PCBs comercializadas em diversos países (Fonte: MMA, 2012a).....	27
TABELA 2.3: Congêneres e isômeros das dioxinas e furanos (Fonte: ASSUNÇÃO e PESQUERO, 1999).	33
TABELA 2.4: Fatores de equivalência de toxicidade (Fonte: Ministério do Meio Ambiente, 2013).	34
TABELA 2.5: Bactérias utilizadas em trabalhos de biodegradação de POPs.	42
TABELA 2.6: Composição do meio salino.....	52
TABELA 2.7: Composição do meio Yeast Nitrogen Base.	53
TABELA 2.8: Gradiente de temperatura do forno da coluna para as análises dos POP's por GC-MS.	62
TABELA 2.9: Parâmetros operacionais GC-MS.	63
TABELA 2.10: Íons selecionados no modo SIM para os POPs utilizados no trabalho.	64
TABELA 2.11: Média da áreas dos picos cromatográficos dos POPs extraídos com acetato de etila e diclorometano.....	83
TABELA 2.12: Recuperação para diferentes formas de extração de HPAs em meio fortificado com três diferentes concentrações*.....	84
TABELA 2.13: Recuperação dos HPAs em frações diferentes do ambiente de crescimento microbiano.....	85
TABELA 2.14: Recuperação da extração dos POPs para três concentrações da curva analítica.	86
TABELA 2.15: Íons selecionados no modo SIM e no modo SRM para a quantificação e identificação dos compostos estudados.	90
TABELA 2.16: Limites de quantificação e detecção para o modo SIM.....	95
TABELA 2.17: Exatidão e precisão da faixa linear de trabalho para os HPAs em solvente acetato de etila.	96
TABELA 2.18: Exatidão e precisão da faixa linear de trabalho para os POPs clorados em solvente acetato de etila.	97
TABELA 2.19: Razão entre o coeficiente angular da curva na matriz e a curva no solvente.	98
TABELA 2.20: Exatidão e coeficiente de variação calculados para as curvas analíticas do pireno obtidos por liner e coluna comuns e <i>liner</i> e coluna inertes.	100

TABELA 2.21: Valores de precisão e exatidão interdia e intradia para o método de análise dos HPAs.	101
TABELA 2.22: Valores de precisão e exatidão interdia e intradia para o método de análise dos compostos clorados.....	102
TABELA 2.23: Controles de qualidade para as análises das amostras de HPAs durante o período de análise no equipamento de GC-MS.	121
TABELA 2.24: Controles de qualidade para as corridas das análises dos compostos clorados durante o período de análise no equipamento de GC-MS.	122
TABELA 3.1: Espécies de pimentas do gênero <i>Capsicum</i> descritas na literatura (Fonte: BOSLAND e VOSTAVA, 2000)	144
TABELA 3.2: Teores de capsaicinóides em algumas espécies do gênero <i>Capsicum</i> (Fonte: CARVALHO et al. 2006).....	145
TABELA 3.3: Parâmetros operacionais GC-MS.	158
TABELA 3.4: Gradiente de temperatura do forno da coluna para as análises dos extratos de pimenta obtidos por soxhlet.	159
TABELA 3.5: Gradiente de temperatura do forno da coluna para as análises dos extratos de pimenta obtidos por hidrodestilação.	159
TABELA 3.6: Planejamento experimental com dois níveis e quatro variáveis.....	159
TABELA 3.7: Gradiente de temperatura do forno da coluna para as análises de pimentas por <i>headspace</i>	160
TABELA 3.8: Representação da matriz do planejamento fatorial com os níveis estudados e as respostas obtidas em função do número de picos e área dos picos cromatográficos.	166
TABELA 3.9: Compostos voláteis identificados nas pimentas analisadas por hidrodestilação.	178

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Diagrama esquemático das partes básicas de um cromatógrafo gasoso.....	2
FIGURA 1.2: Esquema da câmara de ionização produzindo íons por bombardeamento de elétrons.....	3
FIGURA 1.3: Representação esquemática de um triplo-quadrupolo. (Fonte: adaptado de SPARKMAN et al., 2011).....	4
FIGURA 2.1: Movimento de Poluentes Orgânicos Persistentes no Meio Ambiente.	19
FIGURA 2.2 Arranjo molecular dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (Fonte: adaptado de ABDEL-SHAFY E MANSOUR, 2016).....	21
FIGURA 2.3: Massa molar e solubilidade em água de algum Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs). (Fonte: adaptado de BAMFORTH e SINGLETON, 2005)	23
FIGURA 2.4: Estrutura representativa das bifenilas policloradas.....	25
FIGURA 2.5: Estruturas de bifenilas policloradas coplanares.	29
FIGURA 2.6: Mecanismo de biotransformação de PCBs (Fonte: Adaptado de LUDEWIG, G. e ROBERTSON, 2013).	30
FIGURA 2.7: Estruturas das dibenzo- <i>p</i> -dioxinas policloradas (PCDD) e dibenzofuranos policlorados (PCDF).	32
FIGURA 2.8: Produção de 2,3,7,8-TCDD, como contaminante na síntese do 2,4,5-triclorofenol (Fonte: adaptado de HITES, 2011).	35
FIGURA 2.9: Dioxigenação lateral para o naftaleno e a bifenila (A) e dioxigenação angular para o dibenzofurano e a dibenzo- <i>p</i> -dioxina obtida a partir de enzimas do tipo dioxigenase (Fonte: adaptado de NOJIRI et al., 2001).....	44
FIGURA 2.10: Mecanismo de biodegradação de 2-CDD por bactérias aeróbica (Fonte: adaptado de FIELD e SIERRA-ALVAREZ, 2008).	45
FIGURA 2.11: Mecanismo de biodegradação de PCBS por bactérias aeróbica (Fonte: adaptado de ABRAMOWICZ, 1990).....	45
FIGURA 2.12: Processo anaeróbio/aeróbio combinado de dois passos para biodegradar PCBs (Fonte: adaptado de FIELD e SIERRA-ALVAREZ, 2008).....	46
FIGURA 2.13: Mecanismo de biodegradação anaeróbia do composto 1,2,3,7,8-PeCDD por bactérias Dehalococcoides sp. (Fonte: adaptado de BUNGE et al., 2003).	47
FIGURA 2.14: Metabólitos intermediários comuns para HPAs.....	47
FIGURA 2.15: Inseto praga <i>Diabrotica speciosa</i> (Fonte: adaptado de LAUMANN et al., 2003).....	50
FIGURA 2.16: Esquema da diluição seriada para contagem de colônia viáveis.	54
FIGURA 2.17: Esquema mostrando o pré-ensaio de biodegradação de POP's realizado para meio salino e meio YNB.....	57

FIGURA 2.18: Padrões analíticos em preto e padrão interno em vermelho.	62
FIGURA 2.19: Avaliação do crescimento das bactérias A) <i>Pseudomonas putida</i> , e B) <i>Burkholderia gladioli</i> frente a diferentes concentrações de Tween® 80.	69
FIGURA 2.20: Crescimento de 96 horas da bactéria <i>Pseudomonas putida</i> em meio salino e meio salino com diferentes aditivos. Onde: Tw - Tween® 80; Glic – glicose; MS – meio salino.	69
FIGURA 2.21: Curva de crescimento para a bactéria <i>Sphingobacterium multivorum</i> em A) densidade ótica e em B) UFC.mL ⁻¹	70
FIGURA 2.22: A) Placa usada na contagem das colônias viáveis para o estabelecimento de UFC; B) Relação entre DO a 600 nm e UFC.mL ⁻¹ para a <i>S. multivorum</i>	71
FIGURA 2.23: A) Curva de crescimento da bactéria <i>Sphingobacterium multivorum</i> em tubos de 18 e 25 mm de diâmetro; B) Foto de ambos os tubos utilizados contendo 5 mL de meio de cultura caldo nutriente.	72
FIGURA 2.24: Curva de crescimento para as bactérias A) <i>Sphingobacterium multivorum</i> e B) <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> sob diferentes concentrações do solvente DMF (1, 2, 5 e 10% (V/V)).	73
FIGURA 2.25: Figura representativa da reação da Resazurina a Resorufina em presença de células microbianas.	75
FIGURA 2.26: Fluorescência a 390 nm de uma cultura de bactérias de 48 horas de crescimento com leitura em fluorímetro sob diferentes concentrações do composto resazurina.	76
FIGURA 2.27: Ensaio de viabilidade celular para a bactéria <i>Sphingobacterium multivorum</i> frente a A) dioxina; B) PCB e C) HPA, respectivamente.	76
FIGURA 2.28: Ensaio de viabilidade celular para a bactéria <i>Stenotrophomonas maltophila</i> frente a A) dioxina; B) PCB e C) HPA, respectivamente.	77
FIGURA 2.29: Bactéria <i>Sphingobacterium multivorum</i> crescendo em ágar nutriente depois de ter sido submetida ao crescimento em meio caldo nutriente contendo diferentes concentrações de A) 1,2,3,4-TCDD, B) PCB 15 e C) antraceno.	78
FIGURA 2.30: Bactéria <i>Stenotrophomonas maltophila</i> crescendo em ágar nutriente depois de ter sido submetida ao crescimento em meio caldo nutriente contendo diferentes concentrações de A) 1,2,3,4-TCDD, B) PCB 15 e C) antraceno.	78
FIGURA 2.31: Densidade ótica a 600 nm das culturas bacterianas cultivadas por 96 h na presença de POPs em meio YNB.	79
FIGURA 2.32: Densidade ótica a 600 nm das culturas bacterianas cultivadas por 96 h na presença de POPs em Meio Salino.	80
FIGURA 2.33: Porcentagem de recuperação dos POPs em relação ao controle em culturas de 96 h em meio YNB (* significa diferença estatista, p< 0,05, em relação ao controle).....	80
FIGURA 2.34: Porcentagem de recuperação dos POPs em relação ao controle em culturas de 96 h em Meio Salino (* significa diferença estatista, p< 0,05, em relação ao controle).....	81

FIGURA 2.35: Exemplos de análises para otimização da separação cromatografica dos padrões.....	88
FIGURA 2.36: A) Separação cromatografica dos padrões em coluna DB-5 UI (30 m x 0,25 mm x 0,25µm) J&W Scientific Agilent ; B) Nome e estrutura dos respectivos padrões analisados.	89
FIGURA 2.37: Espectros de massa obtidos no modo Full Scan para A) PCB 1, B) PCB 3 e C) PCB 15.	91
FIGURA 2.38: Espectros de massa obtidos no modo Full Scan para A) Fluoreno, B) Fenantreno, C) Antraceno e D) Pireno.	92
FIGURA 2.39: Espectros de massa para a 1,2,3,4-TCDD.	93
FIGURA 2.40: Padrão isotópico observado para fragmentos contendo de 0 a 5 átomos de Cloro. (Fonte Wellington labs, 2012-2014).	94
FIGURA 2.41: A) limite de quantificação e B) limite de detecção para o pireno.....	95
FIGURA 2.42: Curva de calibração em solvente e na matriz para os POPs: A) Fluoreno, B) Fenantreno, C) Pireno, D) PCB 1, E) PCB 15 e F) 1,2,3,4-TCDD.	98
FIGURA 2.43: Decaimento dos picos do fenantreno (1) e antraceno (2), nos três dias não consecutivos de validação interdica do método analítico (dia 1 – preto; dia 2 – rosa; dia 3 – azul).	99
FIGURA 2.44: Resíduos calculados para a curva do Pireno obtidos em (A) <i>liner</i> e coluna comuns e (B) <i>liner</i> e coluna inertes.....	100
FIGURA 2.45: Efeito de memória obtido na separação cromatográfica de POPs em GC-MS (preto) e eliminação do efeito após a aplicação de medidas corretivas (rosa).	103
FIGURA 2.46: Resultado da recuperação dos compostos A) fluoreno, B) fenantreno e C) pireno em meio contendo <i>Burkholderia gladioli</i> , por 0, 1, 3, 7 e 14 dias.....	104
FIGURA 2.47: Resultado da recuperação dos compostos A) fluoreno, B) fenantreno e C) pireno em meio contendo <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> , por 0, 1, 3, 7 e 14 dias.....	104
FIGURA 2.48: Crescimento microbiano medido em 14 dias de experimento para os compostos Fluoreno, Fenantreno e Pireno.....	107
FIGURA 2.49: Medida de pH do meio de cultura em 14 dias de experimento.	107
FIGURA 2. 50: Biodegradação de fluoreno, com porcentagem em massa, frente a 14 bactérias isoladas da <i>D. speciosa</i> (asterisco significa diferença estatista, p< 0,05, em relação ao controle).....	108
FIGURA 2.51: Biodegradação de fenantreno, com porcentagem em massa, frente a 14 bactérias isoladas da <i>D. Speciosa</i> (asterisco significa diferença estatista, p< 0,05, em relação ao controle).	108
FIGURA 2.52: Biodegradação de pireno, com porcentagem em massa, frente a 14 bactérias isoladas da <i>D. Speciosa</i> (asterisco significa diferença estatística, p< 0,05, em relação ao controle).	109
FIGURA 2.53: Imagem da espuma formada pela agitação do frasco contendo a cepa <i>Serratia marcescens</i>	112

FIGURA 2.54: Surfactante com estrutura glicolípídica produzida por <i>Serratia marcescens</i> (Fonte: adaptado de DUSANE et al. 2011).	113
FIGURA 2.55: Crescimento microbiano medido em 14 dias de experimento para os compostos PCB 1 e PCB 15.....	114
FIGURA 2.56: Recuperação do composto PCB 1 em meio de cultura ao longo dos dias 0, 1, 3, 7 e 14.	115
FIGURA 2.57: Perfil de degradação do composto 4,4'-diclorobifenila com porcentagem em massa (PCB 15).	115
FIGURA 2. 58: Crescimento microbiano medido em 7 dias de experimento para na presença do composto 1,2,3,4-TCDD em meio salino.	117
FIGURA 2. 59: Perfil de degradação do composto 1,2,3,4-TCDD com porcentagem em massa (asterisco significa diferença estatística, $p < 0,05$, em relação ao controle em meio salino).	117
FIGURA 2.60: <i>Bactérias Serratia marcescens</i> utilizadas no trabalho.....	118
FIGURA 2.61: Análise <i>Full Scan</i> para a amostra de HPAs ensaiados com <i>Burkholderia gladioli</i> em A) amostra extraída e analisada sem derivatização e em B) análise da amostra derivatizada com HMDS.....	120
FIGURA 2. 62: Análise <i>Full Scan</i> para a amostra de 1,2,3,4-TCDD ensaiada com <i>Serratia marcescens</i> em A) amostra extraída e analisada sem derivatização e em B) análise da amostra derivatizada com HMDS.....	120
FIGURA 2.63: Observação visual do crescimento de bactérias em consórcio após quatro dias de cocultivo (1 - <i>S. multivorum</i> ; 2 - <i>S. maltophilia</i> ; 3 - <i>E. brevis</i> ; 4 - <i>E. cloacae</i> , onde 1.2 significa: bactéria 2 no centro crescendo sobre 1 espalhada sobre a placa).....	123
FIGURA 2.64: Nono dia de crescimento das bactérias <i>S. multivorum</i> , <i>S. maltophilia</i> , <i>E. brevis</i> , <i>E. cloacae</i> , em consórcio, analisadas em microscópio com aumento de 40×.	123
FIGURA 2.65: Bactérias do gênero <i>Pseudomonas</i> em consórcio, analisadas em microscópio com aumento de 40 vezes.	123
FIGURA 3.1: Pimentas da espécie <i>Capsicum baccatum</i> , em A) Pimenta Dedo de moça e em B) Pimenta Chapéu de Frade. (Fonte: adaptado de Amaro, sem data - Embrapa).....	147
FIGURA 3.2: Pimenta malagueta pertencente a espécie <i>Capsicum frutescens</i> . (Fonte: adaptado de CARVALHO et al., 2006).....	148
FIGURA 3.3: Pimentas pertencente a espécie <i>Capsicum chinense</i> . A) Pimenta bode; B) Pimenta Biquinho; C) Pimenta Cumari do Pará; D) Pimenta Neyde. (Fonte: adaptado de CARVALHO et al., 2006 e VIRIDEA, 2018).....	149
FIGURA 3.4: Representação esquemática das etapas individuais na extração de óleos essenciais por destilação. (Fonte: adaptado de CHEMAT e BOUTEKEDJIRET, 2015).	152
FIGURA 3.5: Sistema de hidrodestilação conectado ao extrator do tipo Clevenger. (Fonte: adaptado de LUCCHESI et al., 2004)	153

FIGURA 3.6: Representação esquemática da hidrodestilação assistida por micro-ondas. (Fonte: adaptado de GOLMAKANI e REZAEI 2008).	154
FIGURA 3.7: Pimenta Neyde – exótica roxa (<i>Capsicum chinense</i>).....	157
FIGURA 3.8: GC-MS adaptado para a análise por headspace.	160
FIGURA 3.9: Extração de óleo essencial de pimenta por soxhlet.	162
FIGURA 3.10: Extração de óleo essencial de pimenta por hidrodestilação. A) Foto do extrator Clevenger montado para a extração; B) Foto do óleo obtido após extração da pimenta Bode (<i>Capsicum chinense</i>).....	163
FIGURA 3. 11: Frascos de 10 mL contendo amostras de 1 g de pimenta juntamente com 2 g de sal Na ₂ SO ₄ preparados para análise por <i>headspace</i>	165
FIGURA 3.12: Representação dos efeitos sobre as variáveis dependentes investigadas sendo A) a área dos picos obtidos e B) o número de picos, para o cromatograma do headspace da pimenta Bode, onde T = temperatura; t = tempo; m = massa de pimenta; s = massa de sal Na ₂ SO ₄	167
FIGURA 3.13: Cromatogramas do <i>headspace</i> da pimenta Bode mostrando os efeitos A) da temperatura, B) do tempo de permanência no forno e C) da temperatura combinada a massa da amostra.....	168
FIGURA 3.14: Cromatogramas para o óleo essencial obtido para a pimenta vermelha (em preto) e Chapéu de padre (em rosa) obtida A) por soxhlet, B) hidrodestilação e C) a partir do headspace da amostra.	170
FIGURA 3.15: Cromatogramas para o óleo essencial obtido a partir das pimentas biquinho, bode, cumari, malagueta e roxa obtido por soxhlet, B) hidrodestilação e C) <i>headspace</i> da amostra, com destaque para as substâncias presentes para alguns dos picos mais intensos.	171
FIGURA 3.16: Gráfico de escores da PC1 x PC2 x PC3 o óleo essencial de cinco pimentas obtidos em A) por soxhlet, em B) por hidrodestilação e em C) a partir do headspace estático da amostra.....	173
FIGURA 3.17: Gráfico de escores da PC1 x PC2 e PC1 x PC3 referente a 5 amostras de pimentas <i>Capsicum</i> provenientes das análises do óleo essencial obtido por A) soxhlet; B) hidrodestilação e C) <i>headspace</i> da amostra.....	175
FIGURA 3.18: Gráfico dos pesos da PC1 para a análise dos voláteis das pimentas obtido por A) soxhlet; B) hidrodestilação e C) <i>headspace</i> da amostra.	175

RESUMO

OTIMIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIAS ANALÍTICAS EM GC-MS APLICADAS À BIODEGRADAÇÃO DE POLUENTES ORGÂNICOS PERSISTENTES E ÓLEO ESSENCIAL DE PIMENTAS

Nos últimos anos, um grande número de compostos vem sendo sintetizado com finalidade de trazer conforto e comodidade à vida cotidiana. Esses produtos, no entanto, têm gerado uma grande quantidade de resíduos que, diariamente, são lançados no meio-ambiente, causando grandes transtornos à população. Maiores preocupações estão voltadas para os poluentes orgânicos persistentes (POPs), que são compostos de difícil degradação, que podem bioacumular na cadeia alimentar e intoxicar homens e animais a eles expostos. Sabe-se, porém, que insetos adquirem resistência a xenobióticos devido a micro-organismos a eles associados, os quais possuem mecanismos enzimáticos próprios para a metabolização desses compostos. Desse modo, em uma primeira etapa, o presente trabalho propôs o desenvolvimento de um método analítico para o estudo da biodegradação de três classes de POPs: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bifenilas policloradas (PCBs) e dioxinas. Os micro-organismos utilizados no trabalho foram isolados da *Diabrotica speciosa*, um inseto presente em diversas culturas agrícolas brasileira. Todos os POPs foram analisados por cromatografia gasosa e espectrometria de massas, cujo método foi validado observando variáveis como faixa linear de trabalho, efeito de matriz, precisão e exatidão intra e inter dia, limite de detecção e quantificação. A validação seguiu as normas estabelecidas pela Anvisa, de acordo com a Resolução RDC Nº 166/2017. Esse estudo também contou com uma otimização do crescimento das bactérias e das técnicas de extração dos compostos investigados. As bactérias que mais se destacaram nesse estudo para a aplicação em processos de biorremediação foram a *Burkholderia gladioli*, aplicada a HPAs e a *Serratia marcescens*, aplicada a dioxinas. Essas bactérias degradaram, respectivamente, 18,3 e 22,3% da massa aplicada em relação ao controle em sete dias de experimento. Em uma segunda etapa esse trabalho propôs, ainda, o desenvolvimento de um método de análise de óleo essencial de pimentas. A Análise de Componentes Principais (PCA) dos compostos voláteis de sete pimentas do gênero *Capsicum*, submetidas à extração por soxhlet, hidrodestilação e a partir da análise do headspace da amostra, mostrou uma similaridade bastante grande

principalmente entre a pimenta Bode e a pimenta Biquinho (*Capsicum chinense*). Por outro lado, a Cumari do Pará, (*Capsicum chinense*), foi a pimenta que mais se diferenciou em relação as pimenta analisadas. A análise da amostra obtida pela técnica de hidrodestilação e a análise do headspace apresentaram o maior número de sinais em relação à extração por soxhlet, 134, 110 e 79 sinais respectivamente. A análise dos compostos obtidos por hidrodestilação apresentou maior intensidade dos sinais e menor dispersão dos dados das replicatas, o que refletiu numa maior qualidade dos dados gerados para a PCA. O perfil do óleo essencial obtido por soxhlet apresentou picos intensos para os compostos capsaicina e dihidrocapsaicina, enquanto que o composto 3,3-Dimetilciclohexanol se destacou como o sinal mais intenso nas análises obtidas para a hidrodestilação e o headspace da amostra. Deste modo, esse estudo se destaca por contribuir para a ampliação do conhecimento técnico-científico desde a área de química ambiental até a área de química dos produtos naturais mostrando a versatilidade das técnicas que empregam equipamento de GC-MS.

Palavras chave: Micro-organismos, *Diabrotica speciosa*, Poluentes Orgânicos Persistentes, cromatografia gasosa, espectrometria de massas, Pimentas *Capsicum* spp., Soxhlet, Hidrodestilação, *Headspace* estático.

ABSTRACT

GC-MS ANALYTICAL METHODOLOGIES OPTIMIZATION AND VALIDATION APPLIED TO PERSISTENT ORGANIC POLLUTANTS BIODEGRADATION AND PEPPERS ESSENTIAL OIL

Recently, a large number of compounds have been synthesized in order to bring comfort and convenience to everyday life. These products, however, produce a large amount of daily waste that are released into the environment causing great inconvenience to the population. Higher concerns focus on the compounds known as persistent organic pollutants (POPs) that have brought serious problems of persistent contamination for decades. POPs are compounds of difficult degradation, that can lead to the bioaccumulation in the food chain and intoxication of the men and animals exposed to them. It is known that insects can acquire resistance to xenobiotics due to their association with microorganisms, which have their own enzymatic mechanisms for biotransformation of these compounds. Thus, in a first step, the present work proposed the development of an analytical method to study the biodegradation of three classes of POPs: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and dioxins. Microorganisms used in this research were all isolated from *Diabrotica speciosa*, an insect present in several Brazilian agricultural crops. All POPs were analyzed by gas chromatography and mass spectrometry, whose method was validated by observing variables such as linear range, matrix effect, accuracy and intra- and inter-day accuracy, limit of detection and quantification. The validation followed the standards established by *Anvisa*, in accordance with Resolution RDC No. 166/2017. Due to the high adsorption of the samples components into GC equipment, occurring in decreased sensitivity. Moreover, this study also presents the optimization of bacterial growth and different extraction techniques for the target analytes. For bioremediation processes, *Burkholderia gladioli* was the most prominent bacteria for HPAs, while *Serratia marcescens* was better for dioxins. These bacteria degraded 18.3 and 22.3%, respectively, of the applied mass in relation to the control in seven days experiment. In a second stage, this work also proposed the development a method of peppers essential oils analysis. The Principal Component Analysis (PCA) of volatile compounds of seven Capsicum peppers, submitted to soxhlet extraction, hydrodistillation and headspace analysis, showed a great similarity between Bode pepper and Biquinho pepper

(*Capsicum chinense*). Cumari of Pará, also belonging to the species *Capsicum chinense*, was the most differentiated pepper in comparison all those analyzed. Analysis of volatile compounds extracted by hydrodistillation technique and headspace analysis showed the highest number of compounds in relation to the soxhlet extraction, 134, 110 and 79 signs respectively. The analysis of the compounds obtained by hydrodistillation showed signals with higher intensity and less dispersion of data, which reflected a greater quality of data generated for PCA. The profile of the essential oil obtained by the soxhlet extraction showed intense peaks for the compounds capsaicin and dihydrocapsaicina, whereas the 3,3-Dimethylcyclohexanol compound stood out as the most intense signal in the analyzes obtained by hydrodistillation and headspace. Thus, this study stands out for contributing to the expansion of technical-scientific knowledge from the environmental chemistry area to the natural products chemistry area showing the techniques versatility that employs GC-MS equipment.

Key words: Microorganisms, *Diabrotica speciosa*, Persistent Organic Pollutants, gas chromatography, mass spectrometry, *Capsicum* spp. Peppers, Soxhlet, Hydrodistillation, Static Headspace.

SUMÁRIO

Capítulo 1	1
1 - Disposições gerais	1
1.1 - Cromatografia gasosa aplicada a análises ambientais e análise de produtos naturais	1
1.1.1 – Cromatografia gasosa acoplada a massas	1
1.1.2 – Cromatografia gasosa aplicada à análise ambiental	5
1.1.3 – Cromatografia gasosa aplicada à análise de produtos naturais	7
1.2 - Materiais e infraestrutura	9
1.2.1 – Materiais	9
1.2.2 - Infraestrutura	10
1.2.2.1- Laboratório de microbiologia	10
1.2.2.2 - Laboratório de Produtos Naturais.....	11
1.2.2.3 – Equipamentos.....	11
1.3 - Referências Bibliográficas	12
Capítulo 2	17
2 – Biodegradação de poluente orgânicos persistentes por bactérias associadas ao inseto praga <i>Diabrotica speciosa</i>	17
2.1 - Introdução	17
2.1.1 – Poluentes orgânicos persistentes	17
2.1.1.1 - Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos	20
2.1.1.2 – Bifenilas policloradas	25
2.1.1.3 – Dioxinas.....	32
2.1.2 - Biodegradação e biorremediação	40
2.1.3 - Simbiose entre micro-organismos e inseto praga.....	47
2.1.4 - <i>Diabrotica speciosa</i>	49
2.2 – Objetivos	51
2.2.1 - Objetivo geral	51
2.2.2 - Objetivos específicos.....	51
2.3 - Procedimento Experimental.....	51
2.3.1 - Cultivo das bactérias	51
2.3.2 - Preparo do pré-inóculo e inoculação das bactérias.....	52

2.3.3 - Determinação dos parâmetros de cultivo para o experimento de biodegradação	53
2.3.3.1 - Relação entre unidade formadora de colônia e densidade ótica ...	53
2.3.3.2 - Teste do diâmetro do tubo a ser usado no experimento de biodegradação.....	54
2.3.3.3 - Toxicidade do solvente <i>N,N</i> -dimetilformamida	55
2.3.3.4 - Toxicidade do aditivo do meio de cultura Tween [®] 80.....	55
2.3.3.5 - Toxicidade dos poluentes orgânicos persistentes	55
2.3.4 - Pré-ensaio de biodegradação dos POP's.....	56
2.3.5 - Ensaio do efeito dos aditivos do meio de cultura sobre a biodegradação	58
2.3.6 – Perfil de degradação.....	58
2.3.7 - Extração dos POP's do meio de cultivo.....	59
2.3.7.1 - Escolha do solvente de extração.....	59
2.3.7.2 - Extração líquido-líquido - meio de cultura/acetato de etila	60
2.3.7.3 - Extração via separação entre biomassa e meio de cultura	60
2.3.8 - Análises Cromatográficas.....	61
2.3.8.1 - Preparo das soluções estoque e solução de trabalho.....	61
2.3.8.2 - Parâmetros cromatográficos	62
2.3.8.3 - Análise quantitativa	63
2.3.8.4 - Validação do método analítico	64
2.3.8.5 – Análise qualitativa.....	66
2.3.9 - Análise estatística.....	66
2.4 - Resultados e discussões	67
2.4.1 – Otimização das condições de crescimento das cepas microbianas ...	67
2.4.1.1 – Toxicidade do solvente DMF e dos POPs	73
2.4.1.2 - <i>Screening</i> inicial das bactéria associadas a <i>D. speciosa</i> – Pré ensaio de biodegradação	78
2.4.2 - Extração dos POP's do meio de cultivo.....	82
2.4.2.1 - Ensaio do solvente de extração	82
2.4.2.2 – Validação do método de extração com acetato de etila	83
2.4.3 - Otimização das condições cromatográficas	86
2.4.3.1 - Separação cromatográfica	86
2.4.3.2 - Método quantitativo	89
2.4.3.3 - Validação do método cromatográfico	94

2.4.4 - Perfil de degradação.....	103
2.4.4.1 - Ensaio do efeito de aditivos no meio de cultura sobre a biodegradação.....	103
2.4.4.2 - Ensaio de degradação dos HPAs.....	105
2.4.4.3 - Ensaio de degradação dos PCBs.....	111
2.4.4.4 - Ensaio de degradação da 1,2,3,4-TCDD	116
2.4.4.5 – Análise qualitativa.....	119
2.4.4.6 - Outras considerações sobre o experimento de biodegradação ..	121
2.4.4.7 – Relação inseto micro-organismo	124
2.5 – Conclusão	125
2.6 – Referências bibliográficas	127
Capítulo 3	143
3 - Extração e análise por GC-MS do óleo essencial de pimentas <i>Capsicum</i> spp.	143
3.1 – Introdução	143
3.1.1 – <i>Capsicum</i> spp.	143
3.1.2 – Espécies de pimentas <i>Capsicum</i> spp. investigadas	146
3.1.3 – Óleo essencial de pimenta.....	149
3.1.4 – Extração e análise de óleo essencial.....	151
3.2 - Objetivos	156
3.2.1 - Objetivo Geral:.....	156
3.2.2 - Objetivos específicos.....	156
3.3 - Procedimento Experimental	156
3.3.1 – Pimentas utilizadas no trabalho	156
3.3.2 – Extração do óleo essencial	157
3.3.2.1 – Soxhlet	157
3.3.2.2 – Hidrodestilação	157
3.3.3 – Análise por GC-MS	158
3.3.3.1 – Análise do extrato obtido por soxhlet.....	158
3.3.3.2 – Análise do extrato obtido em equipamento Clevenger	159
3.3.3.3 – Análise das pimentas por <i>headspace</i> (HS) acoplado a GC-MS .	159
3.3.4 – Análise e tratamento de dados	160
3.4 – Resultados e discussão	161
3.4.1 – Extração dos óleo essenciais das pimentas por soxhlet e hidrodestilação.....	161

3.4.2 – Análise por <i>headspace</i>	164
3.4.3 – Comparação entre as diferentes análises do óleo essencial de pimenta	169
3.5 – Conclusão	179
3.6 – Referências bibliográficas	180
Apêndice A	185
Apêndice B	190

CAPÍTULO 1

1 - Disposições gerais

1.1 - Cromatografia gasosa aplicada a análises ambientais e análise de produtos naturais

1.1.1 – Cromatografia gasosa acoplada a massas

A cromatografia é uma técnica de separação utilizada em diversas áreas de pesquisa, com destaque para a química orgânica, química de produtos naturais e química ambiental. Instrumentos modernos proporcionam separação de misturas complexas tanto em fase líquida quanto em fase gasosa. Se a separação ocorre em fase móvel líquida a cromatografia é dita cromatografia líquida. Se a separação ocorre em fase móvel gasosa, chama-se de cromatografia gasosa (KARASEK e CLEMENT, 1988).

Separações em cromatografia gasosa são obtidas por uma série de partições entre uma fase gasosa em movimento e uma fase estacionária (normalmente líquida) mantida em um tubo de pequeno diâmetro (a coluna) após uma mistura ser injetada como uma banda estreita. A amostra é introduzida na coluna na forma de vapor. Na coluna, a solubilidade de cada componente na fase gasosa depende da sua pressão de vapor, que por sua vez é uma função da temperatura da coluna e da afinidade entre o composto e a fase estacionária. Diferenças na pressão de vapor fazem com que as moléculas de cada componente sejam divididas entre a fase gasosa móvel e a fase estacionária. Um detector monitora a composição do fluxo de gás conforme ele emerge da coluna, carregando os componentes separados, e os sinais resultantes fornecem dados requeridos para a análise. A Figura 1.1 mostra os componentes básicos de um cromatógrafo gasoso (KARASEK e CLEMENT, 1988; BEREZKIN e DRUGOV, 1991; BARTLE e MYERS, 2002).

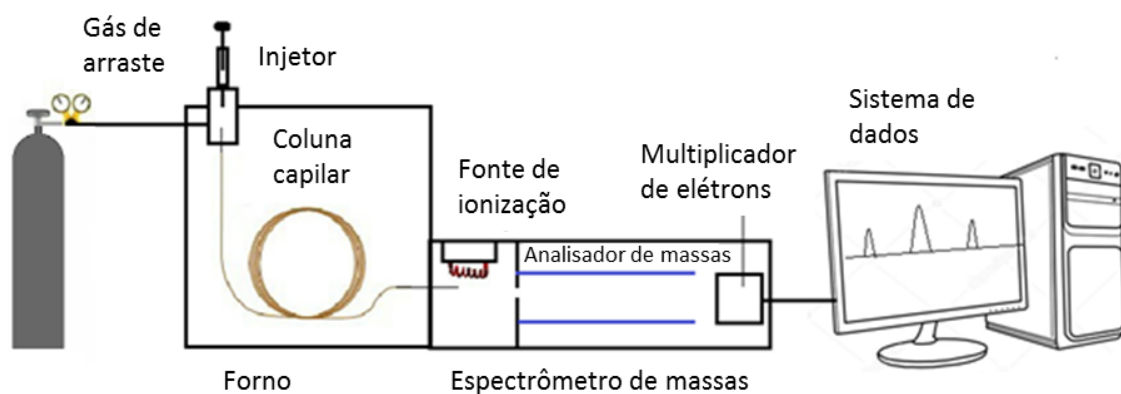


FIGURA 1.1: Diagrama esquemático das partes básicas de um cromatógrafo gasoso.

A cromatografia gasosa (GC) foi inventada por Martin e James na década de 1950. Esses pesquisadores utilizaram nitrogênio como fase móvel e óleo de silicone como fase estacionária para a separação de ácidos graxos voláteis. Hoje, essa técnica analítica é uma das mais importantes e onipresentes na química moderna. Métodos baseados em GC sustentam pesquisas, desenvolvimento e controle de qualidade em muitas indústrias e centros de pesquisa. Fabricação de petroquímicos, análise de contaminantes em alimentos, resíduos em fármacos, análise de poluentes ambientais e análise forense são áreas em que essa técnica mais se destaca (BARTLE e MYERS, 2002; SPARKMAN et al., 2011).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) é a combinação sinérgica de duas poderosas técnicas microanalíticas, um cromatógrafo a gás que separa os componentes de uma mistura no tempo, e um espectrômetro de massas que fornece informações que auxiliam na identificação estrutural de cada componente. Caracterizam-se por técnicas bastante compatíveis, pois as técnicas de ionização por espectrometria de massa requerem analitos em fase gasosa e são, portanto, idealmente adequadas para a cromatografia gasosa que requer, do mesmo modo, amostras volatilizadas. O espectrômetro de massa quando acoplado a cromatografia gasosa é sem dúvida um instrumento de análises indispensável no campus de inúmeros ramos da ciência, como ciência ambiental, forense, saúde, pesquisa médica e biológica, indústria de aromas e fragrâncias, segurança alimentar, embalagem e muitos outros.

Um fator que foi muito significativo na evolução da cromatografia gasosa acoplada ao analisador de massas foi sem dúvida o desenvolvimento dos sistemas de dados. Uma análise cromatográfica de 10 minutos, adquirindo um

espectro a cada segundo, resulta em um total de aproximadamente 600 espectros. Desse modo, esse tipo de análise requer além de um sistema com alta capacidade de armazenamento de dados, um sistema com capacidade de rápida aquisição de informações (SPARKMAN et al., 2011).

Análises por espectrometria de massas dependem de dois processos básicos que ocorrem no analisador: ionização e separação de massas. Diferentes métodos de ionização podem ser combinados com as diferentes técnicas de separação de massa, dependendo dos resultados desejados. A cromatografia gasosa faz uso basicamente de dois tipos de método de ionização: ionização química e ionização por impacto eletrônico. Por trazer mais detalhes sobre as estruturas dos compostos a ionização por impacto eletrônico costuma ser a forma mais comum. Nesse tipo de ionização o analito entra na câmara de ionização a baixas pressões sendo fragmentado quando colide com elétrons acelerados por um potencial de 70 eV provenientes de um filamento focado através da câmara (Figura 1.2). Os fragmentos gerados como íons positivos são então encaminhados ao analisador que separa as massas e envia ao detector (KARASEK e CLEMENT, 1988).

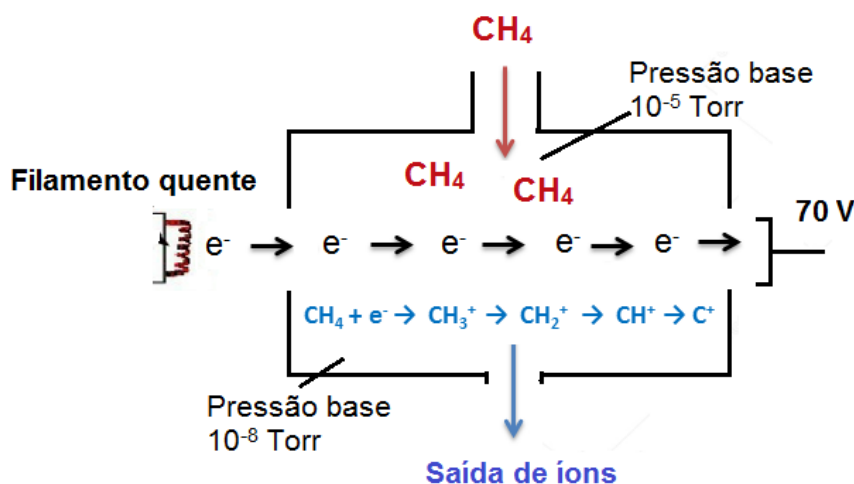


FIGURA 1.2: Esquema da câmara de ionização produzindo íons por bombardeamento de elétrons.

Os analisadores mais comuns de massa são aqueles baseados no tempo de voo dos íons de massa diferentes, conhecido como TOF (*Time of flight*); os analisadores baseados na oscilação dos íons em torno de um eletrodo central, sendo a oscilação dependente da massa do íon, conhecido como *Orbitrap* (*Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping*); e os analisadores do tipo

quadrupolo e *ion trap* que separam as massas de acordo com a estabilidade frente a um campo eletromagnético. A escolha do analisador geralmente está baseada no tipo de dado que se deseja gerar, sendo alguns analisadores mais adequados para a análise qualitativa (analisadores de alta resolução), enquanto outros são mais adequados para análises quantitativas. As análises quantitativas normalmente requerem analisadores mais seletivos, que são capazes de eliminar, com eficiência, possíveis interferentes contidos na amostra. Nesse caso, destacam-se os analisadores do tipo quadrupolo, os quais caracterizam-se como filtros de massa, sendo eficientes na separação de massas específicas para a análise.

Um tipo especial de analisador quadripolar é conhecido como triplo quadrupolo (Figura 1.3). O triplo quadrupolo envolve dois analisadores de quadrupolo montados em uma série, mas operando simultaneamente (como um filtro de massa ou *scanner*) e outro que apesar de ser incluído no nome como quadrupolo é, na verdade, uma célula de colisão que fica entre os dois analisadores de massa. A vantagem dessa célula de colisão é a possibilidade de uma segunda fragmentação, gerando o que é chamado de análise de massa sequencial (MS/MS), possibilitando a utilização da técnica de monitoramento de reações selecionadas (SRM - *Selected Reaction Monitoring*), a qual seleciona íons mais específicos para uma dada molécula aumentando, assim, a seletividade da análise quantitativa (GLISH e VACHET, 2003; SPARKMAN et al., 2011; MOHD, 2012).

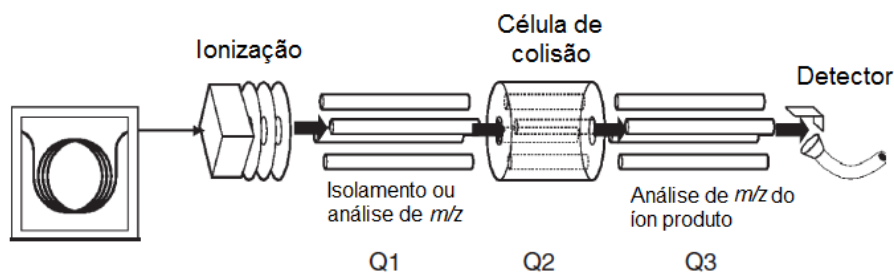


FIGURA 1.3: Representação esquemática de um triplo-quadrupolo. (Fonte: adaptado de SPARKMAN et al., 2011).

1.1.2 – Cromatografia gasosa aplicada à análise ambiental

Embora diversos tipos de metodologias e equipamentos possam ser usados para análises ambientais, métodos cromatográficos são amplamente empregados na atualidade. Isso se deve a grande versatilidade dessa técnica que além da quantificação do analito pode, ainda, fazer a sua identificação. Outra vantagem dos métodos cromatográficos configura-se na alta sensibilidade da análise, podendo detectar amostras altamente diluídas na faixa de ppm a ppt. Um requisito bastante importante, no entanto, para o emprego desse método é a compatibilidade dos analitos com a forma como a amostra deve ser inserida e percolar através da coluna cromatográfica. Em se tratando de cromatografia líquida, a solubilidade da amostra no solvente da fase móvel obviamente é um parâmetro bastante importante. Já para a cromatografia gasosa, a volatilidade dos compostos deve ser um pré-requisito para a seleção dessa técnica (SANTOS e GALCERAN, 2002; SANTOS e GALCERAN, 2003).

Devido a uma ampla gama de compostos orgânicos que vem se tornando poluentes em evidência mundial, métodos que empregam cromatografia gasosa tem se destacado na literatura nos últimos anos (SANTOS e GALCERAN, 2002; SANTOS e GALCERAN, 2003; ALDER et al., 2006; LOZANO et al., 2019; ZHAO et al. 2015; GÓMEZ-RAMOS et al., 2019). Dentre esses compostos cujos relatos são recorrentes na literatura estão os compostos orgânicos voláteis (VOCs), hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), alcanos, ftalatos, pesticidas, compostos clorados, compostos halogenados, retardadores de chama a base de bromo entre outros (KURÁŇ e SOJÁK, 1996; AKUTSU et al., 2001; SANTOS e GALCERAN, 2002; ALDER et al., 2006; BIRCAN et al., 2013; ZHAO et al. 2015; FERNANDES et al., 2016; LOZANO et al., 2019).

Como já mencionado, nos últimos anos as técnicas de GC-MS tem se destacado na análise de várias classes de poluentes orgânicos. No entanto, uma classe em especial tem estado em evidência, os chamados químicos desreguladores endócrinos (EDCs). Esses compostos tem merecido uma atenção especial, pois não trazem apenas efeitos adversos à saúde de seres humanos e animais, mas são capazes de afetar também o crescimento e a reprodução dos seres vivos mesmo em pequenas concentrações. Essas substâncias apresentam características químicas diversas, sendo moléculas polares e apolares, onde

algumas são, ainda, resistente à degradação sendo também classificadas como poluentes orgânicos persistentes (POPs). Os desreguladores endócrinos incluem bifenilas policloradas, ftalatos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, dioxinas, alquilfenóis, pesticidas (em especial os clorados), substâncias farmacêutica e até naturais como estrogênios e fitoestrogênios (SANTOS e GALCERAN, 2003; TRENHOLM et al., 2006; BILA e DEZOTTI, 2007).

Compostos apolares halogenados ou não halogenados são analisados com facilidade por cromatografia gasosa, como o caso dos HPAs, bifenila policloradas, pesticidas entre outros (AKUTSU et al., 2001; SANTOS e GALCERAN, 2003; TRENHOLM et al., 2006; ZHAO et al., 2015). No entanto, mesmo os compostos apolares podem ser analisados por essa técnica, desde que um tratamento prévio de derivatização seja realizado. A derivatização reduz a polaridade de grupos carboxila e hidroxila, por adição de grupos orgânicos de menor polaridade (SANTOS e GALCERAN, 2003; LIU et al., 2004).

Trenholm et al. (2006) analisaram vários pesticidas e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos classificados como EDCs de matriz aquosa por GC-MS com analisador do tipo *ion trap*. Os compostos farmacêuticos e esteroides, porém foram analisados por cromatografia líquida acoplada a análise de massas (LC-MS). Liu et al. (2004) ao analisar os esteroides estrona, 17-estradiol, 17-etinilestradiol, 16-hidroxiestrona, 4-nonilfenol, bisfenol A e 4-terc-octilfenol, preferiram utilizar o método GC-MS. Devido a polaridade elevada desses compostos, esses autores tiveram que desenvolver uma metodologia de derivatização com bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida, a qual foi realizada juntamente com a etapa de extração. A realização da extração e derivatização em uma única etapa apresentou a vantagem de não consumir tempo extra no preparo da amostra.

O preparo de amostra configura-se sempre como uma etapa muito importante em análises ambientais. Devido a alta complexidade das matrizes, normalmente mais do que uma simples extração é requerida para a eliminação de interferentes. Esse preparo de amostra comumente costuma ter uma etapa extra, chamada *clean up*, que se configura como uma etapa mais elaborada de “limpeza” do extrato. Embora a própria separação cromatográfica e a alta seletividade do analisador de massas já sejam, por si só, responsáveis pela eliminação de muitos interferentes importantes, a necessidade da análise de amostras extremamente diluídas torna a etapa de *clean up* fundamental (SANTOS e GALCERAN, 2003).

A tabela 1.1 apresenta a diversidade de compostos orgânicos, matrizes e analisadores que podem ser empregados para análises ambientais por meio da técnica GC-MS.

TABELA 1.1: Análises ambientais executadas pela técnica GC-MS

Poluentes investigados	Matriz	Analisador de massas	Referência
Dibenzodioxinas policloradas, dibenzofuranos e hidrocarbonetos aromáticos	Cinza	Quadrupolo	GOHDA et al., 2003
Éter difenílico polibromado	Peixe	Quadrupolo	AKUTSU et al., 2001
Esteróides	Água	<i>Ion trap</i>	Liu et al., 2004
Pesticidas	Solo	Quadrupolo	SÁNCHEZ-BRUNETE et al., 2004
Compostos orgânicos voláteis	Ar	Quadrupolo	Wu et al., 2004
Pesticidas e HPAs	Água	<i>Ion trap</i>	TRENHOLM et al., 2006
PCBs e pesticidas clorados	Lixo sólido	<i>Ion trap</i>	LOURENCETTI et al., 2007
HPAs	Poeira	Quadrupolo	MANNINO e ORECCHIO, 2008.
Poluentes orgânicos persistentes	Sedimento marinho	Triplo quadrupolo	CAMINO-SÁNCHEZ et al., 2011.
Dibenzo- <i>p</i> -dioxina e dibenzofurano halogenados	Solo	Quadrupolo	MYERS et al., 2012
HPAs	Ar atmosférico	Triplo quadrupolo	ZHAO et al., 2015
Contaminantes ambientais	Mel de abelha	<i>Orbitrap</i>	GÓMEZ-RAMOS et al., 2019.
Drogas veterinárias	Produtos de colmeia	Triplo quadrupolo	LOZANO et al., 2019

1.1.3 – Cromatografia gasosa aplicada à análise de produtos naturais

A análise de produtos naturais está voltada ao estudo de moléculas com algum tipo de ação biológica. Esse tipo de análise inclui detecção e quantificação de moléculas isoladas de plantas, micro-organismos, animais marinhos, entre outros, estudos quimiotaxonômicos, *finger printing* químico, controle

de qualidade de fitoterápicos, além de estudos metabólicos. A análise de produtos naturais teve como base, a princípio, a técnica de ressonância magnética nuclear (RMN) que é classicamente utilizada para a caracterização estrutural das substâncias. No entanto, o surgimento de técnicas refinadas no ramo da cromatografia possibilitou uma ampla utilização desse tipo de método para análise dos produtos naturais. Devido a compatibilidade com uma diversidade muito grande de amostras a cromatografia líquida é, geralmente, a mais utilizada. Porém análises que se utilizam da técnica de GC-MS, não deixam de ser importantes para essa área da ciência, principalmente para a análise de compostos de maior volatilidade (SARKER et al., 2006).

Os compostos voláteis caracterizados como produtos naturais que são mais amplamente analisados por GC-MS são os compostos do tipo terpenos. Os terpenos são moléculas derivadas de unidades de isoprenos e podem ter de dez a quinze carbonos. Essas substâncias fazem parte do óleo essencial de plantas e podem ser isoladas de várias partes dos vegetais por arraste a vapor, hidrodestilação entre outros (DAFERERA et al. 2000). Esses compostos são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas fazendo parte do seu mecanismo de defesa. A aplicação do óleo essencial de plantas pode ser diversa, indo desde o ramo farmacêutico até o alimentício. A atividade biológica que mais se destaca para esse tipo de extrato é a sua ação antibacteriana e antifúngica (OLIVEIRA et al., 2006).

Embora o maior destaque para o uso de GC-MS na literatura seja para os compostos voláteis presentes em óleo essenciais, outros compostos pertencentes à classe dos produtos naturais podem ainda ser analisados por essa técnica, como por exemplo, ácidos fenólicos, flavonóides, cumarinas, carboidratos e ácidos graxos. Nesse caso, como se tratam de compostos com certo grau de polaridade, um processo de derivatização da amostra sempre é necessário para tornar essas moléculas compatíveis com o processo de análise específico para cromatografia gasosa (MARKHAM et al., 1996; CANINI et al. 2007; SORIA et al., 2009). A Tabela 1.2 abaixo trás algumas referências da literatura para as quais a análise de produtos naturais esteve baseada exclusivamente na técnica de GC-MS.

TABELA 1.2: Análise de produtos naturais pela técnica de GC-MS

Produtos naturais	Matriz	Reagente usado na derivatização	Referência
Compostos fenólicos	Óleo de oliva	BSTFA	ANGEROSA et al, 1995
Compostos aromáticos e ácidos graxos	Própolis	Etanol-diclorometano	MARKHAM et al., 1996.
Ácidos graxos e β -caroteno	Beldroega	Metanol-clorofórmio	LIU et al., 2000
Ácidos fenólicos, flavonóides e cumarinas	Mamão	BSTFA	CANINI et al., 2007
Carboidratos pequenos	Cenoura	Trimetilsilil	SORIA et al., 2009

BSTFA - *N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida*;

1.2 - Materiais e infraestrutura

1.2.1 – Materiais

- Água destilada proveniente de um equipamento de osmose Reversa, modelo PRO 4000, KEMFLO.
- Acetato de etila e diclorometano grau HPLC Tedia e Panreac.
- N,N-dimetilformamida Tedia;
- Éter etílico P. A. Synth;
- Cloreto de Sódio grau P.A. Synth;
- Hidrogeno fosfato de sódio anidro Synth;
- Diidrogeno fosfato de potássio Synth;
- Cloreto de amônio Synth.
- Sulfato de amônio Synth
- Sulfato de magnésio heptahidratado
- Cloreto de cálcio Synth;
- Sulfato ferroso Synth;
- Sulfato de manganês heptaidratado Synth.
- Sulfato de Zinco Synth;
- Sulfato de cobalto heptaidratado Synth;
- Molibidato de sódio diidratado Synth

- Glicose – D-anidra P.A. Synth;
- Sulfato de sódio anidro Synth;
- Placa de ELISA de 96 poços, TPP;
- Placas de Petri Petri diâmetro 9 cm;
- Fenantreno, pireno, antraceno, PCB-1, PCB-3, PCB-15, dibenzofurano, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).
- Dioxina 1,2,3,4-TCDD Unitech USA (Medley, FL, EUA).
- Meio de cultura Nutriente-Ágar (NA) Acumedia;
- Caldo Nutriente (CN) Acumedia;
- YNB (Yeast Nitrogen Base) Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA);
- Tween® 80 Delaware
- Micropipetas Gilson® de 10, 100 e 1000 µL;
- Viel 2 mL 9mm Nova Analítica;
- Viel para *headspace* 10 mL;
- Tubo criogênico 2,0 mL TPP;
- Tubos falcon de 15 e 50 mL Greiner;
- Tubos de vidro com tampa 25 mm de diâmetro Laborglas.
- Erlenmeyer de 250 mL;
- Alça de Drigalski;
- Alça de platina (5 cm x 0,5 cm);
- Álcool 70%;
- Bico de Bunsen.
- Microscópio Leica® DM500

1.2.2 - Infraestrutura

1.2.2.1- Laboratório de microbiologia

Os ensaios microbiológicos foram realizados em um laboratório de bioensaios que faz parte do Laboratório de Produtos Naturais do departamento de química da UFSCar. Esse laboratório possui uma balança analítica BEL engineering Classe II, autoclave vertical Phoenix Luferco, uma incubadora BOD Solab SL-200, espectrofotômetro FEMTO 700 plus (que foi usado para medida de densidade ótica -

OD), uma incubadora refrigerada com agitação orbital TECNAL TE-421, modelo TE-424, com capacidade para 20 erlenmeyer de 250 mL. Esse laboratório conta também com um freezer vertical - 80°C MDF-U56VC (Sanyo, Osaka, Japão) a disposição para o armazenamento de amostras biológicas. Todo o trabalho com os micro-organismos foi feito em capela de fluxo laminar, Bio SEG 09, previamente esterilizado com solução aquosa de etanol 70% (v/v) e radiação UV 260 nm. O material a ser usado no cultivo dos micro-organismos, tanto meio de cultura quanto vidraria, foi previamente autoclavado por 20 minutos a 121°C.

1.2.2.2 - Laboratório de Produtos Naturais

A extração dos óleos essenciais de pimentas por hidrodestilação e soxhlet foi realizada no laboratório de produtos naturais. Esse laboratório conta com um sistema de extração de 6 balões de 250 mL, seis extratores soxhlet, 6 condensadores acoplados a um banho Ethik que foi mantido a 4°C durante todo o processo de extração. A concentração do extrato foi feita com auxílio de um evaporador rotatório BUCHI, rotavapor R-114 e R-200, equipado com banho BUCHI B-480 e 490, respectivamente, e um recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25. A hidrodestilação foi feita com o auxílio de uma manta Prolab acoplada a um regulador de voltagem (Variac). Esse sistema também contou com um extrator do tipo Clevenger modificado refrigerado a 4°C, pelo banho recirculador.

1.2.2.3 – Equipamentos

a) Centrífuga

A inoculação das bactérias e extração dos POP's foi feita por meio da separação das cepas do meio de cultura com o auxílio de uma centrífuga Eppendorf 5810R (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha) com rotores F-34-6-38 (Rotação Máxima: 18500 x g), com capacidade para 6 tubos de 15 mL e A-4-81 (Rotação Máxima: 3220 x g), com capacidade para 6 tubos de 50 mL.

b) Espectrofluorímetro

O ensaio de inibição de crescimento microbiano foi realizado em Espectrofluorímetro Spectramaz Multi-Mode Reader/Leitor de microplacas;

c) Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (GC-MS)

As análises dos extratos dos POP's e extratos dos óleos essenciais de pimentas foram realizadas em um cromatógrafo à gás modelo QP 2010 Plus hifenado a um analisador de massas triplo quadrupolo TQ-8040 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Esse equipamento conta com injeção automática realizada por um amostrador AOC 5000 (Shimadzu, Kyoto, Japão). O gás helio 5.0 (99.9995%) (White Martins, São Carlos, SP, Brasil) foi usado como gás de arraste. Todos os dados obtidos a partir desse equipamento foram avaliados pelo uso do *software* GCMS Solution (Shimadzu, Kyoto, Japão).

1.3 - Referências Bibliográficas

ALDER, L.; GREULICH, K.; KEMPE, G.; VIETH, B. "Residue analysis of 500 high priority pesticides: Better by GC-MS or LC-MS/MS?" *Mass Spectrometry Reviews*, **25**(6): 838-865, 2006.

AKUTSU, K.; OBANA, H.; OKIHASHI, M.; KITAGAWA, M.; NAKAZAWA, H.; MATSUKI, Y.; MAKINO, T.; ODA, H.; HORI, S. "GC/MS analysis of polybrominated diphenyl ethers in fish collected from the Inland Sea of Seto, Japan". *Chemosphere*, **44**(6): 1325-1333, 2001.

ANGEROSA, F.; D' ALESSANDRO, N.; KONSTANTINOU, P.; DI GIACINTO, L. "GC-MS Evaluation of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **43**(7): 1802-1807, 1995.

BARTLE, K. D. e MYERS, P. "History of gas chromatography". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **21**, 547-557, 2002.

BEREZKIN, V. G. e DRUGOV, Y. S. *Gas Chromatography in Air Pollution Analysis*, Academic Press, Oxford, 1991.

BILA, M. D. e DEZOTTI, M. "Desreguladores endócrinos no meio ambiente: efeitos e consequências". *Química Nova*, **30**: 651-666, 2007.

BIRCAN, Y. S.; KANAMORI, R.; HASEGAWA, Y.; OHBA, K.; MATSUMOTO, K.; KITAGAWA, K. "GC-MS ultra trace analysis of dioxins produced through hydrothermal gasification of biowastes". *Microchemical Journal*, **99**(2): 556–560, 2011.

CAMINO-SÁNCHEZ, F. J.; ZAFRA-GÓMEZ, A.; PÉREZ-TRUJILLO, J. P.; CONDE-GONZÁLEZ, J. E.; MARQUES, J. C.; VÍLCHEZ, J. L. "Validation of a GC-MS/MS method for simultaneous determination of 86 persistent organic pollutants in marine sediments by pressurized liquid extraction followed by stir bar sorptive extraction". *Chemosphere*, **84**(7):, 869–881, 2011.

CANINI, A.; ALESIANI, D.; D'ARCANGELO, G.; TAGLIATESTA, P. "Gas chromatography–mass spectrometry analysis of phenolic compounds from *Carica papaya* L. leaf". *Journal of Food Composition and Analysis*, **20**(7): 584–590, 2007.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. "GC-MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plants and Their Fungitoxicity on *Penicillium digitatum*". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **48**(6): 2576–2581, 2000.

FERNANDES, A. R.; MORTIMER, D.; ROSE, M.; SMITH, F., PANTON, S.; GARCIA-LOPEZ, M. "Bromine content and brominated flame retardants in food and animal feed from the UK". *Chemosphere*, **150**: 472–478, 2016.

GLISH, G. L. e VACHET, R. W. "The basics of mass spectrometry in the twenty-first century." *Nature Reviews Drug Discovery*, **2**(2): 140–150, 2003.

GOHDA, H.; HATANO, H.; HANAI, T.; MIYAJI, K.; TAKAHASHI, N.; SUN, Z.; DONG, Z.; YU, H.; CAO, T.; ALBRECHT, I. D.; NAIKWADI, K. P.; KARASEK, F. "GC and GC-MS analysis of polychlorinated dioxins, dibenzofurans and aromatic hydrocarbons in fly ash from coal-burning works". *Chemosphere*, **27**(1-3): 9–15, 1993.

GÓMEZ-RAMOS, M. M.; UCLES, S.; FERRER, C.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R.; HERNANDO, M. D. "Exploration of environmental contaminants in honeybees using GC-TOF-MS and GC-Orbitrap-MS". *Science of The Total Environment*, **647**: 232–244, 2019.

KARASEK, F. W. e CLEMENT, R. E. "Basic gas chromatography–mass spectrometry: Principles and techniques". Amsterdam: Elsevier Science, 1988.

KURÁŇ, P. e SOJÁK, L. "Environmental analysis of volatile organic compounds in water and sediment by gas chromatography". *Journal of Chromatography A*, **733**: 119–141, 1996.

LOURENCETTI, C.; FAVORETO, R.; MARCHI, M. R. R.; RIBEIRO, M. L. "Residues of organochlorine pesticides and PCBs in some Brazilian municipal solid waste compost". *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **42**(6), 697–705, 2007.

- LOZANO, A.; HERNANDO, M. D.; UCLÉS, S.; HAKME, E.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. "Identification and measurement of veterinary drug residues in beehive products". *Food Chemistry*, **274**: 61-70, 2019.
- LIU, L.; HOWE, P.; ZHOU, Y.-F.; XU, Z.-Q.; HOCART, C.; ZHANG, R. "Fatty acids and β -carotene in Australian purslane (*Portulaca oleracea*) varieties". *Journal of Chromatography A*, **893**(1): 207–213, 2000.
- LIU, R.; ZHOU, J.; WILDING, A. "Simultaneous determination of endocrine disrupting phenolic compounds and steroids in water by solid-phase extraction–gas chromatography–mass spectrometry". *Journal of Chromatography A*, **1022**: 179–189, 2004.
- MANNINO, M. R. e ORECCHIO, S. "Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in indoor dust matter of Palermo (Italy) area: Extraction, GC–MS analysis, distribution and sources". *Atmospheric Environment*, **42**(8): 1801–1817, 2008.
- MARKHAM, K. R.; MITCHELL, K. A.; WILKINS, A. L.; DALDY, J. A.; LU, Y. "HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zeland propolis". *Phytochemistry*, **42**(1): 205–211, 1996.
- MOHD, M. A. "Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications", 1st ed.; Intech: Shanghai, 2012.
- MYERS, A. L.; MABURY, S. A.; REINER, E. J. "Analysis of mixed halogenated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PXDD/PXDFs) in soil by gas chromatography tandem mass spectrometry (GC–MS/MS)". *Chemosphere*, **87**(9): 1063–1069, 2012.
- OLIVEIRA R. A. G.; LIMA E. O.; VIEIRA W. L.; FREIRE K. R. L.; TRAJANO V. N.; LIMA I. O.; SOUZA E. L.; TOLEDO M. S.; SILVA-FILHO R. N. "Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica". *Revista Brasileira Farmacognosia*, **16**: 77-82, 2006.
- SÁNCHEZ-BRUNETE, C.; ALBERO, B.; TADEO, J. L. "Multiresidue Determination of Pesticides in Soil by Gas Chromatography–Mass Spectrometry Detection". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**(6): 1445–1451, 2004.
- SANTOS, F. e GALCERAN, M. "The application of gas chromatography to environmental analysis". *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **21**: 672–685, 2002.
- SANTOS, F. J. e GALCERAN, M. T. "Modern developments in gas chromatography–mass spectrometry-based environmental analysis". *Journal of Chromatography A*, **1000**: 125–151, 2003.
- SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. "Methods in Biotechnology: Natural Product Isolation". 2ª ed. Totowa: Humana Press Inc., 2006.
- SPARKMAN, O. D.; PENTON, Z. KITSON, F. G. "Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide", Academic Press, Oxford, 2011.

SORIA, A.; SANZ, M.; VILLAMIEL, M. "Determination of minor carbohydrates in carrot (*Daucus carota* L.) by GC–MS". *Food Chemistry*, **114**(2): 758–762, 2009.

TRENHOLM, R. A.; VANDERFORD, B. J.; HOLADY, J. C.; REXING, D. J.; SNYDER, S. A. "Broad range analysis of endocrine disruptors and pharmaceuticals using gas chromatography and liquid chromatography tandem mass spectrometry". *Chemosphere*, **65**(11):1990–1998, 2006.

WU, C.-H.; FENG, C.-T.; LO, Y.-S.; LIN, T.-Y.; LO, J.-G. "Determination of volatile organic compounds in workplace air by multisorbent adsorption/thermal desorption-GC/MS". *Chemosphere*, **56**(1): 71–80, 2004.

ZHAO, B.; ZHANG, S.; ZHOU, Y.; HE, D.; LI, Y.; REN, M.; XU, Z.; FANG, J. Characterization and quantification of PAH atmospheric pollution from a large petrochemical complex in Guangzhou: GC–MS/MS analysis. *Microchemical Journal*, **119**, 140–144, 2015, 2015.

CAPÍTULO 2

2 – Biodegradação de poluentes orgânicos persistentes por bactérias associadas ao inseto praga *Diabrotica speciosa*

2.1 - Introdução

2.1.1 – Poluentes orgânicos persistentes

Um grande número de poluentes é liberado no ambiente anualmente causando sérios problemas ambientais. A cada ano 1000 novos produtos químicos são sintetizados resultando em diversos produtos contaminantes. Atualmente, entre 60.000 e 95.000 compostos químicos estão em uso comercial, sendo liberado no mundo todo mais de 450 milhões de quilogramas de toxinas no ar, água e solo (ORTIZ-HERNÁNDEZ, 2011). No entanto, alguns poluentes têm recebido atenção especial nos últimos anos por não serem apenas tóxicos, mas persistentes no meio ambiente, o que aumenta ainda mais o perigo que eles representam aos seres vivos em geral. Desse modo, esses compostos vêm ganhando atenção especial da comunidade científica e governamental, bem como das políticas ambientais e organizações não governamentais, no sentido tanto da sua identificação, quanto para evitar sua produção. A persistência desses compostos no ambiente está relacionada à suas baixas pressões de vapor, tempo de meia vida na atmosfera de mais de dois dias e principalmente baixa taxa de degradação sendo, geralmente inferior a 30% em 28 dias (LERCHE et al., 2002; FIEDLER, 2003).

Poluentes orgânicos persistentes (POPs) são compostos orgânicos de origem natural ou antropogênica, formados de forma intencional ou não. Inicialmente, doze POPs foram indicados na Convenção de Estocolmo¹, com concordância do Programa das Nações Unidas para o meio ambiente (UNEP), como substâncias a ter a produção e uso eliminado (aldrin, clordano, DDT, dieldrin, endrin,

¹ Convenção de Estocolmo: tratado internacional assinado por 152 países em 2001 em Estocolmo, Suécia, favorável ao Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente. O Tratado de Estocolmo teve como objetivo estabelecer fundamentos internacionais para proteção da saúde humana e do meio ambiente dos efeitos tóxicos de poluentes orgânicos persistentes (POPs) sendo pensado para diminuir ou eliminar globalmente a produção e o uso de POPs produzidos pelo homem.

heptaclor, mirex, toxafeno, hexaclorobenzeno, bifenilas policloradas, dibenzo-*p*-dioxina policlorada (PCDD) e dibenzofurano policlorados (PCDF)). Hoje, outros compostos como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), certos retardadores de chama bromados, bem como compostos organometálicos como o tributilestanho (TBT) tem sido adicionados à lista de Poluentes Orgânicos Persistentes. Por persistirem no ambiente, esses compostos podem ser transportados em baixas concentrações por rios e águas marinhas e, como são semi-voláteis, também podem ser transportados a longas distâncias pela atmosfera. Isso leva a uma distribuição desses poluentes nas mais diversas regiões do planeta, estando presente em locais onde nunca foram usados antes (FIEDLER, 2003).

Poluentes Orgânicos Persistentes são caracterizados por sua baixa solubilidade em água e alta solubilidade em lipídios resultando em bioacumulação em tecidos gordurosos dos seres vivos, sendo encontrados em altos níveis na cadeia alimentar pelo processo de magnificação trófica. Deste modo, tanto humanos como animais podem estar expostos a esses compostos por longos períodos de tempo, resultando em efeitos tóxicos que podem ser agudos ou crônicos (FIEDLER, 2003; KOVNER, 2009).

Trocas de POPs entre a superfície terrestre e a atmosfera ocorrem em resposta às mudanças de temperatura. Compostos persistentes semi-voláteis podem participar de repetidas trocas ar-superfície, conforme pode ser visto na Figura 2.1, movendo-se pelo globo terrestre, chegando as mais diversas regiões. Assim compostos lançados nos trópicos, onde a temperatura é mais elevada, serão mais facilmente volatilizados. Sob temperaturas mais baixas, no entanto, esses compostos voltam à superfície terrestre. Quando chegam a regiões mais frias e de alta altitude as trocas ar-superfície se tornam menos significativas, o que faz com que esses compostos permaneçam por mais tempo nessas regiões. Desse modo, regiões polares correm o risco de se tornar grandes depósitos de POPs, causando grande impacto não só a vida selvagem, mas a vida de nativos destas regiões remotas, os quais tem sua alimentação baseada principalmente na caça de animais que podem ter bioacumulado esses compostos ao longo da cadeia alimentar (KOVNER, 2009).

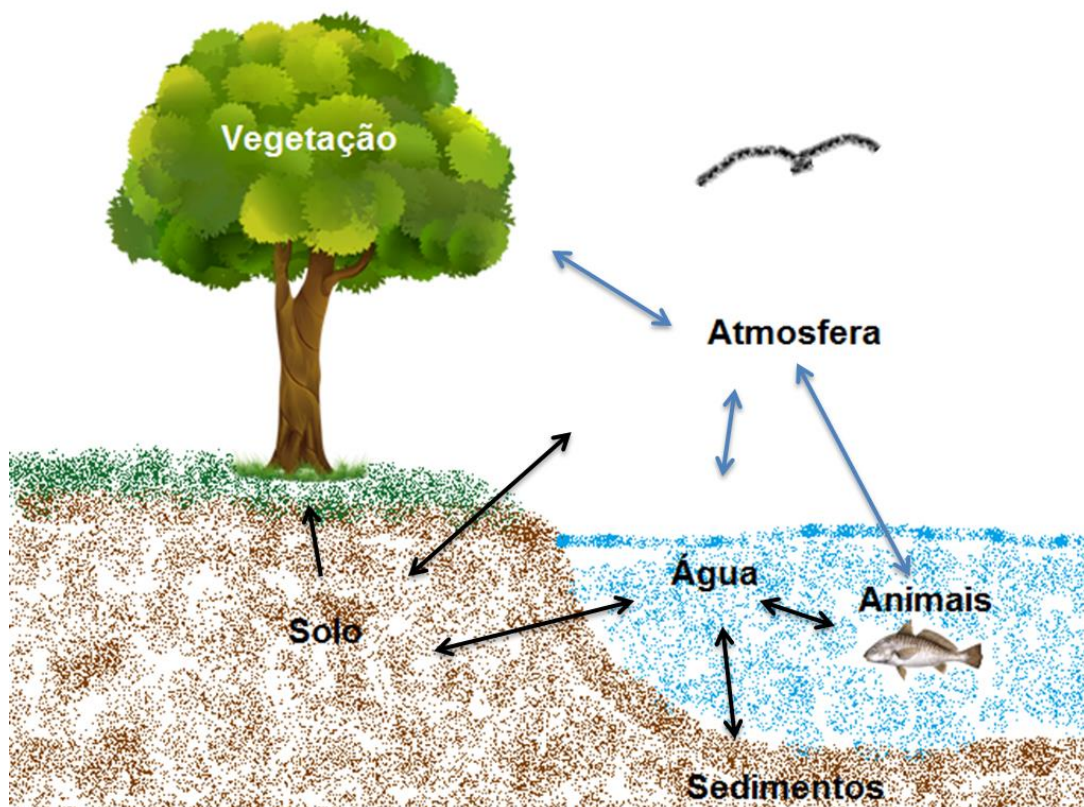


FIGURA 2.1: Movimento de Poluentes Orgânicos Persistentes no Meio Ambiente.

A descoberta da contaminação por POPs em regiões remotas do Ártico a milhares de quilômetros de qualquer fonte conhecida foi o grande impulso para se estabelecer a Convenção de Estocolmo em 2001. Com o avanço da tecnologia e o surgimento de sistemas de monitoramento remotos via satélite foi possível ter uma melhor percepção das implicações da contaminação por POPs no planeta. Em 2001 imagens de satélite mostraram a passagem de uma nuvem de poeira através do Oceano Pacífico para a América do Norte e nuvens de poeira viajando da África para a Ásia. Essa constatação tornou evidente que a distribuição de POPs na superfície terrestre, além de ser um problema real, pode ter consequências para os mais diversos ecossistemas existentes no planeta. Isso ocorre porque a associação a partícula sólida facilita o transporte de grandes quantidades desses poluentes, por tornar esse transporte muito mais rápido e efetivo. Desse modo, a questão relacionada à distribuição de poluentes longe de ser um problema local, é um problema de proporções globais (FIEDLER, 2003; KOVNER, 2009).

Nos últimos anos alterações na vida selvagem tem sido um alerta aos seres humanos a respeito da contaminação de certos ecossistemas. Normalmente, anormalidades ou declínios detectados em populações de animais silvestres podem

soar como um sobreaviso precoce para as pessoas sobre sua exposição a POPs. Os efeitos a saúde vão desde anormalidades reprodutivas, defeitos de nascença, disfunção do sistema imunológico, defeitos neurológicos até o aparecimento de cânceres. As pessoas estão expostas a POPs principalmente através de alimentos contaminados como carnes, peixe e produtos lácteos. Outras possibilidades menos comuns incluem água contaminada e contato direto com os produtos químicos. Em pessoas e outros mamíferos, os POPs podem ser transferidos através da placenta e do leite materno para os descendentes em desenvolvimento (KOVNER, 2009).

Devido à preocupação com os efeitos adversos a saúde dos seres humanos e animais selvagens, atualmente, houve um grande incentivo à pesquisa sobre as fontes, destino ambiental e transferências dos POPs na cadeia alimentar. No entanto, a pesquisa desses compostos representa um grande desafio por não se tratar de contaminantes de fácil monitoramento. Geralmente, POPs são lançados no ambiente em quantidades de ultratraço. Por exemplo, a Inglaterra emite cerca de 0,5 kg de dibenzodioxinas e dibenzofurano policlorados (PCDD/Fs) na atmosfera anualmente o que leva a uma concentração no ar na ordem de fg m^{-3} . A análise de quantidades tão baixas de poluentes exige métodos de detecção muito seletivos e de alta sensibilidade. Outra limitação da análise de POPs em relação a outros contaminantes está relacionada às técnicas utilizadas demandarem tempo de preparo e as análises apresentarem um custo elevado dependendo do método empregado (JONES e VOOGT, 1999)

2.1.1.1 - Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são uma classe de compostos orgânicos que consistem em dois ou mais anéis de benzeno fundidos e/ou moléculas pentacíclicas que estão dispostos em várias configurações estruturais. Essas configurações podem ser classificadas em linear, aglomerado ou arranjos angulares, conforme pode ser visto na Figura 2.2.

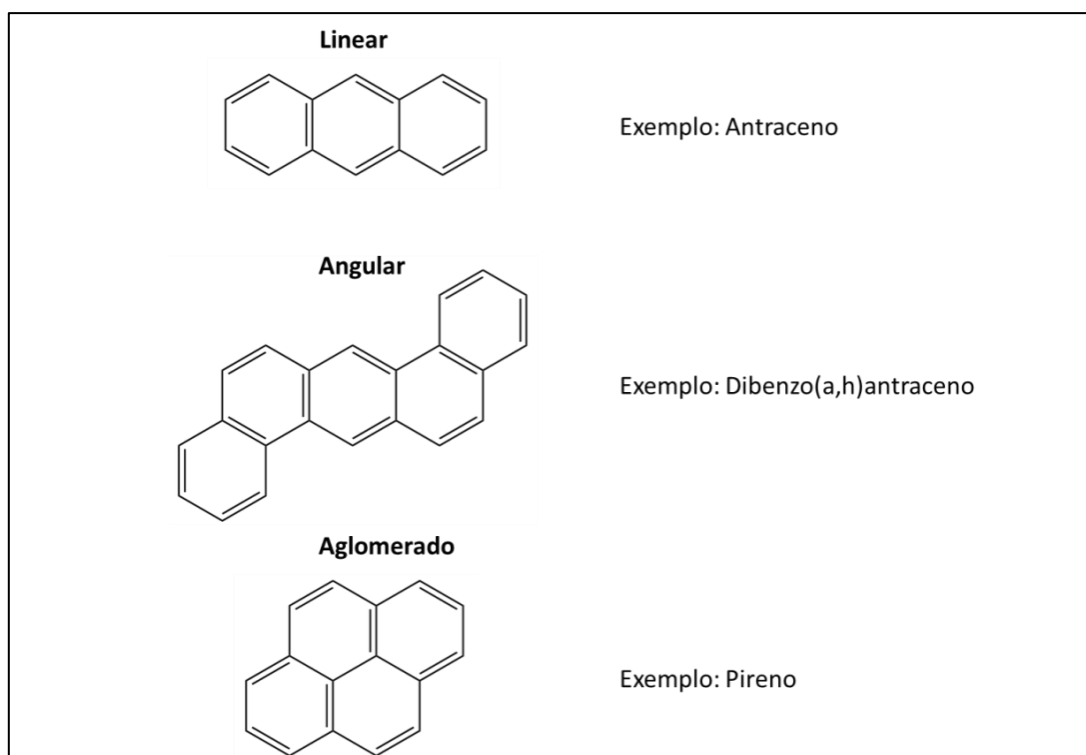


FIGURA 2.2 Arranjo molecular dos Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (Fonte: adaptado de ABDEL-SHAFY E MANSOUR, 2016).

Os HPAs são geralmente sólidos incolores, brancos ou amarelo pálido. São um grupo de substâncias orgânicas onipresente no solo, na água e no ar com várias centenas de compostos quimicamente relacionados, ambientalmente persistentes e de toxicidade variada. Esses compostos são gerados de forma não intencional de duas fontes principais: naturais (biogênica e geoquímica) e antropogênica, sendo essa última a principal causa de poluição ambiental e, portanto, o foco de programas de biorremediação (BAMFORTH E SINGLETON, 2005; ABDEL-SHAFY E MANSOUR, 2016).

No que diz respeito às emissões provenientes de fontes naturais, tem sido relatado que 2000 toneladas de HPAs totais presentes na atmosfera são atribuíveis aos incêndios florestais naturais. As emissões globais de benzo(a)pireno por vulcões foram estimados entre 1,2 a 14 toneladas anuais. Apesar da quantidade alarmante desses poluentes que são produzidos de forma natural, como foi dito anteriormente, a maior fonte de emissão de HPAs para o ambiente ainda é proveniente de fontes antropogênicas, representando um perigo considerável para a saúde humana (Earl et al., 2003). No Brasil a queimada de canaviais, por exemplo, caracteriza-se como um dos principais processos antropogênicos responsáveis pelo

aumento da concentração de HPAs no solo e no ar das cidades. Os canaviais são queimados para facilitar o processo de corte manual e para aumentar o teor de açúcar, em peso, por meio de evaporação da água. Estudos realizados para o ar do interior e exterior de residências já tem comprovado o aumento da concentração de equivalentes de benzo(a)pireno de $0,007 \text{ ng.m}^{-3}$ para $1,7 \text{ ng.m}^{-3}$, após as queimadas serem realizadas (ANDRADE et al., 2010; CRISTALE et al., 2012).

A persistência dos HPAs no meio ambiente depende de vários fatores, como a estrutura química, a concentração, a dispersão e a biodisponibilidade do contaminante. A estrutura química está relacionada principalmente a características como hidrofobicidade e solubilidade. Quanto mais hidrofóbico, menos solúvel e mais persistente será o composto. A Figura 2.3 ilustra as estruturas de alguns HPAs e suas respectivas solubilidades. Como pode ser visto, a solubilidade desse tipo de composto depende principalmente do número de anéis e da ligação entre esses anéis. Além disso, fatores ambientais como tipo e estrutura do solo, pH, temperatura e a presença de níveis adequados de oxigênio, nutrientes e água controlam a biodisponibilidade dessas substância para a atividade das comunidades microbianas degradantes, contribuindo para controlar o tempo que os HPAs persistem no ambiente. A associação de HPAs com co-poluentes como hidrocarbonetos e metais pesados é outro fator que pode prolongar seu tempo de permanência no ambiente (BAMFORTH E SINGLETON, 2005; ABDEL-SHAFY E MANSOUR, 2016).

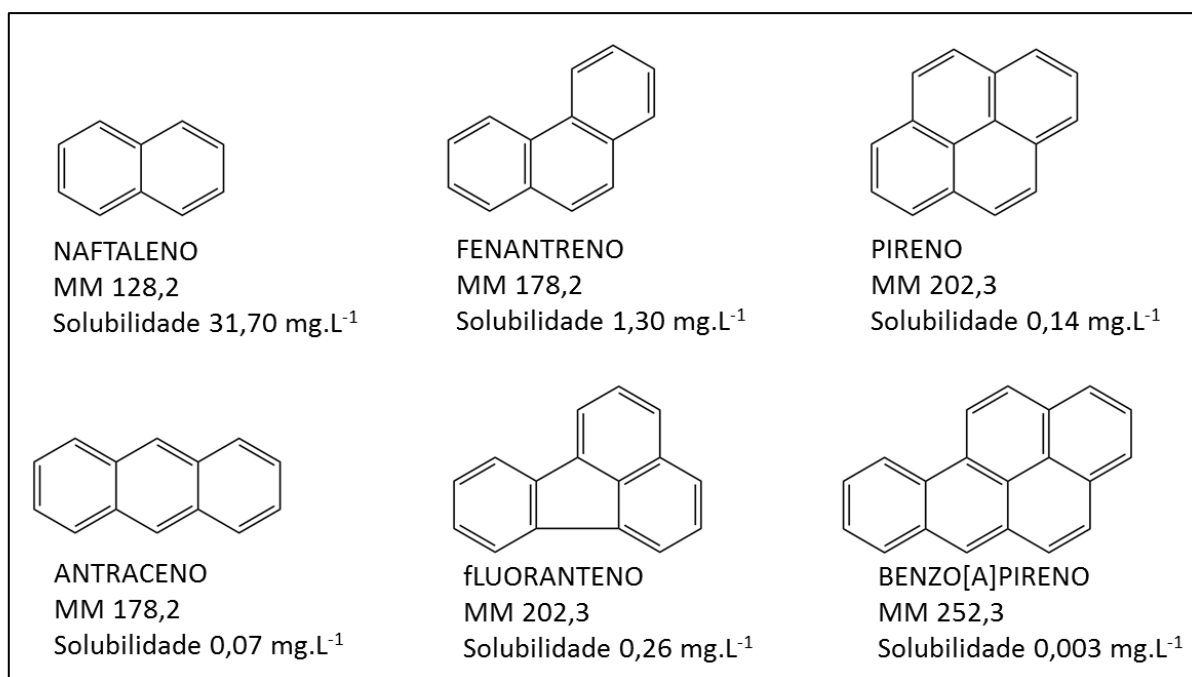


FIGURA 2.3: Massa molar e solubilidade em água de algum Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos (HPAs). (Fonte: adaptado de BAMFORTH e SINGLETON, 2005)

Muitos HPAs têm propriedades tóxicas, mutagênicas e/ou carcinogênicas. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos são altamente solúveis em lipídeos e, assim, prontamente absorvidos a partir do trato gastrointestinal de mamíferos. Eles são rapidamente distribuídos em uma ampla variedade de tecidos com uma acentuada tendência para a localização na gordura corporal. Por isso, muitos HPAs são considerados poluentes ambientais que podem ter um efeito negativo sobre a flora e fauna dos habitats afetados, resultando na absorção e acumulação ao longo da cadeia alimentar e, quando chegam ao ser humano, em graves problemas de saúde e /ou defeitos genéticos (SAMANTA et al. 2002).

Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos são quimicamente inertes, no entanto, eles sofrem ativação metabólica em células de mamíferos resultando em diol-epóxidos que se ligam covalentemente a macromoléculas celulares, incluindo DNA, causando erros na replicação do DNA e mutações que iniciam o processo carcinogênico. Aparentemente todos os HPAs com potencial cancerígeno apresentam esse tipo de mecanismo. Há também evidências de que outros intermediários reativos são gerados por processos de oxidação que pode resultar na alquilação quimicamente instável do DNA, o que leva a um evento potencialmente mutagênico (PHILLIPS, 1999).

A exposição a altos níveis de poluentes contendo HPAs pode resultar em sintomas como irritação nos olhos, náusea, vômitos, diarreia e confusão mental. Já a exposição prolongada ou crônica aos HPAs pode incluir diminuição da função imunológica, catarata, dano renal e hepático, problemas respiratórios, sintomas semelhantes aos da asma e anormalidades da função pulmonar. O contato repetido com a pele pode induzir vermelhidão e inflamação. O naftaleno, um HPA específico, pode causar a quebra dos glóbulos vermelhos se inalado ou ingerido em grandes quantidades (ABDEL-SHAFY e MANSOUR, 2016).

As vias de exposição à HPAs incluem respiração em ambientes contaminados, inalação em ambientes com lareira, hábito de fumar cigarros, além de águas contaminadas por efluentes industriais ou derramamento de petróleo (ABDEL-SHAFY e MANSOUR, 2016). Há, também, vários relatos na literatura sobre o aumento significativo de certas doenças cancerosas atribuídas a uma exposição incomum a HPAs no ambiente de trabalho (JACOB E SEIDEL, 2002; ROSSBACH et al. 2007). No entanto, acredita-se que a dieta ainda é a maior fonte da exposição humana a esse tipo de composto. Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos foram detectados e quantificados em muitos alimentos, incluindo carnes grelhadas no carvão, alimentos defumados, gorduras e óleos, frutos do mar, bebidas e vegetais. As possíveis fontes de contaminação por HPAs em alimentos são numerosas e incluem solos contaminados, ar e água poluídos, modo de cozimento, processamento de alimentos, tipo de combustível (carvão, madeira, diesel, propano), condições de geração de fumaça durante a cura, composição da madeira, temperatura de pirólises, fontes endógenas e teor de lipídios da carne (GOMAA et al., 1993).

Aparentemente a deposição gasosa desses HPAs é o principal mecanismo para a acumulação em vegetais, porém foi observado, em alguns casos, uma relação direta entre a concentração de HPAs no solo e na planta contaminada (TAO et al., 2004). A introdução desse tipo de composto no solo pode se dar de várias maneiras, como por exemplo, matéria proveniente do tratamento de esgoto público, lixiviação dos locais de armazenamento de carvão e utilização de fertilizantes que contem HPAs. No entanto, outra forma bastante importante da introdução de HPAs no solo é a deposição dos compostos depois do transporte local ou por longas distâncias. O grau de transferência de HPAs para o solo depende de características ambientais, como por exemplo, temperatura e quantidade de

precipitação, e de características físico-químicas individuais dos compostos, especialmente massa molecular, coeficiente de partição octanol-ar (K_{oa}), solubilidade em água, coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}), constante da lei de Henry e pressão de vapor. Geralmente compostos com alta massa molecular (mais de quatro anéis) tendem a ser depositados nas vizinhanças do ponto de descarga, pois esses tem particionamento preferencial para a matéria particulada presente no ar (EARL et al., 2003).

2.1.1.2 – Bifenilas policloradas

Bifenilas policloradas (PCBs - do Inglês Polychlorinated Biphenyls), são compostos aromáticos clorados que podem ser sintetizados pela reação do grupo bifenila com cloro anidro na presença de catalisador (PENTEADO e VAZ, 2001; FURUKAWA, 2000). A Figura.2.4 apresenta a estrutura da bifenila, mostrando as possíveis substituições por átomos de cloro que vão desde 1 até 10 átomos do halogênio. Essas substituições podem gerar até 209 estruturas diferentes que são denominadas congêneres. A Tabela 2.1 apresenta o número de congêneres possíveis em função do número de átomos de cloro na molécula de PCB.

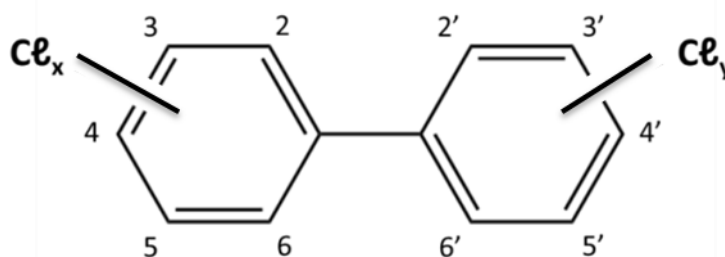


FIGURA 2.4: Estrutura representativa das bifenilas policloradas.

TABELA 2.1: Congêneres de PCBs, número de isômeros e massa molecular (Fonte: PENTEADO e VAZ, 2001).

Bifenila	Nº de isômeros	Massa molecular
Monocloro	3	188,7
Dicloro	12	223,1
Tricloro	24	257,5
Tetracloro	42	292,0
Pentacloro	46	326,4
Hexacloro	42	360,9
Heptacloro	24	395,3
Octacloro	12	429,8
Nonacloro	3	464,2
Decacloro	1	498,7
Total	209	

A Figura 2.4 apresenta, ainda, uma numeração conforme recomendação da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), usada para a nomenclatura dos congêneres, onde o anel da esquerda apresenta numeração no sentido anti-horário, enquanto que o anel da direita apresenta numeração no sentido horário adicionada de apóstrofo. Essa numeração inicia-se na posição da ligação entre os anéis com o número 1 e segue até o número 6 (PENTEADO e VAZ, 2001).

Bifenilas policloradas foram sintetizadas pela primeira vez em 1881, mas a aplicação industrial dessa descoberta se deu em torno de 50 anos depois pela Swan Corporation. Esses compostos foram introduzidos no mercado para uso como óleo não inflamáveis para transformadores e capacitores elétricos. Foram usados ainda como fluídos hidráulicos, resina plastificante, sistema de transferência de calor, plastificante para borracha, como extensor de pesticidas entre outros. A importância comercial desse produto na década de 30 se deve a características únicas dessas substâncias como estabilidade química e estabilidade térmica. Num tempo marcado por falhas em transformadores elétricos com conseqüente incêndio do óleo mineral derivado de petróleo usado como isolante térmico, as misturas de PCBs não inflamáveis e resistentes ao calor, logo ganharam grande aceitação. As misturas comercializadas eram formadas por apenas 130 dos 209 congêneres possíveis e foram vendidas com diferentes nomes dependendo do país de origem, conforme apresentado na Tabela.2.2. A Monsanto foi o principal produtor mundial, comercializando o produto no Brasil sob o nome Ascarel e Aroclor.

TABELA 2.2: Marcas das misturas de PCBs comercializadas em diversos países (Fonte: MMA, 2012a).

Marca	Fabricante	País
Aroclor	Monsanto	Estados Unidos
Chlorextol	Allis-Chalmers	Estados Unidos
Clophen	Bayer	Alemanha
Dykanol	Federal Pacific Electric Co.	Estados Unidos
Fenclor	Caffaro S.P.A	Itália
Kanechlor	Kanegafuchi	Japão
Inerteen	Westinghouse	Estados Unidos
NoFlamol	Wagner Electric Corp	Estados Unidos
Phenoclor	Prodelec	França
Pyralene	Prodelec	França
Pyranol	General Electric	Estados Unidos
Santotherm	Mitsubibishi/Monsanto	Japão

Entre os anos de 1930 a 1970 esses produtos à base de PCBs foram produzidos e aplicados de forma não controlada até que, em 1966, foram finalmente reconhecidos como contaminantes ambientais devido à detecção em peixes e pássaros. Seu pico de produção, no entanto, se deu em 1970 com 50.000 toneladas, sendo a maior parte consumida pela indústria eletro-eletrônica. No final de 1971 a contaminação do meio ambiente e da vida selvagem se tornou evidente, e essa classe de compostos clorados aromáticos já era um dos poluentes mais abundantes no ecossistema. Em 1978 começam a surgir as primeira leis restringindo o uso desses compostos, até que em 1983 foi publicada uma lei federal proibindo o uso de PCBs em todo o território americano a partir de 1988 (PENTEADO e VAZ, 2001; ROBARDS, 1990).

Todo produto a base de PCBs comercializado no Brasil foram importados dos Estados Unidos e Alemanha, não sendo produzido em território nacional. Em 1981 surgiu a primeira lei proibindo uso e comercialização desse tipo de produto em território nacional. Essa lei conhecida como Portaria Interministerial (MIC/MI/MME) 0019, também estabeleceu que transformadores que faziam uso desse tipo de produto poderiam continuar em funcionamento, mas no caso da necessidade de manutenção, o fluído isolante deveria, então, ser substituído por outro livre de PCB, sendo que o primeiro deveria ter um descarte apropriado. Em 1986 surgiu a Instrução Normativa Sema STC/CRS-001 que estabeleceu

procedimentos para manuseio, primeiros socorros, transporte e armazenamento de materiais contendo PCBs. Em 1987 houve o estabelecimento da Norma ABNT/NBR-8371, que veio para ampliar a Instrução Normativa SEMA. Essa norma foi, ainda, revisada em 1997 e no ano de 2005 (MMA, 2012a). Obedecendo a critérios estabelecidos pela Convenção de Estocolmo de 2001, da qual o Brasil passou a fazer parte em 2004, em 2012 foi publicado o Guia para o Inventário Nacional de PCB destinado a direcionar detentores e usuários de aplicações elétricas, incluindo equipamentos elétricos, produtos e resíduos usados ou gerados por estes que possam conter bifenilas policloradas. Esse guia teve por objetivo mapear a existência de equipamentos e resíduos de PCBs (provenientes do uso de equipamentos elétricos) e acompanhar o ciclo de vida dos mesmos até seu tratamento final como resíduo. Ao elaborar esse inventário o Brasil assumiu o compromisso internacional da retirada de uso de PCBs até 2025 e a sua completa destruição até 2028 (MMA, 2012b).

Bifenilas policloradas apresentam vários tipos de toxicidade aguda. A DL_{50} oral varia de 2 a 10 g/Kg. O primeiro relato de envenenamento por PCBs ocorreu no ano de 1968 na cidade de Yusho, capital da ilha de Kyusho, no Japão. Os indivíduos afetados apresentaram sintomas como cloroacne, hiperqueratose, bronquite, edema e entorpecimento dos membros. Seus filhos também apresentaram os mesmos sintomas indicando que PCBs podem cruzar a membrana da placenta. Apesar de preocupante, no entanto, os níveis ambientais de PCBs não devem oferecer risco de intoxicação do tipo aguda. Por outro lado, a possibilidade de intoxicação do tipo crônica por meio da biocumulação tem sido demonstrada para frangos de corte com diminuição do crescimento. Contudo, a preocupação em relação à acumulação desse tipo de composto por humanos é ainda maior, já que a possibilidade de mutação genética tem sido também relatada (ROBARDS, 1990; LUDEWIG e ROBERTSON, 2013).

O potencial tóxico dos PCBs depende principalmente da sua estrutura espacial. Maior toxicidade é atribuída à estruturas coplanares que não apresentam átomos de cloro nas posições *orto* em ambos os anéis. Esses compostos induzem efeito tóxico de forma similar em mamíferos e pássaros, tais como hepatotoxicidade, imonotoxicidade e toxidade reprodutiva. Estruturas coplanares tais como aquelas apresentadas pelos compostos PCB 77, PCB 126 e PCB 169 (Figura 2.5) agem, em parte, por um mecanismo iniciado pela ligação ao receptor citosólico hidrocarboneto

de arilo, semelhante ao que ocorre para a dioxina mais tóxica conhecida, a 2,3,7,8-TCDD (PENTEADO e VAZ, 2001; EISLER, R. e BELISLE, 1996).

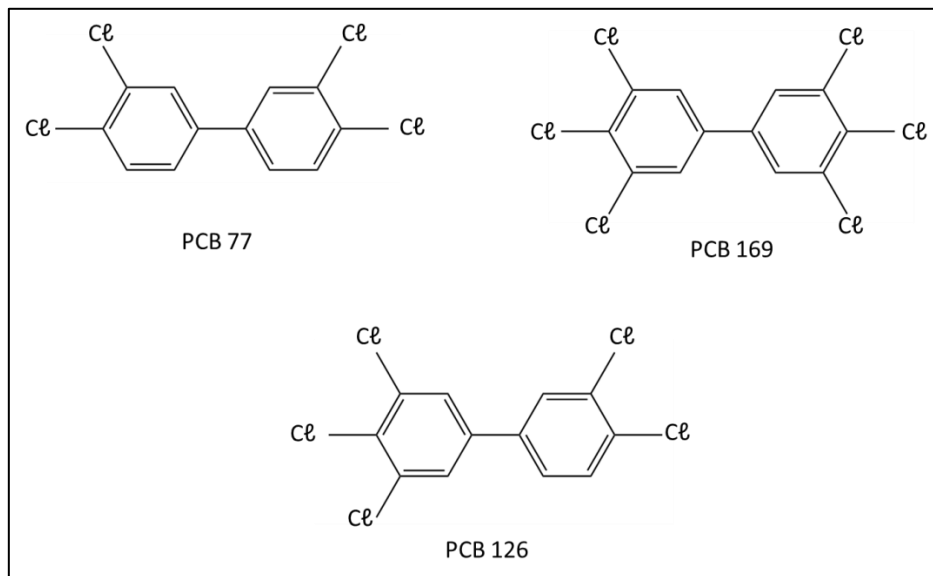


FIGURA 2.5: Estruturas de bifenilas policloradas coplanares.

Bifenilas policloradas podem ser metabolizadas no organismo via família da citocromo P-450, como mostrado na Figura.2.6. Essa metabolização de PCBs gera PCBs hidroxilados, PCB-quinonas, além de espécies reativas de oxigênio (ERO). Bifenila policloradas ou seus metabólitos podem se ligar covalentemente ao DNA formando adutos. As espécies reativas de oxigênio formadas durante a metabolização de PCBs, podem reagir e danificar o DNA. Esse é o primeiro passo para a ocorrência de uma mutação cromossômica ou mutação gênica. Compostos reativos, intermediários ou EROs também podem danificar proteínas relacionadas ao DNA, como topoisomerasas, tubulina, etc. O resultado pode ser quebras na fita de DNA e erros na distribuição dos cromossomos durante a mitose. Alterações na regulação gênica de tais proteínas, por exemplo, da telomerase, também pode resultar em alterações no DNA. Essas mutações no gene, no cromossomo e no genoma podem resultar na formação de uma célula iniciada, o primeiro passo na carcinogênese (LUDEWIG, G. e ROBERTSON, 2013).

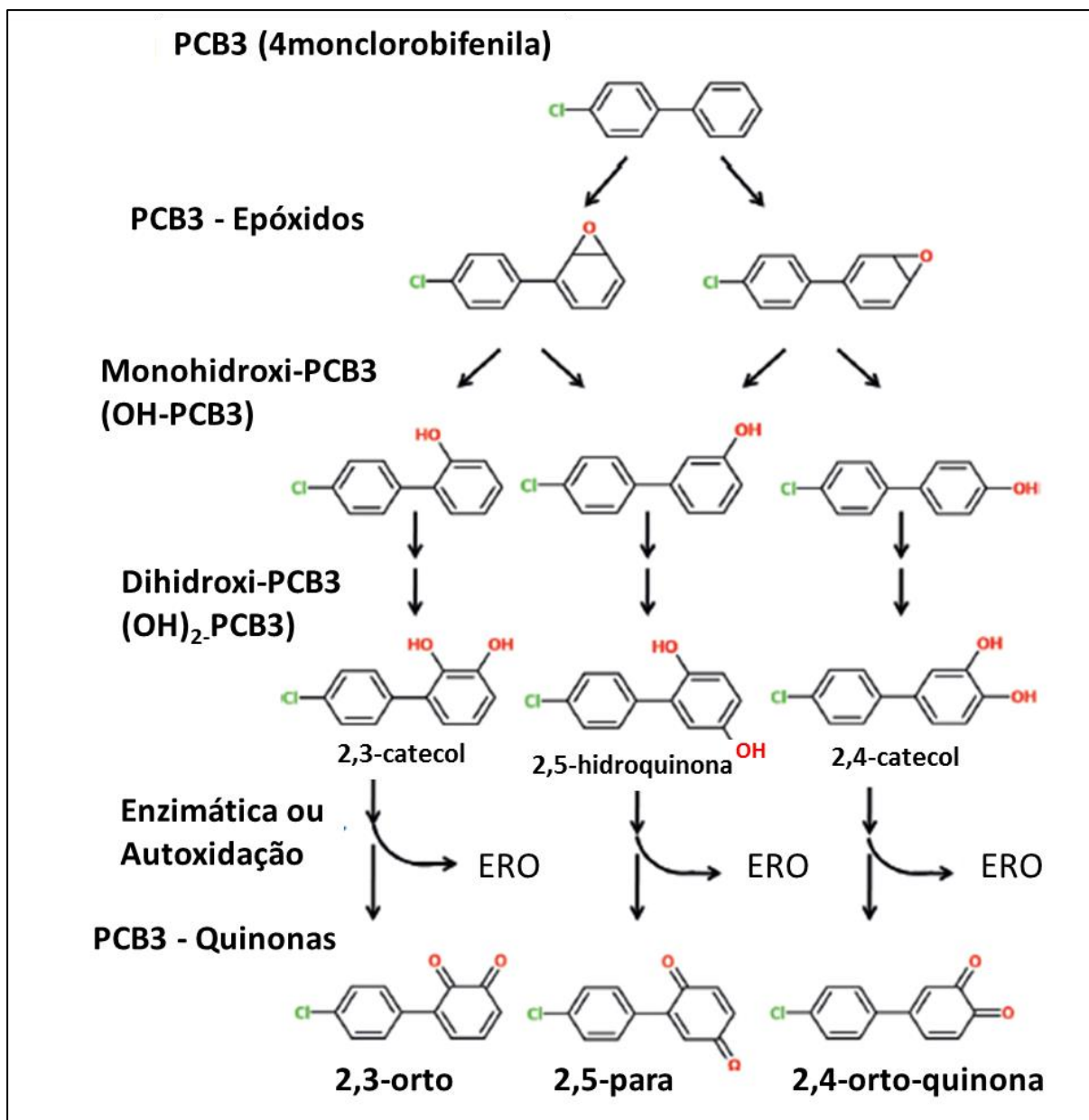


FIGURA 2.6: Mecanismo de biotransformação de PCBs (Fonte: Adaptado de LUDEWIG, G. e ROBERTSON, 2013).

Os PCBs foram identificados em diversas amostras ambientais. Esses compostos sempre estão presentes como misturas complexas de isômeros e congêneres. Geralmente em áreas de indústria e aterros com altos níveis de contaminação por PCBs, há uma maior concentração desses compostos em vários extratos ambientais. Outros locais sem histórico de contaminação a quantidade de resíduo cai drasticamente. No entanto, a maior preocupação em relação a esses contaminantes está relacionada a sua estabilidade química e propensão a bioconcentração em níveis tróficos superiores da cadeia alimentar, o que tem sido comprovado apropriadamente no ecossistema norte-americano dos Grandes Lagos.

Nesses locais, tem sido demonstrado que PCBs foram biomagnificados 12,9 vezes do plâncton para os peixes (EISLER, R. e BELISLE, 1996; SAFE, 1994).

Bifenilas policloradas individuais apresentam diferentes propriedades físico-químicas que influenciam as suas taxas de particionamento, a captação e retenção em matrizes ambientais, e as suas taxas de distribuição por diversas vias ambientais. O resultado dessa diferenciação entre os vários congêneres é a diferenciação da composição em PCBs do Aroclor comercial, fonte de contaminação, da distribuição de congêneres em amostras biológicas. Por exemplo, alguns compostos, como 2,4,4',5-tetraclorobifenil, estão presentes em concentrações relativamente altas no leite humano (3,7 para 11% do total de PCBs), mas é um dos componentes menores (0,03%) do Aroclor 1260. Outros congêneres, como 2,2',3,3',4,5,6'-heptaPCB e 2,2',3,4,5,5',6'-heptaPCB, são os principais componentes do Aroclor 1260 (5,5 e 4,1% do total de PCBs, respectivamente), mas são componentes traço do extrato de leite humano (<0,4% a não detectável para ambos os compostos). Comportamento como esse, tornam esses compostos potencialmente ainda mais perigosos, já que podem influenciar na seleção de compostos cuja toxicidade individual é maior do que a toxicidade apresentada pela mistura (EISLER, R. e BELISLE, 1996; SAFE, 1994).

Uma ampla distribuição de PCBs tem sido documentada em vários sistemas biológicos em todo o mundo. A preocupação maior, no entanto, está focada em organismos aquáticos porque muitas fábricas que produziram e usaram PCBs localizavam-se em áreas ribeirinhas, estuarinas, costeiras e lacustres. De fato, a presença de congêneres tóxicos coplanar, PCB 77, 126, 169, tem sido demonstrado em vários trabalhos que tratam de organismos aquáticos (BOCIO et al., 2007; FOCARDI et al., 1995; BHAVSAR et al., 2007). A poluição aquática, no entanto, tem sido um problema a ser enfatizado e discutido, pois além de prejudicar esses ecossistemas também tem sido a rota primária de exposição humana e de animais domésticos a esses compostos devido ao consumo de peixes, entre outros, provenientes de águas contaminadas (EISLER, R. e BELISLE, 1996; SAFE, 1994; TANABE, 1988).

2.1.1.3 – Dioxinas

O termo “dioxina” é amplamente utilizado na literatura para se referir a classe de hidrocarbonetos aromáticos halogenados estrutural e quimicamente relacionados. Essa classe de compostos inclui dibenzodioxinas policloradas (PCDDs - *polychlorinated dibenzodioxins* - ou dioxinas) dibenzofuranos policlorados (PCDFs - *polychlorinated dibenzofurans* - ou furanos) e bifenilas policloradas coplanares também conhecidos como *dioxin-like* PCBs ou dl-PCBs. Tratam de compostos com estrutura quase planar, altamente tóxicos e persistentes no ambiente (DAVY, 2004; LACERDA e ROSE, 2016). Dioxinas e furanos podem ser substituídos de 1 até 8 átomos de cloro, formando um grande número de isômeros e congêneres. Para as dioxinas podem ser formados até 75 congêneres e para os furanos até 135 (ASSUNÇÃO e PESQUERO, 1999). A Figura 2.7 abaixo apresenta a estrutura genérica para esses compostos. Os números de 1 a 9 são especialmente utilizados na nomenclatura desses compostos.

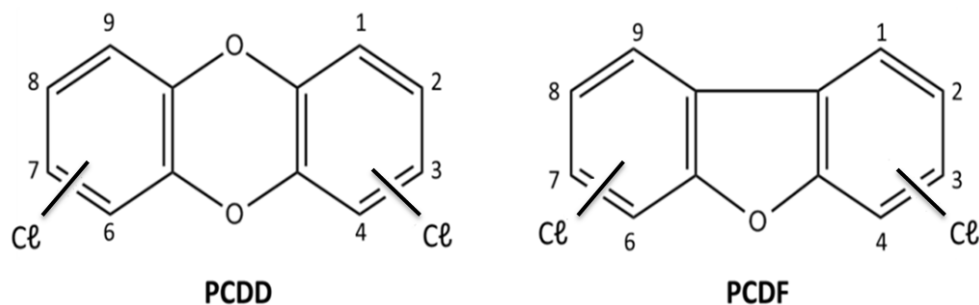


FIGURA 2.7: Estruturas das dibenzo-*p*-dioxinas policloradas (PCDD) e dibenzofuranos policlorados (PCDF).

A Tabela.2.3 mostra os isômeros e os congêneres das dioxinas e furanos.

TABELA 2.3: Congêneres e isômeros das dioxinas e furanos (Fonte: ASSUNÇÃO e PESQUERO, 1999).

Átomos de cloro	Isômeros das dioxinas	Isômeros dos furanos
1	2	4
2	10	16
3	14	28
4	22	38
5	14	28
6	10	16
7	2	4
8	1	1
Congêneres	75	135

Furanos e dioxinas são substâncias que se destacam entre os POPs devido a alta toxicidade apresentada. Os efeitos agudo e crônico dos congêneres com substituição nas posições 2,3,7 e 8 se sobressai entre os demais. A 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dibenzodioxina (2,3,7,8-TCDD), em especial, tem recebido maior atenção pública e científica por possuir a DL₅₀ mais baixa conhecida e ser, por isso, o produto químico mais tóxico já produzido pelo homem. São necessários apenas 0,6 µg/kg de peso corporal para matar porquinhos-da-índia machos. Os dibenzofuranos policlorados são apenas ligeiramente menos tóxicos; por exemplo, o DL₅₀ do 2,3,7,8-TCDF é de cerca de 6 µg/kg para porquinhos-da-índia machos (ASSUNÇÃO e PESQUERO, 1999; HITES, 2011).

Por ser o congêneres mais tóxico, a 2,3,7,8-TCDD serve para fins de cálculo de equivalente toxicológico. Para caracterizar a toxicidade relativa entre os vários compostos é adotada internacionalmente a Toxicidade Equivalente (TEQ), com o uso de Fatores de Toxicidade Equivalente (TEF - *Toxicity Equivalency Factors*). Os Fatores de Toxicidade Equivalentes são baseados em valores de toxicidade aguda de estudos *in vivo* e *in vitro*. Nesse caso, a 2,3,7,8-TCDD é tomada como valor 1 (um). Para o cálculo de toxicidade equivalente total em uma mistura, cada composto deve ter sua participação absoluta multiplicada pelo fator de equivalência, e as somas desses valores para todos os PCDD e PCDF presentes resultará na toxicidade relativa à 2,3,7,8-TCDD (ASSUNÇÃO e PESQUERO, 1999; MMA, 2013).

Atualmente, existem três conjunto de valores: o mais antigo são os TEFs estabelecidos pela NATO/CCMS *Working Group on Dioxins and Related Compounds as International Toxicity Equivalency Factors* (I-TEF), depois foram

estabelecidos os valores do Grupo de Trabalho da WHO/IPCS, que reavaliou os I-TEFs e estabeleceu um novo esquema. Em 2005 a WHO (Organização Mundial da Saúde) alterou alguns valores de TEFs. Os três esquemas estão mostrados na Tabela 2.4. (MMA, 2013).

TABELA 2.4: Fatores de equivalência de toxicidade (Fonte: Ministério do Meio Ambiente, 2013).

Composto	I-TEF (1988)	WHO-TEF 1998	WHO-TEF 2005
2,3,7,8-TetraCDD	1	1	1
1,2,3,7,8-PentaCDD	0,5	1	1
1,2,3,4,7,8-HexaCDD	0,1	0,1	0,1
1,2,3,6,7,8-HexaCDD	0,1	0,1	0,1
1,2,3,7,8,9-HexaCDD	0,1	0,1	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HeptaCDD	0,01	0,01	0,01
1,2,3,4,6,7,8,9-OctaCD	0,001	0,0001	0,0003
2,3,7,8-TetraCDF	0,1	0,1	0,1
1,2,3,7,8-PentaCDF	0,05	0,05	0,03
2,3,4,7,8-PentaCDF	0,5	0,5	0,3
1,2,3,4,7,8-HexaCDF	0,1	0,1	0,1
1,2,3,6,7,8-HexaCDF	0,1	0,1	0,1
1,2,3,7,8,9-HexaCDF	0,1	0,1	0,1
2,3,4,6,7,8-HexaCDF	0,1	0,1	0,1
1,2,3,4,6,7,8,HeptaCDF	0,01	0,01	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HeptaCDF	0,01	0,01	0,01
1,2,3,4,6,7,8,9-OctaCDF	0,001	0,0001	0,0003

Ao contrário das bifenilas policlorada, os PCDD/Fs nunca foram produzidos intencionalmente como produtos comercializáveis, exceto para a pesquisa e como padrões. As dioxinas caracterizam-se como subprodutos indesejados da indústria e processos de combustão. De fato, várias contaminações com dioxinas ocorreram a partir do século XX, como frutos de mudanças na indústria química que passou a utilizar a síntese orgânica como base para obtenção de produtos diferenciados. Nesse contexto, dioxinas são formadas em vários processos envolvendo cloro ou substâncias e/ou materiais que o contenham, como produção de pesticidas, fenóis clorados e branqueamento de papel e celulose. O exemplo mais clássico da presença não intencional de dioxinas em produtos industrializados foi a presença acidental de 2,3,7,8-TCDD em 2,4,5-triclorofenol (também conhecido como Dowicide 2), produzido pela reação de 1,2,4,5-tetraclorobenzeno com hidróxido de sódio (NaOH). A dimerização do fenol resultante produz pequenas

quantidades de 2,3,7,8-TCDD, que contaminam o produto fenólico clorado. Essa reação pode ser melhor entendida a partir da Figura 2.8. Embora as dioxinas estivessem presentes em baixos níveis em alguns produtos comerciais, seu uso difundido resultou na liberação de PCDD/Fs no meio ambiente em níveis que às vezes requeriam remediação (ASSUNÇÃO e PESQUERO, 1999; DAVY, 2004; HITES, 2011)

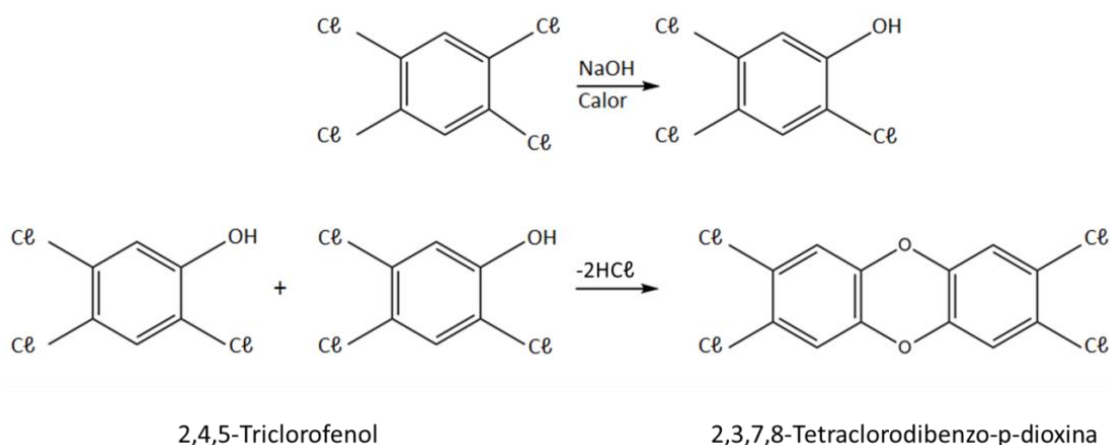


FIGURA 2.8: Produção de 2,3,7,8-TCDD, como contaminante na síntese do 2,4,5-triclorofenol (Fonte: adaptado de HITES, 2011).

Dioxinas veem sendo produzidas desde o advento do fogo. A partir da tomada de consciência da presença dessas substâncias em nosso meio tem se estabelecido que a combustão de material orgânico é também responsável pela inserção de dioxinas no meio ambiente, mesmo que a nível de traço. No entanto, em relação aos processos de combustão, a maior preocupação está voltada para incineradores de resíduos urbanos que, pela constante demanda, podem contribuir de forma significativa para o aumento desse tipo de poluentes no ambiente. Tem sido comprovado que a faixa de 250 a 400 °C caracteriza-se como uma faixa de temperatura ideal para a formação de dioxinas. Deste modo, o controle de temperatura de fornos de combustão de resíduos tem contribuído de forma significativa para a redução da emissão desse tipo de poluente (BUMB et al., 1980; ASSUNÇÃO e PESQUERO, 1999; DAVY, 2004). Esse fato tem sido comprovado por Hites (2011) ao analisar os diversos estratos de sedimento dos lagos Siskiwit e Great, usando métodos de datação radioisotópicas. Segundo esse autor, a deposição de dioxinas nesses lagos veio aumentando desde 1935 ocorrendo um

máximo em 1970 e, desde de então, iniciou-se um decréscimo, que tem se acentuado cada vez mais ao longo dos anos.

A exposição humana a PCDD/Fs pode ocorrer por contaminação de origem ambiental, acidental e ocupacional. A principal via de exposição, no entanto, é o alimento. Estima-se que mais de 90% da exposição humana ocorra através da dieta, sendo os alimentos de origem animal as fontes predominantes. A contaminação dos alimentos é causada principalmente pela deposição de várias fontes (por exemplo, incineração de resíduos, produção de produtos químicos, indústria metalúrgica) em terras agrícolas e uma acumulação subsequente na cadeia alimentar, na qual eles estão particularmente associados à gordura. Outras fontes podem incluir ração contaminada, aplicação inadequada de lodo de esgoto para adubação, inundação de pastagens e certos tipos de processamento de alimentos (LIEM et al., 2000).

Nas últimas décadas, vários acidentes foram relatados como causa da exposição excessiva de seres humanos a compostos relacionados com as dioxinas. Exemplos bem conhecidos são aqueles relatados para a cidade de Seveso na Itália e Times Beach nos EUA. O acidente de Seveso ocorreu em meados dos anos 70 numa fábrica de 2,4,5-triclorofenol a partir da reação de 1,2,4,5-tetraclorobenzeno com NaOH. Foi num sábado quando não havia ninguém na fábrica, havendo um superaquecimento dos reatores que não aguentaram a pressão e explodiram lançando uma nuvem tóxica na atmosfera. Amostras de solo analisadas, depois do acidente, acusaram a presença de 2,3,7,8-TCDD e logo crianças da localidade em torno da fábrica foram hospitalizadas com várias reações na pele. Mais de 730 pessoas foram evacuadas do local até a completa descontaminação do solo. Estima-se que cerca de 2 kg de 2,3,7,8-TCDD, foram lançados aos arredores da fábrica com a explosão (HITES, 2011).

Outro caso de exposição severa a dioxinas ocorreu em Times Beach no Estado do Missouri U.S.A, no final dos anos 60. Nesse caso, a contaminação dessa cidade se deu a partir de resíduos da produção de Hexaclorofenos pela Northeastern Pharmaceutical and Chemical Company (NEPACCO). Nesse tempo essa empresa resolveu descartar os resíduos a muito tempo acumulados contratando o serviço de Russell Bliss para a “reciclagem” do óleo. Bliss dirigia uma pequena empresa na qual ele coletava óleo usado em garagens, aeroportos e bases militares, e o levava de volta para um dos quatro tanques de 91.000 L em suas

instalações. Ele fez dinheiro pagando uma pequena taxa para coletar o óleo e ganhou uma grande soma ao vendê-lo para reprocessadores de petróleo ou por pulverizar o óleo para controle de poeira em estradas de terra ou em arenas de hipismo. Ao pulverizar o óleo contaminado em algumas dessas arenas observou-se o adoecimento e grande mortandade de cavalos que logo alertaram para o problema. No entanto, quando a verdadeira causa das mortes foi detectada, cerca de 38 locais no Missouri estavam contaminados por dioxinas, incluindo Times Beach. Por causa desse incidente a cidade teve que ser evacuada e todas as propriedades compradas pelo governo. Cerca de \$33.000.000 dolares foram gastos para a descontaminação desses locais (HITES, 2011).

Outra fonte importante de exposição humana a dioxinas, em especial a 2,3,7,8-TCDD, ocorreu na guerra do Vietnã, quando os EUA utilizaram o herbicida conhecido como Agente Laranja como defoliante para ganhar vantagem sob seus inimigos. O Agente Laranja consistia de uma mistura de n-butil ésteres de 24-D e 245-T, sintetizados a partir do 2,4,5-triclorofenol. Como resultado desse material de partida, o Agente Laranja estava contaminado com cerca de 3 ppm de 2,3,7,8-TCDD. Como um total de $4,5 \times 10^7$ litros de Agente Laranja foram pulverizado naquela região, estima-se que na ordem de 150 kg de 2,3,7,8-TCDD foram liberados no ambiente do sul do Vietnã (HITES, 2011).

Mais de 40 anos se passaram desde o fim da guerra do Vietnã, no entanto, estudos recentes apontam que as concentrações de dioxina permanecem elevadas tanto no meio ambiente como em humanos que residem perto de antigas bases da Força Aérea dos EUA no sul do país. Pesquisadores estão especialmente preocupados com efeitos adversos sobre a saúde infantil. Dioxinas tem sido relatadas como desreguladoras endócrinas o que pode levar a diversas deficiências na formação das crianças (Boda et al., 2018; Pham et al., 2015 Oanh, et al., 2018). Segundo Boda et al. (2018), níveis de 2,3,7,8-TCDD e TEQ-PCDD/Fs nas amostras de sangue de cordão umbilical de crianças vietnamitas estão altamente correlacionados com aqueles nas amostras de leite materno. Isso sugere que as dioxinas no leite materno refletem a exposição pré-natal a essa substância. O aumento da exposição pré-natal à dioxina esteve associado à diminuição do hormônio testosterona em meninas e meninos. Esse resultado tem preocupado os pesquisadores já que níveis desregulados de testosterona no período perinatal esta relacionado com desordens no desenvolvimento neurológico, tais como transtorno

do espectro autista e transtorno do desenvolvimento da linguagem. Pham et al. (2015) não encontraram desordens no desenvolvimento neurológico no grupo de crianças analisadas, mas mostraram que a exposição perinatal a dioxinas pode afetar o desenvolvimento socioemocional dessas crianças. Outros estudos tem ainda apontado que a exposição perinatal à dioxina se correlaciona com retardo de crescimento intrauterino e pós-natal, imunotoxicidade (maior suscetibilidade a doenças infecciosas), atraso sutil em desenvolvimento cognitivo e motor, desenvolvimento anormal do genital do feto e efeitos sobre o desenvolvimento reprodutivo posterior (OANH, et al., 2018; TOPPARI e JUUL, 2010; SATHYANARAYANA et al., 2017). Há ainda outro relato na literatura indicando que a alta exposição a 2,3,7,8-TCDD está associada a um desbalanço na proporção sexual de bebês nascidos entre os anos de 1977 a 1984, em Seveso na Itália. Segundo o estudo, nesse tempo a proporção de proles do sexo feminino foi muito maior do que a do sexo masculino, o que foi normalizado nos anos seguintes (MOCARELLI et al. 2006).

A princípio, o primeiro indicador de uma exposição do tipo aguda a dioxinas é o aparecimento de cloroacnes, que são erupções na pele que parecem acnes, mas são causadas por compostos aromáticos clorados. Nesse caso, o efeito do agente tóxico é fazer com que as células indiferenciadas se transformem em queratinócitos, que produzem queratina. Ocorre o desaparecimento das glândulas sebáceas e a formação de um comedão fechado, freqüentemente chamado de cistos de retenção (SUSKIND, 1985).

Exposição do tipo aguda ocorreram principalmente no que ficou conhecida como zona A em Seveso. A zona A representa a região com a concentração mais alta de TCDD por metro cúbico de solo, podendo chegar até 580 μg . A região pouco menos exposta a TCDD, menos de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{m}^{-3}$, ficou conhecida como região B. O aparecimento de cloroacne foi prontamente observado principalmente para a região A, em Seveso. No entanto, na região B, foi observado de 1977 a 1986 um aumento do número de casos de canceres, o que representa outro risco para a exposição a dioxinas (BERTAZZI et al., 1993).

Promoção de tumores, queratinização, perda de massa corporal, imonotoxicidade, toxicidade reprodutiva e/ou teratogenicidade entre outros efeitos biológicos em seres vivos, são mediados através do receptor aril-hidrocarboneto (AhR), que se trata de uma porção de uma proteína receptora citosolica presente em

tecidos de animais. Dioxinas se ligam de forma eficiente a esse receptor devido a sua estrutura peculiar. Trata-se de substâncias com conformação quase planar. Outros compostos aromáticos clorados como PCBs com estrutura semelhante a dioxinas também podem se ligar a esse tipo de receptor o que torna essas substâncias tão perigosas quanto as dioxinas. Uma vez ligado a esse receptor, esses compostos são capazes inclusive de chegar até o núcleo da célula e ligar-se ao DNA (POLAND e KNUTSON, 1982; SAFE, 1987).

É evidente que todos esses efeitos adversos sobre a saúde humana tem alertado as autoridades para a identificação de dioxinas no meio ambiente e eliminação da sua produção. Essa substância, inclusive, tem sido citada na Convenção de Estocolmo de 2001 como uma das “dirty dozen” (duzia suja), com a qual os países signatário devem se preocupar. Países europeus tem se preocupado em legislar sobre limites desse tipo de composto em alimentos e ambientes de trabalho, procurando evitar ao máximo a exposição das pessoas a essas substâncias. Em países em desenvolvimento, no entanto, poucos dados existem sobre fontes e destinação das dioxinas, furanos e PCBs. Os dados são ainda mais escassos quando se trata de alimentos (DAVY, 2004; LACERDA e ROSE, 2016). O Brasil publicou recentemente seu inventário de fontes de dioxinas e furanos, mas esse inventário não trás dados para alimentos. Trata-se de um relatório que divide em dez categorias as fontes emissoras de PCDD/Fs, identificando a categoria 2 (Produção de Metais Ferrosos e Não-Ferrosos) e categoria 6 (Processos de Queima ao Ar Livre) como as principais responsáveis por emissões desse tipo de substância no Brasil, chegando a um total de 61% das emissões. A região sudeste foi identificada como a principal emissora desses poluentes, devido a maior industrialização e também, devido a um maior número de dados encontrados para essa região que possui um maior monitoramento por ser também um importante centro de ciência e tecnologia do país. O próprio inventário deixa claro que não existe um monitoramento adequado para as fontes emissoras no país que possam gerar dados mais completos e confiáveis (MMA, 2013). A única legislação vigente no Brasil para controle de emissão trata-se de uma resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente CONAMA nº 316/2002, que limita a emissão de PCDD/Fs em efluentes gasosos provenientes de incineradores de resíduos sólidos a $0,50 \text{ ng.N}^{-1}\text{m}^{-3}$.

2.1.2 - Biodegradação e biorremediação

A tecnologia de biorremediação utiliza organismos vivos para reduzir, eliminar, conter ou transformar contaminantes presentes em solos, sedimentos, água e ar. A biorremediação pode ser conhecida também como biorregulação e biorrestauração. Nesse processo os resíduos orgânicos são imobilizados ou mesmo biologicamente degradados sob condições controladas. Como se trata de uma degradação biológica, esse processo é, então, conhecido como biodegradação. O princípio desta técnica é remover os poluentes do ambiente natural por assimilação e/ou converter os poluentes em um produto menos nocivo (biotransformação). Quando compostos orgânicos complexos são transformados em compostos inorgânicos simples ou em seus elementos constituintes o processo é denominado mineralização. O agente biológico mais comum a ser utilizado são micro-organismos, embora algumas espécies de plantas também possam ser usadas em processo de biorremediação. Quando micro-organismos são utilizados é comum o aproveitamento da comunidade microbiológica natural do próprio ambiente contaminado. Nesse caso, as estratégias de biorremediação são desenvolvidas para promover o metabolismo microbiano dos contaminantes envolvidos, ajustando-se o suprimento de água, ar e nutrientes (tais como N/P/K). Esse processo é chamado de bioestimulação. Muitas vezes o processo de biorremediação pode ser melhorado pela adição de micro-organismos, que possuem capacidade de biodegradação conhecida para aquele poluente. Esse processo é conhecido como bioaugmentação. (BAMFORTH e SINGLETON, 2005; ADAMS et al., 2015)

A biorremediação envolve a produção de energia por meio de uma reação redox dentro das células microbianas. Para tornar possível o processo de biorremediação um sistema que contenha um ou mais dos seguintes itens é geralmente necessário: uma fonte de energia (doador de elétrons), um receptor de elétrons e nutrientes. Diferentes tipos de receptores de elétrons pertencentes à célula de micro-organismos podem estar envolvidos na biorremediação, como redução de oxigênio, nitrato, manganês, ferro (III), sulfato ou dióxido de carbono. O potencial redox fornece uma indicação da dominância relativa das classes de aceptores de elétrons (ADAMS et al., 2015).

O processo de remoção de poluentes depende principalmente da natureza do poluente, que pode incluir: agroquímicos, compostos clorados, corantes,

gases de efeito estufa, metais pesados, hidrocarbonetos, resíduos nucleares, plásticos e esgotos. Levando em consideração o local de aplicação, as técnicas de biorremediação podem ser categorizadas como: *ex situ* ou *in situ*. A natureza do poluente, profundidade e grau de poluição, tipo de ambiente, localização, custo e políticas ambientais são alguns dos critérios de seleção que são considerados na escolha de qualquer técnica de biorremediação. Além dos critérios de seleção dos processos de biorremediação, critérios de desempenho que determinam o sucesso desse processo, tais como concentração de oxigênio e nutrientes, temperatura, pH e outros fatores abiótico, também recebem consideração importante antes do projeto de biorremediação (AZUBUIKE et al., 2016).

Quando plantas são utilizadas para fins de biorremediação esse processo passa a ser chamado de fitorremediação. A fitorremediação é definida como o uso de plantas para extrair, sequestrar ou desintoxicar poluentes. Dependendo do tipo de poluente, se elementar ou orgânico, existem diferentes mecanismos envolvidos na fitorremediação. Como os elementos são imutáveis, as estratégias de fitorremediação para poluentes de radionuclídeos e metais pesados concentram-se na hiperacumulação acima do solo. Em contraste, os poluentes orgânicos podem potencialmente ser completamente mineralizados pelas plantas. Embora enzimas presentes em vegetais possam estabelecer a degradação de poluentes durante a fitorremediação, uma contribuição importante é atribuída a micróbios presentes na rizosfera de plantas durante esse processo. Esta contribuição da população rizomicrobiana é referida como rizorremediação. Em alguns casos, os micróbios da rizosfera são mesmo os principais contribuintes para o processo de degradação (MEAGHER, 2000; KUIPER et al., 2004).

Apesar de muitos métodos físico-químicos terem sido desenvolvidos nos últimos anos para tratar poluentes (LUKES e LOCKE; 2005; PIGNATELLO et al., 2006; BABUPONNUSAMI e MUTHUKUMAR, 2013; OTURAN, M. A. e AARON, 2014; CAGNETTA et al. 2016) esse tipo de abordagem, em muitos casos, são caras, não específicas ou têm potencial de introduzir contaminação secundária. Como resultado, tem havido um interesse crescente em tratamentos biológicos ecologicamente corretos. Nesse caso, a biorremediação é frequentemente considerada um método econômico e menos prejudicial ao meio ambiente, e tem sido, portanto, cada vez mais valorizada na aplicação para limpeza ambiental (SINGH et al., 2008).

Processos de biorremediação para POPs costumam envolver dois tipos de micro-organismos específicos: fungos e bactérias. Fungos lignolíticos são amplamente citados na literatura como tendo propriedade de degradação de HPAs, PCBs e dioxinas, por meio de enzimas como lignina peroxidase e peroxidase de manganês (KUBATOVA et al., 2001; KAMEI et al., 2005; HARITASH e KAUSHIK, 2009; WANG et al. 2009; MORI et al., 2015). No entanto, isolados microbianos de ambientes contaminados mostram que as bactérias são agentes ativamente envolvidos na degradação desse tipo de poluente. O primeiro relato da degradação de PCBs por bactérias foi feito por Ahmed e Focht em 1973. Esses pesquisadores isolaram duas espécies de *Achromobacter* ssp. provenientes de esgoto. A primeira foi isolada pelo enriquecimento do meio de cultura com bifenila e a segunda pelo enriquecimento com 4-clorobifenil. Eles mostraram que essas linhagens poderiam degradar vários congêneres de PCBs, por diferentes vias metabólicas. Utilizando técnicas espectroscópicas e espectrometrias esses pesquisadores mostraram que a degradação do anel aromático não substituído foi preferida, que não ocorreu de cloração e que isso levou a um acúmulo do metabolito ácido clorobenzoico.

Desde 1973 até os dias atuais vários trabalhos tem destacado a importância de diversos gêneros de bactérias na metabolização de POPs. A Tabela 2.5 abaixo trás as principais bactérias citadas na literatura, em ordem cronológica, com capacidade de biodegradar HPAs, PCBs e dioxinas.

TABELA 2.5: Bactérias utilizadas em trabalhos de biodegradação de POPs.

Bactéria	POPs	Concentração	Tempo	Degradação (%)	Referências
<i>Pseudomonas testosterone</i>	2,3,7,8-TCDD	0,3 ppm	238 d	NM*	PHILIPPI et al., 1982
<i>Corynebacterium</i> sp.	2,4,4'-CB	5 uM	24 h	95	BEDARD et al., 1986
	3,4,2'-CB			98	
	2,3,2',3'-CB			92	
<i>Erwinia</i> sp.	2,7-DCDD	2 ppm	24 h	27,6	LIAW e SRINIVASAN, 1990
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	2,3-CB	0,3%	24h	100	GIBSON et al., 1993
	2,4'-CB			100	
	2,5,4'-CB			100	
	2,3,2',3'-CB			81	
<i>Sphingomonas</i> sp.	1-CDD	250 uM	16 h	60,8	WILKES et al., 1996
	2,3-DCDD			28,4	
	4-CDF			100	
	2,8-DCDF			84,8	

TABELA 2.5: (continuação)

Bactéria	POPs	Concentração	Tempo	Degradação (%)	Referências
<i>Pseudomonas cepacza.</i>	B[a]P B[a]A Cor	5 mg/mL	63 d	20-30 20-30 65-70	JUHASZ, et al., 1996
<i>Burkholderia sp.</i>	2-CDD 2-CDF	0.1 mg/L 0,3 mg/L	24 h	95 100	PARSONS et al., 1998
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Pir, Flua, B[a]A B[a]P D[a,h]A Cor	20-250 mg/L	42 d	98 45 26 22 22 55	JUHASZ et al., 2000
<i>Pseudomonas sp.</i>	2,4,4'-CB 2,2',5-CB 2,2',5,5'-CB 2,2',5,6'-CB 2,2',4,5'-CB	20-100 ug/mL	21 d	95 100 85 95 45	KOMANCOV Á et al., 2003
<i>Sphingomonas wittichii</i>	1,2,3-TrCDD 1,2,3,4,7,8-HxCDD	50 ug/mL	120 h	23 10,2	NAM et al., 2006
<i>Enterobacter sp. e Pseudomonas sp.</i>	Aroclor 1242	100 ppm	12 d	69-86	ADEBUSOY E et al, 2008
<i>Rhodococcus sp.</i>	2-CDF	100 mg/L	90 h	70	PENG et al., 2013
<i>Bacillus sp., Delftia sp., Clostridium sp., Geobacillus sp., Methanobacterium formicium, e Bacillus acidicola sp.(consórcio)</i>	Flu Fen Flua Pir	10 mg/kg	125 d	90 90 80 70	LI et al., 2015
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	3,3',4,4'- CB	250 ug/L	12 d	90	WANG et al., 2016
<i>Microbacterium sp.</i>	B[a]P	0.056 mM	10 d	84,2	QINA et al., 2017
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Pir	600 mg/L	200 d	100	JIANG et al. 2018

Legenda para as siglas: *NM – não mencionado; CDD – clorodibenzo-*p*-dioxina; TCDD – tetraclorodibenzo-*p*-dioxina; DCDD – diclorodibenzo-*p*-dioxina; TrCDD – triclorodibenzo-*p*-dioxina; HxCDD – Hexaclorodibenzo-*p*-dioxina; CDF – clorodibenzofurano; DCDF – diclorodibenzofurano; CB - clorobifenila; Flu – Fluoreno; Fen – fenantreno; Flua – Fluoranteno; Pir – pireno; Cor – Coroneno; B[a]A – dibenzo[a]antraceno; B[a]P – dibenzo[a]pireno; D[a,h]A – dibenzo[a,h]antraceno.

As cepas mencionadas na Tabela 2.5 são, em geral, bactérias isoladas de solo, lodo ou sedimento contaminado por POPs. Essas bactérias possuem capacidade excepcional de crescer em meio de cultura contendo bifenila, dibenzofurano, fenantreno entre outros aromáticos, como única fonte de carbono. Devido à capacidade de adaptação esses micro-organismos são agentes importantes na degradação de uma infinidade de compostos. A etapa inicial na

degradação de compostos aromáticos por via aeróbia é geralmente a introdução de dois grupos hidroxilas no anel benzênico formando um *cis*-hidroxidiol. As enzimas que catalisam a incorporação de átomos de oxigênio em substratos aromáticos são chamadas dioxigenases. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, bifenilas policloradas e dioxinas tem em comum a dependência de dioxigenases para iniciar o processo de biodegradação. A dioxigenação é uma das reações de oxigenação produzida por uma família de oxigenasse Rieske dependentes de ferro que não possuem grupos do tipo heme. Dependendo da estrutura dos substratos esse tipo de oxidação pode ser denominada de dioxigenação lateral/*cis*-dihidroxição, como no caso dos HPAs e bifenila, Figura 2.9 A, ou dioxigenação angular, como no caso das dioxinas e furanos, Figura.2.9 B (NOJIRI et al., 2001).

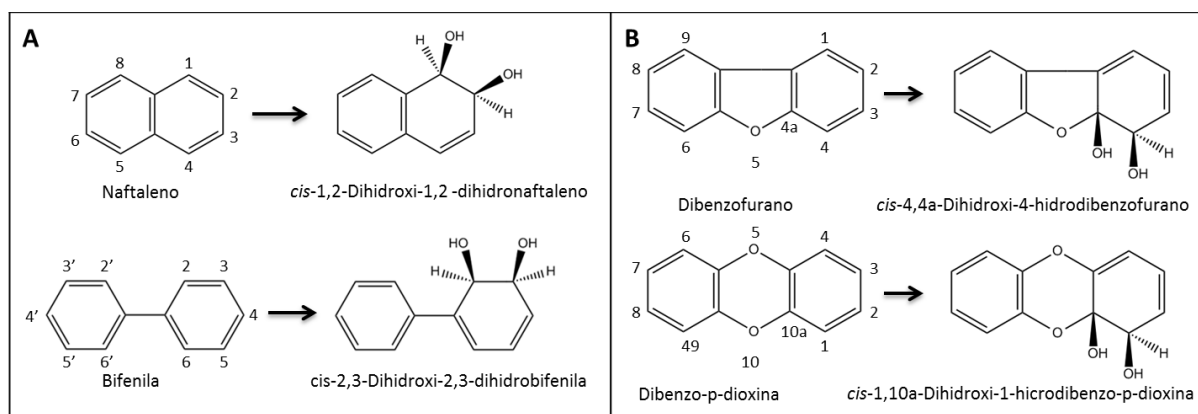


FIGURA 2.9: Dioxigenação lateral para o naftaleno e a bifenila (A) e dioxigenação angular para o dibenzofurano e a dibenzo-*p*-dioxina obtida a partir de enzimas do tipo dioxigenase (Fonte: adaptado de NOJIRI et al., 2001).

Depois da dioxigenação do anel ocorre espontaneamente a quebra na posição *meta* ou *orto* em relação às hidroxilas e uma série de outras reações leva a formação de moléculas simples como catecol, ácido benzoico e ácido salicílico clorados. Assim, a dihidroxigenação angular ou lateral seguida por desidrogenação do anel costuma ser o ponto crítico nas vias de degradação aeróbica de vários compostos aromáticos (NOJIRI et al., 2001). A Figura.2.10 apresenta a proposição do mecanismo de degradação para a 2-clorodibenzo-*p*-dioxina por via aeróbica até a formação das moléculas mais simples 4-clorocatecol e 4-cloroguaicol.

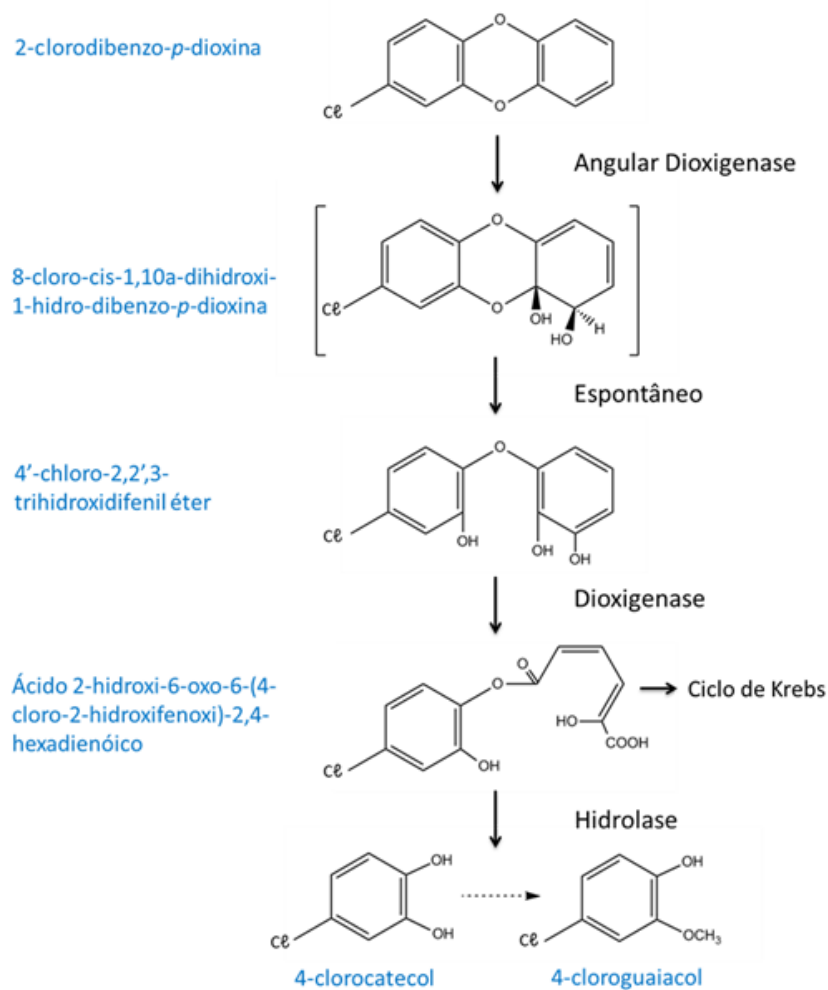


FIGURA 2.10: Mecanismo de biodegradação de 2-CDD por bactérias aeróbica (Fonte: adaptado de FIELD e SIERRA-ALVAREZ, 2008).

O mecanismo de degradação aeróbica para PCBs é muito semelhante ao da para a degradação de dioxinas e furanos. Como pode ser observado na Figura.2.11 esse processo também leva a um acúmulo de moléculas mais simples como ácido clorobenzoico no meio de cultura.

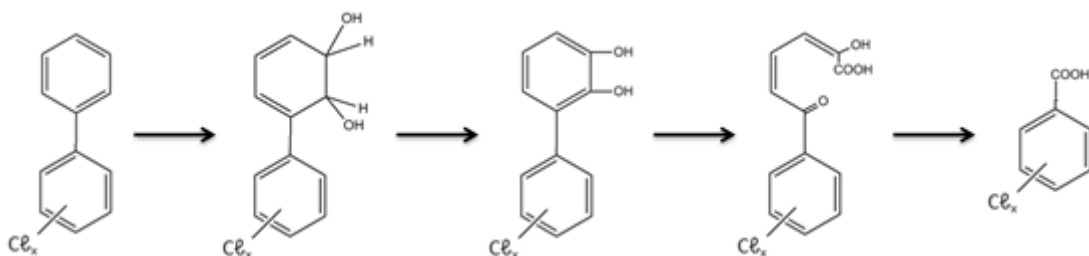


FIGURA 2.11: Mecanismo de biodegradação de PCBs por bactérias aeróbica (Fonte: adaptado de ABRAMOWICZ, 1990).

Em geral, a maioria das bactérias aeróbicas, no entanto, são capazes de degradar apenas congêneres de PCBs e dioxinas com pequeno nível de cloração

mono até tetrassubstituídos. É possível que níveis mais altos de cloração resultem em impedimento estérico as enzimas que atuam no processo de dioxigenação. Por outro lado, tanto PCBs quanto dioxinas altamente cloradas podem ser perfeitamente degradadas por sistemas anaeróbios. Este processo envolve bactérias que utilizam organo-haletos na respiração celular. Os substratos halogenados funcionam como aceptadores de elétrons sob condição anóxica. A energia gerada nesse processo envolve a síntese de ATP e atua como uma fonte de crescimento e metabolismo de bactérias de-halorespirantes. Bactérias anaeróbicas, presente em sedimentos fluviais e lacustres, removem cloro mesmo dos congêneres altamente clorados. Deste modo, os compostos levemente clorados formados por esse processo além de serem menos tóxicos podem ser perfeitamente aproveitados como substrato para biodegradação bacteriana aeróbica. Assim, esse dois sistemas biológicos caracterizam-se por serem processos complementares. Por tanto, um tratamento combinado utilizando os dois processos de forma sequencial, como mostrado na Figura 2.12, pode resultar em uma biorremediação muito eficiente para contaminação com POPs clorados, por resultar num tratamento muito mais completo (ABRAMOWICZ, 1990; FIELD e SIERRA-ALVAREZ, 2008; MURUGAN, K. E VASUDEVAN, 2018).

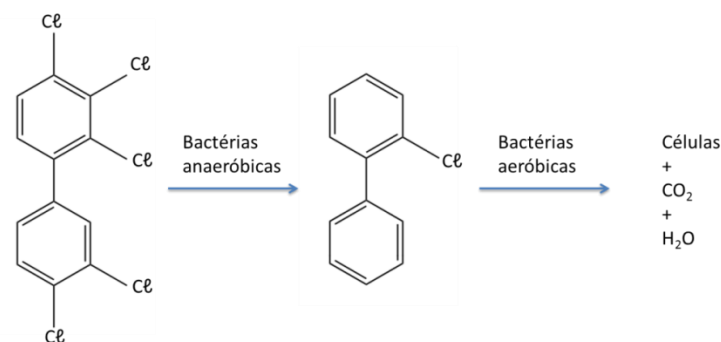


FIGURA 2.12: Processo anaeróbio/aeróbio combinado de dois passos para biodegradar PCBs (Fonte: adaptado de FIELD e SIERRA-ALVAREZ, 2008).

A Figura 2.13 mostra o mecanismo anaeróbico de biodegradação do composto 1,2,3,7,8-PeCDD por uma cultura pura de bactérias *Dehalococcoides* sp. As principais rotas estão marcadas com setas em negrito.

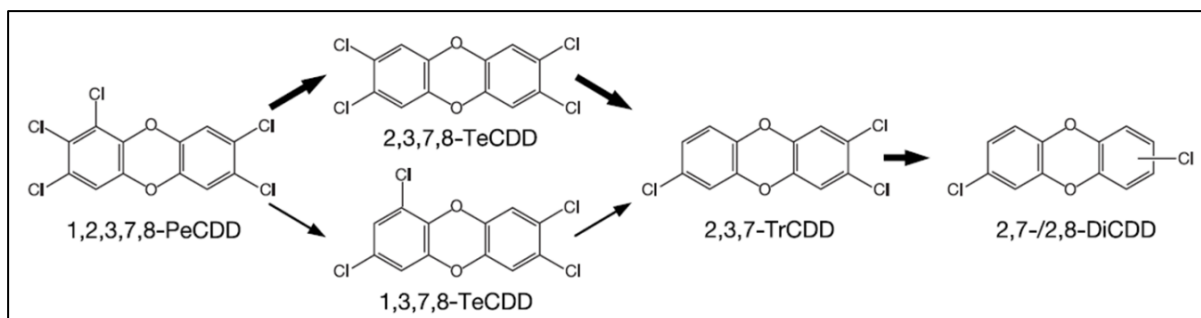


FIGURA 2.13: Mecanismo de biodegradação anaeróbia do composto 1,2,3,7,8-PeCDD por bactérias *Dehalococcoides* sp. (Fonte: adaptado de BUNGE et al., 2003).

Assim como para PCBs e dioxinas, a biodegradação de HPAs tem sido observada sob condições aeróbias e anaeróbias. No entanto, o processo mais comum utilizado tem sido a via aeróbia, visto que a biodegradação anaeróbia é um processo lento e seu processo bioquímico ainda não é completamente entendido. Os metabólitos intermediários comuns à via aeróbia são catecois, ácido protocatecóico e gentísicos (Figura 2.14). Esses metabólitos são, então, degradados por cinco vias similares, que incluem a clivagem do anel, para produzir ácidos succínico, fumárico, pirúvico e acético e acetaldeído, todos utilizados para a síntese de proteína celular e energia por micro-organismos com produção de dióxido de carbono e água (WILSON e JONES, 1993; HARITASH e KAUSHIK, 2009).

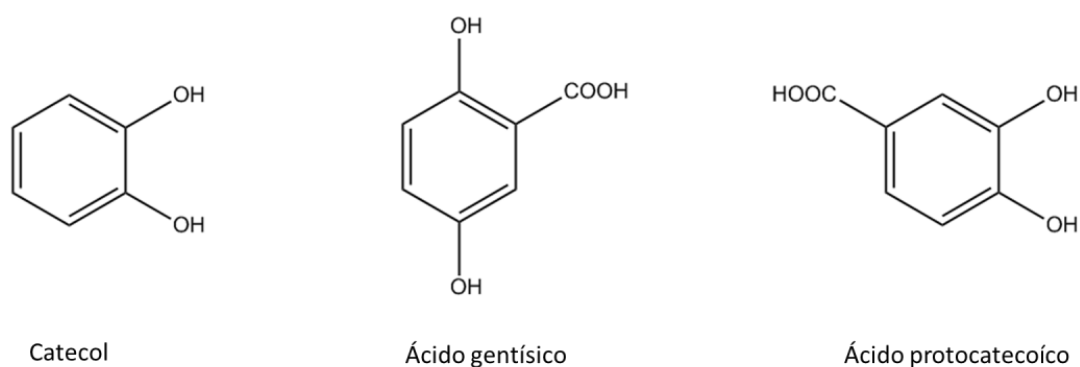


FIGURA 2.14: Metabólitos intermediários comuns para HPAs

2.1.3 - Simbiose entre micro-organismos e inseto praga

Insetos podem ocupar uma vasta gama de territórios, os quais podem ser grandemente limitados em nutrientes ou fornecer recursos alimentares não balanceados. Geralmente os insetos têm como fonte principal em sua alimentação

seiva de plantas, sangue de vertebrados ou mesmo materiais lenhosos. Algumas dessas dietas podem ser ricas em carboidratos, mas pobre em compostos nitrogenados. Para sobreviver com uma dieta restrita, os insetos se tornam altamente dependentes de sistemas simbióticos microbianos que fornecem nutrientes essenciais e/ou ajudam na digestão de certos alimentos. Estima-se que acima de 20% de todos os insetos vivem obrigatoriamente associados com micro-organismos simbiotes. Nesse caso, a dependência inseto/micro-organismo pode ser tão intensa a ponto de o primeiro sofrer atraso de crescimento, mortalidade e até esterilidade quando privado do simbiote, enquanto o segundo acaba não sobrevivendo sem o seu hospedeiro (KNOWLES, 2008; COOPER E DOBSON, 2007). Devido à importância de tais associações mutualísticas, muitas vezes hospedeiro e simbiote coevoluem para acomodar um ao outro. É o que ocorre, por exemplo, com pulgões e a bactéria *Buchnera aphidicola*. Enquanto o inseto evoluiu para produzir células especializadas ou órgãos para abrigar os simbiotes e facilitar a passagem desse de mãe para filho, o simbiote evoluiu para produzir mais aminoácidos ou outros nutrientes necessários ao hospedeiro (MORAN, 2006).

A proteção do hospedeiro contra inimigos naturais e o proporcionamento de vantagens nutricionais estão entre os principais benefícios da associação inseto/micro-organismo, no entanto, estudos mostram que as interações simbiote-hospedeiros podem ainda alterar até mesmo o modo de reprodução do inseto, induzindo o desenvolvimento de ovos não fertilizados, mudança de sexo ou provocando incompatibilidades espermatozóide-óvulo, podendo afetar inclusive na escolha do companheiro para o acasalamento (WERREN, 2012). Além disso, a resistência de insetos à inseticidas pode estar relacionada também a essa associação. Geralmente a resistência a inseticidas é adquirida de várias formas diferentes como alteração dos sítios-alvo de agroquímicos, aumento da regulação de enzimas degradantes, e valorização da excreção de inseticidas. Todas estas mudanças são atribuídas a mutações no genoma do inseto praga. No entanto, um caminho mais rápido para a aquisição de resistência a inseticidas tem sido comprovadamente atribuído ao enriquecimento de micro-organismos especializados na degradação dessas moléculas no meio ambiente devido ao abuso de inseticidas. Como esses micro-organismos podem ser adquiridos horizontalmente (do ambiente para o inseto), como é o caso da bactéria *Burkholderia* sp. em percevejos de feijão;

esses insetos passam a ser tolerantes a inseticidas, quando infectados pelos endossimbiontes (KIKUCHI, 2012).

A capacidade de degradação de inseticidas e outras substâncias por micro-organismos estão relacionada a sua capacidade de adaptação rápida. A exposição a uma determinada substância pode levar ao enriquecimento do meio com micro-organismos que possuem capacidade de degradação de uma molécula específica. Sendo assim, espera-se que os mesmos micro-organismos que ao estabelecer simbiose com insetos pragas podem levar a aquisição de resistência a inseticidas, poderão também, ser utilizados na remediação de recursos naturais contaminados por POPs, uma vez que ao adaptar-se para a degradação de pesticidas esses micro-organismos passam a possuir rotas metabólicas especializadas para compostos que não são comuns na natureza (xenobióticos). Deste modo, o trato gastrointestinal de insetos se configura como um microbioma importante a ser investigado buscando cepas microbianas com potencial para aplicações biotecnológicas como, por exemplo, em processos de biorremediação de áreas contaminadas.

2.1.4 - *Diabrotica speciosa*

A *Diabrotica speciosa* (Figura 2.15) mais conhecida como patriota ou vaquinha é um inseto de coloração verde no corpo com três manchas amarelas em cada élitro e cabeça avermelhada. Mede aproximadamente 6 mm e vive somente durante algumas semanas. Faz postura de forma aglomerada na parte subterrânea das plantas e o período de incubação dos ovos é de, aproximadamente, 13 dias. A larva apresenta forma cilíndrica com coloração esbranquiçada medindo cerca de 12 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro. Vivem no solo por aproximadamente 23 dias, depois constroem pupas onde ficam por mais 17 dias, quando eclodem os insetos adultos (GASSEN, 1989).

É um inseto que corre em quase todos os estados brasileiros causando danos a milho, soja, amendoim, batata (LAUMANN et al., 2003) girassol e algodão, podendo ocorrer também em uva e tabaco (ROBERTO et al., 2001; MORAES e KÖHLER, 2012). Os insetos adultos alimentam-se de folhas, brotos, frutos e pólen levando a desfolha das plantas. As larvas se alimentam das raízes podendo atacar a região de crescimento das raízes o que leva a morte de plantas recém-germinadas.

Quando atacam as raízes adventícias causam um crescimento irregular das plantas, que se tornam recurvadas. No milho esse fenômeno é conhecido como “pescoço de ganso” ou “milho ajoelhado” (GALLO et al. 2002 e LAUMANN et al., 2003). Plantas atacadas pela larva geralmente tem diminuição de peso, altura e, conseqüentemente, diminuição de produção (LAUMANN et al., 2003) .



FIGURA 2.15: Inseto praga *Diabrotica speciosa* (Fonte: adaptado de LAUMANN et al., 2003).

A espécie *Diabrotica speciosa* é uma praga especificamente brasileira, mas o gênero *Diabrotica* pode ser encontrado em outras regiões do mundo. Nos Estados Unidos, a espécie *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte é uma praga especializada na herbivoria de milho. Por anos esta praga foi controlada por rotação de cultura soja/milho, já que o inseto não poderia se alimentar de soja por não ser tolerante as defesas naturais dessa planta que conta com uma espécie de inibidor de cisteína protease. No entanto, com o passar do tempo essa prática levou a seleção de uma nova variante da praga que se tornou resistente à rotação de cultura. Comparações da microbiota intestinal entre o inseto resistente a rotação de cultura (RR-WCR) e o inseto selvagem (WT-WCR) revelaram mudanças concomitantes na estrutura da comunidade bacteriana com adaptação do hospedeiro às dietas de soja. A administração de antibióticos a espécie resistente tornou esse inseto susceptível a cisteína protease e impossibilitou a herbivoria desse vegetal, comprovando a dependência do inseto a microbiota para a adaptação a substâncias tóxicas (CHU et al., 2013).

Embora o potencial para a biodegradação de POPs por micro-organismos endofíticos seja bastante destacado na literatura, micro-organismos proveniente de insetos ainda são muito pouco utilizados (BARAC et al. 2004;

NEWMAN e REYNOLDS, 2005; RYAN et al., 2008; YOUSAF et al. 2011; ZHU et al., 2014) . Sabendo-se da importância da microbiota para a adaptação do gênero *Diabrotica* a substâncias tóxicas, a espécie brasileira configura-se como uma boa fonte de micro-organismos a ser estudada, pois ao estar amplamente distribuída em várias culturas diferentes, essa praga já começa a apresentar resistência a determinados inseticidas.

2.2 – Objetivos

2.2.1 - Objetivo geral

Desenvolvimento de um procedimento analítico para a investigação do potencial biotecnológico de microrganismos associados ao inseto *Diabrotica speciosa* na biodegradação de poluentes orgânicos persistentes.

2.2.2 - Objetivos específicos

- a) Cultivo de micro-organismos provenientes do inseto praga *Diabrotica speciosa* em meio líquido na presença de poluentes orgânicos persistentes selecionados;
- b) Desenvolvimento de técnicas de extração de POP's objetos de estudo;
- c) Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para análise de POP's;
- d) Avaliação de parametro cinético de biodegradação;
- e) Elaboração de propostas de aquisição de resistência pelo inseto como benefícios da simbiose inseto/micro-organismo.

2.3 - Procedimento Experimental

2.3.1 - Cultivo das bactérias

As bactérias utilizadas nesse trabalho foram obtidas por isolamento do inseto praga *Diabrotica speciosa* em duas épocas distintas, pelos alunos do Laboratório de Produtos Naturais Fabiana Aparecida Marques em 2012 (MARQUES,

2012) e Anderson Luigi Luiz em 2013 (LUIZ, 2013). As bactérias foram mantidas sob refrigeração a - 80 °C em um freezer vertical MDF-U56VC (Sanyo, Osaka, Japão) numa solução aquosa 25% glicerol (v/v). Após serem retiradas do freezer a -80 °C, as bactérias foram imediatamente estriadas em placas contendo Nutriente-Ágar e mantidas em B.O.D a 28 °C até o momento do preparo dos pré-inóculos. A preparação de novos preservados microbianos foi feita sempre por meio da utilização de 500 µL de uma cultura de bactérias com pelo menos 16 h de cultivo em incubadora Shaker e 500 µL de uma solução de glicerol a 50% (v/v). Um total de 14 cepas foram usadas nesse trabalho, sendo elas: *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas monteilii*, *Pseudomonas mosselii*, *Pseudomonas chlororaphis*, *Pseudomonas sp.*, *Sphingobacterium multivorum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Delftia acidovorans*, *Rhizobium radiobacter*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia gladioli*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella oxytoca* e *Empedobacter brevis*.

2.3.2 - Preparo do pré-inóculo e inoculação das bactérias

O pré-inóculo foi preparado pela transferência de uma colônia da placa contendo nutriente ágar para o meio caldo nutriente contido em erlenmeyer de 250 mL. A solução foi então agitada a 135 rpm por um período de aproximadamente de 16 h em incubadora shaker a 28 °C. A partir da determinação da densidade ótica desse pré-inóculo em um espectrofotômetro (700 Plus FEMTO) a 600 nm, utilizando-se cubetas de 1 cm, foram preparados inóculo na densidade requerida para cada experimento (MONOD, 1949). Os inóculos foram preparados em dois meios diferentes, um meio contendo basicamente sal conforme aquele usado por Fukuda et al. (2002), o qual é chamado meio salino (MS), Tabela 2.6 e um meio mais rico em nutrientes, YNB (Yeast Nitrogen Base), conforme pode ser visto na Tabela 2.7. Ambos os meio tiveram seu pH acertado para 7.

TABELA 2.6: Composição do meio salino.

Composição	Concentração	Composição	Concentração
Na ₂ HPO ₄	3,39 g.L ⁻¹	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g.L ⁻¹
KH ₂ PO ₄	1,5 g.L ⁻¹	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,5 g.L ⁻¹
NaCl	0,3 g.L ⁻¹	CaCl ₂	0,01 g.L ⁻¹
NH ₄ Cl	0,5 g.L ⁻¹	FeSO ₄	0,001 g.L ⁻¹

TABELA 2.7: Composição do meio Yeast Nitrogen Base.

Composição	Concentração	Composição	Concentração
Ácido p-aminobenzóico	200 µg L ⁻¹	Sulfato de magnésio	0,5 g L ⁻¹
Sulfato de amônio	5 g L ⁻¹	Sulfato de manganês	400 µg L ⁻¹
Biotina	2 µg L ⁻¹	DL-metionina	20 mg L ⁻¹
Ácido bórico	500 µg L ⁻¹	Niacina	400 µg L ⁻¹
Cloreto de cálcio	0,1 g L ⁻¹	Iodeto de potássio	100 µg L ⁻¹
Pantotenato de cálcio	400 µg L ⁻¹	Piridoxina	400 µg L ⁻¹
Sulfato de cobre	40 µg L ⁻¹	Riboflavina	200 µg L ⁻¹
Cloreto férrico	200 µg L ⁻¹	Cloreto de sódio	0,1 g L ⁻¹
Ácido fólico	2 µg L ⁻¹	Molibdato de sódio	200 µg L ⁻¹
L-histidina	10 mg L ⁻¹	Tiamina	400 µg L ⁻¹
Inositol	2 mg L ⁻¹	DL-triptofano	20 mg L ⁻¹
Sulfato de zinco	400 µg L ⁻¹	Fosfato de potássio monobásico	1 g L ⁻¹

2.3.3 - Determinação dos parâmetros de cultivo para o experimento de biodegradação

2.3.3.1 - Relação entre unidade formadora de colônia e densidade ótica

A concentração inicial de bactérias usada no trabalho de biodegradação foi estabelecida a partir de dados da literatura que apresentam a concentração de 10^8 UFC mL⁻¹ como sendo uma concentração adequada (KASEMODEL, 2012). Como a determinação de UFC é um processo lento, para facilitar o processo de inoculação procurou se estabelecer uma relação entre Unidade Formadora de Colônia (UFC) e Densidade Ótica (DO). Para isso, foi feita uma curva de crescimento em triplicata para a bactéria *S. multivorum*, onde foram realizadas medidas de UFC e a DO nos tempos de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11 e 13 h. Nesse caso, 1 mL do pré-inóculo foi inoculado em 100 mL de caldo nutriente contido em um frascos de 500 mL, o qual foi mantido sob agitação a 135 rpm, a uma temperatura de 28 °C, durante todo o tempo do experimento. Amostras de 1 mL de meio foram retiradas para a leitura da DO a 600 nm de tempos em tempos e 100 µL para o experimento de UFC. O experimento de Unidade Formadora de Colônia foi

feito pelo método de diluição seriada, onde 100 μL da suspensão microbiana foram adicionadas a 900 μL de solução salina. Dessa diluição (10^1) foram tomados 100 μL que foi adicionado a outro tubo contendo 900 μL de solução salina, levando a uma diluição de 10^2 e assim sucessivamente até se obter a melhor diluição para a contagem das colônias. De cada diluição foram retiradas alíquotas de 5 μL que foram transferidos para a placa contendo Nutriente Ágar conforme esquema (Figura 2.16). As placas foram incubadas em B.O.D. à 28 C e após um período de 24 h foi possível contar o número de colônias formadas.

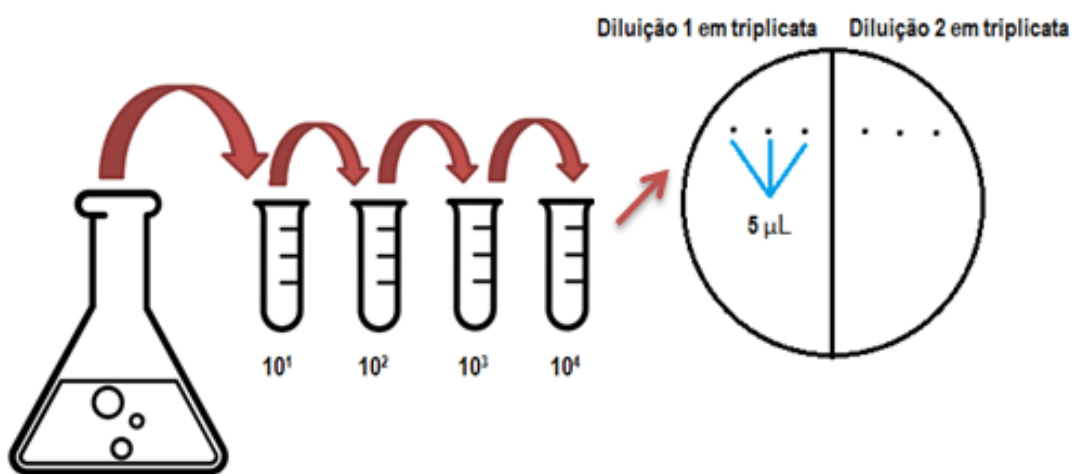


FIGURA 2.16: Esquema da diluição seriada para contagem de colônia viáveis.

2.3.3.2 -Teste do diâmetro do tubo a ser usado no experimento de biodegradação

Para os experimentos de biodegradação as bactérias foram inoculadas em tubos de vidro contendo meio salino. Para isso foi necessário saber qual o diâmetro do tubo era mais apropriado entre: 18 e 25 mm. Ambos os tubos foram avaliados construindo-se uma curva de crescimento com medida de Densidade Ótica por unidade de tempo para a bactéria *Sphingobacterium multivorum*. Primeiramente preparou-se um pré-inoculo da bactéria em caldo nutriente. Depois de 16 h inoculou-se essa bactéria na densidade ótica de 0,1 em 5 mL de caldo nutriente em cada tubo em triplicata. Nos tempos 0, 1, 3, 7 e 11 h foram feitas as leituras de densidade ótica, cujo resultado foi analisado por meio de um gráfico de DO (600nm) versus o tempo. Todas as leituras foram feitas a partir do meio de

cultura com as bactérias em crescimento, realizando-se diluições de 2, 4 ou 10 vezes, quando necessário.

2.3.3.3 - Toxicidade do solvente *N,N*-dimetilformamida

O solvente *N,N*-dimetilformamida foi utilizado no preparo das soluções de POP's para a aplicação direta no meio de cultura. Desse modo, tornou-se necessário avaliar o grau de tolerância das bactérias frente a esse solvente. Esse ensaio foi realizado pela construção de curvas de crescimento de duas bactérias distintas *Sphingobacterium multivorum* e *Stenotrophomonas maltophilia*, frente a diferentes concentrações do solvente. Para isso, frascos contendo caldo nutriente com 0, 1, 2, 5 e 10% (V/V) em duplicata foram preparados para cada bactéria. A partir do pré-inóculo dessas bactérias foi ajustado a densidade ótica de cada frasco para 0,1 e levado para a incubadora shaker a 28 °C com agitação de 135 rpm de onde foram tomados alíquotas nos tempos de 0, 4 e 24 h para a leitura de DO.

2.3.3.4 - Toxicidade do aditivo do meio de cultura Tween[®] 80

Para o teste de toxicidade do Tween[®] 80 (polisorbato 80) foram feitas curvas de crescimento das bactérias *Pseudomonas putida* e *Burkholderia gladioli* em presença de 0, 0,1, e 0,5% (m/v) do composto em meio de cultivo, sendo o crescimento monitorado por aumento de densidade ótica nos tempos 0, 1, 2, 4, 6 e 22 h. As cepas foram inoculadas em caldo nutriente conforme descrito no item 2.3.2.

2.3.3.5 - Toxicidade dos poluentes orgânicos persistentes

Esse ensaio consistiu no monitoramento do crescimento microbiano frente às concentrações de 10, 20, 50 e 100 µg.mL⁻¹ de 1,2,3,4-TCDD, PCB 15 e antraceno, que são compostos representantes das classes, dioxina, PCBs e HPAs, usados no trabalho. Para isso, foi realizado um ensaio de viabilidade celular com resazurina. Esse composto é usado em testes de viabilidade celular sendo reduzido a resorufina e monitorado por análises colorimétricas. A quantidade de células viáveis será sempre proporcional à quantidade de resorufina formada, o que torna esse método útil para o monitoramento de crescimento microbiano já que esse

composto é fluorescente e pode ser monitorado a 390 nm. Para a realização desse ensaio inicialmente foi obtido uma curva da concentração resazurina *versus* a fluorescência a 390 nm. Para esse ensaio, se elegeu uma concentração inicial de $0,2 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ para a resazurina como sendo a melhor concentração a ser aplicada nos ensaios. A bactéria utilizada no experimento para a construção da curva foi a *S. multivorum* que foi inoculada em placa de ELISA de 96 poços escura na concentração 10^5 UFC mL^{-1} . O volume total contido nos poços foi $200 \mu\text{L}$, sendo $160 \mu\text{L}$ composto por caldo nutriente, $10 \mu\text{L}$ do inóculo e $30 \mu\text{L}$ de resazurina. A concentração da resazurina utilizada para a construção da curva de calibração variou entre $0,025$ e $0,275 \text{ mg}.\text{mL}^{-1}$. O tempo de crescimento foi de 48 h e a resazurina foi adicionada apenas 40 min antes da leitura, ficando incubada junto às cepas na mesma temperatura de cultivo ($28 \text{ }^\circ\text{C}$) em estufa B.O.D. Após a escolha da concentração mais adequada de resazurina esse procedimento foi repetido para duas bactérias *S. multivorum* e *S. maltophila*. Para isso, incubou-se as bactérias em quadruplicata nas concentrações de 10, 20, 50 e $100 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de 1,2,3,4-TCDD, PCB 15 e antraceno por 48 h em caldo nutriente. Um controle positivo de morte microbiana consistiu na submissão das cepas ao antibiótico tetraciclina e um controle negativo foi obtido para as cepas em solvente DMF a 2% (v/v). Depois desse tempo cada poço foi adicionado de resazurina para a concentração final de $0,2 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ e deixado mais 40 min sob incubação. Logo após realizou-se a leitura das amostras em fluorímetro Spectramax Multi-Mode Reader. A fenda de excitação foi ajustada para $\lambda_{\text{ex}} = 530 \text{ nm}$ e de emissão para $\lambda_{\text{em}} = 590 \text{ nm}$, sendo realizado um total de 3 leituras para cada placa.

2.3.4 - Pré-ensaio de biodegradação dos POP's

A fim de selecionar as bactérias a serem usadas no ensaio de biodegradação foi feito um pré-ensaio com onze bactérias selecionadas. Fizeram parte dessa seleção principalmente gêneros com citação prévia na literatura relativo à habilidade de degradar xenobióticos (WILKES et al., 1996; JUHASZ et al., 2000; KOMANCOVÁ et al., 2003; TOLEDO et al., 2006; DAS e MUKHERJEE, 2007; ZHANG e ZHU, 2012; WASI et al., 2013; SINGH et al., 2015; DUDÁŠOVÁ et al., 2016; PUGAZHENDI et al., 2017). As bactérias selecionadas para esse ensaio foram *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas montellii*, *Pseudomonas mosselii*,

Pseudomonas chlororaphis, *Pseudomonas sp.*, *Sphingobacterium multivorum*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia gladioli*, *Enterobacter cloacae* e *Empedobacter brevis*.

Para a execução desse ensaio cada uma das bactérias foi inoculada separadamente em tubos de vidro com tampa em um volume de 25 mL de meio. Dois meios foram utilizados, sendo um meio mais rico em nutrientes, composto por 6,7 g.L⁻¹ de YNB e 0,2% e 0,1% de glicose e do surfactante Tween® 80, respectivamente. O segundo meio era composto basicamente de sais conforme descrito no item 2.3.2, sendo caracterizado como um meio pobre em nutrientes. Para esse experimento três compostos foram adicionados ao meio de cultura separadamente na concentração de 50 µg.mL⁻¹. Esses compostos foram fenantreno, PCB 15 e dibenzofurano, onde cada um dos compostos representou uma das classes usadas nesse trabalho, HPAs, PCBs e dioxina, respectivamente, sendo o último composto um análogo estrutural da dioxina sem substituição com átomos de cloro o que diminui a toxicidade do composto minimizando riscos de contaminação. O experimento contou ainda com um controle, onde o meio adicionado de xenobióticos não recebeu bactérias. Esse controle foi feito para monitorar eventuais perdas ambientais dos xenobióticos. Todos os tubos ficaram sob agitação de 135 rpm e incubação a 28 °C por 4 dias ao final dos quais foi realizada a extração do meio de cultivo por extração líquido-líquido com acetato de etila. Um esquema desse experimento pode ser visualizado na Figura 2.17. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

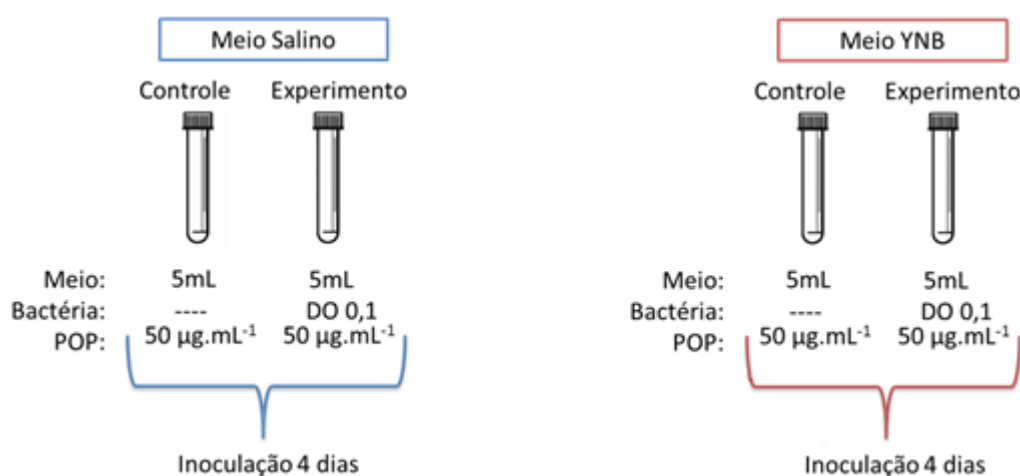


FIGURA 2.17: Esquema mostrando o pré-ensaio de biodegradação de POP's realizado para meio salino e meio YNB.

2.3.5 - Ensaio do efeito dos aditivos do meio de cultura sobre a biodegradação

A fim de selecionar um meio de cultura que propiciasse uma degradação mais efetiva dos POP's foi feito um experimento de degradação dos HPAs fluoreno, fenantreno e pireno realizando-se extrações nos dias 0, 1, 3, 7 e 14. Esse experimento foi realizado para as bactérias *Burkholderia gladioli* e *Stenotrophomonas maltophilia*, que são amplamente citadas na literatura como degradadoras de xenobióticos em potencial (JUHASZ et al., 2000; TOLEDO et al., 2006; 2000; ZHANG e ZHU, 2012; GAO et al., 2013; SINGH et al., 2015; DUDÁŠOVÁ et al., 2016). Para a realização desse experimento cada bactéria foi inoculada na concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹ (DO = 0,1) a partir do pré-inoculo em quatro meios diferentes. O primeiro meio foi preparado somente a base de sais conforme item 2.3.2 sendo chamado de meio salino ou MS. O segundo meio foi preparado pela adição do surfactante Tween® 80 0,1% (m/v) ao meio salino sendo chamado de MStw. O terceiro meio foi preparado pela adição de 0,2% de glicose ao meio salino e foi chamado de MStw. O quarto meio, mais rico em nutrientes, foi preparado a partir da mistura 6,7 g.mL⁻¹ de YNB, 0,1% (m/v) de Tween® 80 e 0,2% (m/v) de glicose, sendo chamado de meio YNB. O volume final de cada tubo contendo o inoculo foi de 5 mL ao qual foram adicionados 50 µL de uma solução de Fluoreno, fenantreno e pireno em DMF, para uma concentração final no tubo de cultivo de 50 µg.mL⁻¹ de cada composto. Foi feito um controle contendo apenas meio de cultura adicionado de HPAs para monitoramento das perdas ambientais. O crescimento das bactérias foi monitorado via contagem do número de colônias viáveis para cada dia de extração. Ao final de cada período de incubação os tubos foram extraídos pelo método via separação entre biomassa e meio de cultura. O experimento foi realizado em triplicata.

2.3.6 – Perfil de degradação

O experimento de cinética de degradação foi realizado em três etapas. Uma etapa contou com a aplicação dos compostos HPAs (fluoreno, antraceno e pireno) para 14 bactérias em 14 dias de experimento. A segunda etapa foi feita pela aplicação dos compostos da classe dos PCBs (PCB 1 e PCB 15) para 4 bactérias

selecionadas em 14 dias de experimento. A terceira etapa tratou da avaliação do composto mais tóxico de todos, 1,2,3,4-TCDD, que foi aplicado para apenas 2 bactérias em 7 dias de experimento. Para esse experimento foi utilizado meio salino adicionado de quantidade traço de Na_2MoO_4 , MnSO_4 , ZnSO_4 e CoSO_4 (1mg L). Também foi aumentado a quantidade de FeSO_4 de $0,001 \text{ g.L}^{-1}$ para $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ e adicionado $0,01 \text{ g.L}^{-1}$ de glicose. As bactérias foram inoculadas na concentração de 10^8 UFC.mL^{-1} separadamente em 5 mL do meio. Os compostos foram aplicados na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ usando 100 μL de uma solução em DMF. O controle para perdas ambientais foi realizado para tubos em triplicata contendo meio de cultura e POP's, enquanto que o crescimento microbiano foi monitorado por contagem da UFC a cada dia em que houve extração. A extração foi feita pela separação da biomassa e meio de cultura sendo cada fração submetida a extração em duplicata com 5 mL de acetato de etila. As amostras foram extraídas nos dias 0, 1, 3, 7 e 14, em triplicata.

2.3.7 - Extração dos POP's do meio de cultivo

2.3.7.1 - Escolha do solvente de extração

Devido ao emprego de diferentes solventes, na literatura, para a extração dos compostos do meio de cultura, escolheu-se dois dos solventes mais citados (acetato de etila e diclorometano) para um teste de capacidade de extração frente a três compostos das diferentes classes utilizadas no trabalho, sendo eles fenantreno (HPA), 4,4'-diclorobifenila (PCB) e dibenzofurano (furanos e dioxinas). Para a realização desse estudo, adicionou-se 5 mL de meio salino a tubos de ensaio com tampa fortificando o meio de cultura com $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cada composto. Agitando-se cada um dos tubos extraiu-se imediatamente, pelo método de extração líquido-líquido, três tubos com acetato de etila e outros três com diclorometano (Panreac). Separando-se alíquotas de cada triplicata, retirou-se a umidade com adição de 5 g de Na_2SO_4 . As amostras foram armazenadas em freezer a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ até o momento da análise em GC-MS.

2.3.7.2 - Extração líquido-líquido - meio de cultura/acetato de etila

Essa extração foi feita misturando-se o meio de cultura contendo os POPs, após o processo de incubação, a 7 mL do solvente acetato de etila (solvente selecionado por meio do experimento do item 2.3.7.1) no próprio frasco de cultivo, sendo agitado logo em seguida em Vortex por aproximadamente 30 s. Depois deixou-se em repouso em torno de 5 min até que as fases acetato de etila/meio de cultura (que não são miscíveis entre si) voltassem a ficar totalmente separadas. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, a fração acetato (fração superior do tubo) foi sendo retirada e transferida a outro recipiente. Repetiu-se esse processo mais duas vezes e transferiu-se o extrato para um balão de 25 mL para aferição do volume. Deste volume apenas uma pequena parte foi coletada para a remoção de gotículas de água com 5 g de Na₂SO₄ anidro, sendo posteriormente armazenado em frasco âmbar em freezer a -20 °C até o momento da análise em GC-MS.

2.3.7.3 - Extração via separação entre biomassa e meio de cultura

Após o período de incubação das bactérias com os POP's, os frascos de cultivo foram retirados da incubadora e todo o conteúdo foi transferido para tubos Falcon de 15 mL. Ao tubo de vidro no qual as bactérias haviam sido incubadas foi adicionado 5 mL de acetato de etila, para fazer a extração de parte dos compostos que eventualmente pudessem estar aderidos ao vidro. Enquanto isso, os tubos *Falcon* contendo as bactérias e o meio de cultura foram mantidos na centrífuga para a separação entre a biomassa microbiana e o meio de cultura. Esses tubos foram centrifugados a 18500 x g por 10 min a uma temperatura de 4 °C. Depois de centrifugado o sobrenadante foi vertido sobre o acetato de etila que estava no tubo de vidro, onde as bactérias haviam sido cultivadas. Ao tubo *Falcon* contendo somente a biomassa foi adicionado 5 mL de acetato de etila. Esse tubo foi então agitado em Vortex, sonicado por 10 min e centrifugado a 18500 x g por 2 min, para separação da biomassa do solvente. A fração contendo o meio de cultivo foi também agitada em Vortex e, tanto a fração contendo a biomassa quanto a fração contendo o meio de cultivo, foram separadas do solvente acetato, sendo o solvente reunido em um único frasco. Novamente foi adicionado 5 mL de acetato de etila ao meio de cultivo e 5 mL de solvente a biomassa bacteriana. Ambos os frascos foram agitados

em Vortex e o solvente coletado foi somado ao solvente da primeira fase. Com o processo de extração finalizada, o extrato foi aferido em balão de 25 mL. Uma alíquota desse volume (aproximadamente 10 mL) foi seca com 5 g de Na₂SO₄ anidro e transferido para um frasco âmbar que foi armazenado em freezer a -20 °C até o momento da análise em GC-MS.

2.3.8 - Análises Cromatográficas

2.3.8.1 - Preparo das soluções estoque e solução de trabalho

Os padrões analíticos foram preparados por meio da pesagem $10,0 \pm 0,1$ mg de cada padrão em balança analítica e solubilizados em balão de 10,0 mL com acetato de etila, para se obter soluções estoque de 1 mg.mL^{-1} . As soluções de trabalho foram preparadas pela diluição de 1,0 mL de cada solução estoque em 50,0 mL de acetato de etila, obtendo-se soluções de concentração final de $20,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$, as quais foram utilizadas no preparo da curva analítica. Os reagentes antraceno e PCB 3, que foram usados como padrão interno, tiveram a solução estoque diluída 100 vezes para se obter uma solução de trabalho de $10 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$. Essa solução foi usada sempre num volume fixo (100,0 μL) para cada ponto da curva analítica a fim de obter a concentração final de $1,0 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A Figura 2.18 mostra as estruturas dos compostos selecionados como padrão e padrão interno para as análises cromatográficas quantitativas em GC-MS.

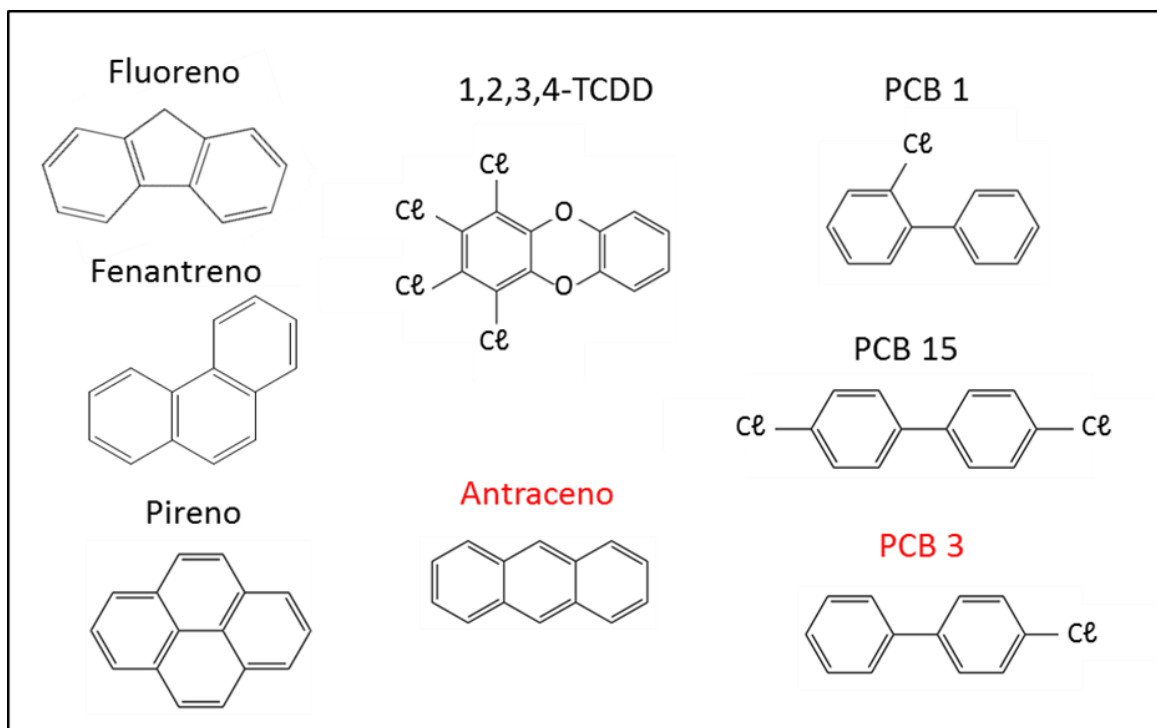


FIGURA 2.18: Padrões analíticos em preto e padrão interno em vermelho.

2.3.8.2 - Parâmetros cromatográficos

As análises cromatográficas foram realizadas em equipamento GC-MS (Shimadzu TQ-8040), equipado com auto-injetor (PAL AOC-5000) e coluna DB-5 UI (30 m × 0,25 mm × 0,25µm) J&W Scientific Agilent. O gradiente de aquecimento e os parâmetros de operação do equipamento foram otimizados para os padrões analíticos utilizando como critério o aumento da resolução e da sensibilidade do método. As Tabelas 2.8 e 2.9 apresentam os parâmetros utilizados no equipamento GC-MS para a validação analítica e análise de amostras.

TABELA 2.8: Gradiente de temperatura do forno da coluna para as análises dos POP's por GC-MS.

Taxa de aumento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)
---	90*	1
23	280	0
10	293	1

* temperatura inicial

TABELA 2.9: Parâmetros operacionais GC-MS.

Gás de arraste:	Hélio 5.0
Volume de injeção:	1 μ L
Temperatura de injeção:	290 °C
Fluxo:	1,0 mL.min ⁻¹
Fluxo de purga:	3,0 mL.min ⁻¹
Velocidade linear:	37,0 cm.min ⁻¹
Divisão de fluxo (<i>Split</i>):	1:10
Corte do solvente:	3,5 min
Temperatura da fonte:	280 °C
Temperatura da interface:	280 °C
Ionização:	70 eV
Intervalo de massa:	<i>m/z</i> 40-400
Tempo total da análise:	12 min

2.3.8.3 - Análise quantitativa

A análise quantitativa das amostras foi feita pelo Modo SIM (Select Ion Monitoring). Para a otimização desse modo de análise primeiramente fez-se uma análise de íons totais para os padrões (Full Scan) identificando individualmente a formação dos íons moleculares e o perfil de fragmentação. A partir dessa análise, com auxílio do *software* GCMS Solution Postrun Analysis selecionou-se para cada composto um íon para quantificação e outros dois íons para a confirmação do sinal criando-se assim método no Modo SIM. A Tabela .2.10 descreve todos os íons selecionados para essa análise.

TABELA 2.10: Íons selecionados no modo SIM para os POPs utilizados no trabalho.

	Íon molecular [M] ⁺ (m/z)	Íon quantificação (m/z)	Íon referência 1 (m/z)	Íon referência 2 (m/z)
PI Antraceno	178,0	178,0	176,0	152,0
Fluoreno	166,0	165,0	166,0	82,0
Fenantreno	178,0	178,0	176,0	152,0
Pireno	202,0	202,0	200,0	101,0
PI 2 PCB 3	188,0	188,0	152,0	76,0
PCB 1	188,0	188,0	152,0	76,0
PCB 15	222,0	222,0	152,0	224,0
1,2,3,4-TCDD	322,0	322,0	257,0	320,0

2.3.8.4 - Validação do método analítico

A validação do método analítico foi feita observando parâmetros cromatográficos recomendados nas instruções da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução RDC Nº 166 (ANVISA, 2017). Os parâmetros considerados foram:

- Limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD)
- Faixa linear de trabalho
- Efeito de matriz
- Precisão e exatidão inter e intra-dia
- Eficiência do método de recuperação

Os limites de quantificação e detecção foram determinados por comparação do sinal do composto com o ruído da linha de base. As análises para a obtenção desses parâmetros foram feitas por meio da diluição sucessiva dos padrões até que se obteve a relação sinal/ruído de 10 vezes para o LQ e de 3 vezes para o LD.

A faixa linear de trabalho foi obtida para o intervalo variando de 0,5 a 12 µg.mL⁻¹ de cada um dos compostos. A curva analítica foi construída pelo método de padronização interna tendo como base dois PIs, o antraceno para os HPAs e o PCB 3 para a padronização dos compostos clorados. A curva foi construída a partir de 8 pontos contidos dentro do intervalo de concentração estabelecido inicialmente *versus* a área do pico do composto dividido pela área do pico do padrão interno. A eficiência da regressão linear foi aferida avaliando parâmetros como coeficiente de determinação (R²), exatidão e a precisão.

Para verificar o efeito de matriz, curvas de calibração foram construídas nas mesmas concentrações usadas na construção da curva analítica em solvente, preparadas a partir da diluição da solução de trabalho no extrato microbiano obtido a partir do cultivo de micro-organismos na ausência de POP's. Essa curva foi então comparada à curva obtida para o solvente para verificar se houve desvios no coeficiente angular relativo a interferentes contidos na matriz.

A avaliação da precisão e exatidão do método foi feita a partir de três soluções com concentração dentro da faixa linear de trabalho, sendo um ponto baixo equivalente a 120% do valor do primeiro ponto da curva, um ponto médio e um alto entre 40 e 60%, e entre 90 e 100%, respectivamente a concentração do maior ponto da curva. Todos os três pontos foram preparados em quintuplicata e foram avaliados três vezes durante o período de um dia para verificar a repetibilidade do método intra-dia. Durante o período de três dias não consecutivos essas soluções em quintuplicata foram também analisadas para se verificar a repetibilidade do método inter-dia. O controle de qualidade do método foi realizado pela utilização, mais uma vez, do ponto baixo, médio e alto da curva em quintuplicata durante o tempo de análise das amostras para garantir a precisão e exatidão do método mesmo durante várias análises cromatográficas seguidas. Os valores obtidos foram utilizados para calcular o desvio padrão $s(x)$, o coeficiente de variação $CV(\%)$ e exatidão para a quintuplicata dos pontos baixo, médio e alto analisados de acordo com as equações 1, 2 e 3 abaixo:

$$s(x) = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (x_j - \bar{x})^2} \quad (1)$$

$$CV(\%) = \frac{s(x)}{\bar{x}} \times 100 \quad (2)$$

$$Exatidão (\%) = \frac{\bar{x}}{x_{teórica}} \times 100 \quad (3)$$

onde x_j são os valores de cada medida, n é o número de valores medido para cada ponto e \bar{x} é a média obtida para cada concentração.

A eficiência do método de extração foi analisada pela fortificação de um cultivo de dois dias da bactéria *Pseudomonas putida*, com três

concentrações de cada um dos compostos, um ponto baixo, médio e um ponto alto. Depois de dopadas cada amostra foi extraída pela metodologia via separação da biomassa microbiana do meio de cultivo. As três concentrações utilizadas foram realizadas em triplicata para cada um dos compostos. A recuperação foi calculada pela equação 4 abaixo:

$$\% \text{ Recuperação} = \frac{\text{valor medido} - \text{valor real}}{\text{valor real}} \times 100 \quad (4)$$

2.3.8.5 – Análise qualitativa

A análise qualitativa foi realizada somente para as amostras que indicavam algum tipo de degradação dos POPs. O objetivo dessa análise foi verificar a existência de metabólitos derivado da degradação desses compostos. Primeiramente uma análise no modo *Full Scan* foi realizada. Posteriormente, o solvente de cada amostra foi evaporado e a o conteúdo sólido restante no frasco foi submetido a um processo de derivatização com Hexametildisilazano (HMDS). O processo de derivatização consistiu em: adicionar 500 µL de HMDS ao frasco contendo o extrato sólido, sonicar por 30 min a uma temperatura de 55 °C, adicionar 500 µL de água ultrapura, agitar e coletar a fração orgânica que foi seca com Na₂SO₄ anidro e injetada em GC-MS para análise (RUIZ-MATUTE et al., 2011).

2.3.9 - Análise estatística

As análises estatísticas, como Anova e teste T, bem como os cálculos de média, desvio padrão e regressão linear foram feitas no programa Microsoft Excel[®] 2010 por meio da ferramenta de análise de dados.

2.4 - Resultados e discussões

2.4.1 – Otimização das condições de crescimento das cepas microbianas

O primeiro passo para o cultivo de micro-organismos deve ser o estabelecimento das condições ideais de cultivo, uma vez que o metabolismo e crescimento das cepas irá depender dessas condições. Entre estes parâmetros estão, o tipo de meio de cultura a ser utilizado, suplementos, tamanho do frasco de cultivo (aeração), temperatura, agitação, pH, concentração das bactérias, concentração de POPs, entre outros. Todos os pré-inóculos das bactérias sempre foram preparados em meio caldo nutriente, que se trata de um meio de cultura rico que contém todos os nutrientes necessários para o rápido crescimento dos micro-organismos investigados. Para o inóculo, no entanto, foram utilizados meios mais pobres com o objetivo de estimular a metabolização dos POPs. Um dos meios utilizado para alguns testes iniciais foi o meio YNB, que se trata de um meio com conteúdo de aminoácidos, vitaminas e minerais definido (conforme descrito na Tabela 2.6). Outro meio amplamente utilizado nesse trabalho foi o meio salino, o qual costuma ser usado em trabalhos de biodegradação. Esse segundo tipo de meio é utilizado, na maior parte dos casos, somente com conteúdo mineral estimulando o consumo do poluente como fonte de carbono (AHN et al., 1998; JUHASZ et al., 2000; JOHNSEN, A. R. e KARLSON, 2004). Em alguns casos, no entanto, há a suplementação com algumas moléculas orgânicas para servir de fonte adicional de carbono, geralmente para proporcionar um início no crescimento microbiano, ou mesmo para servir de surfactante, melhorando a biodisponibilidade dos POPs (BILLINGSLEY et al., 1999; GAO et al., 2013).

Poluentes orgânicos costumam ser extremamente hidrofóbicos e, portanto, muito pouco solúveis em meios bióticos. Deste modo, a degradação desse tipo de composto tende a se tornar ainda mais escassa, ou desafiadora, nesse tipo de ambiente que é tipicamente hidrofílico. A biodisponibilidade de poluentes em ambientes de degradação tem sido destacado como um fator muito importante no processo de biodegradação em diversos artigos presentes na literatura (BILLINGSLEY et al., 1999; BAUTISTA, et al. 2009; CHRZANOWSKI et al., 2011;

CHEN et al., 2013). Uma forma de se aumentar a disponibilidade de POPs amplamente empregada em trabalhos de biodegradação é a adição de um composto surfactante. Esses compostos agem sob os poluentes impedindo seu acúmulo nas paredes ou precipitação nos frascos usados para a inoculação dos micro-organismos, por formar micelas que são responsáveis por uma melhor distribuição das moléculas no meio de cultura. Os compostos empregados são moléculas anfifílicas naturais que podem ser produzidas por micro-organismos como os ramnolípidios provenientes de *Pseudomonas* sp. ou mesmo moléculas anfifílicas sintéticas. Dentre as moléculas sintéticas, podem ser empregada moléculas catiônicas ou aniônicas como Nansa LSS38/AS, ou não iônica como Tween[®] 80 ou Triton[®] X-100. Geralmente surfactantes naturais possuem a vantagem de ser menos tóxicos as cepas do que surfactantes sintéticos (CHRZANOWSKI et al., 2011). Segundo Bautista et al. (2009), os surfactantes sintéticos Triton[®] X-100 e Tergitol NP-10, usados num experimento de degradação de HPAs pelas bactérias *Enterobacter* sp., *Pseudomonas* sp. and *Stenotrophomonas* sp. apresentaram certo grau de toxicidade as bactérias, embora seu uso contribuiu de maneira significativa para a degradação dos compostos naftaleno, fenantreno e antraceno. O Tween[®] 80, por outro lado, foi o surfactante mais efetivo nesse experimento, pois além de contribuir para a degradação desses compostos, também contribuiu para o crescimento bacteriano, servindo como fonte de carbono. De fato Chen et al. (2013) verificaram um crescimento duas vezes maior em 80 horas de experimento para a bactéria *Burkholderia cepacia* em presença de Tween[®] 80 (500 mg.L⁻¹), frente a um meio que não continha o surfactante. Nesse mesmo tempo esses autores verificaram que a degradação do pireno foi cerca de 20 % maior.

Baseados nos conhecimentos prévios sobre a vantagem de se ter um surfactante presente no meio de cultura fez-se uma avaliação do crescimento microbiano para o Tween[®] 80 nas concentrações de 0,1 e 0,5% (m/v). Como pode ser observado na Figura 2.19, esse surfactante realmente foi utilizado como fonte de carbono pelas bactérias em meio salino, pois tanto a bactéria *Pseudomonas putida*, quanto a *Burkholderia gladioli* cresceram de forma proporcional a concentração empregada. No entanto, também pode ser observado, esse crescimento não foi significativo para as primeiras 6 h de experimento, para as quais as bactérias crescem lentamente. Somente após 22 h foi possível observar mudanças no valor de densidade ótica, que foi muito mais acentuado para a *B. gladioli* do que para a *P.*

putida, indicando que a *B. gladioli* pode estar utilizando essa molécula com mais eficiência. Deste modo, esse experimento comprovou que o Tween® 80 pode ser usado nos processos de degradação de POPs sem representar uma fonte de toxicidade aos micro-organismos.

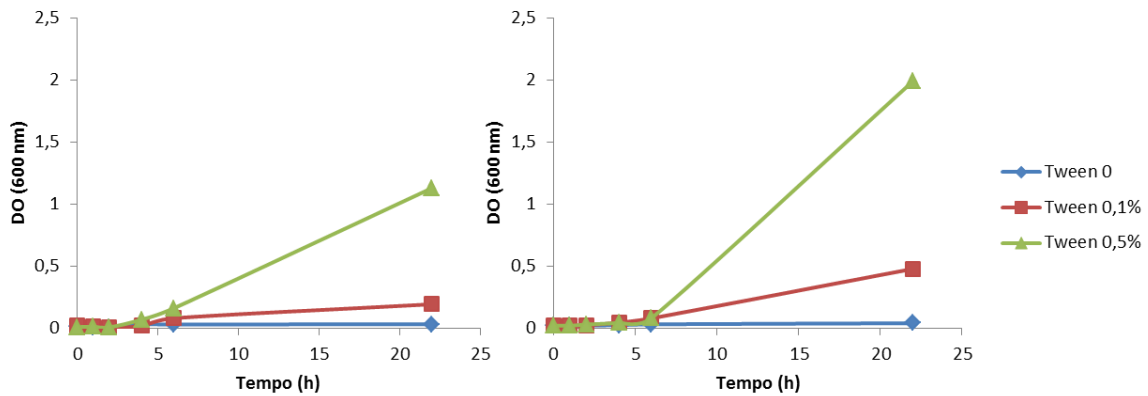


FIGURA 2.19: Avaliação do crescimento das bactérias A) *Pseudomonas putida*, e B) *Burkholderia gladioli* frente a diferentes concentrações de Tween® 80.

A glicose foi, ainda, avaliada como uma possível fonte de carbono adicional para ser empregado juntamente com o meio salino. Esse aditivo foi testado nas concentrações 0,2 e 0,01% (m/v). Como pode ser visto na Figura 2.20 a glicose 0,2% representou uma fonte de carbono aproximadamente 3 vezes mais eficiente que o Tween® 80 a 0,5% (m/v). Por outro lado, é evidente que a diminuição da concentração de glicose levou também uma diminuição acentuada do crescimento microbiano.

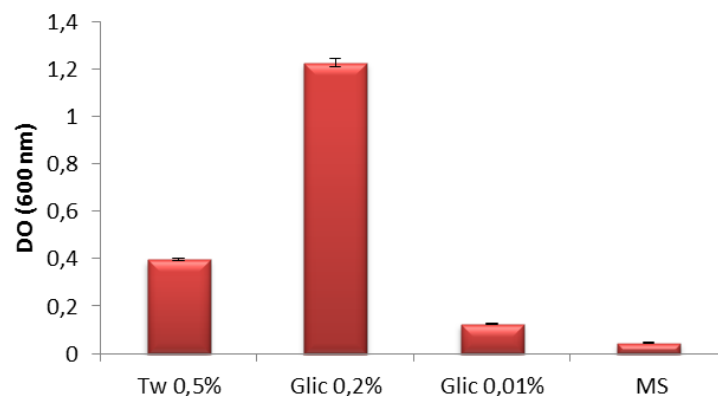


FIGURA 2.20: Crescimento de 96 horas da bactéria *Pseudomonas putida* em meio salino e meio salino com diferentes aditivos. Onde: Tw - Tween® 80; Glic – glicose; MS – meio salino.

Sem dúvida a glicose é a substância que tem sido mais amplamente empregada como fonte adicional de carbono em trabalhos de biodegradação (DAS e MUKHERJEE, 2007; PERLATTI, 2012; GAO et al., 2013; MURÍNOVÁ et al., 2014). Sua aplicação vai desde pequenas quantidades, 50 mg L⁻¹ até quantidades relativamente altas 5 g L⁻¹. Em todos os casos, no entanto, tem sido relatado que o estímulo ao crescimento microbiano tem levado também a uma maior degradação dos POPs em estudo.

Outro fator importante em experimentos de crescimento microbiano, é o estabelecimento de uma concentração inicial para o inóculo dos micro-organismos. É comum na literatura a concentração das cepas ser trazida na forma de Unidades Formadoras de Colonia por mL (UFC.mL⁻¹). No entanto em alguns trabalhos a densidade ótica (DO) também é utilizada. A faixa de UFC.mL⁻¹ utilizada é bastante diversa. Foram encontrados trabalhos que usam UFC.mL⁻¹ entre 1 × 10⁵ a 5,6 × 10¹⁰ (JUHASZ, et al., 200; SWAATHY et al., 2014; LIN et al, 2014a). Kasemodel (2012) que trabalhou com a seleção de bactérias para a degradação de pesticidas organoclorados recomenda a UFC.mL⁻¹ de 1 × 10⁸ como sendo a concentração ideal das cepas para o inóculo. Como o estabelecimento da UFC.mL⁻¹ se trata de um trabalho dispendioso e impossível de ser usado de forma imediata na montagem inicial dos experimentos com bactérias, o que se costuma fazer é definir uma relação entre UFC e DO. Nesse caso, é necessário fazer medidas de UFC.mL⁻¹ e DO em tempos diversos traçando uma curva que relacione os valores. Segundo Kasemodel, 1 × 10⁸ UFC.mL⁻¹ costuma corresponder a DO de 0,1. As Figura 2.21 A e B trazem as curvas de crescimento feitas de 0 a 14 h para a bactéria *Sphingobacterium multivorum* em DO e UFC.mL⁻¹, respectivamente.

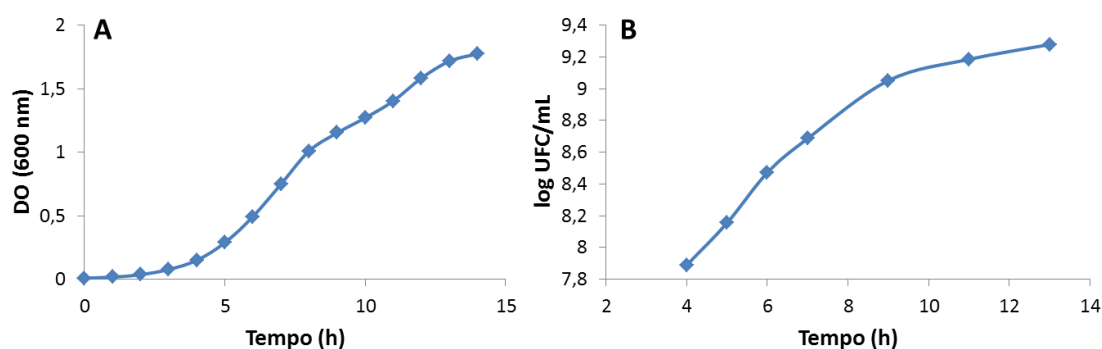


FIGURA 2.21: Curva de crescimento para a bactéria *Sphingobacterium multivorum* em A) densidade ótica e em B) UFC.mL⁻¹.

A Figura 2.22 A mostra a imagem das colônias obtidas no experimento de UFC e a Figura 2.22 B trás a relação entre DO e UFC.mL⁻¹. Como pode ser observado, uma relação entre as duas medidas pode ser estabelecida a partir do ajuste dos quadrados mínimos, sendo que a DO de 0,1 foi concebida, nesse experimento, como equivalente a $7,9 \times 10^7$ UFC.mL⁻¹ para a bactéria *S. multivorum*. Como o coeficiente de determinação foi muito próximo a 1 ($R^2 = 0,9899$) a equação obtida é um bom modelo matemático para a previsão da UFC a partir da DO.

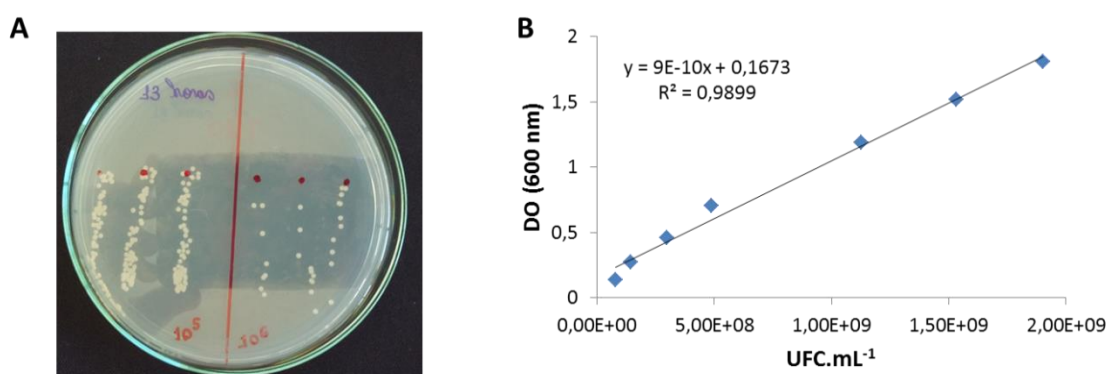


FIGURA 2.22: A) Placa usada na contagem das colônias viáveis para o estabelecimento de UFC; B) Relação entre DO a 600 nm e UFC.mL⁻¹ para a *S. multivorum*.

É importante destacar que as medidas de densidade ótica utilizada nesse trabalho são na realidade medidas de turbidez, já que bactérias em meio aquoso formam um sistema coloidal que interage com a luz levando a um espalhamento do feixe luminoso. O comprimento de onda para medir densidade ótica para bactérias geralmente costuma ser 600 nm, como o que foi utilizado nesse trabalho. No entanto, comprimentos de 578 e 660 nm também podem ser usados para realizar esse tipo de medida (KEIM et al, 1999; HABE et al, 2001; FUKUDA et al., 2002).

Uma vez estabelecidas as condições do meio de cultivo e concentração inicial das cepas, avaliou-se também o diâmetro do frasco a ser utilizado no experimento de degradação dos POPs. Para o experimento de degradação optou-se por tubos de vidro aeração, os quais uma vez autoclavados poderiam manter a esterilidade do meio, garantindo a pureza da cultura. O diâmetro do tubo costuma ser importante em experimentos de cultivo microbiano devido a promoção de uma maior ou menor oxigenação do meio de cultivo devido a área

superficial do inóculo. Para testar as diferenças de oxigenação, uma curva de crescimento para a bactéria *Sphingobacterium multivorum* foi realizada em um tubo de diâmetro de 18 mm e outra curva para a mesma bactéria em um tubo de 25 mm. O resultado para esse experimento encontra-se na Figura 2.23.

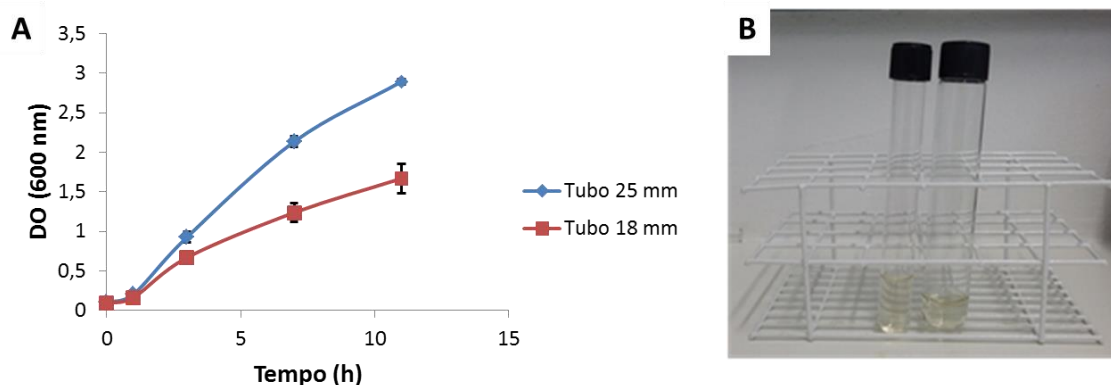


FIGURA 2.23: A) Curva de crescimento da bactéria *Sphingobacterium multivorum* em tubos de 18 e 25 mm de diâmetro; B) Foto de ambos os tubos utilizados contendo 5 mL de meio de cultura caldo nutriente.

Como pode ser observado, a *S. multivorum* apresentou crescimento mais pronunciado no frasco de 25 mm do que no frasco de 18 mm. Esse resultado permite confirmar a dependência da aeração para o crescimento microbiano, uma vez que esse tubo permite um inóculo com maior área superficial estimulando uma oxigenação mais intensa à medida que o tubo é agitado na incubadora rotatória. Vale ressaltar que a preocupação com uma oxigenação eficiente do meio de cultura não está apenas relacionada ao proporcionamento de um melhor crescimento dos micro-organismos, mas também uma degradação mais efetiva dos POPs. Como foi destacado na revisão da literatura desse trabalho, sabe-se que as enzimas que promovem a degradação de POPs são enzimas dependentes de oxigênio, pois todas as reações promovidas na estrutura do poluente estão relacionadas à adição de hidroxilas na cadeia carbônica que culmina com a quebra dessa estrutura levando a moléculas menores como catecóis, fenóis, ácido salicílico e benzóico (NOJIRI et al., 2001; FIELD e SIERRA-ALVAREZ, 2008). Deste modo, o tubo de 25 mm foi selecionado para o experimento de degradação.

2.4.1.1 – Toxicidade do solvente DMF e dos POPs

Uma vez que os parâmetros de crescimento haviam sido estabelecidos, restou o ensaio de toxicidade do solvente DMF usado na solubilização dos POPs e toxicidade dos próprios POPs que são objeto de investigação nesse trabalho. Para a solubilização dos POPs, dois solventes são comumente encontrados na literatura, dimetilsulfóxido, DMSO, ou dimetilformamida, DMF (DEAN-ROSS e CERNIGLIA, 1996; JUHASZ et al. 2003; DAS e MUKHERJEE, 2007; KASEMODEL, 2012). Destes dois, definitivamente o DMF é o mais citado, por isso esse solvente foi escolhido para a realização dos experimentos. No entanto, a toxicidade desse solvente não costuma ser indicada nos trabalhos de biodegradação de POPs, por isso realizou-se um ensaio de crescimento das bactérias *Sphingobacterium multivorum* e *Stenotrophomonas maltophilia* sob diferentes concentrações do solvente DMF. O resultado desse experimento encontra-se na Figura 2.24 abaixo:

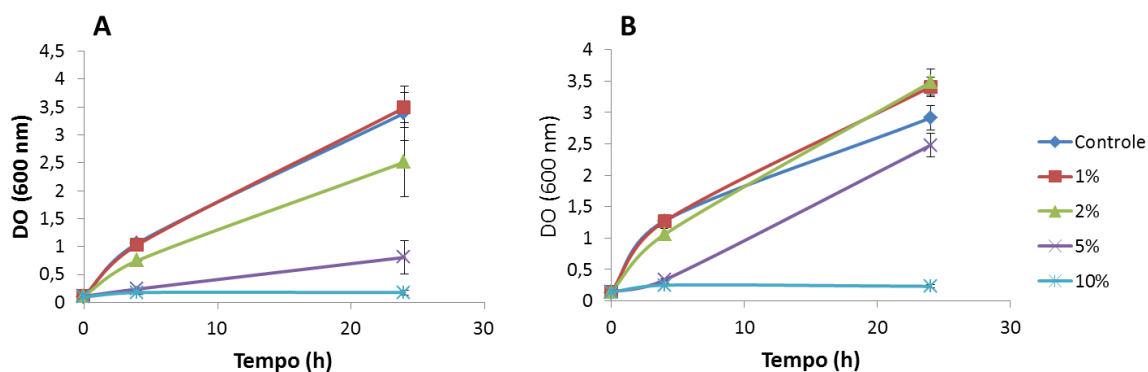


FIGURA 2.24: Curva de crescimento para as bactérias A) *Sphingobacterium multivorum* e B) *Stenotrophomonas maltophilia* sob diferentes concentrações do solvente DMF (1, 2, 5 e 10% (V/V)).

Como pode ser observado na Figura 2.24, o solvente DMF apresentou grau de toxicidade diferenciado para as duas bactérias testadas. Esse solvente a 5% (v/v) foi muito mais tóxico para a *S. multivorum* do que para a *S. maltophilia*. Para a *S. maltophilia* a concentração de 5% de DMF apresentou um efeito inibitório de 15% em relação ao controle em 24 h de experimento. Por sua vez, para a *S. multivorum*, nas mesmas condições, o efeito inibitório foi de 76%. O DMF, no entanto, apresentou efeito inibitório superior a 90% para ambas as bactérias na concentração de 10% (v/v), indicando auto grau de toxicidade para essa concentração. Um

resultado semelhante foi encontrado por Amin et al, (2010), num experimento para compostos com efeito antibacteriano, onde o solvente DMF também foi testado para a bactéria *Staphylococcus capitis*. Segundo esses autores, uma concentração de 1,3 mol.L⁻¹, equivalente a 10% (v/v) de DMF matou 80% das bactérias, enquanto que as concentrações abaixo de 0,5 mol.L⁻¹ (4% v/v) apresentaram efeito inibitório menor que 10%.

Por meio dos resultados apresentados para esse experimento optou-se pelo uso de concentrações não maiores que 2% (v/v) para o solvente DMF, evitando assim o estresse e morte das bactérias devido ao seu efeito tóxico. Geralmente os experimentos de biodegradação apresentados na literatura não indicam a concentração do solvente aplicada ao meio de cultura. Apenas um trabalho foi encontrado para o qual o autor diz usar a concentração de 5% (m/v) de DMF para o estudo da biodegradação de pireno por *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa* (DAS e MUKHERJEE, 2007).

Outro fator que pode causar estresse e baixa viabilidade das bactérias estudadas é a aplicação de altas concentrações do próprio POP utilizado no experimento de biodegradação. Segundo Kasemodel (2012), bactérias marinhas selecionadas apresentaram baixa tolerância a pesticidas clorados, sendo este um critério para a rejeição destas bactérias no trabalho de biodegradação realizado pela autora. Deste modo, nesse trabalho procurou-se estabelecer a melhor concentração a ser utilizada no experimento de biodegradação a partir de concentrações encontradas na literatura. Nesse caso, a faixa de 10 a 100 µg.mL⁻¹ foi selecionada para essa avaliação.

Para o estabelecimento da toxicidade dos compostos buscou-se, então, um método que fosse rápido e de menor custo devido à necessidade de um grande número de experimentos a ser realizado para isso. Sendo assim, por meio de uma busca a literatura, escolheu-se o método fluorimétrico com o uso do reagente resazurina para a determinação do crescimento microbiano (MARISCAL et al., 2009). Esse método foi escolhido, pois os experimentos são realizados em placas de Elisa com capacidade para 96 amostras, o que permite a obtenção de um grande número de dados de crescimento com replicatas em um curto espaço de tempo. A determinação da viabilidade celular com resazurina consiste basicamente na transformação desse composto por meio de uma reação de redução para resorufina (Figura 2.25) que é um composto com atividade fluorescente, quando

excitado por uma fonte luminosa. Essa transformação da resazurina para resorufina está diretamente relacionada a enzimas bacterianas presentes em células vivas e pode, portanto, ser relacionado à viabilidade celular.

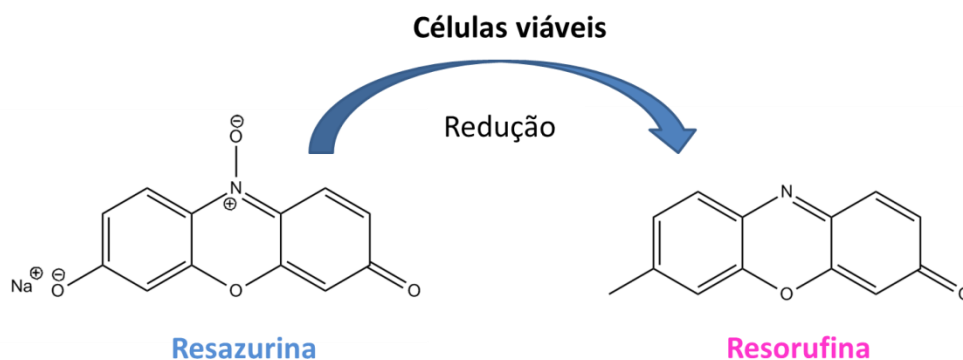


FIGURA 2.25: Figura representativa da reação da Resazurina a Resorufina em presença de células microbianas.

Para a realização desse ensaio foi obtido inicialmente uma curva de concentração da resazurina *versus* a fluorescência da resorufina com emissão em 590 nm, onde se elegeu a concentração de $0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ como sendo a melhor concentração a ser utilizada nos ensaios. A concentração de $0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$, foi selecionada por estar num ponto razoavelmente central da curva de calibração e pertencer a uma faixa linear da mesma, conforme pode ser observado na Figura 2.26. A bactéria utilizada no experimento para a construção da curva foi a *Sphingobacterium multivorum* que foi plaqueada em placa de ELISA escura na concentração 10^5 obtida a partir de um pré-inóculo de 16 h. O volume total contido nos poços foi 200 μL (160 μL CN; 10 μL inóculo; 30 μL resazurina). O tempo de crescimento foi de 48 h e a resazurina foi adicionada apenas 40 min antes da leitura, ficando incubada junto às cepas na mesma temperatura de cultivo (28°C) em estufa B.O.D.

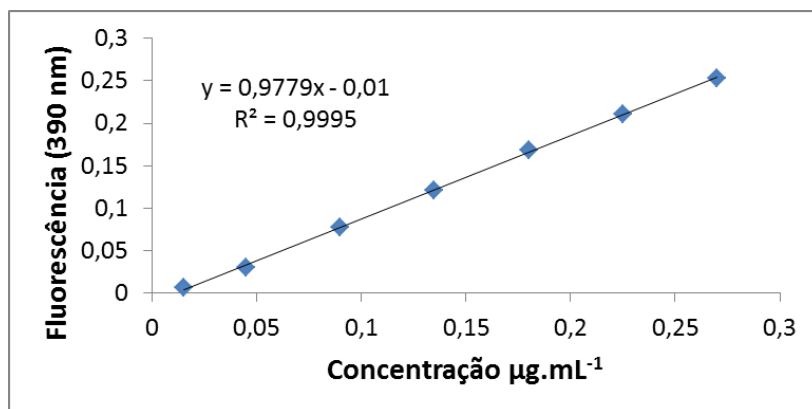


FIGURA 2.26: Fluorescência a 390 nm de uma cultura de bactérias de 48 horas de crescimento com leitura em fluorímetro sob diferentes concentrações do composto resazurina.

Uma vez estabelecida a curva de calibração, o método foi empregado na avaliação do crescimento microbiano para a presença dos POPs previamente selecionados por categoria. Para esses experimentos foi eleito um POP de cada classe química usado nesse trabalho, sendo eles 1,2,3,4-TCDD (classe das dioxinas), 4,4'-Diclorobifenila (PCB 15 - PCBs) e Antraceno (HPAs) e avaliado em quatro concentrações diferentes dos mesmos (100, 50, 20 e 10 µg.mL⁻¹). O experimento foi realizado para as bactérias *S. multivorum* e *S. maltophilia* em quadruplicata, contando também com um controle positivo de morte, o qual consistia na submissão das cepas ao antibiótico tetraciclina na concentração de 0,5 mg.mL⁻¹, e um controle negativo, no qual as cepas se encontravam em meio contendo DMF a 2% (v/v). O resultado do experimento se pode ser visualizado nas Figuras 2.27 A-C e 2.28 A-C.

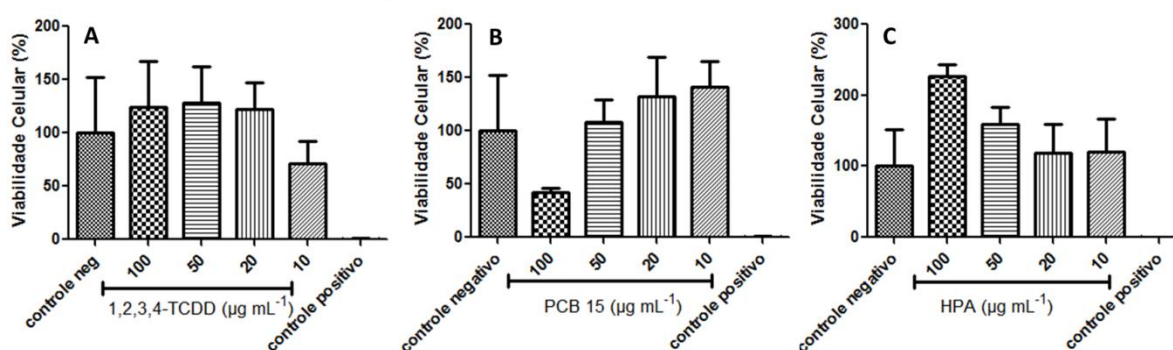


FIGURA 2.27: Ensaio de viabilidade celular para a bactéria *Spingobacterium multivorum* frente a A) dioxina; B) PCB e C) HPA, respectivamente.

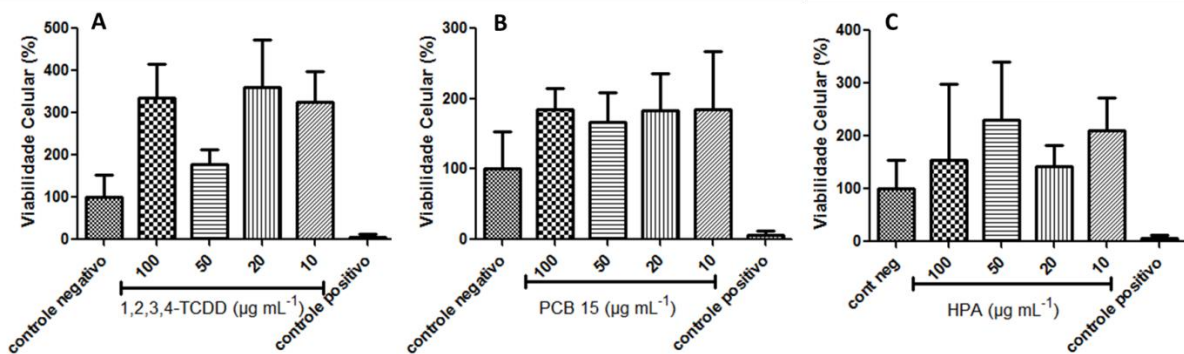


FIGURA 2.28: Ensaio de viabilidade celular para a bactéria *Stenotrophomonas maltophila* frente a A) dioxina; B) PCB e C) HPA, respectivamente.

Como podem ser observados nas Figuras 2.27 e 2.28, os experimentos apresentaram coeficiente de variação superior a 15% e irregularidades em relação às concentrações utilizadas, por isso não foi possível determinar a toxicidade dos POPs para as bactérias por meio deste ensaio. Isso se deve provavelmente a baixa solubilidade dos compostos que leva a um espalhamento de forma irregular do feixe luminoso, gerando uma leitura imprecisa e inexata das culturas. Apesar desse resultado, e do fato da resazurina não ser um composto tóxico para as bactérias, cada um dos poços usados no ensaio foi plaqueado em caldo nutriente ágar, para averiguar por meio desse teste a viabilidade celular em relação às diferentes concentrações. Como pode ser visto nas Figuras 2.29 e 2.30, mesmo permanecendo 48 h em contato com os diferentes POPs, nenhuma das bactérias estudadas deixou de apresentar crescimento nas placas. Deste modo, deduziu-se que nenhuma das concentrações aplicadas nesse ensaio foi efetivamente tóxica aos microorganismos. Para os experimentos de degradação, portanto preferiu-se usar a concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, a qual foi com frequência usada nesse tipo de ensaio (NAM et al., 2006; Kasemodel 2012; GAO et al., 2013).



FIGURA 2.29: Bactéria *Spingobacterium multivorum* crescendo em ágar nutriente depois de ter sido submetida ao crescimento em meio caldo nutriente contendo diferentes concentrações de A) 1,2,3,4-TCDD, B) PCB 15 e C) antraceno.

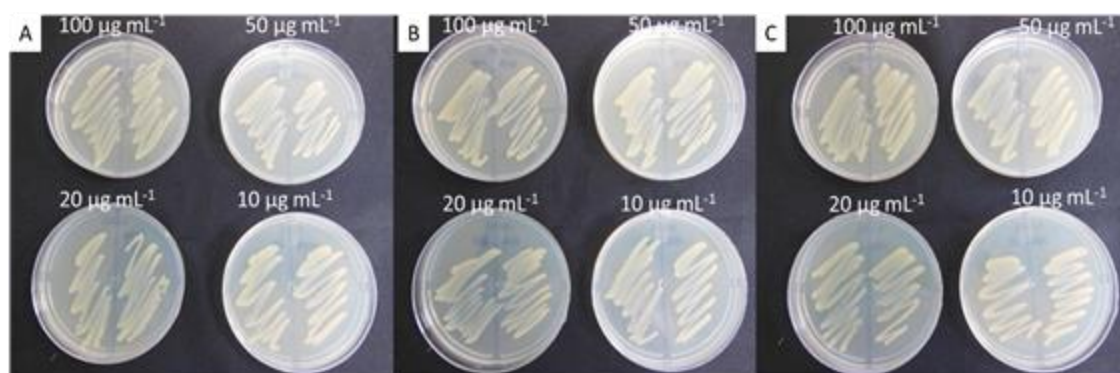


FIGURA 2.30: Bactéria *Stenotrophomonas maltophila* crescendo em ágar nutriente depois de ter sido submetida ao crescimento em meio caldo nutriente contendo diferentes concentrações de A) 1,2,3,4-TCDD, B) PCB 15 e C) antraceno.

2.4.1.2 - Screening inicial das bactéria associadas a *D. speciosa* – Pré ensaio de biodegradação

Complementar ao ensaio de crescimento celular na presença da resazurina, foi realizado um *screening* inicial de biodegradação das bactérias por meio de uma pré-extração e leitura no GC-MS de culturas de 96 h submetidas aos compostos POPs investigados. Para esse experimento, no entanto, os compostos antraceno e 1,2,3,4-TCDD, foram substituídos por fenantreno e dibenzofurano, que são usualmente considerados compostos menos tóxicos (DAVY, 2004; BAMFORTH e SINGLETON, 2005; LACERDA e ROSE, 2016). Essa substituição foi uma estratégia especialmente importante para a dioxina, pois nesse caso, ao utilizar-se um análogo para a mesma, evitou-se uma maior exposição e geração de resíduo

desse composto, sendo o congênero 1,2,3,4-TCDD o composto mais tóxico de todas as substâncias utilizadas nesse trabalho.

Para esse ensaio, foram utilizadas onze cepas de espécies diferentes, as quais foram avaliadas quanto ao crescimento e a capacidade de degradação dos POPs. Também foram investigados meios de cultura diferentes: YNB contendo glicose a 2% (m/v) e um Meio Salino conforme citado no item 2.3.2 desse trabalho. Alíquotas de 5 mL de amostra contendo inicialmente $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de cada composto, foram extraídas 3 vezes com acetato de etila, após um período de crescimento de 96 h. Controles contendo meio de cultura acrescido dos compostos sem a presença de bactérias também foram preparados para o acompanhamento de possíveis das perdas ambientais. Cada um dos extratos teve seu volume aferido para 25 mL em balão volumétrico e uma fração de cada amostra foi separada para a leitura no GC-MS. O crescimento microbiano foi acompanhado pela leitura em espectrofotômetro a 600 nm tendo o meio de cultura isento de bactéria como branco. Os resultados dos experimentos se encontram ilustrados nas Figuras 2.31 a 2.34.

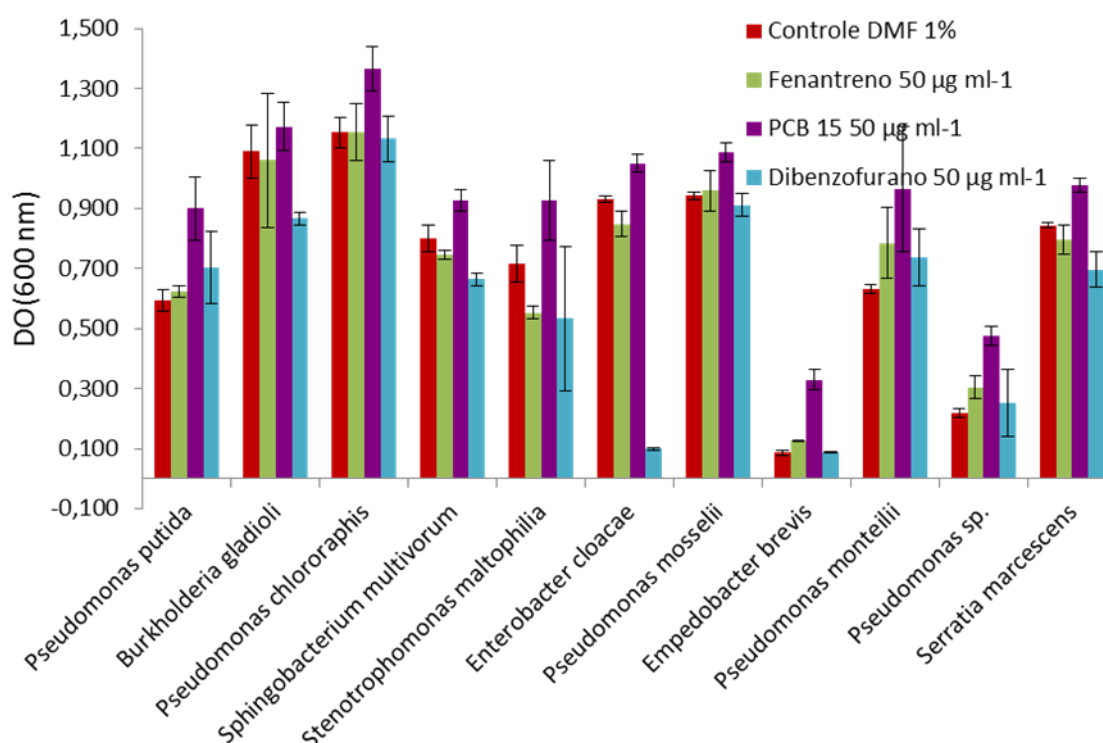


FIGURA 2.31: Densidade ótica a 600 nm das culturas bacterianas cultivadas por 96 h na presença de POPs em meio YNB.

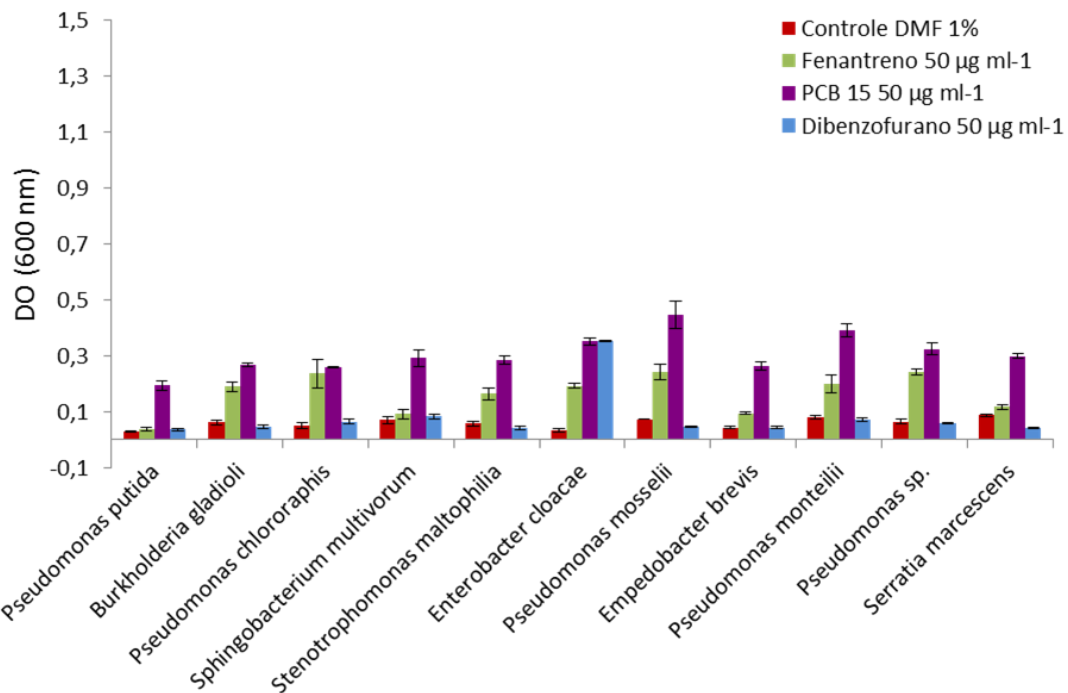


FIGURA 2.32: Densidade ótica a 600 nm das culturas bacterianas cultivadas por 96 h na presença de POPs em Meio Salino.

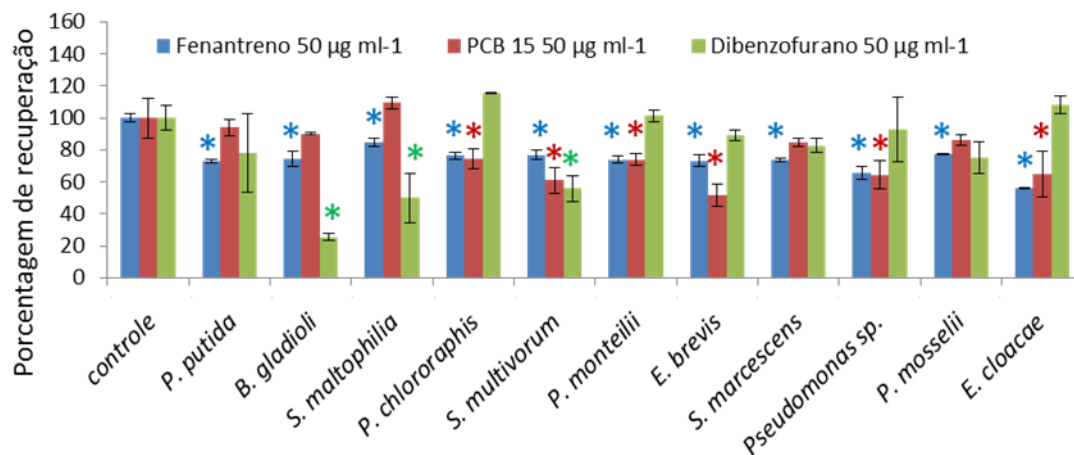


FIGURA 2.33: Porcentagem de recuperação dos POPs em relação ao controle em culturas de 96 h em meio YNB (* significa diferença estatística, $p < 0,05$, em relação ao controle).

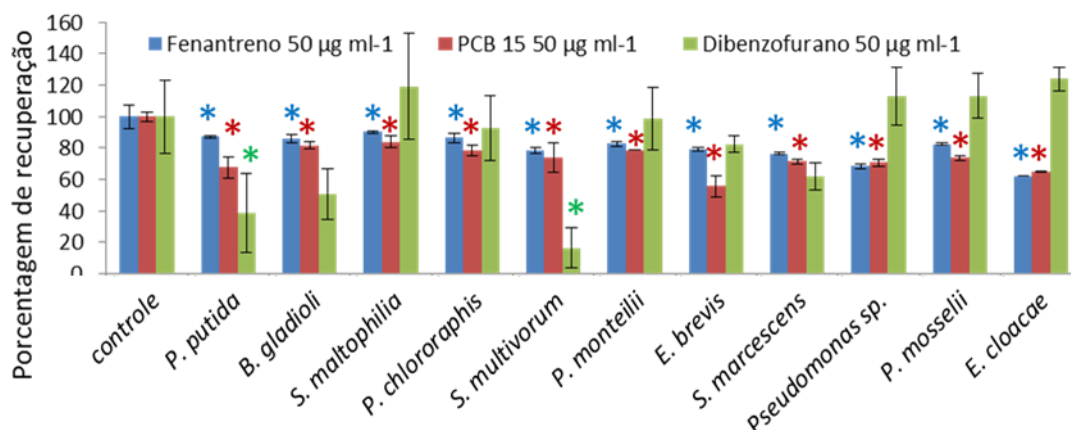


FIGURA 2.34: Porcentagem de recuperação dos POPs em relação ao controle em culturas de 96 h em Meio Salino (* significa diferença estatística, $p < 0,05$, em relação ao controle).

As Figuras 2.31 e 2.32 mostram que o meio salino não favoreceu o crescimento das bactérias, pois uma DO menor foi encontrada em comparação ao crescimento no meio YNB. Como pode ser visto, a DO foi também mais alta para o meio contendo POPs em relação ao controle (meio sem POPs) na maioria dos experimentos, sendo muito mais alta principalmente no meio contendo o PCB 15. Isso ocorreu devido a baixa solubilidade desses compostos em meio de cultura. Desse modo, a existência de POPs no estado precipitado (ou na forma coloidal) no meio de cultura contribuiu para uma maior turbidez do meio e um maior do valor de DO. Assim, esse método de leitura da viabilidade microbiana não se caracteriza como um bom método para a determinação do crescimento celular nesse estudo, tendo em conta que os compostos estudados são extremamente hidrofóbicos. Sendo assim, para outros experimentos com POPs, somente a viabilidade a partir da UFC passou a ser utilizada. A inoculação a partir do pré-inóculo, no entanto, continuou sendo feita por meio da leitura prévia da DO, tendo em vista que, nesse caso, o método de densidade ótica se torna válido, já que o pré-inóculo não contém compostos insolúveis.

As Figuras 2.33 e 2.34 apresentam o resultado obtido a partir da recuperação dos compostos nos diferentes meios comparado ao controle que representou 100% de recuperação. Nesse ensaio, a maioria das bactérias apresentaram algum potencial para a degradação dos compostos chegando a

degradação de 18% para o fenantreno, 27% para o PCB 15 e 83% para o dibenzofurano. Em ambos os meios de cultura o fenantreno mostrou diminuição de concentração com significância estatística em relação ao controle para todas as cepas inoculadas. O PCB 15, por outro lado, apresentou diminuição de concentração com significância estatística em relação ao controle para todos as bactérias somente no meio salino. Já as bactérias que mais influenciaram na degradação do dibenzofurano foram a *P. putida*, a *B. gladioli*, a *P. chlororaphis* e a *S. maltophilia*.

2.4.2 - Extração dos POP's do meio de cultivo

2.4.2.1 - Ensaio do solvente de extração

Na literatura pelo menos três solventes são citados para a extração de POPs do meio de cultura sendo o: hexano, diclorometano e acetato de etila (JOHNSEN e KARLSON, 2004; JUHASZ et al., 2000; SINGH et al, 2015; WANG et al., 2016) . Desses três, os dois últimos são os mais comuns, sendo o acetato de etila preferido em muitos casos devido à possibilidade não só da extração dos POPs, mas também dos seus metabólitos. Moody et al., (2001) utilizou acetato de etila para extrair os HPAs fenantreno e antraceno do meio de cultura contendo *Mycobacterium* sp. Metabólitos como 6,7-benzocumarina, 9,10-antraquinona, ácido 1-hidroxinaftóico e ácido ftálico, entre outros foram extraídos juntamente com os HPAs. Wilkes et al., (1996) ao utilizar acetato de etila para extrair dibenzofurano clorados e dibenzo-*p*-dioxinas do meio de cultura contendo *Sphingomonas* sp. extraíram também salicilatos e catecóis mono- e diclorados.

Devido ao acetato de etila e o dicloro metano serem os solvente mais citados, esses dois foram avaliados quanto a sua capacidade de extração do antraceno, do PCB 15 (4,4'-dicloro-bifenila) e Dibenzofurano. A Tabela 2.11 apresenta o resultado para as extrações em triplicata.

TABELA 2.11: Média da áreas dos picos cromatográficos dos POPs extraídos com acetato de etila e diclorometano.

	Acetato de Etila		Diclorometano	
	Média	CV (%)	Média	CV (%)
Fenantreno	1010108,00	4,91	1075847,00	1,70
PCB 15	393545,30*	8,51	4736688,00*	2,97
Dibenzofurano	968620,00	2,58	94,7811,30	1,88

*diferença estatística entre as extrações para os diferentes solventes ($p < 0,05$)

Como pode ser observado na Tabela 2.11, o resultado das extrações apresentaram dados significativamente diferentes apenas para o composto PCB 15, para o qual o diclorometano apresentou uma extração um pouco superior em relação ao acetado de etila. Porém a média geral entre as extrações para os diferentes solventes mostra que o coeficiente de variação foi apenas de 11,42%, o que não representou uma diferença muito grande em relação aos dois solventes. Desse modo, o acetato de etila foi escolhido como solvente de extração devido a pelo menos três motivos principais sendo: i) esse solvente possibilita uma extração mais fácil, já que fica na fase superior do frasco usado no cultivo facilitando a sua recuperação, que é feita por meio de pipeta de Pasteur, ii) esse solvente possibilita também a extração de metabólitos mais polares, como já foi dito anteriormente e iii) esse solvente não é constituído por moléculas cloradas e se trata, portanto, de um solvente menos prejudicial ao meio ambiente, além de ser menos tóxico às pessoas que o manipulam.

2.4.2.2 – Validação do método de extração com acetato de etila

O primeiro ensaio de recuperação dos POPs em meio de cultura foi realizado por meio de uma extração simples, feita pelo método de extração líquido-líquido, cujo procedimento está presente na maioria dos artigos que tratam da extração destes compostos em meio de cultura (KELLEY e CERNIGLIA, 1991; HONG et al., 2004; SWAATHY et al., 20014; WANG et al, 20016). No entanto, como pode ser visto na Tabela 2.12, não foi possível obter uma boa recuperação, pois a porcentagem de recuperação diferiu muito entre os pontos testados (alto, médio e baixo = 11,50 e 0,60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente). A partir desse resultado, fez-se um teste de recuperação apenas para a solução de concentração média, onde se

extraíu os compostos por etapas, isto é, separou-se por centrifugação o meio de cultura da biomassa bacteriana. Como pode ser observado na Tabela 2.12, no caso da extração por etapas, obteve-se uma melhor recuperação dos compostos, com exceção do antraceno. Numa nova tentativa de se melhorar a extração adicionou-se mais uma etapa a esse procedimento, onde além da centrifugação e extração de cada parte separadamente, a fração dos micro-organismos em acetato de etila foi agitada por meio de um equipamento do tipo Turax. Nesse caso, o experimento foi repetido para todas as concentrações de validação analítica (baixo, médio e alto). O resultado final foi a obtenção de uma recuperação superior a 90% para todas as concentrações de fenantreno e pireno investigadas. Já em relação ao antraceno, é notável que houve melhora para as concentrações médias e alta (5,11 e 11,23 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), porém a menor concentração (0,62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) continuou com recuperação inferior, mesmo com a aplicação desse último método.

TABELA 2.12: Recuperação para diferentes formas de extração de HPAs em meio fortificado com três diferentes concentrações*.

Amostra fortificada ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Extração líquido-líquido		Extração fracionada (ponto central)		Extração fracionada (Turax)	
	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)	Recuperação (%)	CV (%)
Fenantreno						
0,62	102,70	0,70			96,80	2,21
5,14	76,78	3,22	94,09	4,37	92,69	4,37
11,31	62,38	0,88			97,13	2,13
Antraceno						
0,61	88,91	2,72			73,01	0,76
5,11	54,09	5,44	65,44	7,40	92,70	2,24
11,23	42,88	1,53			100,84	0,43
Pireno						
0,62	106,37	0,64			93,64	2,36
5,13	56,54	1,99	93,26	6,37	91,73	9,55
11,29	39,30	1,85			101,31	2,35

* valores correspondentes à média de triplicatas; CV = coeficiente de variação.

Visto que as extrações, após a separação por centrifugação, apresentaram melhor recuperação, procurou-se investigar qual a fração de extrato

apresentava a maior concentração dos compostos. Como pode ser observado na Tabela 2.13, esse experimento mostrou que mais de 99% da massa dos compostos é extraída diretamente do pellet de micro-organismos precipitado pela centrifugação. Logo, conclui-se que essa é a fração mais importante da extração, muito provavelmente devido a baixa solubilidade desses compostos em meio de culturas que quando centrifugados tendem a precipitar juntamente com as bactérias e/ou adsorver na superfície celular. Desse modo, ficou evidente a necessidade da centrifugação do meio de cultura para a obtenção de uma melhor recuperação dos compostos na etapa de extração, pois nesse caso, a precipitação dos POPs junto a matriz biológica permite uma extração mais direta, o que contribui para se evitar perdas.

TABELA 2.13: Recuperação dos HPAs em frações diferentes do ambiente de crescimento microbiano.

	Fenantreno		Antraceno		Pireno	
	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)	Recuperação (%)	RSD (%)
Vidro	0,01	9,44	0,01	12,35	0,02	17,22
Meio	0,18	2,75	0,01	5,16	0,09	4,16
Bactérias	99,81	19,11	99,99	25,38	99,89	9,76

Vidro = tubo de cultivo; Meio = meio de cultivo; Bactérias = *pellet* de bactérias *S. maltophilia* precipitado por centrifugação.

Uma vez definido que a etapa de extração necessitava de um fracionamento do cultivo bacteriano e uma maior atenção em relação à fração contendo a biomassa bacteriana, procurou-se substituir o Turax por um meio de agitação do pellet microbiano menos trabalhoso, já que essa etapa deveria contemplar um grande número de amostras. A solução encontrada, nesse caso, foi o uso do ultrassom por 10 min, o que garantiu eficiência de extração superior a 90% dos compostos investigados, exceto para a 1,2,3,4-TCDD que apresentou recuperação próxima a 70%, como pode ser observado na Tabela 2.14.

TABELA 2.14: Recuperação da extração dos POPs para três concentrações da curva analítica.

HPAs				Compostos clorados			
Fortificação (µg)	Sol. 25 mL (µg.ml ⁻¹)	Rec*	CV %	Fortificação (µg)	Sol. 25 mL (µg.ml ⁻¹)	Rec*	CV %
Fluoreno				PCB 1			
25,08	1,00	99,86	1,64	25,39	1,02	99,48	0,73
125,40	5,02	102,37	1,96	126,95	5,08	96,66	0,17
250,80	10,03	104,98	0,78	253,90	10,16	101,57	0,82
Fenantreno				PCB 15			
25,04	1,00	94,54	0,92	25,09	1,00	104,64	0,89
125,19	5,01	97,81	1,79	125,45	5,02	100,41	0,47
250,37	10,01	99,11	0,96	250,90	10,04	104,32	0,47
Pireno				1,2,3,4-TCDD			
25,04	1,00	92,55	1,63	25,04	1,00	66,79	1,93
125,20	5,01	93,23	1,86	125,20	5,01	74,96	1,06
250,40	10,02	94,96	0,84	250,40	10,02	74,88	1,78

Sol = solução; Rec = Recuperação – *Média de triplicatas; CV = coeficiente de variação

Como pode ser observado na Tabela 2.14, não houve desvios abaixo ou acima de 15% entre os pontos baixo, médio e alto, conforme recomendado pela legislação da Anvisa Resolução RDC N° 166/2017, para nenhum dos compostos com o qual o meio foi fortificado. Desse modo, o método de extração por meio da separação das bactérias por centrifugação e extração das frações (frasco de cultura, biomassa microbiana e sobrenadante) caracterizou-se como um método adequado de extração, tanto para os HPAs, quanto para os POPs clorados.

2.4.3 - Otimização das condições cromatográficas

2.4.3.1 - Separação cromatográfica

A coluna selecionada para a análise dos POPs foi a DB-5 UI (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) da Agilent. Essa coluna caracteriza-se como uma coluna do tipo capilar feita a partir de sílica fundidas com fase estacionária dimetilpolisiloxano substituída em 5% com grupos fenil. Swaathy et al. (2014) utilizaram uma coluna HP-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25µm) para a análise de antraceno no processo de

degradação por *Bacillus licheniformis*. Wang et al. (2016), utilizou a coluna HP-5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 μm) para o experimento de biodegradação de 3,3',4,4'-tetraclorobifenil por *Sinorhizobium meliloti*. Lin et al. (2014b), trabalharam com a coluna capilar DB-5MS (60 m x 0,25 mm x 0,25 μm) para a análise da biodegradação de pibenzo-*p*-dioxinas policloradas por *Pseudomonas mendocina*. Apesar de possuírem nomes comerciais diferentes essas colunas são todas análogas, possuindo em comum fase estacionária dimetilpolisiloxano substituída em 5% com grupos fenil. A coluna utilizada nesse experimento, no entanto, possui ainda um diferencial, trata-se de uma coluna UI, ou seja, ultra-inerte. Isso significa que na fase de fabricação essa coluna passou por um processo químico que garante a supressão de grupos silanóis livres proveniente da sílica fundida, os quais podem interferir na análise de compostos reativos levando a diminuição da sensibilidade.

Uma vez definida a coluna que seria utilizada na análise, preparou-se uma solução padrão de cada um dos compostos para a otimização da separação cromatográfica. Os compostos utilizados foram antraceno, fenantreno, fluoreno, PCB 1, PCB 3, PCB 15 e 1,2,3,4-TCDD, sendo os compostos antraceno e PCB 3 usados como padrão interno (um representante dos HPAs e outro representante dos compostos clorados, respectivamente). Para a otimização da separação cromatográfica uma solução única com concentração 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para todos os POPs foi preparada e analisada no GC-MS a partir de uma rampa de temperatura com velocidade de 15 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. O fluxo do gás Hélio foi mantido em 1,2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, o que se caracteriza num fluxo ideal para manter a velocidade linear próxima a 40 $\text{cm}\cdot\text{seg}^{-1}$, velocidade essa que de acordo com a lei de van Deemter (relativa a viscosidade do gás de arraste hélio) leva a uma menor altura do prato teórico (KARASEK e CLEMENT, 1988; BARTLE e MYERS, 2002). Como pode ser visto na Figura 2.35, esse gradiente de temperatura e velocidade de fluxo não foram favoráveis à separação dos compostos antraceno e PCB 15, os quais coeluíram no tempo de retenção de 11,35 min. Deste modo, novos parâmetros para o gradiente de temperatura e fluxo foram investigados. As melhores condições de análise foram encontradas para uma velocidade de aquecimento de 23 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ no início da rampa de temperatura e um fluxo constante de gás Hélio de 1,0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

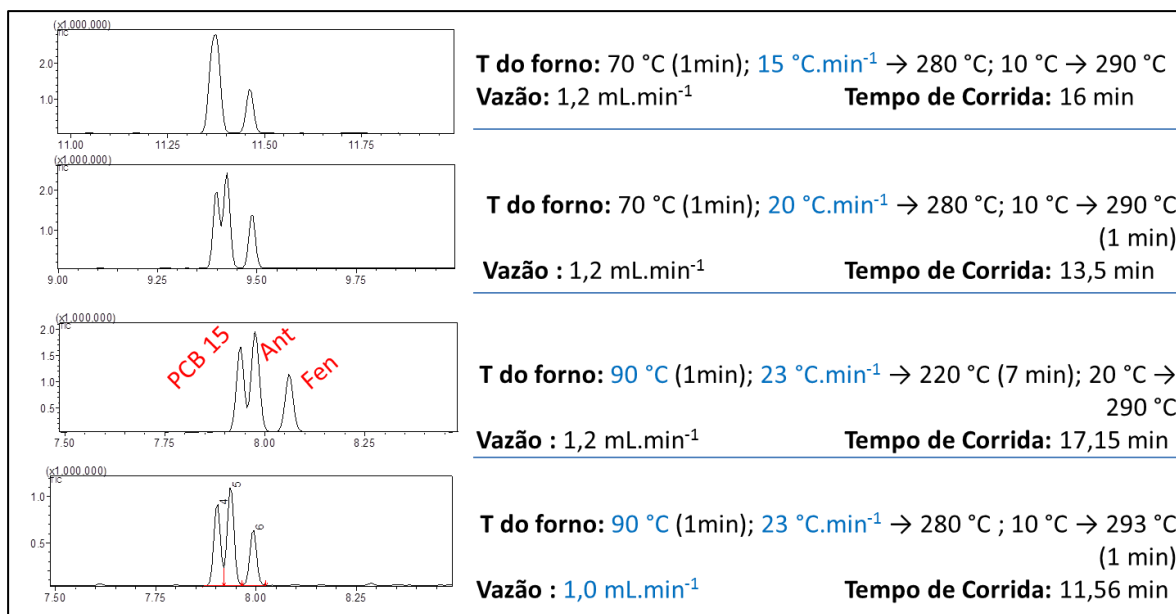


FIGURA 2.35: Exemplos de análises para otimização da separação cromatografica dos padrões.

O tempo total da análise foi de 11,7 min e a separação de todos os compostos pode ser observada na Figura 2.36. Nessa análise observou-se claramente que a separação foi regulada, em grande parte, pela massa molar dos compostos, sendo que os compostos de menor massa foram os primeiros a serem eluídos (1 → PCB 1 = 188,0 g.mol⁻¹; 8 → 1,2,3,4 – TCDD = 322,0 g.mol⁻¹). A separação também foi regulada pelo número de anéis presente no composto. Isso se deve a uma maior interação do tipo π - π com os substituintes fenil da fase estacionária, nesse caso, o pireno (202,0 g.mol⁻¹) acabou tendo maior retenção que o PCB 15 (222,0 g.mol⁻¹), mesmo tendo massa molar menor.

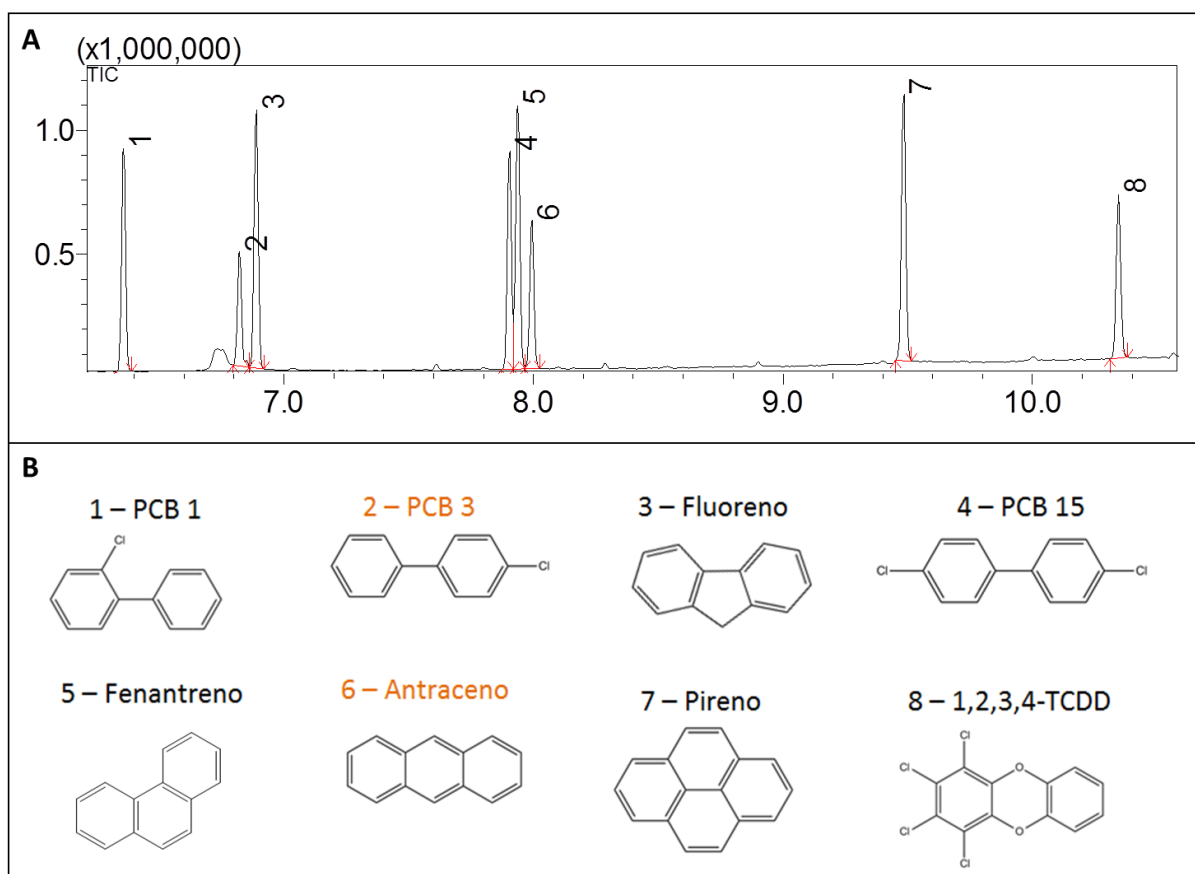


FIGURA 2.36: A) Separação cromatografica dos padrões em coluna DB-5 UI (30 m x 0,25 mm x 0,25µm) J&W Scientific Agilent ; B) Nome e estrutura dos respectivos padrões analisados.

2.4.3.2 - Método quantitativo

Após a otimização da separação cromatográfica por meio do método *Full Scan* (método de varredura total de íons), um método mais seletivo foi utilizado para a realização da análise quantitativa. O método selecionado foi o método SIM (*Selected ion monitoring*), porém o método SRM (*Single Reaction Monitoring*) também foi avaliado (Tabela 2.15). Esse último método apesar de ser o mais seletivo que o primeiro apresentou uma menor sensibilidade para os compostos estudados. Essa diminuição de sensibilidade é muito problemática principalmente para os compostos de maior massa molar e altamente halogenados. Ao serem realizadas as análises nesse trabalho foi possível perceber que a diminuição da sensibilidade está relacionada também a uma diminuição da faixa linear da curva de calibração, o que acaba limitando a análise.

TABELA 2.15: Íons selecionados no modo SIM e no modo SRM para a quantificação e identificação dos compostos estudados.

	Modo SIM			Modo SRM	
	Íon quantificação	Íon referência 1	Íon referência 2	Íon quantificação	Íon referência
Fluoreno	165,0	166,0	82,0	----	-----
Fenantreno	178,0	176,0	152,0	178,0	152,0
Antraceno	178,0	176,0	152,0	178,0	152,0
Pireno	202,0	200,0	101,0	202,0	151,0
PCB 1	188,0	152,0	76,0	188,0	152,0
PCB 3	188,0	152,0	76,0	188,0	152,0
PCB 15	222,0	152,0	224,0	222,0	152,0
1,2,3,4-TCDD	322,0	320,0	257,0	322,0	258,0

Como pode ser observado na Tabela 2.15, o íon de quantificação escolhido para ambos os métodos para quase todos os compostos (com exceção do fluoreno) foi o íon molecular. Isso ocorreu porque esses foram os sinais de maior intensidade (picos base). Como os compostos trabalhados são todos aromáticos, esses caracterizam-se por ser altamente estáveis e compostos de difícil fragmentação. Assim, ocorre uma predominância do íon molecular em detrimento dos outros íons. A alta estabilidade desse tipo de composto também foi observado por Veyrand et al. (2007). Segundo esses autores compostos como os HPAs apresentam fragmentação difícil mesmo sob drásticas condições de ionização. A fragmentação de HPAs por ionização eletrônica leva quase exclusivamente a formação do íon molecular (M^+). Além disso, outro íon comumente formado são aqueles com número de massa $[M-2H]^+$. Desse modo, esse fator além de interferir no tipo de íon formado acaba por interferir também na sensibilidade da análise, por diminuir a quantidade de íons que chegam ao detector.

Os espectros para os compostos estudados encontram-se nas Figuras 2.37 a 2.39. A Figura 2.37 A, B e C apresenta os espectros para os PCBs. A Figura 2.38 A, B, C e D trás os espectros para os HPAs e a Figura 2.39 o Espectro para a dioxina.

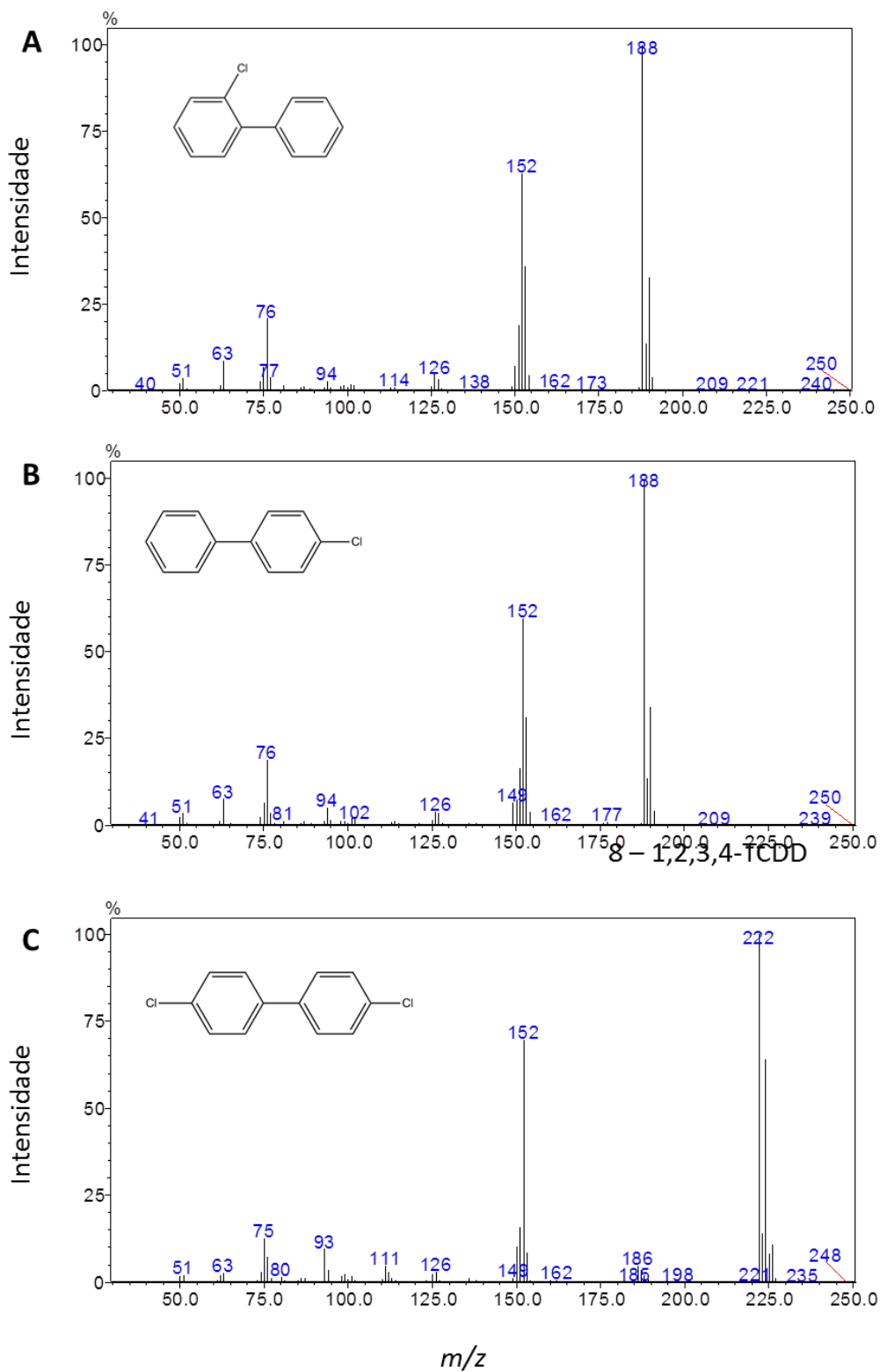


FIGURA 2.37: Espectros de massa obtidos no modo Full Scan para A) PCB 1, B) PCB 3 e C) PCB 15.

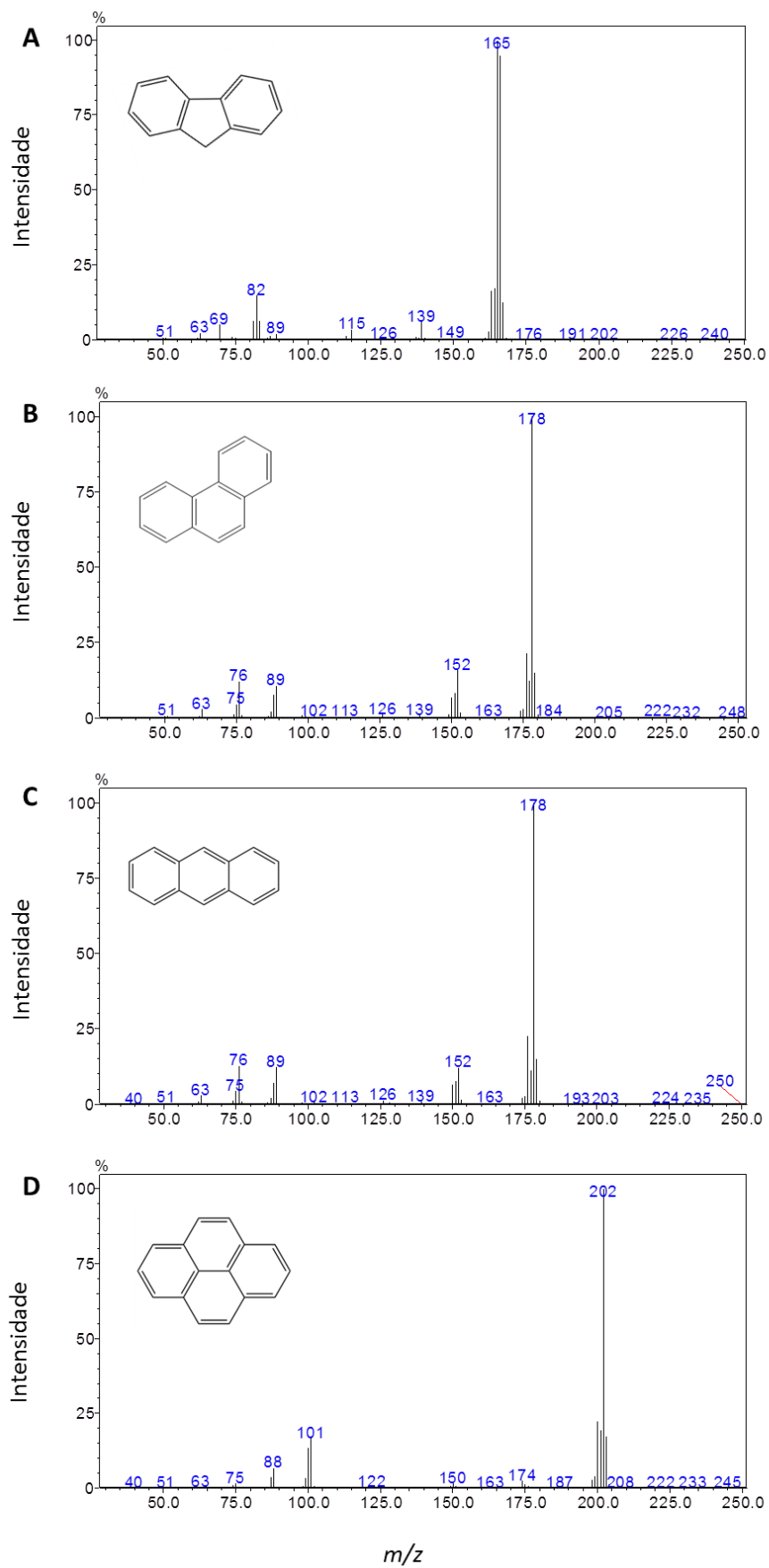


FIGURA 2.38: Espectros de massa obtidos no modo Full Scan para A) Fluoreno, B) Fenantreno, C) Antraceno e D) Pireno.

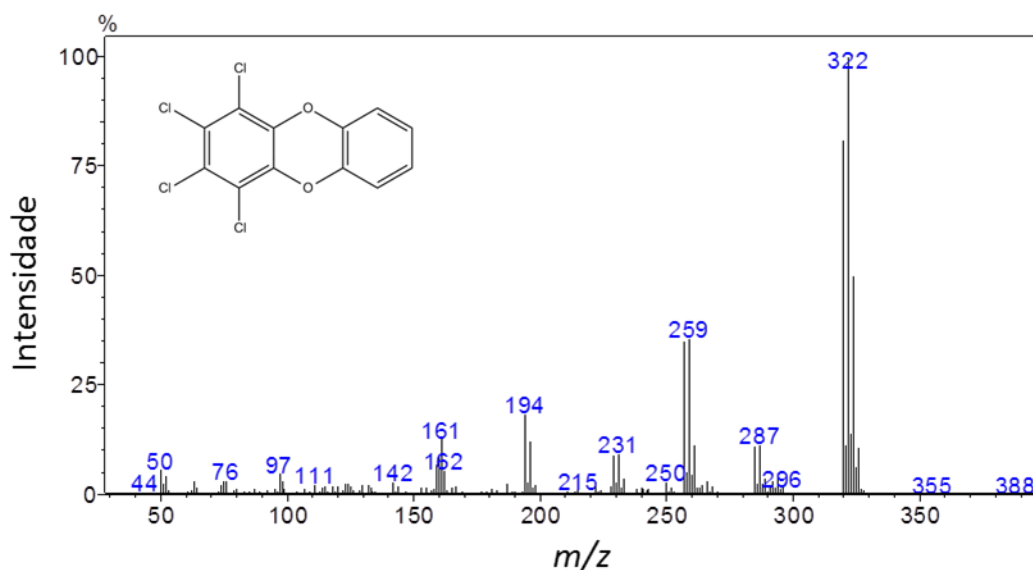


FIGURA 2.39: Espectros de massa para a 1,2,3,4-TCDD.

A Figura 2.37 que apresenta o espectro para os PCBs, indica a perda de um átomo de cloro para os isômeros de posição PCB 1 e PCB 3 (em A e B) levando a formação do íon com m/z 152,0 que é derivado do íon molecular com m/z 188,0. Já para o PCB 15 (em C) ocorre a perda de dois átomos de cloro, passando de m/z 222,0 diretamente ao íon mais estável com m/z 152,0. Os HPAs, na Figura 2.38, mostram a formação de íons bem menos intensos a partir da fragmentação do íon molecular. Isso se deve a grande estabilidade dos anéis aromáticos, para os quais não existe nenhum substituinte capaz de gerar fragmentos com maior estabilidade do que aquela apresentada pelo íon molecular. Já a dioxina, Figura 2.39, mostra claramente a perda de pelo menos um átomo de cloro do íon m/z 322,0 para o m/z 287,0. O fragmento com m/z 259,0 e 251,0 ainda permanecem com três átomos de cloro, enquanto que o fragmento com m/z 194,0 apresenta apenas dois átomos de cloro ligado a estrutura. Esse fato é comprovado pelo padrão isotópico apresentado por substituintes cloro cuja intensidade e número de sinais é regulado pelo número de halogênios ligado a estrutura carbônica. Esse perfil padrão para os átomos de cloro pode ser visualizado na Figura 2.40.

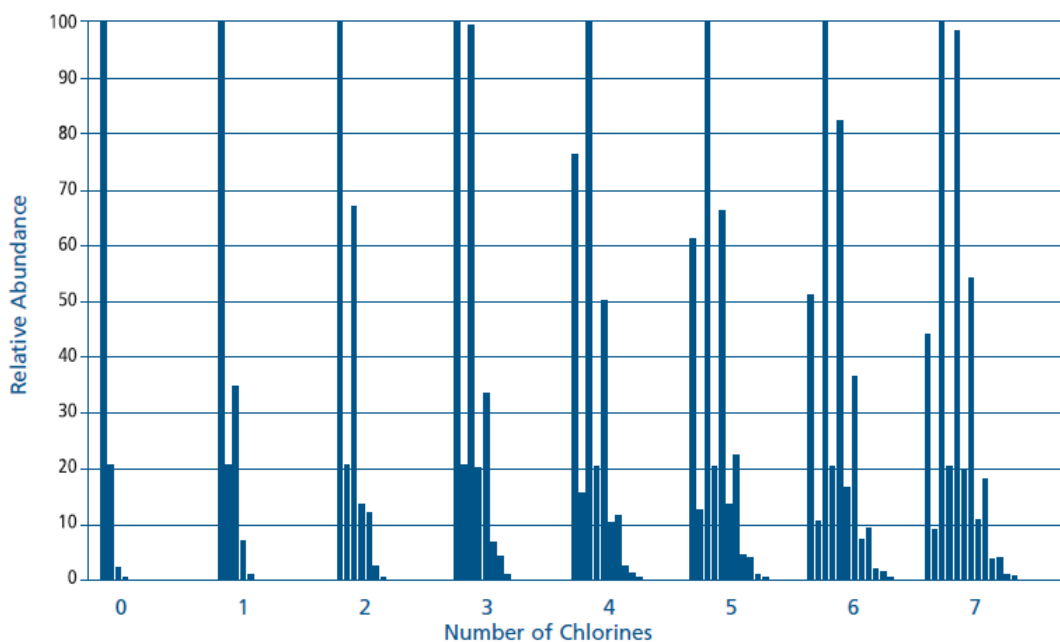


FIGURA 2.40: Padrão isotópico observado para fragmentos contendo de 0 a 5 átomos de Cloro. (Fonte Wellington labs, 2012-2014).

2.4.3.3 - Validação do método cromatográfico

A validação do método quantitativo foi desenvolvida observando parâmetros como, linearidade da curva, limite de quantificação (LQ) e limite de detecção (LD), precisão e exatidão inter- e intradia. Os primeiros parâmetros a serem determinados foram os LQ e LD para todos os compostos, os quais foram estabelecidos por diluições sucessivas da solução dos padrões. A relação sinal/ruído foi utilizada como critério para a obtenção dos valores, sendo que o LQ deve ter um S/R igual a 10 e o LD um S/R igual a 3. A Tabela 2.16, descreve o resultado experimental encontrado para cada um dos parâmetros analisados e a Figura 2.41 ilustra um sinal representativo para LQ e LD do composto Pireno, obtido nesse experimento. Como pode ser observado na Tabela 2.16, os valores de LQ e LD obtidos estão todos na ordem de ng. mL^{-1} , mesmo sendo utilizado o modo de injeção do tipo divisão de fluxo (*split*). Sendo assim, pode se deduzir que, se for necessário a análise de amostras extremamente diluídas, os valores de LQ e LD poderão ser ainda menores pelo uso do modo de injeção *splitless*, o qual se caracteriza pela análise integral da amostra injetada no cromatógrafo. Esse método é comumente utilizado para análises ambientais (análises de matrizes como água e solo), para as quais o analito se encontra a nível traço, necessitando de uma maior sensibilidade

do equipamento (MEZCUA et al., 2004). Além disso, outro fator que limita o valor de LQ e LD é o volume de injeção. Nesse trabalho o volume de injeção foi de 1 μL , o que pode ser considerado como um volume bastante baixo tendo em vista outros trabalhos presentes na literatura que usam desde de 2 até 5 μL (ROSE et al., 2007; GAO, et al., 2013). Mesmo com a injeção de um volume baixo de amostra, o limite de detecção obtido para esse método foi menor que $3,30 \text{ ng.mL}^{-1}$, enquanto Rose et al., (2007) ao injetar 5 μL de amostra que era extrato de óleos contendo HPAs obtiveram limites de detecção que chegou a 2 ng.mL^{-1} .

TABELA 2.16: Limites de quantificação e detecção para o modo SIM.

	Fluoreno	Fenantreno	Pireno
LQ (ng.mL^{-1})	4,11	3,07	1,81
LD (ng.mL^{-1})	1,46	1,45	0,72
	PCB 1	PCB 15	1,2,3,4-TCDD
LQ (ng.mL^{-1})	4,03	3,02	8,80
LD (ng.mL^{-1})	1,43	1,81	3,30

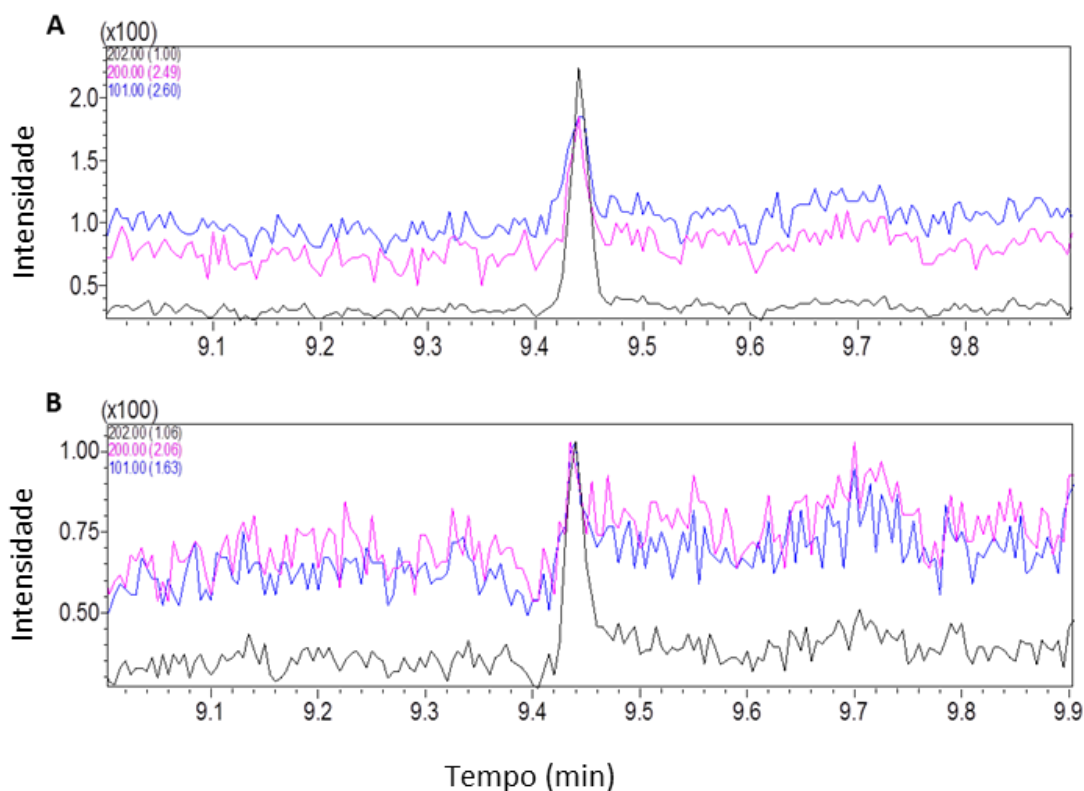


FIGURA 2.41: A) limite de quantificação e B) limite de detecção para o pireno.

A curva de calibração (faixa linear de trabalho) foi definida desde valores acima de 20% da concentração máxima que seria aplicado nos experimento de biodegradação ($12 \mu\text{g.mL}^{-1}$), até valores de 0,2% ($0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$). No entanto, essa curva não apresentou boa linearidade em toda a sua extensão, deste modo a faixa linear de trabalho foi estabelecida para concentrações entre 12 até $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Com esse novo intervalo, obteve-se excelente correlação entre a área do pico e as concentrações nominais, obtendo-se melhores valores de exatidão e precisão. A exatidão e precisão para os pontos das curvas analíticas podem ser observadas nas Tabelas 2.17 e 2.18.

TABELA 2.17: Exatidão e precisão da faixa linear de trabalho para os HPAs em solvente acetato de etila.

Fluoreno				Fenantreno				Pireno			
Conc. ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média * $A_{P/IP}$	CV%	Exatidão %	Conc. ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média * $A_{P/IP}$	CV%	Exatidão %	Conc. ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média * $A_{P/IP}$	CV%	Exatidão %
0,5	0,32	0,88	98,4	0,5	0,45	0,85	94,7	0,5	0,51	1,11	104,6
1,0	0,63	1,12	99,3	1,0	0,90	0,72	97,6	1,0	1,00	1,26	100,6
2,1	1,27	1,42	100,6	2,0	1,82	0,84	100,4	2,0	2,01	0,80	99,8
4,1	2,52	0,65	100,8	4,1	3,65	0,57	101,4	4,0	4,07	0,52	100,6
6,2	3,75	0,93	99,9	6,1	5,39	0,59	100,2	6,0	6,05	0,26	99,5
8,2	4,98	0,65	99,7	8,2	7,18	0,42	100,2	8,1	8,10	1,57	99,8
10,3	6,20	0,29	99,5	10,2	8,89	0,44	99,3	10,1	10,05	0,64	98,9
12,3	7,51	0,47	100,4	12,3	10,75	0,71	100,2	12,1	12,30	0,80	100,9
R ² = 0,9999				R ² = 0,9999				R ² = 0,9998			

* média de triplicatas da área do padrão pelo padrão interno; CV% = coeficiente de variação; R² = coeficiente de determinação.

TABELA 2.18: Exatidão e precisão da faixa linear de trabalho para os POPs clorados em solvente acetato de etila.

PCB 1				PCB 15				1,2,3,4-TCDD			
Conc. ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média* A _{PVP}	CV%	Exatidão %	Conc. ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média* A _{PVP}	CV%	Exatidão %	Conc. ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média* A _{PVP}	CV%	Exatidão %
0,5	0,47	0,89	101,5	0,5	0,41	0,95	108,9	0,6	0,21	0,73	106,2
1,0	0,94	0,71	100,0	1,0	0,82	0,61	102,3	1,1	0,41	1,72	100,9
2,0	1,90	0,46	101,0	2,0	1,66	0,72	100,7	2,2	0,83	0,71	99,6
4,0	3,78	0,38	100,5	4,0	3,34	0,38	100,0	4,4	1,68	0,28	99,5
6,0	5,62	0,33	99,5	6,0	4,95	0,62	98,2	6,6	2,52	0,87	99,1
8,1	7,57	0,62	100,5	8,0	6,72	0,94	99,7	8,8	3,42	2,19	100,6
10,1	9,40	0,50	99,9	10,1	8,37	0,59	99,2	11,0	4,24	0,32	99,6
12,1	11,36	0,52	100,6	12,1	10,24	0,51	101,1	13,2	5,12	0,88	100,3
R ² = 0,9999				R ² = 0,9997				R ² = 0,9999			

* média de triplicatas da área do padrão pelo padrão interno; CV% = coeficiente de variação; R² = coeficiente de determinação.

Como pode ser visto, todos os pontos para as 6 cuvas analíticas construídas em solução, a partir da diluição da solução de trabalho apresentaram exatidão próxima a cem por cento, com coeficientes de variação menores que 3%. Com esse resultado, restou saber se haveria algum efeito de matriz para esse método a partir da injeção de todos os pontos da curva preparados diretamente no extrato do meio de cultura. A Tabela 2.19 apresenta a razão entre o coeficiente angular da curva no solvente e o coeficiente angular da curva na matriz. Como pode ser visto, todas as razões entre coeficientes mostram que os desvios não ultrapassam o valor de 6%, podendo ser considerados erros aleatórios. Isso fica também muito claro quando as duas curvas, matriz e solvente, são sobrepostas (Figuras 2.42). Desse modo, pode se concluir que esse método não apresenta efeito de matriz, podendo a quantificação ser realizada através de curvas em solução. Por isso, o restante da validação foi realizada apenas para a padrões preparados no solvente.

TABELA 2.19: Razão entre o coeficiente angular da curva na matriz e a curva no solvente.

	Coeficiente angular curva na matriz	Coeficiente angular curva no solvente	Razão a_{solv} e a_{mat}
Fluoreno	0,61198	0,60520	1,01
Fenantreno	0,85790	0,87294	0,98
Pireno	0,95151	1,01115	0,94
PCB 1	0,92039	0,93496	0,98
PCB 15	0,81808	0,84378	0,97
1,2,3,4-TCDD	0,37737	0,38855	0,97

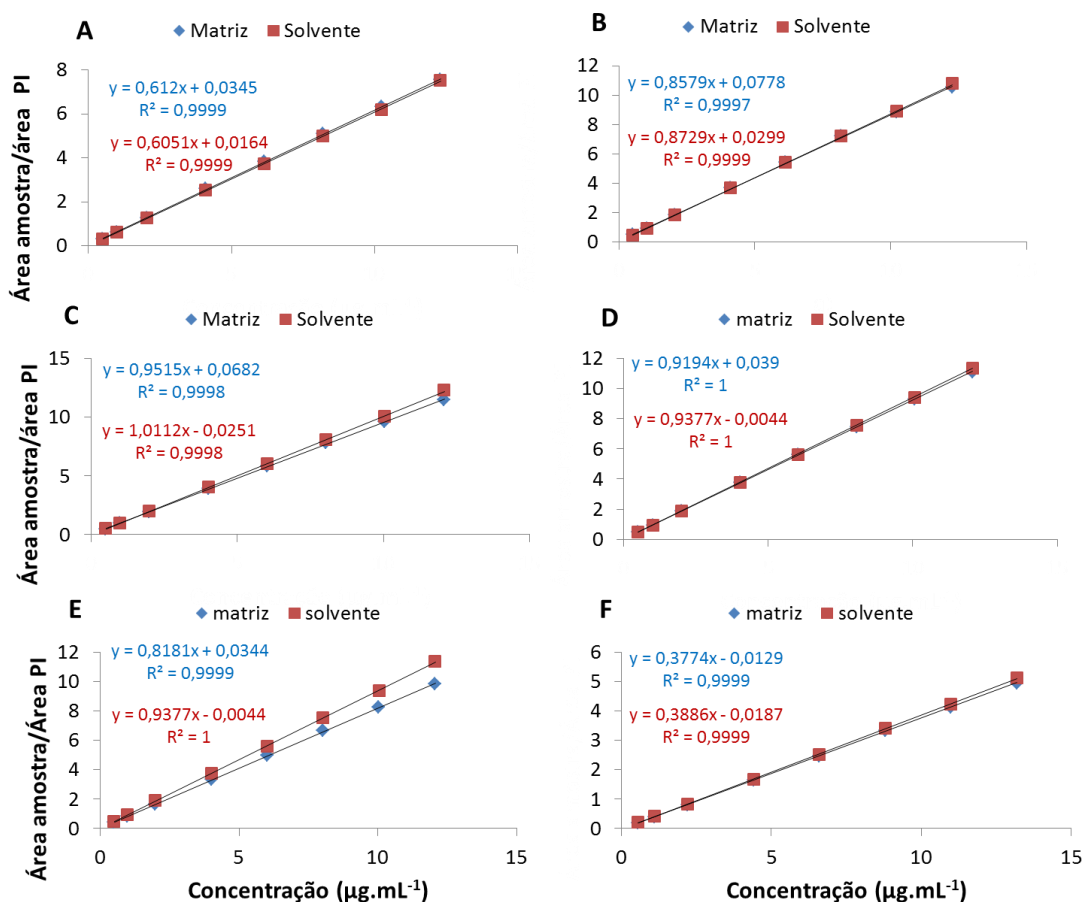


FIGURA 2.42: Curva de calibração em solvente e na matriz para os POPs: A) Fluoreno, B) Fenantreno, C) Pireno, D) PCB 1, E) PCB 15 e F) 1,2,3,4-TCDD.

É importante destacar que essa validação não foi a única realizada para esses compostos. A primeira validação não foi bem sucedida devido a uma perda de sensibilidade que foi observada entre os dias sucessivos de análise. Uma investigação do problema na literatura (MEYER et al. 2007), revelou que essa questão está relacionada a uma adsorção dos compostos em diferentes setores do cromatógrafo à gás como no *liner* do injetor e própria na coluna analítica utilizados. Segundo Meyer et al. (2007), a adsorção ocorre em regiões reativas presente na

sílica que é o principal constituinte desses materiais. Os autores observaram que quando *liners* comuns (sem desativação prévia) são usados no equipamento de GC ocorre perda de sensibilidade no sinal de HPAs como consequência de adsorção nesse material. Como pode ser observado na Figura 2.43 a adsorção dos compostos no *liner* e coluna levou a um severo decaimento na área do pico dos compostos fenantreno e antraceno, nos períodos inter-dia de análise.

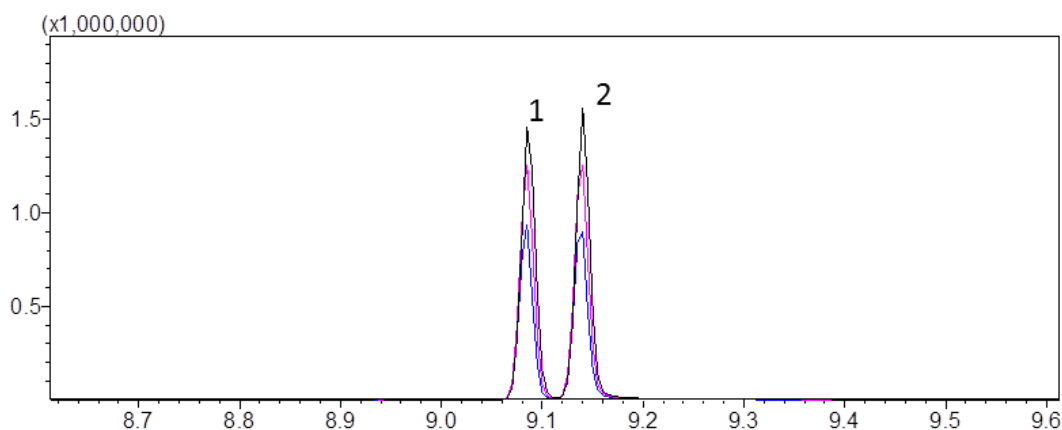


FIGURA 2.43: Decaimento dos picos do fenantreno (1) e antraceno (2), nos três dias não consecutivos de validação interdia do método analítico (dia 1 – preto; dia 2 – rosa; dia 3 – azul).

Como consequência dessa adsorção dos compostos, as primeiras curvas trabalhadas para os POPs não apresentaram boa linearidade. Deste modo, *liners* inertes e também uma coluna UI (ultra inerte) foram adquiridos e avaliados para a correção desse problema. A Tabela 2.20 apresenta os valores de coeficiente de variação e exatidão para os métodos obtidos para a coluna Rtx-5ms (Restek) e para a coluna DB-5 UI (Agilent), para o composto pireno. A análise dos dados obtidos para o primeiro método, na coluna sem desativação, revelou uma acentuada tendência de dispersão na precisão (CV%) e exatidão dos métodos. Por outro lado, a variação dos valores de exatidão foi bem mais aleatória para os pontos da curva estabelecidos por meio do *liner* e coluna inertes.

TABELA 2.20: Exatidão e coeficiente de variação calculados para as curvas analíticas do pireno obtidos por liner e coluna comuns e *liner* e coluna inertes.

Rtx-5 e <i>liner</i> comum				DB-5 UI e <i>liner</i> ultrainerte			
Pireno ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média	CV%	Exatidão %	Pireno ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média	CV%	Exatidão %
0,5	0,77	3,53	110,4	0,5	0,51	1,11	104,6
1,0	1,52	0,93	98,4	1,0	1,00	1,26	100,6
2,0	3,08	3,27	94,4	2,0	2,01	0,80	99,8
4,1	6,52	0,71	97,0	4,0	4,07	0,52	100,6
6,7	9,97	0,55	97,9	6,0	6,05	0,26	99,5
8,2	13,45	1,89	98,6	8,1	8,10	1,57	99,8
10,7	17,34	0,76	101,4	10,1	10,05	0,64	98,9
12,3	21,29	0,24	103,5	12,1	12,30	0,80	100,9

Uma análise mais aprofundada do modelo linear feita a partir do cálculo de resíduos para o método com *liner* e coluna sem serem ultra-inertes (Fig. 2.44 A) para esse composto, não só deixa claro que a linearidade da curva não foi boa, como também acaba mostrando que essa curva está apresentando uma forte tendência quadrática. De outro modo, quando esses consumíveis são substituídos pelo material inerte (Fig 2.44 B) essa tendência desaparece tornando o resíduo muito mais aleatório. Essa tendência é vista não somente para o pireno, mas para todos POPs utilizados nesse estudo.

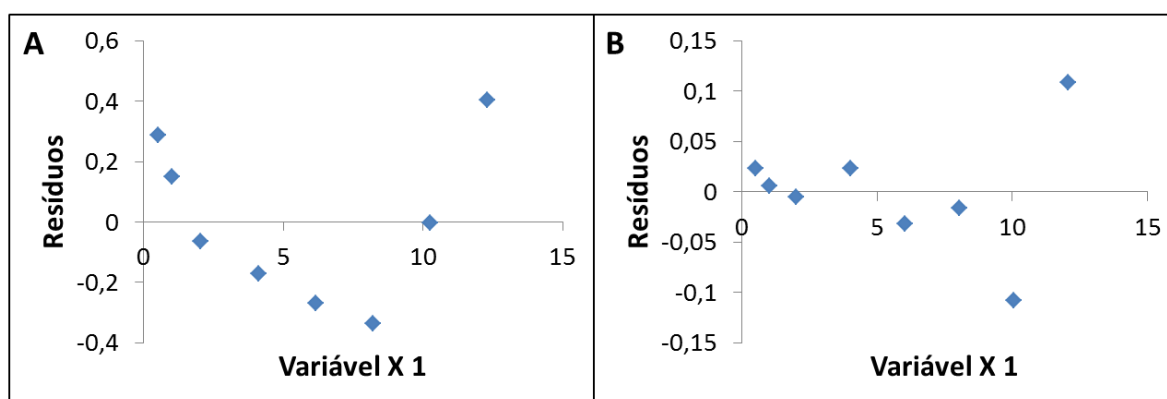


FIGURA 2.44: Resíduos calculados para a curva do Pireno obtidos em (A) *liner* e coluna comuns e (B) *liner* e coluna inertes.

Com esses resultados, ficou evidente a necessidade do uso de materiais ultra-inertes no equipamento de GC-MS para o estudo de POPs. Toda a validação do método e análise dos dados foram feitos a partir desses materiais. As

Tabelas 2.21 e 2.22 trazem os valores de precisão e exatidão obtidos para a análise inter e intradia de amostras em concentrações classificadas como baixa, média e alta (aproximadamente 0,60, 7,0 e 11,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente) em relação a curva de calibração para os HPAs e para os compostos clorados. Essa etapa da validação mostrou que não ocorrem desvios inferiores ou superiores de 15% para esse método, mesmo que a análise seja feita em diferentes períodos do dia ou mesmo diferentes dias da semana. Um desvio menor que 15% é recomendado pela legislação da Anvisa Resolução RDC Nº 166/2017 que rege os métodos analíticos nacionais. Deste modo, o método proposto acima foi adotado como um instrumento efetivo para a análise dos POPs estudados.

TABELA 2.21: Valores de precisão e exatidão interdia e intradia para o método de análise dos HPAs.

Variação interdia										
Dia	Replicatas	Fenantreno			Fluoreno			Pireno		
		$\mu\text{g.mL}^{-1}$	Exatidão (%)	CV (%)	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	Exatidão (%)	CV (%)	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	Exatidão (%)	CV (%)
1	5	0,6	96,5	2,91	0,6	99,7	3,02	0,6	102,7	3,76
1	5	7,2	102,2	0,38	7,2	102,1	0,41	7,1	98,5	0,25
1	5	11,2	101,6	0,35	11,3	101,8	0,24	11,1	98,8	0,59
2	5	0,6	99,7	3,02	0,6	101,0	1,41	0,6	103,3	1,58
2	5	7,2	102,1	0,41	7,2	100,3	0,81	7,0	97,0	0,98
2	5	11,2	101,8	0,24	11,3	100,8	0,84	11,1	97,9	0,83
3	5	0,6	98,2	0,92	0,6	104,9	1,03	0,6	97,4	0,94
3	5	7,2	103,9	0,44	7,2	107,8	0,70	7,0	96,0	0,49
3	5	11,2	103,1	0,31	11,3	107,5	0,27	11,1	96,6	0,45
Variação intradia										
Dia	Replicatas	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	Exatidão (%)	CV (%)	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	Exatidão (%)	CV (%)	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	Exatidão (%)	CV (%)
-	15	0,6	100,2	1,38	0,6	96,2	2,38	0,6	99,1	2,07
-	15	7,2	98,5	3,49	7,2	95,5	3,20	7,0	103,1	0,72
-	15	11,2	98,8	3,38	11,3	95,4	2,85	11,1	102,2	0,68

CV – coeficiente de variação

TABELA 2.22: Valores de precisão e exatidão interdia e intradia para o método de análise dos compostos clorados.

Variação interdia										
Dia	Replicatas	PCB 1			PCB 15			1,2,3,4-TCDD		
		$\mu\text{g.mL}^{-1}$	Exatidão (%)	CV (%)	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	Exatidão (%)	CV (%)	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	Exatidão (%)	CV (%)
1	5	0,6	100,1	3,30	0,6	103,6	2,53	0,6	85,3	3,24
1	5	7,1	100,6	0,31	6,9	98,8	0,22	6,9	90,7	1,11
1	5	11,2	100,8	0,52	10,9	99,4	0,70	11,4	93,6	1,09
2	5	0,6	101,0	1,41	0,6	103,3	1,58	0,6	91,5	1,55
2	5	7,1	100,3	0,81	6,9	97,0	0,98	6,9	92,4	0,94
2	5	11,2	100,8	0,84	10,9	97,9	0,83	11,4	95,7	0,96
3	5	0,6	100,9	1,49	0,6	103,3	1,10	0,6	92,8	1,68
3	5	7,1	102,0	0,38	6,9	99,7	0,61	6,9	96,6	0,32
3	5	11,2	101,5	0,37	10,9	99,6	0,65	11,4	98,7	0,77

Variação intradia										
Dia	Replicatas	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	Exatidão (%)	CV (%)	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	Exatidão (%)	CV (%)	$\mu\text{g.mL}^{-1}$	Exatidão (%)	CV (%)
-	15	0,6	99,8	1,08	0,6	99,7	1,26	0,6	95,0	3,92
-	15	7,1	99,9	0,63	6,9	100,3	0,73	6,9	97,8	1,96
-	15	11,2	99,9	0,67	10,9	100,2	0,61	11,4	99,0	1,04

CV – coeficiente de variação

Normalmente os estudos da literatura que tratam de biodegradação de POPs não costumam trazer a validação do método quantitativo empregado (BAUTISTA et al., 2009; CHEN et al., 2013; GHOSH e MUKHERJI, 2016). Isso ocorre porque esses trabalhos procuram dar ênfase aos micro-organismos degradadores e são publicados em revista cujo escopo encontra-se voltado mais especificamente para os processos de biodegradação. Em revistas que tratam da questão analítica ligada à determinação de POPs, a validação do método analítico sempre é destacada. Nesse caso, no entanto, a determinação de POPs geralmente está voltada a amostras biológicas e ambientais (CAMINO-SÁNCHEZ et al., 2011; LUZARDO et al., 2013; LIN et al., 2015). Luzardo et al. (2013) validaram um método de determinação para 57 POPs em leite materno e colostro em GC-MS observando parâmetros como recuperação, LQ e LD, faixa linear de trabalho e precisão e exatidão inter e intra-dia. Esses autores constataram que o método foi satisfatório, pois eles encontraram limites de quantificação baixos ($0.1-0.4 \mu\text{g L}^{-1}$) e precisão e exatidão com variação menor que 16%. Já Lin et al. (2015), ao validar um método de determinação de bifenilas policloradas por GC-MS, encontraram variação da precisão do método menor que 4,3%.

Vale destacar que para a construção da metodologia de análise dos POPs por GC-MS foi necessário, ainda, ter cuidado com o efeito de memória (*carry over*) nas injeções sucessivas. Esse tipo de efeito foi observado logo no início dos trabalhos e foi corrigido por meio de alguns ajustes realizados principalmente no modo de injeção do equipamento. Efeitos de memória semelhantes foram observado por Ladak et al. (2014) na análise de dioxinas em GC-MS. O trabalho desses autores sugere o uso de um *liner* especial para a correção do problema, além de cuidados com a lavagem da seringa e com a temperatura de injeção. Deste modo, as medidas tomadas para resolver esse problema consistiram basicamente no ajuste da sequência de lavagem da seringa com dois solventes de polaridades diferentes (acetato de etila e diclorometano), aumento no número de lavagens e o aumento da temperatura do injetor de 250 para 290 °C. A Figura 2.45 ilustra a comparação entre as análises com e sem o efeito de memória detectado.

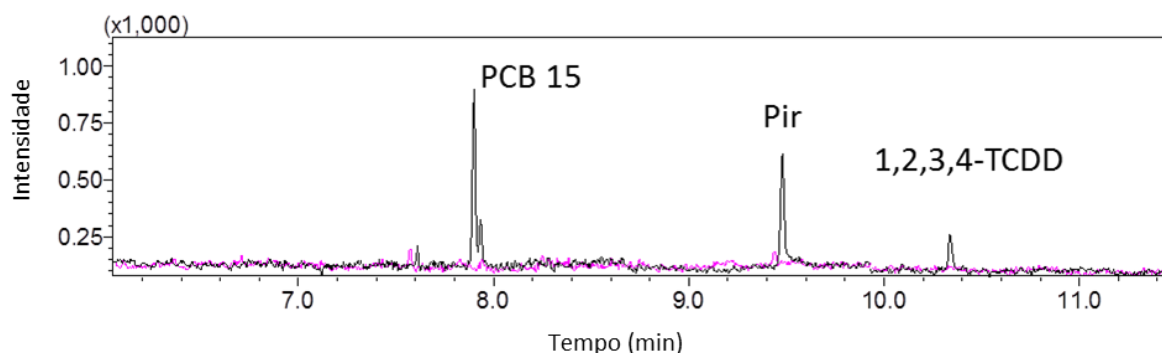


FIGURA 2.45: Efeito de memória obtido na separação cromatográfica de POPs em GC-MS (preto) e eliminação do efeito após a aplicação de medidas corretivas (rosa).

2.4.4 - Perfil de degradação

2.4.4.1 - Ensaio do efeito de aditivos no meio de cultura sobre a biodegradação

Depois de se ter definido e validado o método de análise e extração realizou-se um experimento para a definição do melhor meio de cultura para a degradação dos POPs. Nesse teste foram utilizados quatro meios de cultura diferentes: meio salino; meio salino com adição do surfactante Tween® 80 a 0,1% (m/v), meio salino com adição de fonte de carbono, glicose a 0,2 % (m/v) e YNB (*Yeast Nitrogen Base*) com adição de Tween® 0,1 e 0,2% (m/v) de glicose, o qual se

configurava como um meio mais rico e completo. O resultado da recuperação para o fluoreno, fenantreno e pireno se encontra nas Figura 2.46 e 2.47.

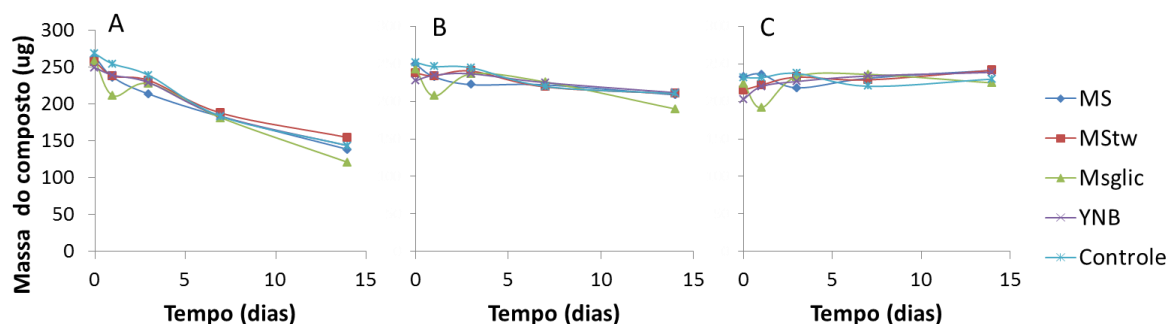


FIGURA 2.46: Resultado da recuperação dos compostos A) fluoreno, B) fenantreno e C) pireno em meio contendo *Burkholderia gladioli*, por 0, 1, 3, 7 e 14 dias.

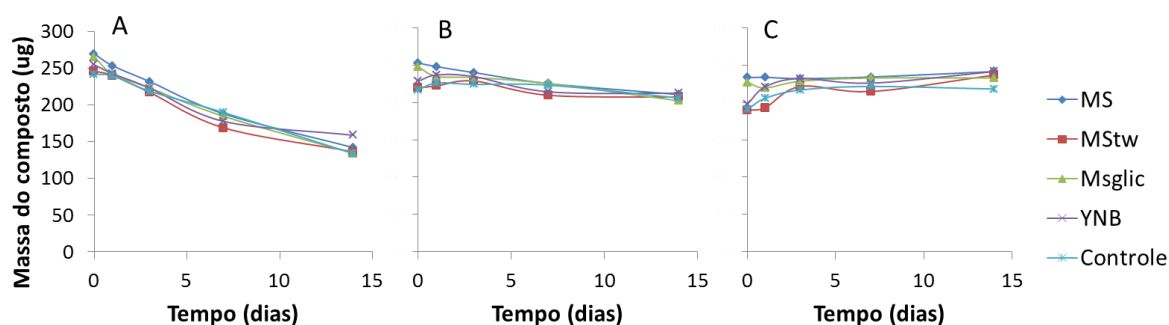


FIGURA 2.47: Resultado da recuperação dos compostos A) fluoreno, B) fenantreno e C) pireno em meio contendo *Stenotrophomonas maltophilia*, por 0, 1, 3, 7 e 14 dias.

Como pode ser visto nas Figuras 2.46 e 2.47 os resultados para ambas as bactérias, *Burkholderia gladioli* e *Stenotrophomonas maltophilia*, foi muito semelhantes. Por meio da observação dos gráficos, pode se concluir que em 14 dias de experimento houve uma diminuição acentuada da quantidade de fluoreno (mais de 50%) no meio de cultura, uma pequena diminuição do composto fenantreno e nenhuma perda para o composto pireno. Ao se analisar os dados em comparação ao controle sem bactéria, percebe-se que não houve biodegradação. Desse modo, conclui-se que esse resultado se deve a uma perda ambiental dos compostos fluoreno e fenantreno, provavelmente por volatilização. Essa hipótese é razoável já que pode ser notado que quanto menos anéis presentes no HPAs, maior foi a perda ao longo dos dias, sendo que não houve perda para o composto de 4 anéis

aromáticos, o pireno. De acordo com Earl et al. (2003), HPAs de maior peso molecular, considerado como sendo aqueles com mais de 4 anéis, quando lançados no ambiente, têm menor probabilidade de sofrer transporte atmosférico de longo alcance e pode se esperar que sejam depositados nas proximidades do ponto de descarga. Isso significa que esse número de anéis é limitante no que diz respeito a pressão de vapor desse tipo de substância. Logo, a existência de 4 anéis no composto pode ter tornado a pressão de vapor baixa o suficiente não só para evitar a distribuição dessas substâncias no meio ambiente, mas para evitar perdas no processo de biodegradação utilizado nesse estudo.

Com esse resultado negativo para a degradação dos HPAs, optou-se por uma mudança de estratégia diante do experimento de degradação. A primeira alteração foi feita no meio de cultura. Observou-se que a quantidade de sulfato feroso utilizado no meio de cultura era 10 vezes menor do que àquela normalmente utilizada na literatura (FURUKAWA et al. 1978; HADIBARATA e TACHIBANA, 2010), por isso a quantidade desse composto passou de 1 mg.L⁻¹ para 10 mg.L⁻¹. Além dessa alteração na quantidade de ferro, outros elementos essenciais foram também adicionados ao meio de cultura, tais como manganês, molibdênio, cobalto e zinco, conforme o meio utilizado por Hadibarata e Tachibana (2010). Já em relação as bactérias, novas cepas foram selecionadas para o trabalho. Tendo em vista o resultado negativo diante das cepas que vinham sendo usadas com repiques constantes, cepas de um preservado mais antigo (com menor número de repiques) foram eleitas para a continuidade do trabalho.

2.4.4.2 - Ensaio de degradação dos HPAs

Para o ensaio de degradação dos HPAs foram selecionadas 14 bactérias isoladas da *Diabrotica speciosa*. Dentre essas bactérias estavam todas aquelas selecionadas para o pré-ensaio de biodegradação que constatou o potencial dessas bactérias para a degradação de POPs. O principal requisito para a seleção dessas bactérias foi o relato na literatura do potencial que o gênero apresentava para esse tipo de ensaio. Assim, todas as *Pseudomonas* isoladas do inseto foram eleitas, por ser esse um dos gêneros mais citados (PHILIPPI et al., 1982; GIBSON et al., 1993; JUHASZ, et al., 1996; JOHNSEN et al., 1996; WILKES et al., 1996; JUHASZ et al., 2000; KOMANCOVÁ et al., 2003; DAS e MUKHERJEE, 2007; WASI

et al., 2013; GHOSH e MUKHERJI, 2016; PUGAZHENDI et al., 2017). Ao todo foram ensaiadas cinco bactérias desse gênero sendo a: *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas monteilii*, *Pseudomonas mosselii*, *Pseudomonas chlororaphis* e *Pseudomonas sp.* O gênero *Burkholderia* também é outro gênero bastante citado na literatura (PARSONS et al., 1998; POTRAWFKE et al., 1998; KANALY e HARAYAMA, 2000; RODRIGUES et al., 2006; CHEN, et al., 2013), sendo utilizado nesse trabalho a espécie *Burkholderia gladioli*. As espécies *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella oxytoca* são espécies já relatadas na literatura, principalmente com relação ao seu potencial para a degradação de HPAs. Poucos relatos, no entanto, citam o caso da degradação de PCBs, para o qual a espécie *Stenotrophomonas maltophilia* se destaca (JUHASZ et al., 2000; TOLEDO et al., 2006; 2000; ZHANG e ZHU, 2012; GAO et al., 2013; SINGH et al., 2015; DUDÁŠOVÁ et al., 2016). No entanto, os trabalhos da literatura que citam o uso dessas bactérias foram conduzidos sempre pelo isolamento das cepas de ambientes contaminados com algum tipo de POP, não tendo como fonte nenhum organismo vivo. O gênero *Delftia* é citado apenas para a degradação de HPAs, sendo também destacado por sua tolerância a anilina (LIU et al., 2002; WU et al., 2015). Já o gênero *Rhizobium* foi escolhido por ser um gênero associado à raiz das plantas, sendo que esse ambiente chamado de rizosfera é constantemente relacionado à degradação de POPs, por intermédio de micro-organismos relativos a essa região (MEAGHER, 2000; KUIPER et al., 2004).

A Figura 2.48 traz o resultado para o crescimento microbiano em UFC.mL⁻¹ para as 14 bactérias realizadas em meio contendo HPAs para os 14 dias de experimento. Como observado, destaca-se nesse experimento a bactéria *Serratia marcescens* que teve o maior crescimento entre as bactérias avaliadas e a *Delftia acidovorans* que de todos os micro-organismos foi aquele que apresentou o menor crescimento. No geral, porém, pode ser constatado que apesar do crescimento não ter sido muito intenso durante o experimento devido à escassez de fonte de carbono no meio mineral, ao qual os micro-organismos foram submetidos, a viabilidade das bactérias foi mantida durante todo o experimento. De mesmo modo, praticamente não houve nenhuma alteração do pH do meio de cultura medido durante os 14 dias de experimento, havendo apenas um pequeno decréscimo para a bactéria de maior crescimento a *Serratia marcescens* (Figura 2.49). Vale destacar que o pH das culturas foi medido devido a influência que esse tem no funcionamento das enzimas,

que possuem sempre um pH ótimo de trabalho. Embora, o valor de pH inicial das culturas possa diferir em muitos trabalhos encontrados na literatura, no geral, o pH 7 é escolhido pela maior parte dos autores como sendo o pH ideal para a degradação dos POPs (WEISSENFELS et al., 1990; SEEGER et al., 2001; WONG et al., 2002).

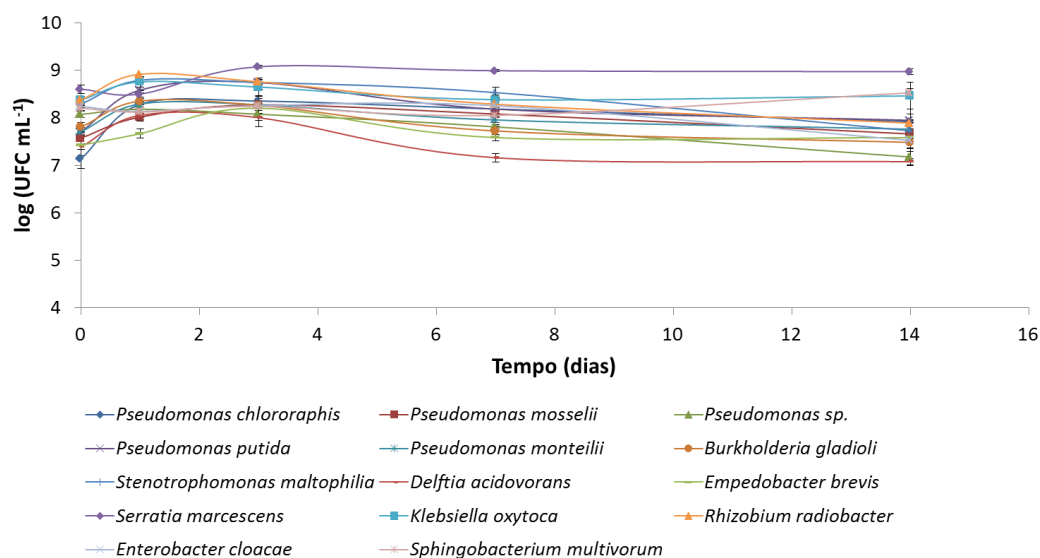


FIGURA 2.48: Crescimento microbiano medido em 14 dias de experimento para os compostos Fluoreno, Fenantreno e Pireno.

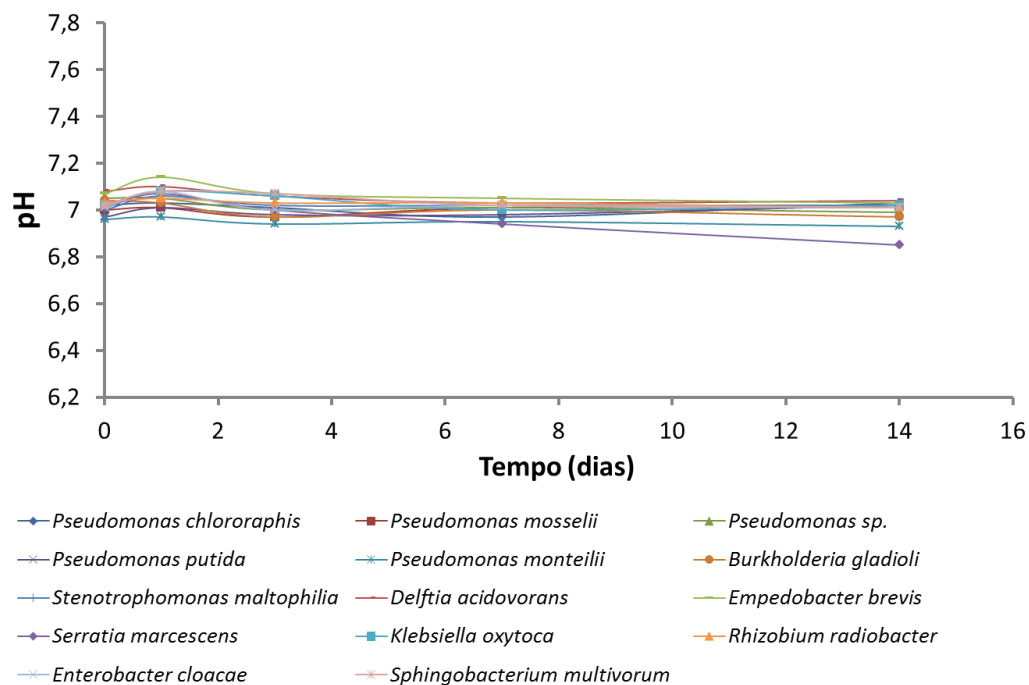


FIGURA 2.49: Medida de pH do meio de cultura em 14 dias de experimento.

As Figura 2.50 a 2.51, abaixo, trazem o resultado para o experimento de biodegradação medidos para os dias 0, 1, 3, 7 e 14.

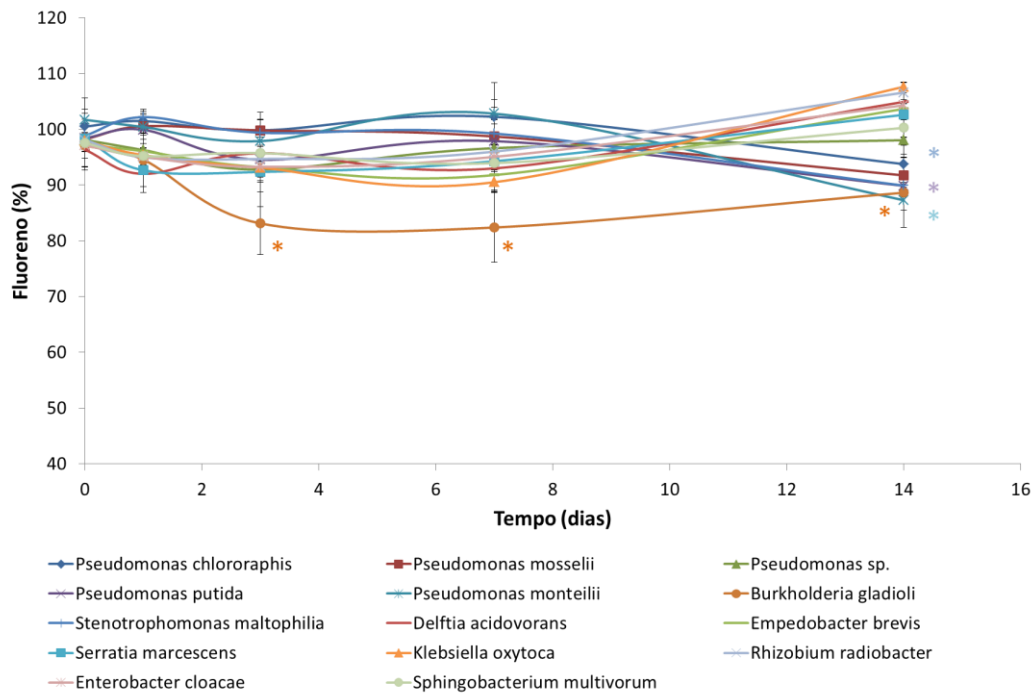


FIGURA 2. 50: Biodegradação de fluoreno, com porcentagem em massa, frente a 14 bactérias isoladas da *D. speciosa* (asterisco significa diferença estatística, $p < 0,05$, em relação ao controle).

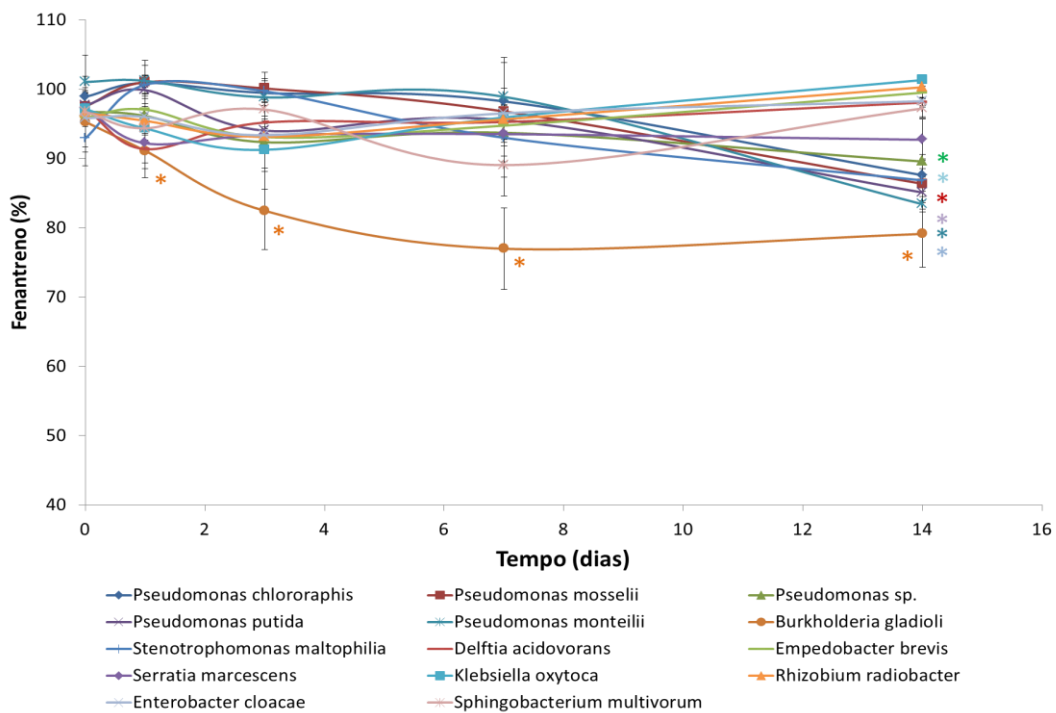


FIGURA 2.51: Biodegradação de fenantreno, com porcentagem em massa, frente a 14 bactérias isoladas da *D. Speciosa* (asterisco significa diferença estatística, $p < 0,05$, em relação ao controle).

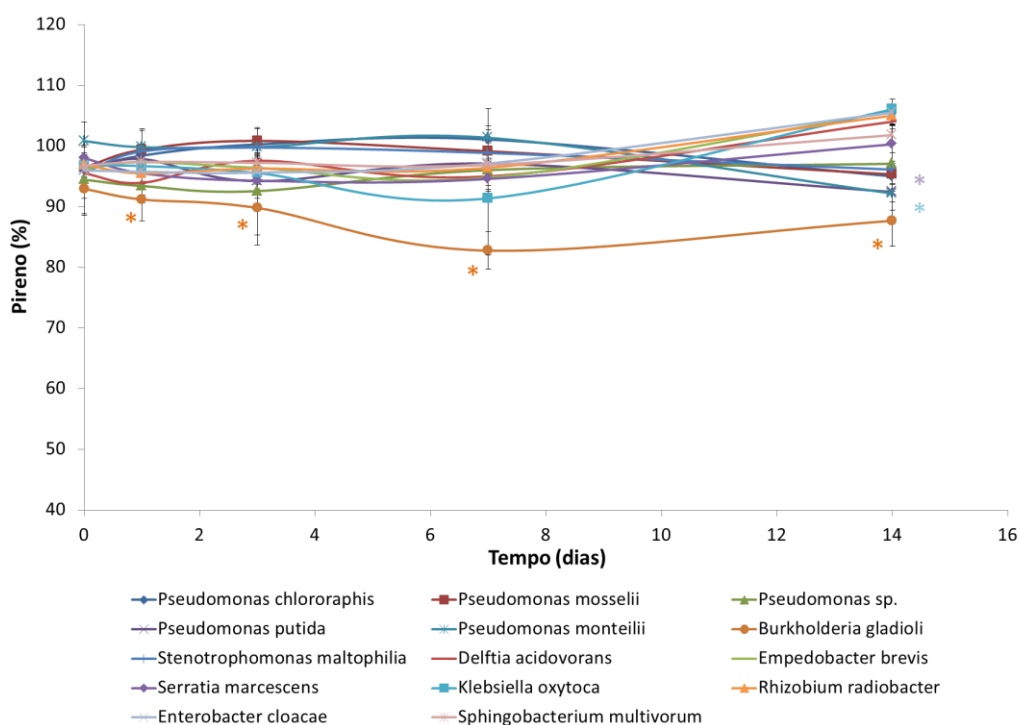


FIGURA 2.52: Biodegradação de pireno, com porcentagem em massa, frente a 14 bactérias isoladas da *D. Speciosa* (asterisco significa diferença estatística, $p < 0,05$, em relação ao controle).

Ao observar os gráficos obtidos para os ensaios com HPAs, vê-se claramente que a *Burkholderia gladioli* se destacou entre as demais por levar a um decréscimo significativo em relação ao controle desses compostos no meio de cultura. Como pode ser visualizado nas Figuras 2.50 a 2.52, uma maior degradação foi alcançada para o fenantreno. Em 7 dias de experimento esse composto diminuiu 18,3% em massa em relação ao controle. Para o Pireno a diminuição da massa chegou próximo a 10% e para o Fluoreno a 14,7%. É importante destacar que para o composto fenantreno, não apenas uma maior degradação foi obtida, mas também se observou um decaimento na concentração do composto em um menor intervalo de tempo do que para os demais. Já no primeiro dia de experimento a diferença é de 4,2% passando a 12,8% no terceiro dia e 18,3% no sétimo dia.

A bactéria *Burkholderia gladioli* é uma bactéria encontrada no solo, água e até em animais podendo causar doenças em plantas e seres humanos, não sendo no entanto, uma infecção do tipo usual (MOEBIUS et al., 2012; VIGLIANI e CUNHA, 2018). O gênero costuma ser bastante citado para a degradação de POPs. *Burkholderia xenovorans* são citadas pela capacidade de degradação de Aroclor

1242 em sedimentos (RODRIGUES et al., 2006). Bactérias *Burkholderia cocovenenans* isoladas de solo contaminado por HPAs apresentaram elevada taxa de remoção de fenantreno em relação a outras cepas isoladas do mesmo solo (WONG et al, 2002). A bactéria *Burkholderia cepacia* isolada também de solo conseguiram crescer em concentrações muito altas de pireno, sendo capazes de degradar também os compostos fluoreno e benz[a]antraceno (JUHASZ et al., 1997). Os autores Chen et al. (2013) em um trabalho posterior confirmaram a alta tolerância da *Burkholderia cepacia* ao composto pireno. *Burkholderia fungorum* isoladas de uma descarga de refinaria de petróleo são citadas pela capacidade de transformar dibenzotiofeno, fenantreno, nafetaleno e fluoreno, podendo ser usada para melhorar a eficiência da fitoremediação de HPAs (ANDREOLLI et al., 2013). O relato da espécie *Burkholderia gladioli* ligada a degradação de fluoreno, fenantreno e pireno não foi encontrado na literatura, se não, um relato associando essa espécie a degradação de naftaleno (WILSON, et al., 2003).

Segundo Palleroni (2015) as bactérias *B. pseudomallei* e *B. gladioli* costumam ser espécies notáveis por sua capacidade de viver à custa de qualquer um dos composto de uma longa lista de orgânicos como única fonte de carbono e energia. Isso é possível graças acumulação de poli- β -hidroxibutirato (PHB) como material de reserva de carbono. Talvez por isso mesmo, essa bactéria foi aquela que mais se destacou entre as demais cepas avaliadas na degradação dos HPAs num meio pobre em nutrientes.

Outras bactérias que merecem destaque para esse ensaio são as bactérias do gênero *Pseudomonas* que apresentaram degradação significativa em reação ao controle principalmente para o décimo quarto dia de experimento. Para o fenantreno todas as espécies desse gênero apresentaram degradação significativa que chegou a 11%. Para o fluoreno e pireno apenas as espécies *P. putida* e *P. monteilii* merecem destaque chegando até 14% de degradação.

Evidentemente, como foi dito anteriormente, o gênero *Pseudomonas* é o gênero mais citado para a degradação de POPs em toda a literatura (WASI et al., 2013). Bactérias *Pseudomonas paucimobilis* e *Pseudomonas vesicularis* isoladas de solo foram citadas como sendo capazes de degradar os compostos fenantreno e fluoreno, respectivamente, em mais de 90%. Essas cepas cresceram utilizando esses HPAs como única fonte de carbono, no entanto, o crescimento foi fortemente influenciado pela variação de temperatura e pH (WEISSENFELS et al., 1990). Um

trabalho de 1996 apresenta o isolamento de 41 cepas provenientes de um local de gaseificação de carvão antigo contaminado por HPAs, todas pertencentes ao gênero *Pseudomonas*. Dessas 38 cepas foram identificadas como pertencentes a espécie *P. fluorescens*, 2 cepas a *P. putida* e 1 *Pseudomonas* sp. (JOHNSEN et al., 1996). Bactérias *Pseudomonas stutzeri* foram citadas quanto a sua capacidade de metabolizar primariamente o pireno para o composto *cis*-4,5-di-hidro-4,5-di-hidroxipireno (PYRdHD), já *Pseudomonas saccharophila* foram capazes de metabolizar o PYRdHD para o composto pireno-4,5-diona que consiste numa oxidação do primeiro (KAZUNGA e AITKEN, 2000). Bactérias *Pseudomonas putida* foram descritas quanto a sua capacidade de não apenas degradar, mas chegar a mineralização do composto fenantreno em solo (DOONG e LEI, 2003). *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de solo contaminado por petróleo no nordeste da Índia foram capazes de crescer em pireno como única fonte de carbono alcançando taxas de degradação do composto de 32%. A assimilação de pireno pelas bactérias foi influenciada pela produção de biosurfactante que aumentou a solubilidade do POP no meio de cultura (DAS e MUKHERJEE, 2007). Em outro trabalho mais recente encontrado na literatura foi constatado que as *P. aeruginosa* podem, ainda, alcançar taxas de degradação máxima de $1.111 \text{ mg.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ desse mesmo composto se forem submetidas a presença do surfactante sintético Tween[®] 80 (GHOSH e MUKHERJI, 2016).

2.4.4.3 - Ensaio de degradação dos PCBs

Após ter sido feito o experimento de biodegradação para os compostos HPAs foram também realizados para os PCBs 2-fluorobifenila (PCB 1) e 4,4'-diclorobifenila (PCB 15). Para esse experimento, no entanto, apenas quatro bactérias foram selecionadas dentre as 14 bactérias avaliadas a princípio, sendo: *Sphingobacterium multivorum*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas putida* e *Stenotrophomonas maltophilia*. A *Pseudomonas putida* e a *Stenotrophomonas maltophilia* foram selecionadas por serem cepas constantemente citadas na literatura para a degradação de POPs (JOHNSEN et al., 1996; DOONG e LEI, 2003; JUHASZ et al., 2000; SOMARAJA et al., 2013). A bactéria *Sphingobacterium multivorum*, por outro lado, é uma bactéria pouco utilizada em processos de biorremediação desse tipo de composto, mas o gênero é bastante citado para a

biodegradação de óleos lubrificantes que pode ter como constituinte compostos clorados tais como os PCBs, mesmo que em pequenas quantidades (SAIMMAI et al., 2012; NOPARAT et al., 2014). Já a *Serratia marcescens* foi selecionada por ser a única das 14 bactérias estudadas anteriormente que claramente produz biossurfactante durante o seu crescimento em meio mínimo. A produção de biossurfactante foi percebida assim que os frascos foram agitados para a retirada da alíquota que seria usada na contagem de unidades formadoras de colônia. A Figura 2.53 ilustra a espuma formada devido à agitação dos frascos durante o crescimento da *S. marcescens*. Como pode ser observado, dentre os sete frascos, enfileirados contendo bactérias de espécies diferentes, o único que apresentou uma espessa camada de espuma logo acima do meio de cultura é, de fato, aquele que contém as cepas da *Serratia marcescens*.

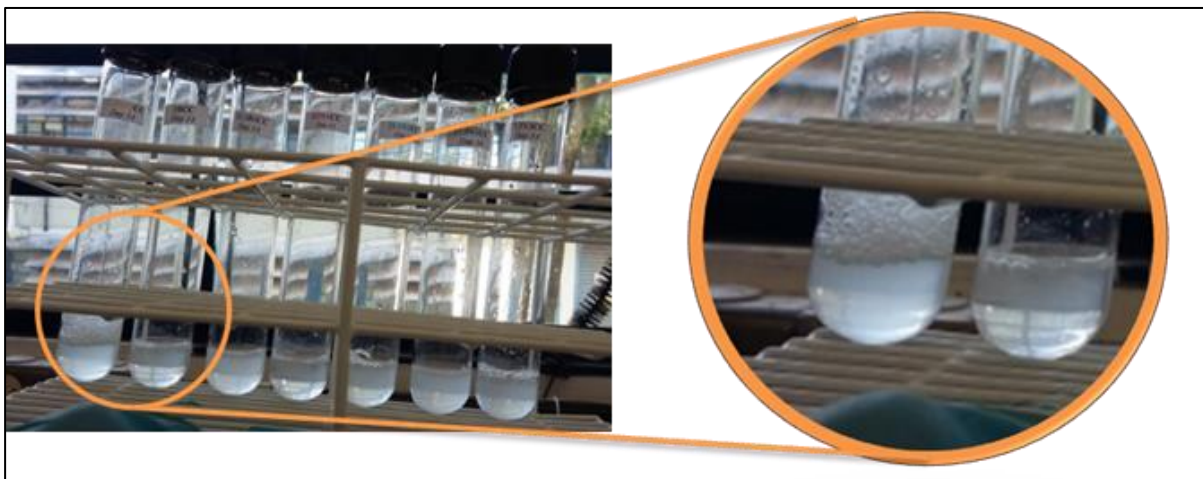


FIGURA 2.53: Imagem da espuma formada pela agitação do frasco contendo a cepa *Serratia marcescens*.

Ao se fazer uma investigação na literatura, encontraram-se vários relatos destacando a bactéria *Serratia marcescens* como uma cepa produtora de biossurfactante. Os surfactantes produzidos pela *S. marcescens* foi primeiramente descrito por Matsuyama et al. (1986). Esses autores perceberam a diminuição da tensão superficial provocada por essas bactérias e descobriram que isso ocorria devido à produção de compostos do tipo lipopetídeos. Um desses compostos que foi denominado Serrawetina W1 é composto basicamente de serina ligada ao ácido 3-hidroxidecanóico. Dusane et al., (2011), ao analisar um surfactante que foi extraído dessa mesma espécie de bactérias, proveniente de corais, encontraram um composto do tipo glicolípídico formado por glicose e ácido palmítico (Figura 2.54).

Segundo Silva (2002), os biossurfactantes são produtos do metabolismo secundário dos micro-organismos e possuem funções diversas. Entre essas funções se destacam a captação de nutrientes por emulsificação, o que torna as substâncias com propriedades hidrofóbicas biodisponíveis a esses organismos, além da função antimicrobiana, protegendo as cepas de outros micro-organismos invasores. Ainda segundo essa autora, o tipo, propriedade e quantidade de surfactante produzido dependem não apenas da espécie de micro-organismo, mas dos substratos disponíveis.

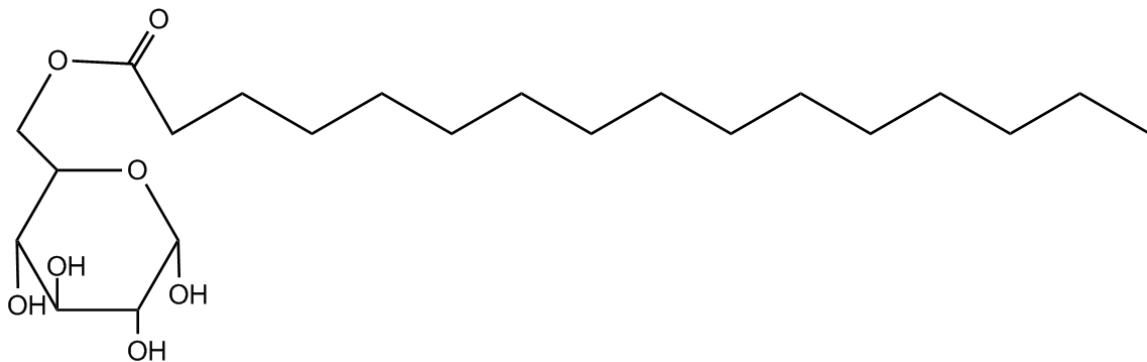


FIGURA 2.54: Surfactante com estrutura glicolípídica produzida por *Serratia marcescens* (Fonte: adaptado de DUSANE et al. 2011).

Em se tratando de pesquisas que abordam biodegradação e/ou biorremediação, surfactantes são sempre mencionados como componentes importantes para o aumento no rendimento do processo de degradação. Pode, ainda, ser citado como um dos fatores que destacam certas bactérias como potenciais degradadoras de POPs. Não é por acaso que bactérias do gênero *Pseudomonas* são constantemente citadas na literatura como degradadoras de compostos orgânicos. Muitas espécies desse gênero são produtoras de ramnolípídeos que são uma espécie de glicolípídeo que funciona como surfactante natural (KASEMODEL, 2012; DAS e MUKHERJEE, 2007).

A Figura 2.55, ilustra o crescimento em UFC.mL⁻¹ para as quatro bactérias ensaiadas nos 14 dias de experimento em meio contendo PCBs. Assim como no experimento com HPAs, nota-se que as bactérias apresentaram um pequeno crescimento e por fim mantiveram a viabilidade celular inicial ao longo dos dias o que confirma a não citotoxicidade desses compostos.

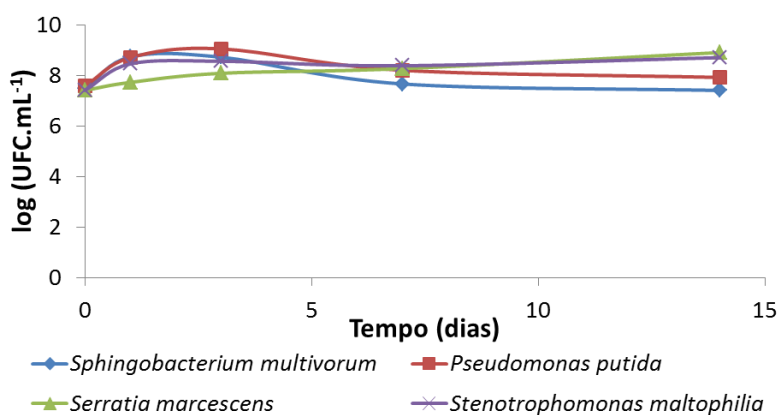


FIGURA 2.55: Crescimento microbiano medido em 14 dias de experimento para os compostos PCB 1 e PCB 15.

A Figura 2.56 apresenta a recuperação do composto PCB 1 ao longo do experimento. É possível perceber que ocorre um rápido decaimento desse composto ao longo dos dias. Ao se comparar o resultado com o experimento controle, porém percebe-se que esse decaimento nada mais é do que uma perda ambiental, já que o controle apresenta a mesma recuperação obtida para a cultura microbiana. Segundo SHIU e MACKAY (1986), a pressão de vapor de PCBs aumenta de forma logarítmica em função da diminuição do número de átomos de cloro, logo o resultado obtido é natural, pois o PCB 1 é um composto que possui apenas um átomo de cloro ligado a estrutura carbônica, o que deve tornar essa substância mais volátil. Somando-se a esse fator, deve-se considerar que, por se tratar de bactérias aeróbias, as vidrarias utilizadas no experimento são propositalmente passíveis a trocas gasosas com o ambiente. Essa combinação de fatores levou a uma grande perda do composto, impossibilitando a análise do processo de degradação, pois a maior parte dos pontos obtidos para os tempos pré-estabelecidos no experimento acabaram ficando abaixo da faixa de detecção do método analítico. Em contrapartida, a ligação da bifenila a dois átomos de cloro ao invés de um, no composto 4,4'-diclorobifenila (PCB 15) torna possível a análise de todos os pontos estabelecidos para o experimento sem perdas significativas. O perfil de biodegradação do PCB 15 é mostrado na Figura 2.57.

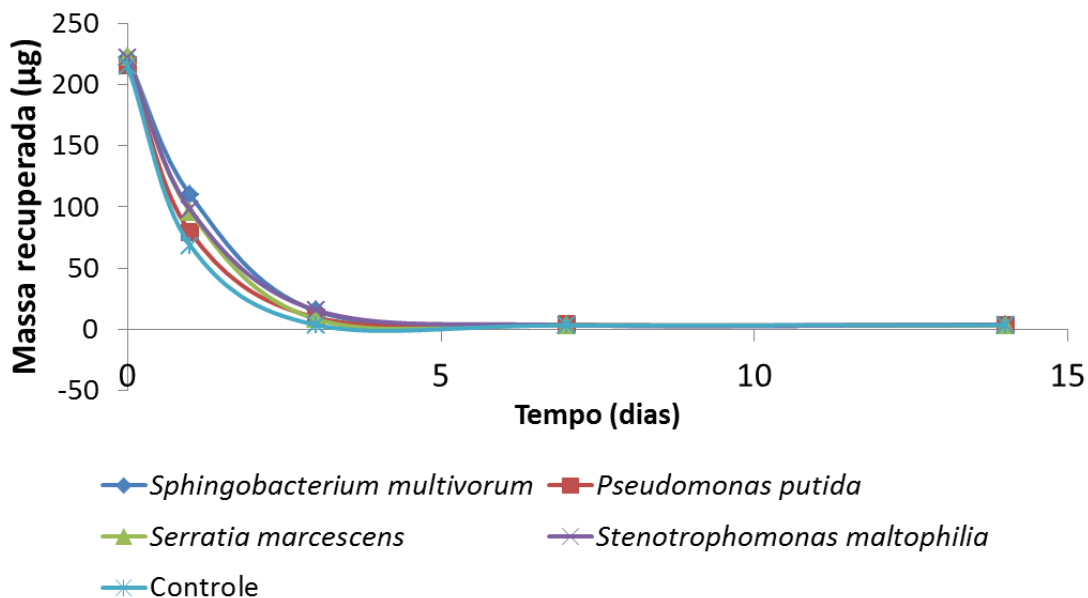


FIGURA 2.56: Recuperação do composto PCB 1 em meio de cultura ao longo dos dias 0, 1, 3, 7 e 14.

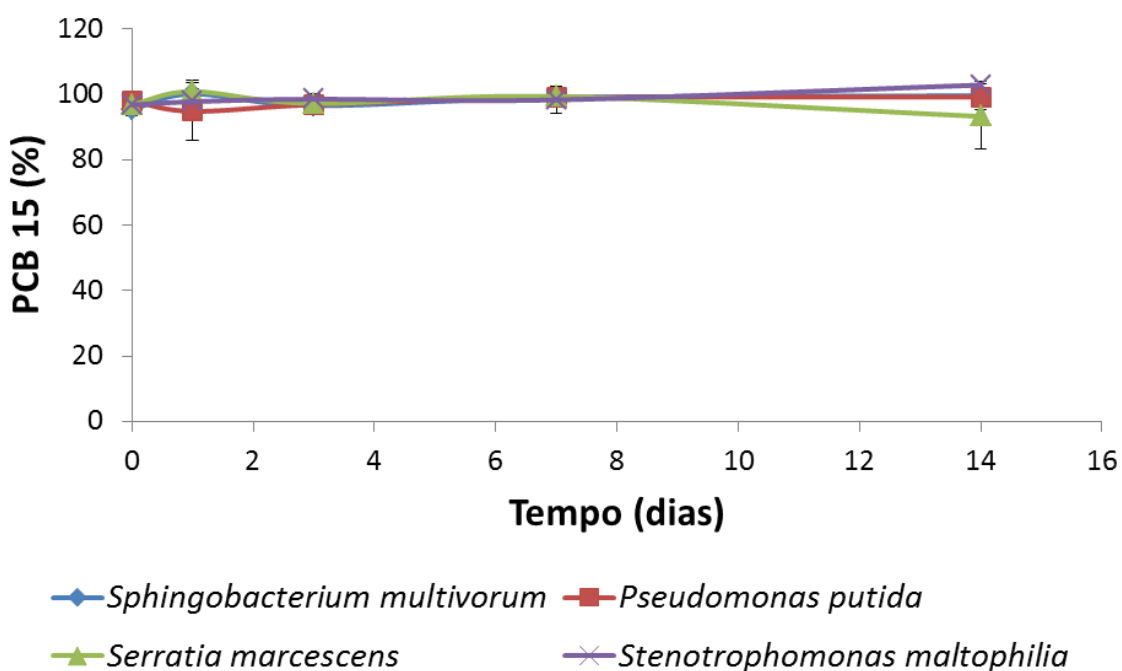


FIGURA 2.57: Perfil de degradação do composto 4,4'-diclorobifenila com porcentagem em massa (PCB 15).

Como pode ser observado na Figura 2.57, não houve degradação do PCB 15 para nenhuma das cepas investigadas em 14 dias de experimento. Nesse

caso, foi possível afirmar que essas bactérias não são capazes de degradar esse composto nas condições estabelecidas. De acordo com Nojiri et al. (2001), o fato de uma bactéria ser capaz de degradar um tipo de POP não implicará na garantia da degradação de outro. Bactérias que expressavam a enzima CAR 1,9a-dioxigenase (CA10) foram capazes de degradar dibenzofurano (DF), dibenzo-*p*-dioxina (DD), carbazol (CAR), naftaleno e bifenila, porém bactérias que expressavam a enzima DF 4,4a-dioxigenase (DBF63) foram capazes de degradar somente DF e DD.

2.4.4.4 - Ensaio de degradação da 1,2,3,4-TCDD

O ensaio de degradação da dioxina 1,2,3,4-TCDD foi realizado com um número menor de bactérias do que aquele dos outros ensaios. Isso se deu devido ao alto grau de toxicidade dessa substância. Desse modo, nesse trabalho procurou-se seguir uma ordem de toxicidade para a realização dos ensaios. Assim, as substâncias não cloradas (HPAs) foram avaliadas primeiramente. Depois se analisou os PCBs que tinham um menor número de átomos de cloro e por último a 1,2,3,4-TCDD que, devido ao maior grau de cloração, é a substância com maior potencial para a bioacumulação. O que se esperava ao seguir essa ordem de prioridades era evitar o contato excessivo com a dioxina pela aplicação de metodologias já otimizadas para essa substância. Por esse motivo apenas as bactérias *Sphingobacterium multivorum* e a *Serratia marcescens* foram estudadas. A *S. multivorum* foi ensaiada pelo mesmo motivo pelo qual ela havia sido ensaiada no experimento com PCBs. Essa bactéria, apesar de ser usada para biodegradação de óleos lubrificantes, não é comumente utilizada para a degradação de POPs. Já a *S. marcescens* foi selecionada pensando-se em explorar sua capacidade de produção de biossurfactantes, sendo a dioxina tetraclorada uma substância extremamente hidrofóbica, devido ao número de cloros presentes na estrutura.

A Figura 2.58 apresenta a curva de crescimento para as duas bactérias selecionadas em UFC.mL⁻¹. Assim como nos experimentos anteriores a 1,2,3,4-TCDD não foi citotóxica para nenhuma das bactérias analisadas.

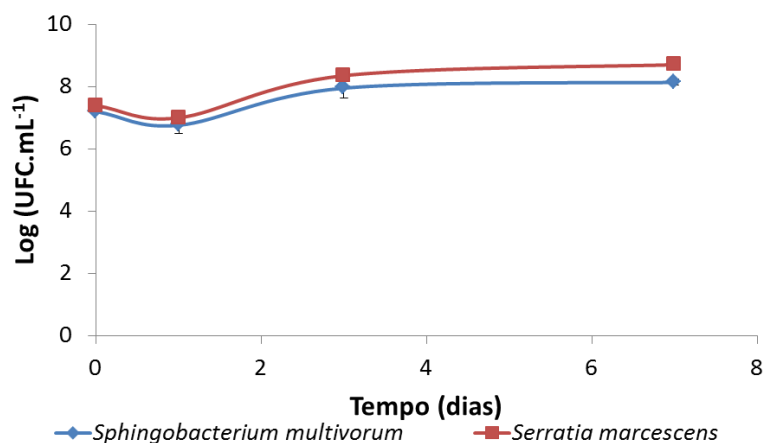


FIGURA 2. 58: Crescimento microbiano medido em 7 dias de experimento para na presença do composto 1,2,3,4-TCDD em meio salino.

A Figura 2.59 ilustra o resultado para o ensaio de degradação do composto 1,2,3,4-TCDD frente as duas bactérias testadas. Os dados normalizados em relação ao controle mostram claramente que não houve degradação para a bactéria *Sphingobacterium multivorum*. No entanto, ocorreu uma diminuição significativa no meio de cultivo (MS) para o composto 1,2,3,4-TCDD ao longo dos dias em relação ao controle para o experimento realizado frente a *Serratia marcescens*. Os dados obtidos para esse experimento mostram um decréscimo de 13,8% em massa do composto em relação ao controle no primeiro dia, chegando a 21% no terceiro e 22,3% no sétimo dia.

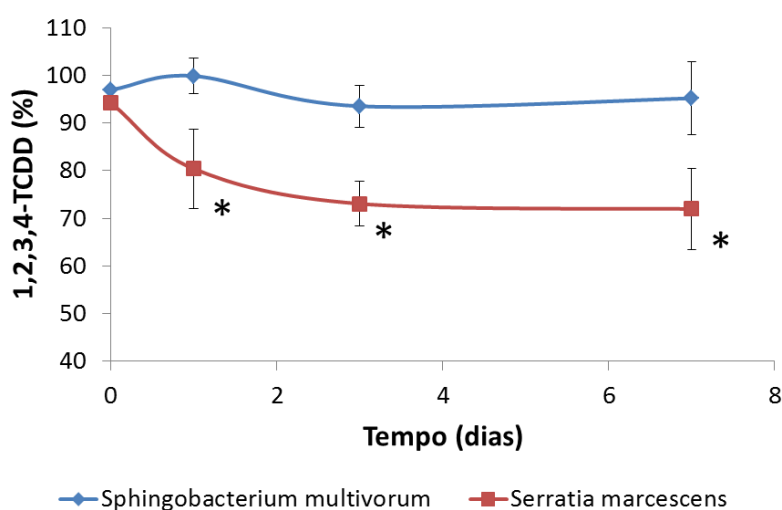


FIGURA 2. 59: Perfil de degradação do composto 1,2,3,4-TCDD com porcentagem em massa (asterisco significa diferença estatística, $p < 0,05$, em relação ao controle em meio salino).

A bactéria *Serratia marcescens* é um micro-organismos do tipo bacilo, aeróbica, gram-negativa da família Enterobacteriaceae. Algumas bactérias dessa linhagem, como no caso da que foi utilizada nesse trabalho, possuem capacidade de produção de pigmento que pode ir do vermelho escuro até rosa pálido, dependendo da idade das colônias (Figura 2.60). Esse pigmento foi extraído em 1902 e chamado de “prodigiosin”. Trata-se de um composto hidrofóbico que teve seu uso comercial impedido devido a forte sensibilidade a luz. Por possuir essa pigmentação, não tão comum em bactérias, essa espécie foi amplamente explorada como marcadora no estudo de infecções. Pode causar infecção em seres humanos, sendo mais comum em usuários de heroína intravenosa e algumas infecções hospitalares. É uma bactéria conhecida desde a antiguidade, quando era associada ao aparecimento misterioso de “sangue” em alimentos, sendo por isso objeto de folclore religioso (YU, 1979).

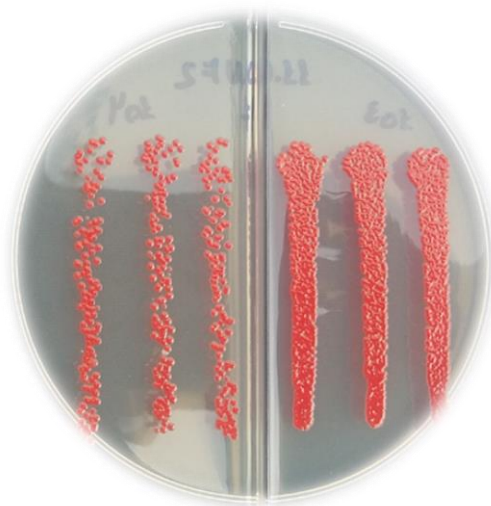


FIGURA 2.60: *Bactérias Serratia marcescens* utilizadas no trabalho.

Bactérias *Serratia marcescens* são comumente citadas na literatura como micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos. Wongs et al. (2004) constataram que *S. marcescens* isoladas de água e lama em associação com *Pseudomonas aeruginosa* degradaram com alta eficiência gasolina, querosene, óleo diesel e óleo lubrificante. Silva et al. (2015) destacaram que bactérias *S. marcescens* isoladas de ambiente contaminado possuem alto potencial para a biorremediação da poluição causada por diesel. Um estudo recente aponta que essa linhagem pode não apenas degradar hidrocarbonetos comuns, mas também degradar HPAs como

antraceno, fluoreno, fenantreno e pireno. Segundo esse estudo, a capacidade de produção de biossurfactante e dioxigenases deve tornar essa cepa uma candidata ideal para biorremediação de HPAs em solo. Diante desse contexto, o trabalho destaca ainda a vantagem das cepas serem excelentes fixadoras de nitrogênio e promotora de crescimento em plantas, podendo, portanto serem usadas também em fitorremediação, o que deve tornar esse processo mais eficiente (PANDEY et al., 2012; ASAF et al., 2017). Além disso, essas bactérias são reportadas na literatura como agentes biológicos capazes de causar corrosão em aço e alumínio o que muitas vezes leva a prejuízos financeiros por conta da destruição de ligas aeronáutica e gasodutos (RAJASEKAR e TING, 2010; RAJASEKAR et al., 2011). No entanto, não há nenhum relato científico da degradação de dioxina pela utilização dessa linhagem. Um único trabalho foi encontrado mencionando o potencial dessas cepas para a degradação de dibenzofurano que se trata de um composto não clorado com estrutura análoga àquelas de dioxinas. Esse trabalho menciona que é a primeira vez que essa bactéria é indicada para a degradação de compostos do tipo *dioxin-like* (JAISWAL e THAKUR, 2007). Um levantamento em publicações científicas atuais cita esse mesmo artigo como referência em desenvolvimentos recentes sobre remediação de dioxinas e furanos, levando a crer que não existem outros relatos relacionando essa cepa a degradação desse tipo de composto (RAJASEKAR et al., 2011). Portanto, o resultado obtido nesse trabalho é de grande relevância para os estudos de biorremediação, pois se trata de uma continuação de estudos que vem sendo praticados na atualidade, mas que não se encontram ainda finalizados.

2.4.4.5 – Análise qualitativa

As análises qualitativas foram feitas em modo *Full Scan* para se avaliar a formação de metabólitos durante o processo de biodegradação. Somente as amostras provenientes do ensaio com as bactérias *Burkholderia gladioli* com HPAs (após 14 dias) e bactérias *Serratia marcescens* com 1,2,3,4-TCDD (após 7 dias) foram analisadas (Figuras 2.61 e 2.62).

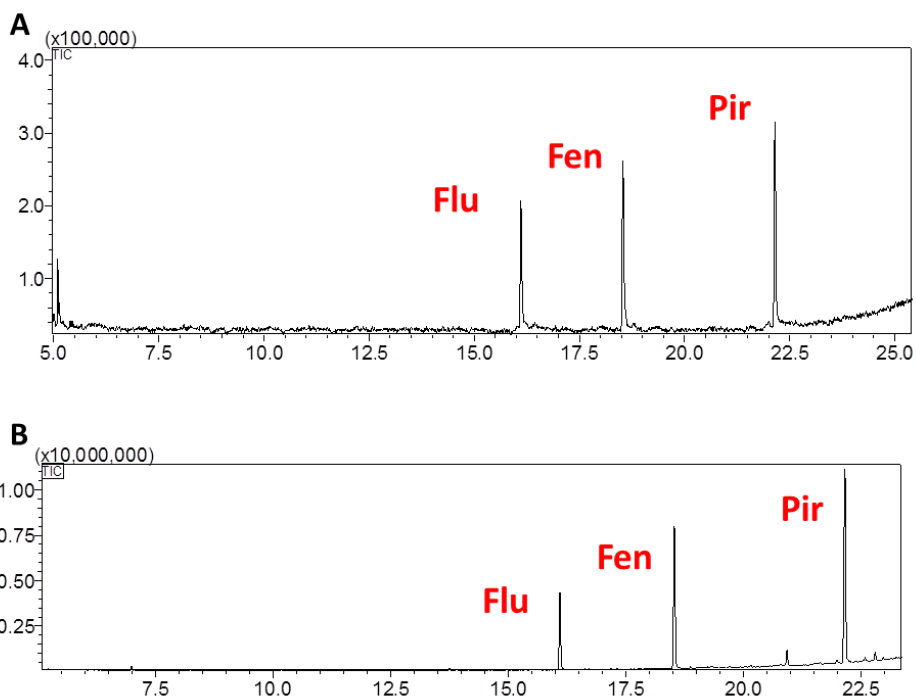


FIGURA 2.61: Análise *Full Scan* para a amostra de HPAs ensaiados com *Burkholderia gladioli* em A) amostra extraída e analisada sem derivatização e em B) análise da amostra derivatizada com HMDS.

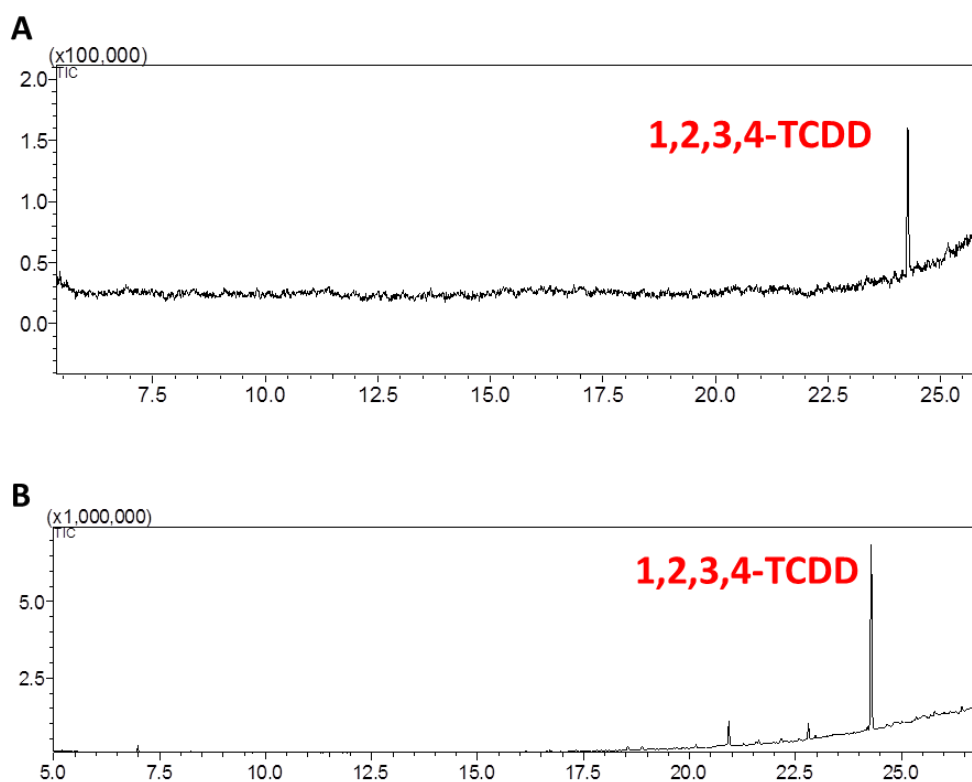


FIGURA 2. 62: Análise *Full Scan* para a amostra de 1,2,3,4-TCDD ensaiada com *Serratia marcescens* em A) amostra extraída e analisada sem derivatização e em B) análise da amostra derivatizada com HMDS.

Como pode ser observado nos cromatogramas das Figuras 2.59 e 2.60, nenhum pico proveniente de metabólitos foi obtido para as amostras investigadas. Os picos que aparecem são apenas os picos dos próprios compostos que foram usados nos experimentos. Apesar do aumento da concentração da amostra por evaporação e aplicação de uma metodologia de derivatização para garantir a análise de compostos mais polares, não foi possível observar picos diferentes daqueles dos próprios compostos empregados na biodegradação, além de alguns picos menores provenientes de ácidos graxos presentes nas culturas microbianas. Isso ocorre provavelmente por dois motivos: primeiro a quantidade de composto degradado foi muito pequena e segundo, a extração realizada pode não ter sido apropriada para os metabólitos.

2.4.4.6 - Outras considerações sobre o experimento de biodegradação

É importante mencionar que todas as análises quantitativa realizadas nesse trabalho contaram com controles de qualidade que foram aplicados em quintuplicata durante a leitura das amostras em GC-MS. Os controles de qualidade consistiram em amostras com concentrações média e alta da curva de calibração que foram aplicados intercalados durante a análise da amostra. Os resultados para esse controle se encontram nas Tabelas 2.23 e 2.24 abaixo.

TABELA 2.23: Controles de qualidade para as análises das amostras de HPAs durante o período de análise no equipamento de GC-MS.

	Valor real ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Média de 5 pontos	Exatidão (%)	CV %
Fluoreno				
Ponto Baixo	0,62	0,65	105,0	1,46
Ponto Médio	7,20	7,71	107,2	1,87
Ponto Alto	11,31	12,47	110,3	0,81
Fenantreno				
Ponto Baixo	0,61	0,63	103,1	1,17
Ponto Médio	7,15	7,38	103,2	1,28
Ponto Alto	11,24	11,92	106,0	0,81
Pireno				
Ponto Baixo	0,60	0,62	102,2	3,06
Ponto Médio	7,05	6,77	96,0	0,94
Ponto Alto	11,08	11,05	99,7	1,88

TABELA 2.24: Controles de qualidade para as corridas das análises dos compostos clorados durante o período de análise no equipamento de GC-MS.

	Valor real	Média de 5 pontos	Exatidão (%)	CV %
PCB 1				
Ponto Baixo	0,60	0,63	104,9	1,59
Ponto Médio	7,05	7,16	101,5	1,48
Ponto Alto	11,08	11,45	103,4	2,50
PCB 15				
Ponto Baixo	0,60	0,64	105,2	1,52
Ponto Médio	7,04	7,03	99,8	1,08
Ponto Alto	11,07	11,35	102,5	1,38
1,2,3,4-TCDD				
Ponto Baixo	0,66	0,54	82,4	3,73
Ponto Médio	7,70	7,25	94,1	4,39
Ponto Alto	12,10	11,74	97,1	3,37

De acordo com os valores de exatidão e precisão apresentados, não houve variação abaixo ou acima de 15% para nenhum dos HPAs e nenhum dos PCBs estando de acordo com legislação da Anvisa Resolução RDC Nº 166/2017 que estabelece esse valor para amostras biológicas. Para a dioxina apenas o ponto mais baixo apresentou exatidão inferior (mas próxima) aquela recomendada por essa legislação. As leituras realizadas no equipamento, no entanto, não chegaram a ultrapassar o ponto médio da curva. Logo, pode se inferir que essa variação na linearidade para o ponto mais baixo da curva não chegou a ser prejudicial à análise.

Outro questão a ser considerada ainda nesse trabalho é a possibilidade da realização de consórcios de bactérias para a aplicação a degradação de POPs. As Figuras 2.61 a 2.63 apresentam o resultados para experimentos realizados para possível inibição de crescimento em cocultura microbianas. Como pode ser visualizado tanto nas fotos sem aumento (Figura 2.63), quanto nas fotos com aumento de 40 vezes (Figuras 2.64 a 2.65) obtidas via microscópio óptico, nenhuma cepa apresentou inibição as culturas feitas em conjunto. Não ouve formação de halo de inibição para nenhuma das bactérias investigadas. Sendo assim, futuros experimentos de biorremediação poderão ser avaliados para coculturas com objetivo de melhorar os resultados obtidos.

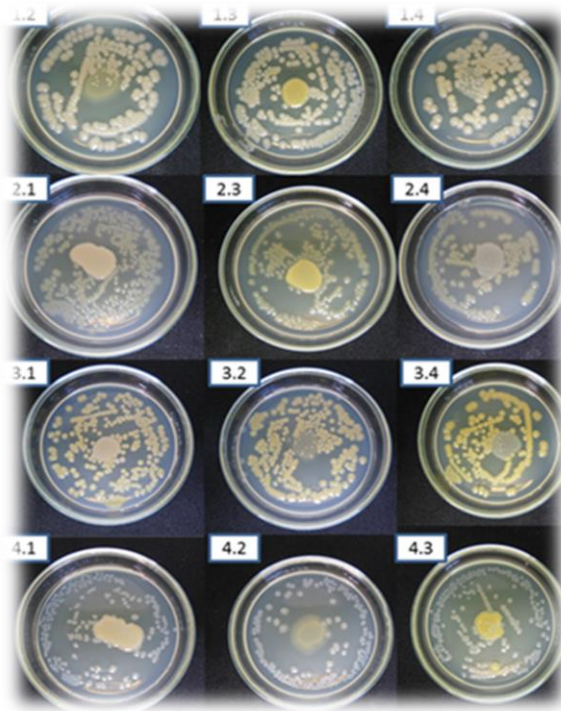


FIGURA 2.63: Observação visual do crescimento de bactérias em consórcio após quatro dias de cocultivo (1 - *S. multivorum*; 2 - *S. maltophilia*; 3 - *E. brevis*; 4 - *E. cloacae*, onde 1.2 significa: bactéria 2 no centro crescendo sobre 1 espalhada sobre a placa).

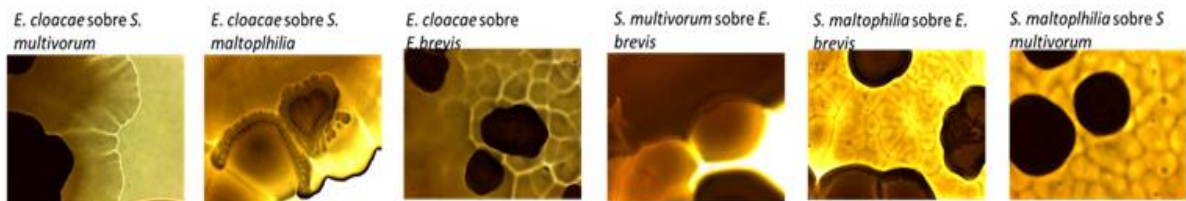


FIGURA 2.64: Nono dia de crescimento das bactérias *S. multivorum*, *S. maltophilia*, *E. brevis*, *E. cloacae*, em consórcio, analisadas em microscópio com aumento de 40x.

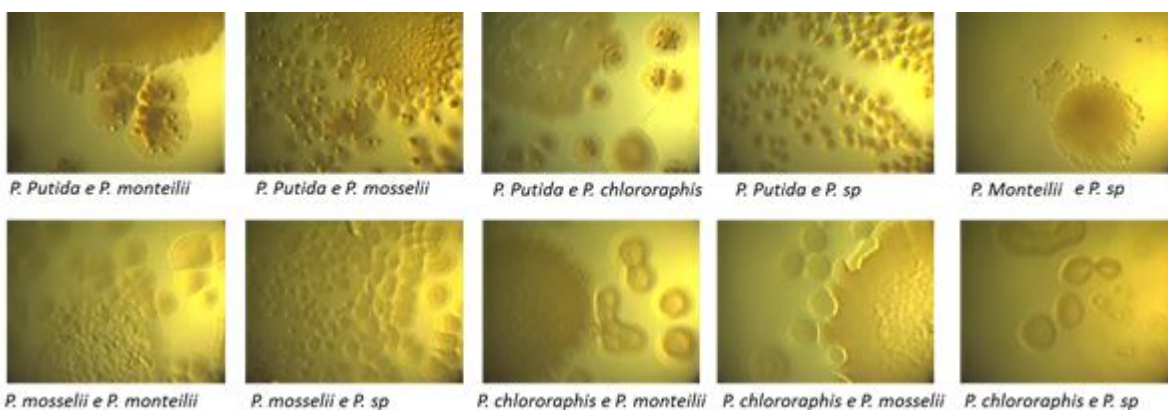


FIGURA 2.65: Bactérias do gênero *Pseudomonas* em consórcio, analisadas em microscópio com aumento de 40 vezes.

2.4.4.7 – Relação inseto micro-organismo

Todos os micro-organismos utilizados nesse trabalho são provenientes do inseto praga *Diabrotica speciosa*. A utilização de micro-organismos associados a insetos em processos de remediação não é comum na literatura, no entanto, a utilização de micro-organismos associados à plantas já é bastante conhecido no meio científico (NEWMAN e REYNOLDS, 2005; RYAN et al., 2008). Barac et al. (2004) utilizaram uma cepa recombinante de *Burkholderia cepacia* proveniente da planta *Lupinus luteus L.*, para melhorar a degradação de tolueno. Esses autores concluíram que essa técnica pode melhorar a eficiência de processos de fitorremediação já que compostos orgânicos voláteis costumam ser extremamente tóxicos para plantas. Yousaf et al. (2011) constataram que azevém, trevo e alfafa colonizadas com bactérias *Enterobacter ludwigii* degradaram eficientemente hidrocarbonetos proveniente de diesel. Esses autores destacaram que a associação de plantas a esse gênero de bactérias traz ainda muitos outros benefícios à planta, como promoção de crescimento por fixação de nitrogênio, produção de fitormônios, além da supressão de patógenos. Siciliano et al. (2011) ainda destacam que plantas que crescem em solo contaminado podem selecionar genótipos específicos de bactérias em resposta a contaminação.

Em relação à utilização de micro-organismos de insetos, Yang et al. (2015) relataram que cepas *Exiguobacterium* sp. isoladas de lavas de farinha foram capazes de degradar e mineralizar poliestireno. Ozdal et al. (2016) citam que cinco bactérias diferentes isoladas de barata foram capazes de degradar endosulfam (*Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus atrophaeus*, *Citrobacter amolonaticus* e *Acinetobacter lwoffii*). De acordo com os autores esses insetos foram coletados de ambientes contaminados com o pesticida. Mudziwapasi, et al. (2016) isolaram duas bactérias de minhoca que degradam o pesticida 4,4 DDT, o que levou os autores a sugerir que bactérias degradadoras de pesticidas associadas a esses invertebrados pode ser uma boa opção para biorremediação de solos contaminados. Quanto à degradação de HPAs, PCBs e dioxinas, no entanto, não foram encontrados relatos na literatura mencionando a utilização desse tipo de micro-organismo, sendo esse trabalho inovador nesse sentido.

2.5 – Conclusão

Esse trabalho mostrou que é possível cultivar micro-organismos do inseto praga *Diabrotica speciosa* em diferentes meios na presença de poluentes orgânicos persistentes. Esses compostos não apresentam citotoxicidade a esses micro-organismos que não apenas crescem nesse meio, mas podem também utilizar POPs como fonte de carbono. Os repiques sucessivos dessas bactérias depois do isolamento podem, no entanto, alterar a capacidade de degradação. Como foi visto no trabalho, cepas *Burkholderia gladioli* em cultivo constante e em estoque apresentaram comportamento diferente frente a HPAs. Aquelas estocadas a mais tempo, portanto com menor número de repiques, foram capazes de degradar essa classe de compostos com sucesso, enquanto que aquelas que já vinham sendo cultivadas a vários meses perderam sua efetividade.

A extração dos compostos do meio de cultivo foi uma etapa bastante trabalhosa. Depois de várias tentativas de se extrair os POPs por meio de uma extração líquido-líquido simples, percebeu-se que a extração não era reprodutível nas diferentes concentrações avaliadas. Deste modo, um novo método de extração foi desenvolvido no qual cada fração do meio de cultura foi separada e extraída de forma diferenciada. A fração na qual se obteve a maior parte dos compostos foi a biomassa bacteriana, sendo que esta fração passou por uma extração mais cuidadosa para evitar perdas. Nesse contexto, esse estudo permitiu o desenvolvimento de uma metodologia segura, com boa reprodução e fácil aplicação, sendo útil não apenas para o desenvolvimento desse trabalho, mas para futuros trabalhos de biodegradação feitos pelo grupo de pesquisa.

A análise dos POPs por GC-MS revelou que compostos com muitos anéis aromáticos condensados e halogênios ligados não permitem o desenvolvimento de uma metodologia de forma simples e direta. Quanto mais anéis esses compostos possuem e mais átomos de halogênio, menor foi a sensibilidade de calibração instrumental. Além disso, a utilização de *liners* e colunas comuns pode contribuir para perda de sensibilidade durante as corridas sucessivas prejudicando a exatidão e precisão das análises. A utilização de materiais com desativação prévia, portanto possibilitou uma melhora na exatidão e precisão contribuindo para a validação do método analítico.

As cepas *Burkholderia gladioli* e *Serratia marcescens* foram as bactérias mais promissoras para futuras pesquisas de biorremediação dos POPs estudados. A *Burkholderia gladioli* apresentou-se mais apropriada para a degradação de HPAs, enquanto que a *Serratia marcescens* foi adequada para a degradação de dioxinas. O gênero *Burkholderia* é um gênero amplamente distribuído na natureza, sendo comuns para solo, plantas e insetos, sendo constantemente citado na literatura na degradação de diversos compostos poluentes. A linhagem *Burkholderia gladioli*, no entanto, não tem sido citada para a degradação de HPAs, o que torna esse estudo muito relevante para se ampliar o conhecimento em relação a importância desse gênero. A *Serratia marcescens*, por outro lado, tem sido apontada como degradadora de dibenzofurano e potencial degradadora de dioxinas, não sendo, no entanto, testada para esse tipo de composto. Essas cepas possuem como principal vantagem uma efetiva produção de surfactantes, mesmo em meio salino que se caracteriza como um meio pobre em nutrientes. A produção de surfactantes é uma excelente qualidade para bactérias aplicadas em biorremediação, por aumentar a biodisponibilidade dos POPs tanto em meio de cultura quanto em solo. Essa característica foi observada somente para essa espécie, dentre todas aquelas que foram investigadas nesse estudo, o que torna essa cepa a mais proeminente entre as cepas isoladas da *D. speciosa* para futuras aplicações em processos de biorremediação.

O gênero *Pseudomonas* não apresentou, nesse estudo, um resultado muito evidente de degradação dos compostos testados. No entanto, esse resultado pode estar limitado às condições do método aplicado nessa pesquisa, como por exemplo, fonte de nitrogênio, aeração ou mesmo concentração inicial de micro-organismos no meio de cultura.

Não foi possível determinar por GC-MS nenhum metabólito do processo de degradação mesmo para as amostras concentradas e derivatizadas.

Visto que bactérias isoladas da *D. speciosa* efetivamente podem degradar xenobióticos, pode-se inferir que a presença desses micro-organismos no inseto em ambiente contaminado por pesticidas pode levar a aquisição de resistência a esses compostos, como fruto da relação inseto/bactéria. Apesar da diferença nas estruturas dos POPs testados nesse trabalho e dos pesticidas utilizados no controle de pragas, a maquinaria genética e enzimática que permite a

degradação de um composto pode acabar favorecendo a degradação do outro. Porém, esse resultado deve inevitavelmente ser determinado de forma experimental.

2.6 – Referências bibliográficas

ABDEL-SHAIFY, H. I. e MANSOUR, M. S. M. “A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: source, environmental impact, effect on human health and remediation”. *Egyptian Journal of Petroleum*, **25**: 107–123, 2016.

ABRAMOWICZ, D. A. “Aerobic and Anaerobic Biodegradation of PCBs: A Review”. *Critical Reviews in Biotechnology*, **10**: 241-251, 1990.

ADAMS, G. O.; FUFAYIN, P. T.; OKORO, S. E.; EHINOMEN, I. “Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: A Review”. *International Journal of Environmental Bioremediation & Biodegradation*, **3**: 28-39, 2015.

ADEBUSOYE, S. A.; ILORI, M. O.; PICARDAL, F.W.; AMUND, O. O. “Extensive biodegradation of polychlorinated biphenyls in Aroclor 1242 and electrical transformer fluid (Askarel) by natural strains of microorganisms indigenous to contaminated African systems”. *Chemosphere*, **73**: 126–132, 2008.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), RDC Nº 166, 2017.

AHMED, M. e FOCHT, D. D. “Degradation of polychlorinated biphenyls by two species of *Achvornobacter*l”. *Canadian Journal of Microbiology*. **19**: 47-57, 1973.

AHN, I.-S.; GHIORSE, W. C.; LION, L. W.; SHULER, M. L. “Growth kinetics of *Pseudomonas putida* G7 on naphthalene and occurrence of naphthalene toxicity during nutrient deprivation”. *Biotechnology and Bioengineering*, **59** (5): 587–594, 1998.

AMIN, R.; KRAMMER, B.; ABDEL-KADER, N.; VERWANGER, T.; EL-ANSARY, A. “Antibacterial effect of some benzopyrone derivatives”. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **45**(1): 372–378, 2010.

ANDRADE, S.J.; CRISTALE, J.; SILVA, F.S.; ZOCCOLO, G.J.; MARCHI, M.R.R. “Contribution of sugar-cane harvesting season to atmospheric contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Araraquara city, Southeast Brazil”. *Atmospheric Environment*, **44**: 2913-2919, 2010.

ANDREOLLI, M.; LAMPIS, S.; POLI, M.; GULLNER, G.; BIRÓ, B.; VALLINI, G. “Endophytic *Burkholderia fungorum* DBT1 can improve phytoremediation efficiency of polycyclic aromatic hydrocarbons”. *Chemosphere*, **92**(6): 688–694, 2013.

ASAF, S., KHAN, M. A., KHAN, A. L., WAQAS, M., SHAHZAD, R., KIM, A.-Y.; KANG, S.-M.; LEE, I.-J. “Bacterial endophytes from arid land plants regulate endogenous hormone content and promote growth in crop plants: an example of

Sphingomonas sp. and Serratia marcescens”. *Journal of Plant Interactions*, **12**(1): 31–38, 2017.

ASSUNÇÃO, J. V. e PESQUERO, C. R. “Dioxinas e furanos: origens e riscos”. *Rev. Saúde Pública*, **33**: 523-530, 1999.

AZUBUIKE, C. C.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C. “Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects”. *World J Microbiol Biotechnol*, **32**: 180, 2016.

BABUPONNUSAMI, A. e MUTHUKUMAR, K. “A review on Fenton and improvements to the Fenton process for wastewater treatment”. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **2**: 557-572, 2013.

BAMFORTH S. M. e SINGLETON I. “Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions”. *J Chem Technol Biotechnol*, **80**: 723–36, 2005.

BANAT, I. M.; MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. “Potential commercial applications of microbial surfactants”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **53**(5): 495–508, 2000.

BARAC, T.; TAGHAVI, S.; BORREMANS, B.; PROVOOST, A.; OEYEN, L.; COLPAERT, J. V.; JACO VANGRONSVELD, J.; VAN DER LELIE, D. “Engineered endophytic bacteria improve phytoremediation of water-soluble, volatile, organic pollutants”. *Nature Biotechnology*, **22**(5): 583–588, 2004.

BARTLE, K. D. e MYERS, P. “History of gas chromatography”. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **21**, 547–557, 2002.

BAUTISTA, L. F.; SANZ, R.; MOLINA, M. C.; GONZÁLEZ, N.; DAVID SÁNCHEZ, D. “Effect of different non-ionic surfactants on the biodegradation of PAHs by diverse aerobic bacteria”. *International Biodeterioration e Biodegradation*, **63**: 913–922, 2009.

BEDARD, D. L.; UNTERMAN, R.; BOPP, L. H.; BRENNAN, M. J.; HABERL, M. L.; JOHNSON, C. “Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls”. *Applied and environmental microbiology*, **51**: 761-768, 1986.

BERTAZZI P.A.; PESATORI A.C.; CONSONNI D.; TIRONI A.; LANDI M.T.; ZOCCHETTI C. “Cancer incidence in a population accidentally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin”. *Epidemiology*, **4**: 398-406, 1993.

BHAVSAR, S.P.; FLETCHER, R.; HAYTON, A.; REINER, E.J.; JACKSON, D. A. “Composition of *dioxin-like* PCBs in fish: An application for risk assessment”. *Environmental Science e Technology*, **41**: 3096–3102, 2007.

BILLINGSLEY, K. A.; BACKUS, S. M.; WARD, O. P. “Effect of surfactant solubilization on biodegradation of polychlorinated biphenyl congeners by *Pseudomonas* LB400”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **52**: 255-260, 1999.

BOCIO, A.; DOMINGO, J. L.; FALCÓ, G.; LLOBET, J. M. “Concentrations of PCDD/PCDFs and PCBs in fish and seafood from the Catalan (Spain) market: Estimated human intake”. *Environment International*, **33**: 170–175, 2007.

BODA, H.; NGHI, T. N.; NISHIJO, M.; THAO, P. N.; TAI, P. T.; HOANG VAN LUONG, H. V.; ANH, T. H.; MORIKAWA, Y.; NISHINO, Y.; NISHIJO, H. “Prenatal dioxin exposure estimated from dioxins in breast milk and sex hormone levels in umbilical cord blood in Vietnamese newborn infants”. *Science of the Total Environment*, **615**: 1312–1318, 2018.

BUMB, R. R.; CRUMMETT, W. B.; CUTIE S. S.; GLEDHILL, J. R.; HUMMEL, R. H.; KAGEL, R. O.; LAMPARSKI, L. L.; LUOMA, E. V.; MILLER, D. L.; NESTRICK, T. J.; SHADOFF, L. A.; STEHL, R. H.; WOODS, J. S. “Trace chemistries of fire: a source of chlorinated dioxins”. *Science*, **210**: 385-389, 1980.

BUNGE, M.; ADRIAN, L.; KRAUS, A.; OPEL, M.; LORENZ, W.G.; ANDREESEN, J. R.; GORISCH, H.; LECHNER, U. “Reductive dehalogenation of chlorinated dioxins by an anaerobic bacterium”. *Nature*, **421**: 357–360, 2003.

CAMINO-SÁNCHEZ, F. J.; ZAFRA-GÓMEZ, A.; PÉREZ-TRUJILLO, J. P.; CONDE-GONZÁLEZ, J. E.; MARQUES, J. C.; VÍLCHEZ, J. L. “Validation of a GC–MS/MS method for simultaneous determination of 86 persistent organic pollutants in marine sediments by pressurized liquid extraction followed by stir bar sorptive extraction”. *Chemosphere*, **84**(7): 869–881, 2011.

CHEN, K.; ZHU, Q.; QIAN, Y.; SONG, Y.; YAO, J.; CHOI, M. M. F. “Microcalorimetric investigation of the effect of non-ionic surfactant on biodegradation of pyrene by PAH-degrading bacteria *Burkholderia cepacia*”. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **98**: 361–367, 2013.

CHRZANOWSKI, Ł.; OWSIANIAK, M.; SZULC, A.; MARECIK, R.; PIOTROWSKA-CYPLIK, A.; OLEJNIK-SCHMIDT, A. K.; HEIPIEPER, H. J. “Interactions between rhamnolipid biosurfactants and toxic chlorinated phenols enhance biodegradation of a model hydrocarbon-rich effluent”. *International Biodeterioration e Biodegradation*, **65**: 605–611, 2011.

CHU, C-C.; SPENCER, J. L.; MATÍAS J.; CURZI, M. J.; ZAVALA, J. A.; SEUFFERHELD, M. J. “Gut bacteria facilitate adaptation to crop rotation in the western corn rootworm”. *PNAS*, **110**: 11917–11922, 2013.

COOPER, J. e DOBSON, H. “The benefits of pesticides to mankind and the environment”, *Crop Protection*. **26**: 1337–1348, 2007.

CONAMA. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Resolução nº 316: Estabelece procedimentos e critérios para o funcionamento de sistemas de tratamento térmico de resíduos. Brasília, 2002.

CRISTALE, J.; SILVA, F. S.; ZOCCOLO G. J.; MARCHI, M. R. R. “Influence of sugarcane burning on indoor/outdoor PAH air pollution in Brazil”. *Environmental Pollution*, **169**: 210-216, 2012.

DAS, K., e MUKHERJEE, A. K. "Differential utilization of pyrene as the sole source of carbon by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains: role of biosurfactants in enhancing bioavailability". *Journal of Applied Microbiology*, **102**(1): 195–203, 2007.

DAVY, C.W. "Legislation with respect to dioxins in the workplace". *Environment International*, **30**: 219– 233, 2004.

DEAN-ROSS, D. e CERNIGLIA, C. E. Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **46**(3): 307–312, 1996.

DOONG, R., e LEI, W. "Solubilization and mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas putida* in the presence of surfactant". *Journal of Hazardous Materials*, **96**(1): 15–27, 2003.

DUDÁŠOVÁ, H., LÁSZLOVÁ, K., LUKÁČOVÁ, L., BALÁŠČÁKOVÁ, M., MURÍNOVÁ, S., & DERCOVÁ, K. "Bioremediation of PCB-contaminated sediments and evaluation of their pre- and post-treatment ecotoxicity". *Chemical Papers*, **70**(8), 2016.

EARL N.; CARTWRIGHT C. D.; HORROCKS S. J.; WORBOYS M.; SWIFT S.; KIRTON J. A.; ASKAN A. U.; KELLEHER H.; NANCARROW D. J. "Review of the fate and transport of selected contaminants in the soil environment", draft Technical Report P5- 079/TR1, 2003. Disponível em: <www.environment-agency.gov.uk> Acesso em: 25 de março de 2018.

EISLER, R. e BELISLE, A. A. "Planar PCB hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review". *National Biological Service Biological Report* 31: 75, 1996.

FIEDLER, H."Persistent Organic Pollutants". *Springer*, New York, 2003.

FIELD, J. A. e SIERRA-ALVAREZ, R. "Microbial degradation of chlorinated dioxins". *Chemosphere*, **71**: 1005–1018, 2008.

PHILIPPI, M.; SCHMID, J.; WIPF, H. K.; HÜTTER, R. "A microbial metabolite of TCDD." *Experientia*, **38**(6), 659–661, 1982.

FOCARDI, S.; BARGAGLI, R.; CORSOLINI, S. "Isomer-specific analysis and toxic potential evaluation of polychlorinated biphenyls in Antarctic fish, seabirds and Weddell seals from Terra Nova Bay (Ross Sea)". *Antarctic Science*, **7**: 31-35, 1995.

FORTNAGEL, P.; HARMS, H.; WITTICH, R. M.; KROHN, S.; MEYER, H.; SINNWEILL, V.; WILKES, H.; FRANCKE, W. "Metabolism of Dibenzofuran by *Pseudomonas* sp. Strain HH69 and the Mixed Culture HH27". *Appl Environ Microbiol.* **56**(4):1148-56, 1990.

FUKUDA, K.; NAGATA, S.; TANIGUCHI H. "Isolation and characterization of dibenzofuran-degrading bacteria". *FEMS Microbiology Letters*, **208**: 179-185, 2002.

FURUKAWA, K. "Biochemical and genetic bases of microbial degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs)". *The Journal of General and Applied Microbiology*,

46: 283–296, 2000.

FURUKAWA, K.; MATSUMURA, F.; TONOMURA, K. “*Alcaligenes* and *Acinetobacter* Strains Capable of Degrading Polychlorinated Biphenyls”. *Agricultural and Biological Chemistry*, **42**(3): 543–548, 1978.

GALLO, D.; Nakano, O.; Silveira Neto, S.; Carvalho, R.P.L.; Batista, G.C.; Berti Filho, E., *et al.* *Manual de Entomologia Agrícola*. 2. ed. Piracicaba: Fealq, 2002. 920 p.

GASSEN, D.N. “Insetos subterrâneos prejudiciais às culturas no sul do Brasil”. Passo Fundo : *EMBRAPA-CNPT*, 1989. 49p. (EMBRAPA-CNPT. Documentos, 13)

GAO, S.; SEO, J.-S.; WANG, J.; KEUM, Y.-S.; LI, J.; LI, Q. X. “Multiple degradation pathways of phenanthrene by *Stenotrophomonas maltophilia* C6”. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **79**: 98–104, 2013.

GIBSON, D. T.; CRUDEN, D. L.; HADDOCK, J. D.; ZYLSTRA, G. J.; BRAND, J. M. “Oxidation of Polychlorinated Biphenyls by *Pseudomonas* sp. Strain LB400 and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707”. *Journal of Bacteriology*, **175**: 4561-4564, 1993.

GOMAA, E. A.; GRAY, J. I.; RABIE, S.; LOPEZ-BOTE, C.; BOOREN, A. M. “Polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food products and commercial liquid smoke flavourings”. *Food Additives Contaminants*, **10**: 503–521, 1993.

GHOSH, I., e MUKHERJI, S. “Diverse effect of surfactants on pyrene biodegradation by a *Pseudomonas* strain utilizing pyrene by cell surface hydrophobicity induction”. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **108**: 67–75, 2016.

HABE, H.; CHUNG, J.-S.; LEE, J.-H.; KASUGA, K.; YOSHIDA, T.; NOJIRI, H.; OMORI, T. “Degradation of chlorinated dibenzofurans and dibenzo-*p*-dioxins by two types of bacteria having angular dioxygenases with different features”. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(8):, 3610–3617, 2001.

HADIBARATA, T. e TACHIBANA, S. “Characterization of phenanthrene degradation by strain *Polyporus* sp. S133”. *Journal of Environmental Sciences*, **22**(1): 142–149, 2010.

HARITASH, A. K. e KAUSHIK, C. P. “Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review”. *Journal of Hazardous Materials*, v. **169**: 1–15, 2009.

HITES, R. A. “Dioxins: An overview and history”. *Environmental Science & Technology*, **45**: 16–20, 2011.

HONG, H.-B., NAM, I.-H., MURUGESAN, K., KIM, Y.-M., & CHANG, Y.-S. “Biodegradation of Dibenzo-*p*-dioxin, dibenzofuran, and chlorodibenzo-*p*-dioxins by *Pseudomonas veronii* PH-03”. *Biodegradation*, **15**(5): 303–313, 2004.

JACOB, J. e SEIDEL, A. “Biomonitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in human urine”. *Journal of Chromatography B*, **778**: 31–47, 2002.

- JAISWAL, P. K. e THAKUR, I. S. "Isolation and characterization of dibenzofuran-degrading *Serratia marcescens* from Alkalophilic Bacterial Consortium of the Chemostat". *Current Microbiology*, **55**(5): 447–454, 2007.
- JIANG, Y.; ZHANG, Z.; ZHANG, X. "Co-biodegradation of pyrene and other PAHs by the bacterium *Acinetobacter johnsonii*". *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **163**: 465–470, 2018.
- JOHNSEN, K.; ANDERSEN, S.; JACOBSEN, C. S. "Phenotypic and genotypic characterization of phenanthrene-degrading fluorescent *Pseudomonas* biovars". *Appl Environ Microbiol* **62**:3818– 3825, 1996.
- JOHNSEN, A. R. e KARLSON, U. "Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons". *Applied Microbiology and Biotechnology*, **63**: 452–459, 2004.
- JONES, K. C. e DE VOOGT, P. "Persistent organic pollutants (POPs), state of the science". *Environmental Pollution*, **100**, 209-221, 1999.
- JUHASZ A.L. BRITZ M.L. STANLEY G.A. Degradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas cepacia*. *Biotechnology Letters* v.18, p. 577-582, 1996.
- JUHASZ, A. L.; BRITZ, M. L.; STANLEY, G. A. "Degradation of fluoranthene, pyrene, benz[a]anthracene and dibenz[a,h]anthracene by *Burkholderia cepacia*". *Journal of Applied Microbiology*, **83**(2): 189–198, 1997.
- JUHASZ, A. L.; STANLEY, G. A.; BRITZ, M. L. "Microbial degradation and detoxification of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia* strain VUN 10,003". *Letters in Applied Microbiology*, **30**: 396-401, 2000.
- KAMEI, I.; SUHARA, H.; KONDO, R. "Phylogenetical approach to isolation of white-rot fungi capable of degrading polychlorinated dibenzo-*p*-dioxin". *Appl Microbiol Biotechnol*, **69**: 358–366, 2005.
- KANALY, R. A. e HARAYAMA, S. biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*, 182(8), 2059–2067, 2000.
- KARASEK, F. W. e CLEMENT, R. E. "Basic gas chromatography–mass spectrometry: Principles and techniques". Amsterdam: Elsevier Science, 1988.
- KASEMODEL, M. C. "Seleção de bactérias para biodegradação dos pesticidas organoclorados DDD , PCP e dieldrin". Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo, 2012. Dissertação de Mestrado, 136 p.

KAZUNGA, C. e AITKEN, M. D. “products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria”. *Applied and Environmental Microbiology*, **66**(5): 1917–1922, 2000.

KEIM, T.; FRANCKE, W.; SCHMIDT, S.; FORTNAGEL, P. “Catabolism of 2,7-dichloro- and 2,4,8-trichlorodibenzofuran by *Sphingomonas* sp strain RW1”. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **23**: 359–363, 1999.

KELLEY, I. e CERNIGLIA, C. E. “The metabolism of fluoranthene by a species of *Mycobacterium*”. *Journal of Industrial Microbiology*, **7**(1): 19–26, 1991.

KNOWLES, A. “Recent development of safer formulations of agrochemicals”. *Environmentalist*, **8**: 35-44, 2008.

KOMANCOVÁ M.; JURČOVÁ I.; KOCHÁNKOVÁ L.; BURKHARD J. “Metabolic pathways of polychlorinated biphenyls degradation by *Pseudomonas* sp. 2”. *Chemosphere*, **50**: 537–43, 2003.

KOVNER, K. “Persistent Organic Pollutants: A Global Issue, a Global Response”. Dezembro de 2009. Disponível em: <https://www.epa.gov/international-cooperation/persistent-organic-pollutants-global-issue-global-response>. Acessado: 07/06/2018

KIKUCHI, Y.; HAYATSU, M.; HOSOKAWA, T.; NAGAYAMA, A.; TAGO, K.; FUKATSU, T. “Symbiont-mediated insecticide resistance”. *PNAS*. **109**: 8618-8622, 2012.

KUBATOVA, A.; ERBANOVA, P.; EICHLEROVA, I.; HOMOLKA, L.; NERUD, F.; SASEK, V. “PCB congener selective biodegradation by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus* in contaminated soil”. *Chemosphere*, **43**: 207-215, 2001.

KUIPER I.; LAGENDIJK E. L.; BLOEMBERG G. V.; LUGTENBERG B. J. J. “Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction”. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **7**: 6–15, 2004

LACERDA, J. P. A e ROSE, M. “Exposição humana a dioxinas, furanos e bifenilas policloradas por meio do consumo de alimentos no brasil: estimativa e carência de dados”. *Revista IPT: Tecnologia e Inovação*, **1**: 17-27, 2016.

LAUMANN, R. A.; RIBEIRO, P. H.; RAMOS, N.; PIRES, C. S. S.; SCHMIDT, F. G. V.; BORGES, M.; MORAIS, M. C. B.; SUJII, E. R. “Ritmos diários de atividades comportamentais de *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (coleoptera: chrysomelidae) relacionados à temperatura”. Brasília, DF: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 2003. 6 p. (Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. Comunicado técnico, 90).

LERCHE D.; VAN DE PLASSHE E.; SCHWEGLER A.; BALK F. “Selecting chemical substances for the UN – ECE POP protocol”. *Chemosphere*; **47**: 617 – 30, 2002.

LI, C-H.; WONG, Y-S.; WANG, H-Y.; TAM, N. F-Y. "Anaerobic biodegradation of PAHs in mangrove sediment with amendment of NaHCO_3 ". *Journal of Environmental Sciences*, **30**: 148-156, 2015.

LIAW, H. J. e SRINIVASAN, V. R. "Biodegradation of diphenyl ethers by a copper-resistant mutant of *Erwinia sp*". *Journal of Industrial Microbiology*, **6**: 235– 241, 1990.

LIEM A.K.; FURST P.; RAPPE C. "Exposure of populations to dioxins and related compounds". *Food Addit Contam.*, **17**: 241-259, 2000.

LIN, M.; HU, X.; CHEN, W.; WANG, H.; WANG, C. "Biodegradation of phenanthrene by *Pseudomonas sp.* BZ-3, isolated from crude oil contaminated soil". *International Biodeterioration & Biodegradation*, **94**: 176–181, 2014a.

LIN, W. C.; CHANG-CHIEN, G. P.; KAO, C. M.; NEWMAN, L.; WONG, T. Y.; LIU, J. K. "Biodegradation of Polychlorinated Dibenzo--Dioxins by Strain NSYSU". *Journal of Environment Quality*, **43**(1): 349-357, 2014b.

LIN, S.; GAN, N.; QIAO, L.; ZHANG, J.; CAO, Y.; CHEN, Y. "Magnetic metal-organic frameworks coated stir bar sorptive extraction coupled with GC–MS for determination of polychlorinated biphenyls in fish samples". *Talanta*, **144**: 1139–1145, 2015.

LIU, H.; YANG, Z.; HUANG, P.; ZHOU, S. Z. "Degradation of aniline by newly isolated, extremely aniline-tolerant *Delftia sp.* AN3". *Applied Microbiology and Biotechnology*, **58**(5), 679–682, 2002.

LUDEWIG, G. e ROBERTSON, L. W. "Polychlorinated biphenyls (PCBs) as initiating agents in hepatocellular carcinoma". *Cancer Lett.* **334**: 46–55, 2013.

LUIZ, A. L. "Investigação do potencial antimicrobiano de plantas do cerrado no controle de micro-organismos simbiótico de insetos praga". São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, 2014. Dissertação de Mestrado, 121 p.

LUKES, P. e LOCKE, B. R. "Degradation of substituted phenols in a hybrid gas-liquid electrical discharge reactor". *Ind. Eng. Chem. Res.*, **44**: 2921-2930, 2005.

LUZARDO, O. P.; RUIZ-SUÁREZ, N.; ALMEIDA-GONZÁLEZ; M., HENRÍQUEZ-HERNÁNDEZ, L. A.; ZUMBADO, M.; BOADA, L. D. "Multi-residue method for the determination of 57 Persistent Organic Pollutants in human milk and colostrum using a QuEChERS-based extraction procedure". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **405**(29): 9523–9536, 2013.

MARISCAL, A.; LOPEZ-GIGOSOS; R. M., CARNERO-VARO, M.; FERNANDEZ-CREHUET, J. Fluorescent assay based on resazurin for detection of activity of disinfectants against bacterial biofilm. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **82**(4): 773–783, 2009.

MARQUES, F. A. "Investigação do potencial antimicrobiano de *Casearia sylvestris* sobre microrganismo endossimbionte de *Diabrotica speciosa*". São Carlos,

Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, 2013. Dissertação de Mestrado, 158 p.

MEAGHER, R. B. "Phytoremediation of toxic elemental organic pollutants". *Current Opinion in Plant Biology*, **3**: 153–162, 2000.

MEYER, D.; DRESSLER, H.; RUCK, W. "Improvement of GC sensitivity for polar and nonpolar PAHs by using a deactivated *liner*". *LCGC north America*. **25**: 180-190, 2007.

MEZCUA, M.; GÓMEZ, M. J.; FERRER, I.; AGUERA, A.; HERNANDO, M. D.; FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. "Evidence of 2,7/2,8-dibenzodichloro-p-dioxin as a photodegradation product of triclosan in water and wastewater samples." *Analytica Chimica Acta*, **524**(1-2): 241–247, 2004.

MOCARELLI P.; BRAMBILLA P.; GERTHOUS P. M.; PATTERSON D. G. JR; NEEDHAM L.I. "Change in sex ratio with exposure to dioxin". *Lancet*, **348**: 409, 1996.

MOEBIUS, N.; ROSS, C.; SCHERLACH, K.; ROHM, B.; ROTH, M.; HERTWECK, C. "Biosynthesis of the respiratory toxin bongkrekic acid in the pathogenic bacterium *Burkholderia gladioli*". *Chemistry & Biology*, **19**(9), 1164–1174, 2012.

MOODY, J. D.; FREEMAN, J. P.; DOERGE, D. R.; CERNIGLIA, C. E. "Degradation of Phenanthrene and Anthracene by Cell Suspensions of *Mycobacterium sp.* Strain PYR-1". *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(4): 1476–1483, 2001.

MONOD, J. "The Growth of Bacterial Cultures". *Annual Review of Microbiology*, **3**(1): 371–394, 1949.

MORAES, J. e KÖHLER, A. "Flutuação populacional e distribuição espacial de *Diabrotica speciosa* Gemar, 1824 (Coleoptera: Chrysomelidae) em cultivo orgânico de tabaco". *Bioikos*, **26**: 87-94, 2012.

MORAN, N. A. "Symbiosis". *Current Biology*, **16**: R866-R871, 2006.

MORI, T.; WATANABE, M.; TAURA, H.; KUNO, T.; KAMEI, I.; KONDO, R. "Degradation of chlorinated dioxins and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and remediation of PAHcontaminated soil by the entomopathogenic fungus, *Cordyceps militaris*". *Journal of Environmental Chemical Engineering*, **3**: 2317–2322, 2015.

MMA – Ministério do Meio Ambiente. Estudo Sobre as Bifenilas policloradas Proposta para Atendimento á "Convenção De Estocolmo", Anexo A – Parte II. 2012a.

Disponível em:

<http://www.mma.gov.br/estruturas/sqa_prorisc_upml/_arquivos/estudo_sobre_as_bifenilas_policloradas_82.pdf> Acesso em: 09 de outubro de 2018.

MMA – Ministério do Meio Ambiente. "Guia para o inventário nacional de Bifenilas policloradas (PCB)". Versão para consulta das partes. BRASIL, 2012b.

MMA – Ministério do Meio Ambiente. “Inventário Nacional de fontes e estimativa de emissões de dioxinas e furanos: Brasil POPs: Plano Nacional de Implementação. Convenção de Estocolmo”, Brasil, 2013. Disponível em: <http://queimadas.cptec.inpe.br/~rqueimadas/material3os/2013_MMA_InventarioEmissoesDioxinas_IBAMA_DE3os.pdf> Acesso em: 14 de outubro de 2018.

MUDZIWAPASI, R.; MLAMBO, S. S.; CHIGU, N. L.; KUIPA, P. K.; SANYIKA, W. T. “Isolation and molecular characterization of bacteria from the gut of *Eisenia fetida* for biodegradation of 4,4 DDT”. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, **4**: 041-047, 2016.

MURÍNOVÁ, S.; DERCOVÁ, K.; DUDÁŠOVÁ, H. “Degradation of polychlorinated biphenyls (PCBs) by four bacterial isolates obtained from the PCB-contaminated soil and PCB-contaminated sediment”. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **9**: 52–59, 2014.

MURUGAN, K. e VASUDEVAN, N. “Intracellular toxicity exerted by PCBs and role of VBNC bacterial strains in biodegradation”. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **157**: 40–60, 2018.

NAM, I. H.; KIM, Y. M.; SCHMIDT, S.; CHANG, Y. S. “Biotransformation of 1,2,3-tri- and 1,2,3,4,7,8-hexachlorodibenzo-*p*-dioxin by *Sphingomonas wittichii* strain RW1”. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 112–116, 2006.

NEWMAN, L. A. e REYNOLDS, C. M. “Bacteria and phytoremediation: new uses for endophytic bacteria in plants”. *Trends in Biotechnology*, **23**(1): 6–8, 2005.

NOJIRI, H.; HABE, H.; TOSHIO OMORI, T. “Bacterial degradation of aromatic compounds via angular dioxygenation”. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **47**: 279–305, 2001.

NOPARAT, P.; MANEERAT, S.; SAIMMAI, A. “Application of biosurfactant from *Sphingobacterium spiritivorum* AS43 in the biodegradation of used lubricating oil”. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **172**(8): 3949–3963, 2014.

OANH, N.T.P.; KIDO, T.; HONMA, S.; OYAMA, Y.; ANH, L.T.; PHUC, H. D.; VIET, N. H.; MANH, H. D.; OKAMOTO, R.; NAKAGAWA, H.; NAKAYAMA, S. F.; NHU, D. D.; VAN TUNG. D.; VAN CHI, V.; MINH, N. H.; VAN TOAN, N. “Androgen disruption by dioxin exposure in 5-year-old Vietnamese children: Decrease in serum testosterone level”. *Science of the Total Environment*, **640**: 466–474, 2018.

ORTIZ-HERNÁNDEZ, M. L.; SÁNCHEZ-SALINAS, E.; OLVERA-VELONA, A., FOLCH-MALLOL, J. L. “Pesticides in the environment: impacts and their biodegradation as a strategy for residues treatment. In Stoytcheva M (ed) Pesticides-formulations, effects, fate”. ISBN: 978-953-307-532-7. *InTech. Rijeka*, 551–574, 2011.

OTURAN, M. A. e AARON, J-J. “Advanced Oxidation Processes in Water/Wastewater Treatment: Principles and Applications”. *A Review. Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **44**: 2577–2641, 2014.

OZDAL, M.; OZDAL, O.G.; ALGUR, O. F. "Isolation and characterization of α -endosulfan degrading bacteria from the microflora of Cockroaches". *Polish Journal of Microbiology*, **65**: 63–68, 2016.

PALLERONI, N. J. "Burkholderia". *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*, 1–50, 2015.

PANDEY, A. K.; CHAUDHARY, P.; SINGH, S. B.; ARORA, A.; KUMAR, K.; CHAUDHRY, S.; NAIN, L. "Deciphering the traits associated with PAH degradation by a novel *Serratia marcescens* L-11 strain". *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, **47**(5), 755–765, 2012.

PARSONS, J. R.; DE BRUIJNE, J. A.; WEILAND, A. R. "Biodegradation pathway of 2-chlorodibenzo-*p*-dioxin and 2-chlorodibenzofuran in the biphenyl-utilising strain JB1". *Chemosphere*, **37**: 1915–1922, 1998.

PHAM, T. T.; NISHIJO, M.; NGUYEN, A. T. N.; TRAN, N.N.; HOANG, V. L.; TRAN, H. A.; NGUYEN, T. V.; NISHIJO, H. "Perinatal dioxin exposure and the neurodevelopment of Vietnamese toddlers at 1 year of age". *Sci. Total Environ.*, **536**: 575–581, 2015.

PHILIPPI, M.; SCHMID, J.; WIPF, H. K.; HUTTER, R. "A microbial metabolite of TCDD". *Experientia*, **38**: 659–661, 1982.

PENG, P.; YANG, H.; JIA, R.; LI, L. "Biodegradation of dioxin by a newly isolated *Rhodococcus* sp. with the involvement of self-transmissible plasmids". *Applied Microbiology and Biotechnology*, **97**: 5585–5595, 2013.

PENTEADO J.C.P e VAZ J.M. "O legado das bifenilas policloradas (PCB)". *Química Nova*, **24**: 390-398, 2001.

PERLATTI, B. Avaliação do potencial bioremediador de cepas microbianas em compostagem aeróbica. Programa de Pós-graduação em Química - Universidade de São Carlos, 2012. Dissertação de Mestrado, 134 p.

PHILLIPS, D. H. "Polycyclic aromatic hydrocarbons in the diet". *Mutation Research*, **443**: 139-147, 1999.

PIGNATELLO, J. J.; OLIVEROS, E.; MACKAY, A. "Advanced oxidation processes for organic contaminant destruction based on the fenton reaction and related chemistry". *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **36**: 1–84, 2006.

POLAND A. e KNUTSON J. C. "2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanisms of toxicity". *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, **22**: 517-554, 1982.

POTRAWFKE, T.; LÖHNERT, T.-H.; TIMMIS, K. N.; WITTICH, R.-M. "Mineralization of low-chlorinated biphenyls by *Burkholderia* sp. strain LB400 and by a two-membered consortium upon directed interspecies transfer of chlorocatechol pathway genes". *Applied Microbiology and Biotechnology*, **50**(4), 440–446, 1998.

PUGAZHENDI, A.; QARI, H.; AL-BADRY BASAHI, J. M.; GODON, J. J.; DHAVAMANI, J. "Role of a halothermophilic bacterial consortium for the biodegradation of PAHs and the treatment of petroleum wastewater at extreme conditions". *International Biodeterioration & Biodegradation*, **121**: 44–54, 2017.

QINA, W.; ZHUA, Y.; FANB, F.; WANGA, Y.; LIUC, X.; DINGA, A.; DOUA, J. "Biodegradation of benzo(a)pyrene by *Microbacterium* sp. strain under denitrification: degradation pathway and effects of limiting electron acceptors or carbon source". *Biochemical Engineering Journal*, **121**: 131-138, 2017.

RAJASEKAR, A.; BALASUBRAMANIAN, R.; VM KUMA, J. "Role of Hydrocarbon Degrading *Bacteria Serratia marcescens* ACE2 and *Bacillus cereus* ACE4 on Corrosion of Carbon Steel API 5LX". *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **50**(17): 10041–10046, 2011.

RAJASEKAR, A. e TING, Y.-P. "Microbial corrosion of aluminum 2024 aeronautical alloy by hydrocarbon degrading *Bacteria Bacillus cereus*ACE4 and *Serratia marcescens* ACE2". *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **49**(13): 6054–6061, 2010.

RATHNA, R.; VARJANI, S.; NAKKEERAN, E. "Recent developments and prospects of dioxins and furans remediation". *Journal of Environmental Management*, **223**: 797–806, 2018.

ROBARDS. K. "The determination of polychlorinated biphenyl residues: A review with special reference to foods". *Journal Food Additives & Contaminants*, **7**: 143-174, 1990.

ROBERTO, S. R.; GENTA, W.; VENTURA, M. U. "*Diabrotica speciosa* (Ger.) (Coleoptera: Chrysomelidae): new pest in table grape orchards". *Neotropical Entomology*, **30**: 721-722, 2001.

RODRIGUES, J. L. M.; KACHEL, C. A.; AIELLO, M. R.; QUENSEN, J. F.; MALTSEVA, O. V.; TSOI, T. V.; TIEDJE, J. M. "Degradation of Aroclor 1242 dechlorination products in sediments by *Burkholderia xenovorans* LB400(ohb) and *Rhodococcus* sp. Strain RHA1(fcb)". *Applied and Environmental Microbiology*, **72**(4): 2476–2482, 2006.

ROSE, M.; WHITE, S.; MACARTHUR, R.; PETCH, R. G.; HOLLAND, J.; DAMANT, A. P. "Single-laboratory validation of a GC/MS method for the determination of 27 polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in oils and fats". *Food Additives and Contaminants*, **24**(6): 635–651, 2007.

ROSSBACH, B., PREUSS, R.; LETZEL, S., DREXLER, H., ANGERER, J. "Biological monitoring of occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by determination of monohydroxylated metabolites of phenanthrene and pyrene in urine". *International Archives of Occupational and Environmental Health*, **81**: 221–229, 2007.

RUIZ-MATUTE, A. I.; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, O.; RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, S.;

SANZ, M. L.; MARTÍNEZ-CASTRO, I. “Derivatization of carbohydrates for GC and GC–MS analyses”. *Journal of Chromatography B*, **879**: 1226–1240, 2011.

RYAN, R. P.; GERMAINE, K.; FRANKS, A.; RYAN, D. J.; DOWLING, D. N. “Bacterial endophytes: recent developments and applications”. *FEMS Microbiology Letters*, **278**(1): 1–9, 2008.

SADLER, R.; CONNELL, D. “Global distillation in an era of climate change, organic pollutants ten years after the Stockholm Convention - environmental and analytical update”. [S.l.]: Intech, p. 191–216, 2012. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/books/organic-pollutants-ten-years-after-the-stockholm-convention-environmental-and-analytical-update/global-distillation-in-an-era-of-climate-change>> Acesso em: 11 de outubro de 2018.

SAFE, S. “Determination of 2,3,7,8-TCDD toxic equivalent factors (TEFs): Support for the use of the *in vitro* AHH induction assay”. *Chemosphere*, **16**: 791–802, 1987.

SAFE, S. “Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment”. *Critical Reviews in Toxicology*, **24**: 87-149, 1994.

SAIMMAI, A.; KAEWRUENG, J.; MANEERAT, S. “Used lubricating oil degradation and biosurfactant production by SC-9 consortia obtained from oil-contaminated soil”. *Annals of Microbiology*, **62**(4): 1757–1767, 2012.

SAMANTA, S. K.; OM V.; SINGH, O. V.; JAIN, R. K. “Polycyclic aromatic hydrocarbons: environmental pollution and bioremediation”. *Trends in Biotechnology*, **20**: 241-248, 2002

SATHYANARAYANA, S.; BUTTS, S.; WANG, C.; BARRETT, E.; NGUYEN, R.; SCHWARTZ, S. M.; HAALAND, W.; SWAN, H. S. “Early prenatal phthalate exposure, sex steroid hormones, and birth outcomes”. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, **102**: 1870–1878, 2017.

SEEGER, M., CAMARA, B., & HOFER, B. “Dehalogenation, denitration, dehydroxylation, and angular attack on substituted biphenyls and related compounds by a biphenyl dioxygenase”. *Journal of Bacteriology*, **183**(12): 3548–3555, 2001.

SHIU, W. Y. e MACKAY, D. A. Critical review of aqueous solubilities, vapor pressures, henry’s law constants, and octanol–water partition coefficients of the polychlorinated biphenyls. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, **15**(2): 911–929, 1986.

SICILIANO, S. D.; FORTIN, N.; MIHOC, A.; WISSE, G.; LABELLE, S.; BEAUMIER, D.; OUELLETTE, D. REAL ROY, R.; WHYTE, L. G.; BANKS, M. K.; SCHWAB, P.; KEN LEE, K.; GREER, C. W. “Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination”. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**(6): 2469–2475, 2011.

SILVA, C. F. “Produção biotecnológica de surfactante por *Serratia marcescens*”. Campinas, Programa de Pós-graduação em Ciência e tecnologia de alimentos, Universidade estadual de Campinas, 2002. Dissertação de Mestrado, p.92.

SILVA, D. S. P.; CAVALCANTI, D. L.; MELO, E. J. V.; SANTOS, P. N. F.; LUZ, E. L. P.; GUSMÃO, N. B.; QUEIROZ SOUSA, M. DE F. V. “Bio-removal of diesel oil through a microbial consortium isolated from a polluted environment. International” *Biodeterioration & Biodegradation*, **97**: 85–89, 2015.

SINGH, S.; KANG, S. H.; MULCHANDANI, A.; CHEN, W. “Bioremediation: environmental clean-up through pathway engineering”. *Current Opinion in Biotechnology*, **19**: 437–444, 2008.

SINGH, A.; KUMAR, K.; PANDEY, A. K.; SHARMA, A.; SINGH, S. B.; KUMAR, K.; ARORA, A.; NAIN, L. “Pyrene degradation by biosurfactant producing bacterium *Stenotrophomonas maltophilia*”. *Agricultural Research*, **4**(1): 42–47, 2015.

SOMARAJA, P. K.; GAYATHRI, D.; RAMAIAH, N. “Molecular characterization of 2-chlorobiphenyl degrading *Stenotrophomonas maltophilia* GS-103”. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **91**(2): 148–153, 2013.

SUSKIND, R. R., “Chloracne, the hallmark of dioxin intoxication”. *Scand. J. Work Environ. Health*, **11**: 165-171, 1985.

SWAATHY, S.; KAVITHA, V.; PRAVIN, A. S.; MANDAL, A. B.; GNANAMANI, A. “Microbial surfactant mediated degradation of anthracene in aqueous phase by marine *Bacillus licheniformis* MTCC 5514”. *Biotechnology Reports*, **4**: 161–170, 2014.

TANABE, S. “PCB Problems in the Future: Foresight from Current Knowledge, Environmental Pollution”, **50**: 5-28, 1988.

TAO, S.; CUI, Y. H.; XU, F.L.; LI, B. G.; CAO, J.; LIU, W.X.; SCHMITT, G., W.; ANG, X.J.; SHEN, W. R.; QING, B. P.; SUN, R. “Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in agricultural soil and vegetables from Tianjin”. *The Science of the Total Environment*, **320**: 11–24, 2004.

TOLEDO, F. L.; CALVO, C.; RODELAS, B.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. “Selection and identification of bacteria isolated from waste crude oil with polycyclic aromatic hydrocarbons removal capacities”. *Systematic and Applied Microbiology*, **29**(3): 244–252, 2006.

TOPPARI, J. e JUUL, A. “Trends in puberty timing in humans and environmental modifiers”. *Molecular and Cellular Endocrinology*, **324**: 39–44, 2010.

VEYRAND, B.; BROSSEAUD, A.; SARCHER, L.; VARLET, V.; MONTEAU, F.; MARCHAND, P.; FRANÇOIS, A.; LE BIZEC, B. “Innovative method for determination of 19 polycyclic aromatic hydrocarbons in food and oil samples using gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry based on an isotope dilution approach”. *Journal of Chromatography A*, **1149** (2): 333–344, 2007.

VIGLIANI, M. B. e CUNHA, C. B. Multiple recurrent abscesses in a patient with undiagnosed IL-12 deficiency and infection by *Burkholderia gladioli*. *IDCases*, **12**: 80–83, 2018.

WANG, C.; SUN, H.; LI, Y.; ZHANG, Q. “Enzyme activities during degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* in soils”. *Chemosphere*, **77**: 733-738, 2009.

WANG, X.; TENG, Y.; LUO, Y.; DICK, R. P. “Biodegradation of 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl by *Sinorhizobium meliloti* NM”. *Bioresource Technology*, **201**: 261–268, 2016.

WASI, S.; TABREZ, S.; AHMAD, M. “Use of *Pseudomonas* spp. for the bioremediation of environmental pollutants: a review”. *Environmental Monitoring and Assessment*, **185**(10): 8147–8155, 2013.

WEISSENFELS, W. D.; BEYER, M.; KLEIN, J. “Degradation of phenanthrene, fluorene and fluoranthene by pure bacterial cultures”. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **32**(4): 479–484, 1990.

WELLINGTON LABS. “Reference and Handling Guide, GC/MS Characterization and Analysis of Selected Halogenated Aromatic Compounds”. 2012-2014. Disponível em:http://www.well-labs.com/docs/wellington_catalogue_2012-2014.pdf. Acessado 09/02/2018.

WERREN, J.H. “Symbionts provide pesticide detoxification”. *PNAS*, **109**: 8364-8365, 2012.

WILKES, H.; WITTICH, R. M.; TIMMIS, K. N.; FORTNAGEL, P.; FRANCKE, W. “Degradation of chlorinated dibenzofurans and dibenzo-*p*-dioxins by *Sphingomonas* sp. strain RW1”. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**: 367– 371, 1996.

WILSON, M. S.; HERRICK, J. B.; JEON, C. O.; HINMAN, D. E.; MADSEN, E. L. “Horizontal transfer of phnac dioxygenase genes within one of two phenotypically and genotypically distinctive naphthalene-degrading guilds from adjacent soil environments”. *Applied and Environmental Microbiology*, **69**(4): 2172–2181, 2003.

WILSON, S. C. e JONES, K. C. “Bioremediation of soil contaminated with polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs): a review”. *Environmental Pollution*, **81**, 229-249, 1993.

WONG, J. W. C.; LAI, K. M.; WAN, C. K.; MA, K. K.; FANG, M. “Isolation and optimization of PAH-degradative bacteria from contaminated soil for PAHs bioremediation” *Water, Air, and Soil Pollution*, **139**(1/4): 1–13, 2002.

WONGSA, P.; TANAKA, M.; UENO, A., HASANUZZAMAN; M., YUMOTO, I.; OKUYAMA, H. “Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil”. *Current Microbiology*, **49**(6): 415–422, 2004.

WU, W.; HUANG, H.; LING, Z.; YU, Z.; JIANG, Y.; LIU, P.; LI, X. "Genome sequencing reveals mechanisms for heavy metal resistance and polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in *Delftia lacustris* strain LZ-C". *Ecotoxicology*, **25**(1): 234–247, 2015.

YANG, Y.; YANG, J.; WU, W.-M.; ZHAO, J.; SONG, Y.; GAO, L.; YANG, R.; JIANG, L. "Biodegradation and mineralization of polystyrene by plastic-eating mealworms: Part 2. Role of gut microorganisms". *Environmental Science & Technology*, **49**(20): 12087–12093, 2015.

YOUSAF, S.; AFZAL, M.; REICHENAUER, T. G.; BRADY, C. L.; SESSITSCH, A. "Hydrocarbon degradation, plant colonization and gene expression of alkane degradation genes by endophytic *Enterobacter ludwigii* strains". *Environmental Pollution*, **159**(10): 2675–2683, 2011.

YU, V. L. "*Serratia marcescens*". *New England Journal of Medicine*, **300**(16): 887–893, 1979.

ZEINALI, M.; VOSSOUGH, M.; ARDESTANI, S. K. "Degradation of phenanthrene and anthracene by *Nocardia otitidiscaviarum* strain TSH1, a moderately thermophilic bacterium". *Journal of Applied Microbiology*, **105**(2): 398–406, 2008.

ZHANG, D. e ZHU, L. "Effects of Tween 80 on the removal, sorption and biodegradation of pyrene by *Klebsiella oxytoca* PYR-1". *Environmental Pollution*, **164**: 169–174, 2012.

ZHU, X.; NI, X.; LIU, J.; GAO, Y. "Application of endophytic bacteria to reduce persistent organic pollutants contamination in plants". *Clean – Soil, Air, Water*, **42**, 306–310, 2014.

CAPÍTULO 3

3 - Extração e análise por GC-MS do óleo essencial de pimentas *Capsicum* spp.

3.1 – Introdução

3.1.1 – *Capsicum* spp.

A pimenta é uma das hortaliças mais consumidas no mundo, mesmo não sendo um condimento que agrada a todo paladar. É matéria-prima para a extração de aromatizantes, corantes e oleorresinas que são utilizadas na indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia. Em alimentos é utilizada principalmente para conferir sabor e resistência à oxidação lipídica. Alguns tipos de pimentas do gênero *Capsicum* são utilizados como plantas ornamentais, por possuírem características tais como fácil cultivo, alta durabilidade além de valor estético bastante apreciado entre as pessoas (CARVALHO et al., 2006; NEITZKE et al., 2010).

As pimentas são fontes importantes de carotenoides e vitaminas. Entre as vitaminas destacam-se, o ácido ascórbico (vitamina C) e os tocoferóis (vitamina E). Um conteúdo de diferentes carotenoides confere as pimentas uma faixa variável de cores que é característica para cada espécie. Mais de 30 pigmentos diferentes já foram identificados. As cores vermelhas e amarelas são as mais comuns para os frutos maduros, sendo a cor vermelha atribuída aos carotenoides capsantina e capsorubina e a cor amarela atribuída aos carotenoides β -caroteno, zeantina e criptoxantina. Os carotenóides encontrados em pimenta como α -caroteno, β -caroteno e β -criptoxantina, são considerados de grande valor nutricional por serem substâncias pró-vitâmicas. O conteúdo de fibra alimentar pode variar de 4 a 16% em massa, podendo ser considerado superior ao teor de algumas frutas e cereais. É fonte também de minerais como potássio, magnésio, ferro, cálcio e fósforo. (CARVALHO et al., 2006; RODRÍGUEZ-BURRUEZO et al., 2010; PINTO et al. 2013).

O gênero de pimentas *Capsicum* pertence à família Solanacea e compreende mais de 30 espécies (Tabela 3.1), as quais são classificadas em

domésticas, semi-domésticas e silvestres. Esse gênero é originário das Américas e já era consumido há mais de 7.000 anos no México. Na época do descobrimento do Brasil pimenta moída misturada às cinzas era utilizada como eficiente método de conservação de sementes. Atualmente o gênero é produzido em todo o mundo sendo os coreanos, tailandeses, indianos e mexicanos os principais consumidores (BOSLAND e VOSTAVA, 2000; CARVALHO et al., 2006).

TABELA 3.1: Espécies de pimentas do gênero *Capsicum* descritas na literatura (Fonte: BOSLAND e VOSTAVA, 2000)

Pimentas gênero <i>Capsicum</i>	
<i>C. annuum</i>	<i>C. geminifolium</i>
<i>var. glabriusculum</i>	<i>C. hookerianum</i>
<i>var. annuum</i>	<i>C. hunzikerianum</i>
<i>C. baccatum</i>	<i>C. lanceolatum</i>
<i>var. baccatum</i>	<i>C. leptopodium</i>
<i>var. pendulum</i>	<i>C. longidentatum</i>
<i>C. caballeroi</i>	<i>C. lycianthoides</i>
<i>C. campylopodium</i>	<i>C. minutiflorum</i>
<i>C. cardenasii</i>	<i>C. mirabile</i>
<i>C. ceratocalyx</i>	<i>C. parvifolium</i>
<i>C. chacoense</i>	<i>C. pereirae</i>
<i>C. chinense</i>	<i>C. praetermissum</i>
<i>C. coccineum</i>	<i>C. pubescens</i>
<i>C. cornutum</i>	<i>C. recurvatum</i>
<i>C. dimorphum</i>	<i>C. rhomboideum</i>
<i>C. eximium</i>	<i>C. schottianum</i>
<i>C. friburgense</i>	<i>C. scolnikianum</i>
<i>C. frutescens</i>	<i>C. tovarii</i>
<i>C. galapagoense</i>	<i>C. villosum</i>

A pungência, que é uma característica bastante apreciada das pimentas, sendo atribuída a substâncias alcalóides chamadas capsaicinóides, cuja concentração define o grau de ardência do fruto. No gênero *Capsicum*, os capsaicinóides mais importantes são: a capsaicina e a diidrocapsaicina. O teor de pungência é avaliado pela escala de Unidades de Calor Scoville (em inglês, Scoville Heat Units – SHU) por meio de aparelhos específicos. O valor de SHU varia de zero a trezentos mil, indo desde pimentas doces (não picantes) até pimentas

extremamente picantes. A Tabela 3.2 descreve alguns exemplos de pimentas cultivados no Brasil cujo teor de capsaicinóides vai de baixo até muito alto (CARVALHO et al., 2006; ZIINO et al. 2009; PINTO et al. 2013).

TABELA 3.2: Teores de capsaicinóides em algumas espécies do gênero *Capsicum* (Fonte: CARVALHO et al. 2006).

Nível de pungência	Nome Vulgar	Nome científico	Capsaicinóides	
			Totais (SHU)	(%)
Nenhum	Pimenta Cambuci	<i>C. baccatum var. pendulum</i>	0	0
	Pimenta biquinho	<i>C. chinense</i>	0	0
Baixa	Pimenta redonda	<i>C. baccatum var. pendulum</i>	10.510	0,06
Média	Pimenta jalapeño	<i>C. baccatum var. annuum</i>	34.590	0,20
	Pimenta de cheiro	<i>C. chinense</i>	47.180	0,27
Alta	Pimenta bode	<i>C. chinense</i>	105.500	0,59
Muito alta	Pimenta malagueta	<i>C. frutescens</i>	156.370	0,89
	Pimenta Cumari do Pará	<i>C. chinense</i>	219.020	1,22

Pimentas do gênero *Capsicum* têm sido usadas desde os tempos pré-colombianos, como plantas medicinais. Na atualidade essa planta configura-se como um dos mais amplamente utilizados de todos os remédios naturais. A capsaicina, é considerada como princípio ativo dessa planta e tem sido muito utilizada no tratamento de dores crônicas e inflamações. Essa substância tem sido utilizada principalmente no tratamento tópico para uma variedade de condições caracterizadas por dor não responsiva aos analgésicos clássicos. É utilizada em tratamento de lombalgia, neuralgia pós-herpética, neuroma pós-mastectomia, síndrome da distrofia simpática reflexa, neuropatia diabética, artrite reumatóide, psoríase, prurido associado à hemodiálise e vestibulite vulvar. A sensação de dor é causada pela liberação de um neurotransmissor nas terminações nervosas, chamado substância P, que informa ao cérebro que algo doloroso está ocorrendo. A capsaicina leva a um aumento de liberação de substância P, causando um esgotamento da sua fonte, reduzindo sua liberação e diminuindo a dor. A diminuição da liberação da substância P no tratamento de artrite também é vantajosa no sentido de se reduzir a inflamação em longo prazo e diminuir a degradação da cartilagem (RUMSFIELD e WEST, 1991; ZHANG e LI, 1994; FUSCO e GIACOVAZZO, 1997; BOSLAND e VOSTAVA, 2000).

A capsaicina também tem sido citada na literatura como uma substância antitumoral, capaz de induzir apoptose em muitos tipos de linhagem celular maligna, incluindo adenocarcinoma do cólon, câncer pancreático, carcinoma hepatocelular, câncer de próstata, câncer de mama e muitos outros. O mecanismo pelo qual a capsaicina induz apoptose em células cancerígenas não está completamente elucidado, mas envolve aumento de cálcio intracelular, geração de espécies reativas de oxigênio, ruptura do potencial de transição da membrana mitocondrial, e ativação de fatores de transcrição como NFκB e STATS (MORI et al., 2006; IP et al., 2011; DÍAZ-LAVIADA e RODRÍGUEZ-HENCHE, 2014).

3.1.2 – Espécies de pimentas *Capsicum* spp. investigadas

As diferentes espécies e variedades de pimentas são, em geral, distinguidas por características morfológicas dos frutos e, principalmente, das flores. O gênero *Capsicum* é dividido em cinco grandes espécies cultiváveis: *Capsicum annum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum pubescens*, *Capsicum chinense* e *Capsicum frutescens*. Dessas espécies três foram investigadas nesse trabalho: *Capsicum baccatum*, *Capsicum frutescens* e *Capsicum chinense* (ESHBAUGH, 1970).

a) *Capsicum baccatum*

As pimentas da espécie *C. baccatum* são tradicionalmente cultivadas na região andina há milhares de anos e constituem a pimenta mais popular consumida nessa região. No Brasil são conhecidas duas variedades, uma doméstica, variedade *pendulum*, e outra semi-domesticada, variedade var. *praetermissum*. Nesse trabalho, no entanto, só foram estudadas pimentas da variedade *pendulum*. Essa variedade é encontrada com maior frequência na região Sul do país, sendo uma planta do tipo arbustiva de cerca de um metro de altura. Apresenta flores uniformes e frutos que variam muito, tanto no formato, quanto na pungência. As mais cultivadas no Brasil são a Dedo de moça e a Chapéu de frade. A pimenta Dedo de moça é também conhecida como Chifre de viado, pimenta vermelha ou calabreza e é a pimenta mais consumida no país em molhos ou desidratada. Possui frutos maduros de coloração vermelha, alongados com cerca de

7,5 cm de comprimento por 1,5 cm de largura. Já a Chapéu de frade também conhecida como Cambuci é bastante consumida em saladas por ser considerada uma pimenta doce. Possui frutos maduros também de coloração vermelha com cerca de 4 cm de comprimento e 7 cm de largura, Figura 3.1 (CARVALHO et al., 2006; RÉGO et al., 2010).

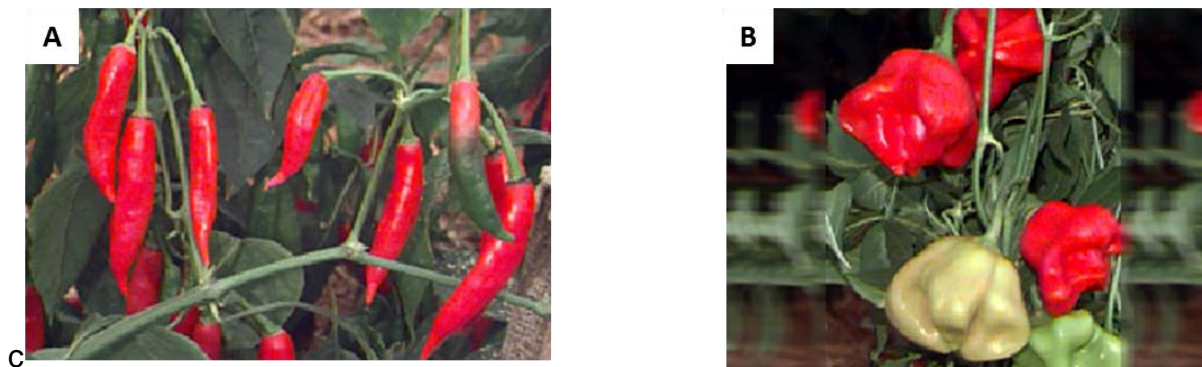


FIGURA 3.1: Pimentas da espécie *Capsicum baccatum*, em A) Pimenta Dedo de moça e em B) Pimenta Chapéu de Frade. (Fonte: adaptado de Amaro, sem data - Embrapa)

b) *Capsicum frutescens*

Os tipos mais comuns dessa espécie de pimenta são a malagueta e o tabasco. No Brasil a malagueta é a mais comum, sendo o tabasco uma planta mais comum nos Estados Unidos. A pimenta Malagueta (Figura 3.2) é encontrada principalmente na Região Norte, mas também pode ser cultivada nas regiões Sudeste, Nordeste e Centro-Oeste. Possui frutos eretos, alongados, pequenos e vermelhos, medindo de 1 cm a 3 cm de comprimento por 0,4 cm a 0,5 cm de largura. É consumida *in natura*, conservas e molhos, sendo bastante comuns na culinária nordestina, onde é utilizada no tempero de pratos à base de peixes, carnes e outros típicos da Bahia, como o acarajé (CARVALHO et al., 2006).



FIGURA 3.2: Pimenta malagueta pertencente a espécie *Capsicum frutescens*. (Fonte: adaptado de CARVALHO et al., 2006)

c) *Capsicum chinense*

Essa espécie foi a primeira a ser encontrada pelos exploradores do “Novo Mundo”, no entanto, não é uma espécie muito difundida mundialmente. O nome “chinense” não é muito adequado, pois sendo tipicamente americana, não tem relação com a China. É uma planta que se destaca pela ampla adaptação às condições tropicais sendo a espécie mais brasileira de todas as pimentas domesticadas. Possui grande variabilidade que pode ser vista na diversidade de formas e cores dos frutos, que são geralmente muito picantes e aromáticos. Quatro das pimentas estudadas nesse trabalho pertencem a essa espécie: Cumari do Pará, Pimenta Bode, Biquinho e Pimenta Neyde – Roxa exótica (Figura 3.3).

A Cumari do Pará é muito utilizada em conservas, por ser uma pimenta aromática. Seu formato é alongado chegando até 3 cm de comprimento por 1 cm de largura. Quando madura tem coloração amarela (CARVALHO et al., 2006).

A Pimenta Bode é mais comum na região centro-oeste. Possui frutos arredondado ou achatados de cerca de 1 cm de diâmetro. Apresenta cor amarela ou vermelha, quando madura. É muito aromática e pungente, sendo amplamente utilizada na culinária goiana como tempero no preparo de carnes, arroz, feijão, pamonha salgada, em biscoitos de polvilho, podendo ser usada *in natura* ou em conservas (CARVALHO et al., 2006).

A Pimenta Biquinho é uma pimenta muito popular por ser doce e aromática. Possui frutos com coloração vermelha ou amarela, quando maduros, com 2,5 a 2,8 cm de comprimento e 1,5 cm de largura. Seu formato é triangular pontiagudo, como um bico, que dá origem ao nome vulgar. É muito comum em

Minas e no Estado de Goiás. Os frutos são usados para o preparo de conservas, mas podem ser consumidos frescos, como aperitivo (CARVALHO et al., 2006).

A pimenta Neyde é uma pimenta exótica de coloração roxa escura muito picante de origem brasileira. Pode ser usada em molhos, mas é principalmente utilizada para a decoração de jardins (VIRIDEA, 2018).

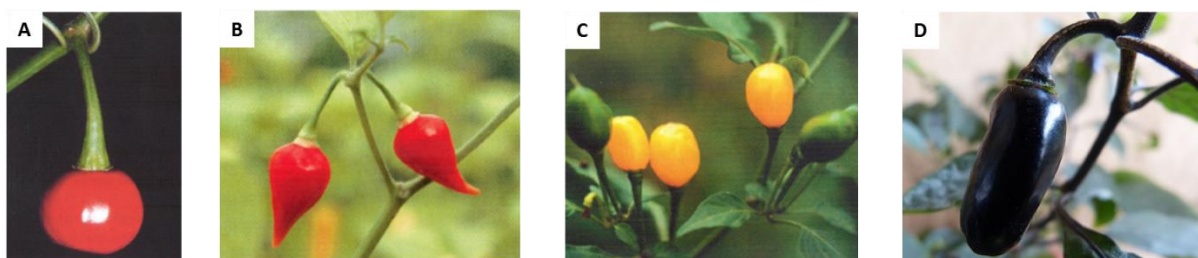


FIGURA 3.3: Pimentas pertencente a espécie *Capsicum chinense*. A) Pimenta bode; B) Pimenta Biquinho; C) Pimenta Cumari do Pará; D) Pimenta Neyde. (Fonte: adaptado de CARVALHO et al., 2006 e VIRIDEA, 2018).

3.1.3 – Óleo essencial de pimenta

As propriedades flavorizantes (aromáticas e pungentes) das pimentas estão contidas em seus óleos voláteis ou óleo essenciais, e em suas oleorresinas. Os óleos essenciais são líquidos oleosos aromáticos formados por uma mistura complexa de compostos voláteis que são obtidos de material vegetal (flores, brotos, sementes, folhas, galhos, cascas, ervas, madeira, frutas e raízes). São utilizados para diversos fins, tais como aromatizantes de alimentos, fragrâncias para perfumes e como princípio ativo de produtos farmacêuticos. Possuem ainda propriedades antibacterianas e antifúngicas (BURT, 2004; RIBEIRO-SANTOS et al., 2007). Já as oleorresinas, segundo Ponce et al. (2008), constituem a verdadeira essência das especiarias em sua forma mais concentrada, contendo componentes voláteis e não voláteis.

Pino et al. (2006) identificaram 102 compostos voláteis em Pimenta Habanero (*Capsicum chinense* Jack. cv. Habanero) cultivadas em Yucatán no México. Os principais constituintes para essas pimentas foram (*E*)-2-hexenal, 3-metilbutanoato de hexila, 3-metilbutanoato de (*Z*)-3-hexenilo, pentanoato de hexila, 3,3-dimetilciclo-hexanol e ácido hexadecanóico. Pino et al. (2007) analisaram os voláteis de dez pimentas Habanero (*Capsicum chinense* Jack.) agrupadas por suas

cores: quatro vermelhas, cinco laranjas e uma marrom. A partir desse estudo os autores concluíram que a composição dos compostos voláteis das pimentas Habanero difere claramente para as diferentes cultivares. As cultivares laranja e marrom possuem em geral quantidades maiores de ésteres, com notas de odor frutado, do que as cultivares vermelhas. Sendo assim, as cultivares laranja e marrom foram classificadas como melhor em composição química e sabor, representando as cultivares mais relevantes para a espécie.

Luning et al. (1994) utilizaram *headspace* dinâmico para analisar compostos voláteis do pimentão *C. annuum* cv. Mazurka, nos seus diferentes estágios de maturação. Segundo esses autores as diferentes amostras apresentaram vários compostos de odor em comum como 2,3-butanodiona (caramelo), 1-penteno-3-ona (pungente), hexanal (gramínea), 3-careno (pimentão vermelho, borracha), (*Z*)- β -ocimene (rançoso, suado), octanal (frutado) e 2-isobutil-3-metoxipirazina (pimenta verde). Durante o estágio de maturação eles observaram o desaparecimento de notas de odor verde, aumentando-se compostos tais como, (*E*)-2-hexenal e (*E*)-2-hexenol, que têm odores amendoados, frutados e doces. Mazida et al. (2005), também analisaram os compostos voláteis de uma pimenta dessa mesma espécie, porém de outra variedade (*Capsicum annuum* var. *annuum* cv. Kulai). As análises foram feitas por meio de microextração em fase sólida (SPME). Esses autores, assim como os primeiros encontraram um aumento do composto (*E*)-2-hexenal, durante a maturação, mas enfatizaram o aumento não só desse composto, mas também dos compostos 2,3-butanodiona, 3-careno e linalol, aos quais atribuíram o cheiro doce frutado. Por outro lado, aromas verdes e gramíneos representados pelos compostos hexanal e 2-isobutil-3-metoxipirazina foram perdidos durante esse processo. Os autores deduziram, portanto, que seis compostos são marcadores do amadurecimento da espécie testada, sendo hexanal e 2-isobutil-3-metoxipirazina que deve decrescer, enquanto que 2,3-butanodiona, 3-careno, (*E*)-2-hexenal e linalol devem aumentar.

Os voláteis mais importantes durante os estágios de maturação, no entanto, costumam mudar entre as espécies. Liu et al. (2009) investigaram os voláteis de uma pimenta nativa chinesa (*Capsicum frutescens*), para a qual eles conseguiram identificar oitenta e cinco compostos. Segundo os autores, compostos com função aldeído e cetona aumentaram durante a maturação enquanto que os álcoois tiveram um leve decréscimo. Os compostos que se destacaram nos três

estágios analisados foram: 3-hexen-1-ol e éster formiato de hexila para o estágio verde; 2-pentanol e o éster propanoato de 2-metilhexila para o estágio intermediário; e o 3-heptadeceno para o estágio maduro. Os autores afirmaram que o composto 2-isobutil-3-metoxipirazina que é geralmente dominante em pimenta fresca não foi encontrado na espécie estudada.

Kollmannsberger et al. (2011) investigaram a composição de voláteis em duas pimentas de espécies diferentes do Chile usadas a milênio na culinária andina, a Rocoto (*Capsicum pubescens*) e a Ají (*Capsicum baccatum* L. var. *pendulum*). Mais de 200 voláteis foram detectados para as pimentas e diferenças marcantes no padrão de volátil foram encontradas entre os acessos estudados. Segundo os autores, nessas pimentas andinas não ocorre um destaque muito pronunciado para aromas frutados/exóticos como ocorre na espécie *C. chinense*. Essas pimentas apresentam um aroma que mistura o odor de terra, vegetais e pimentão. Enquanto que a Ají apresentou uma nota adicional mais doce e frutada, a Rocoto exibiu um aroma de pepino. O aroma da *C. pubescens* se deve principalmente a 2-etoxipirazinas substituída e produtos de clivagem provocados por lipoxigenases como 2-nonenais e 2,6-nonadienal. Já o aroma da *C. baccatum* se deve ao 2-Heptanotiol, 3-isobutil-2-etoxipirazina e vários fenóis, como o guaiacol, e terpenóides, como o α -pineno, 1,8-cineol e linalol. O aroma frutado dessa pimenta é característico de alguns compostos do tipo ésteres 3-metil-2-butil.

3.1.4 – Extração e análise de óleo essencial

a) Extração

Vários são os métodos citados na literatura utilizados para a extração de óleo essencial. A maneira tradicional de isolar compostos voláteis de material vegetal é a destilação a vapor ou hidrodestilação (Figura 3.4). Nesse processo, as plantas expostas a água fervente ou vapor, liberam seus óleos essenciais por evaporação. Normalmente os pontos de ebulição desses compostos variam entre 200 a 300 °C, mas a combinação da pressão de vapor desses compostos com a pressão de vapor da água se iguala facilmente a pressão atmosférica o que acaba por facilitar a evaporação dessas substâncias. O vapor carregado de óleo essencial sobe e entra em tubulações estreitas que são resfriadas por uma fonte externa. À

medida que os vapores de água e óleo essencial são condensados, ambos são coletados e separados em um recipiente próprio. O óleo essencial, sendo menos denso e imiscível na água, fica na superfície. O rendimento dos óleos essenciais pode variar entre 0,005 a 10%, dependendo muito do tempo de destilação, temperatura e pressão de operação e principalmente do material vegetal.

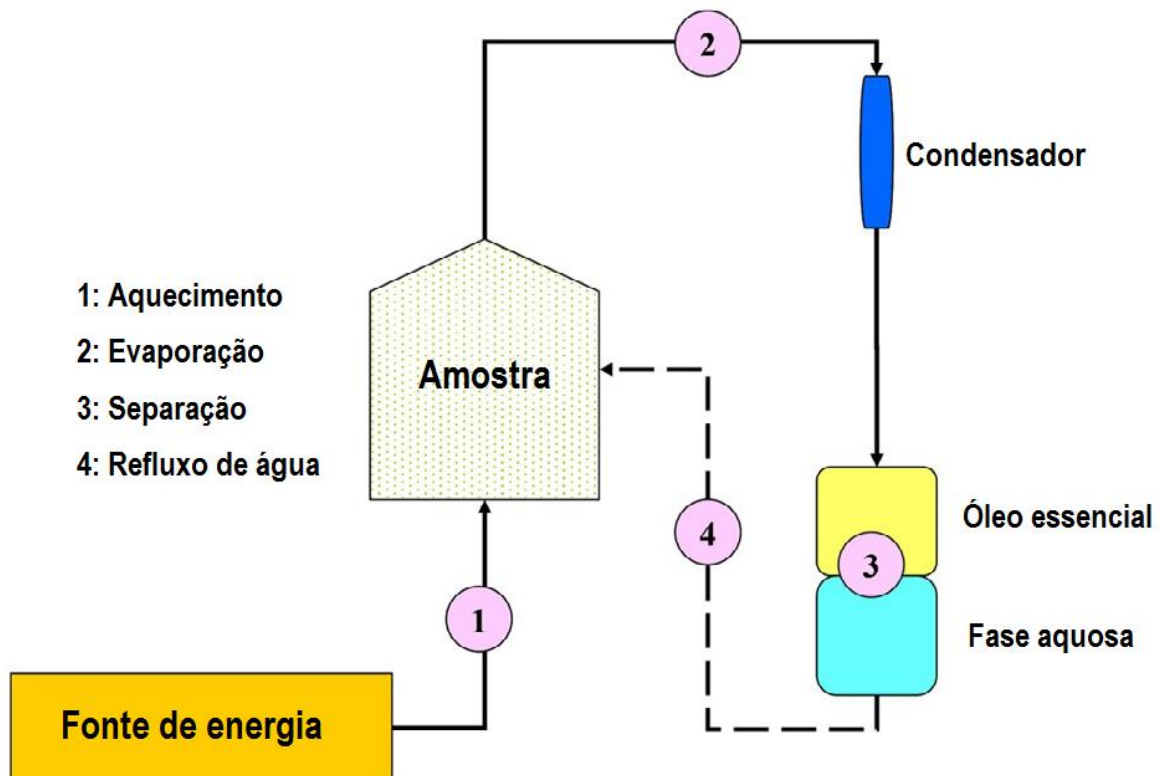


FIGURA 3.4: Representação esquemática das etapas individuais na extração de óleos essenciais por destilação. (Fonte: adaptado de CHEMAT e BOUTEKEDJIRET, 2015).

Três tipos de destilação são mais comuns para a extração de óleos essenciais: destilação com água, destilação com água e vapor d'água e destilação direta com vapor d'água. No método que utiliza a destilação com água, o material vegetal fica em contato direto com a água em ebulição, flutuando ou imerso no líquido, dependendo da densidade desse material. O vapor resultante da água fervente carrega consigo os óleos voláteis que ao ser resfriado separa-se do meio aquoso, podendo ser coletado. No método por destilação com água e vapor d'água, o material vegetal fica em uma placa perfurada acima da água quente, e o vapor passa através do material vegetal. A água é aquecida e o vapor úmido atravessa o

material, de modo que esse material não fica em contato direto com a água. Na destilação direta com vapor d'água nenhuma água é colocada dentro do tanque de destilação, mas é direcionada de uma fonte externa até o material. Nesse caso, o vapor de água costuma estar superaquecido e ter pressão superior a atmosférica rompendo os sacos contendo as moléculas de óleo na planta (KOKETSU, M.; GONÇALVES, 1991; CHEMAT e BOUTEKEDJIRET, 2015). A Figura 3.4 ilustra um esquema geral referente ao processo de destilação.

Um tipo de hidrodestilação especial utiliza-se de um aparato chamado Clevenger para uma extração otimizada de óleos essenciais (LUCCHESI et al., 2004). Um esquema contendo extrator do tipo Clevenger pode ser visualizado na figura 3.5.

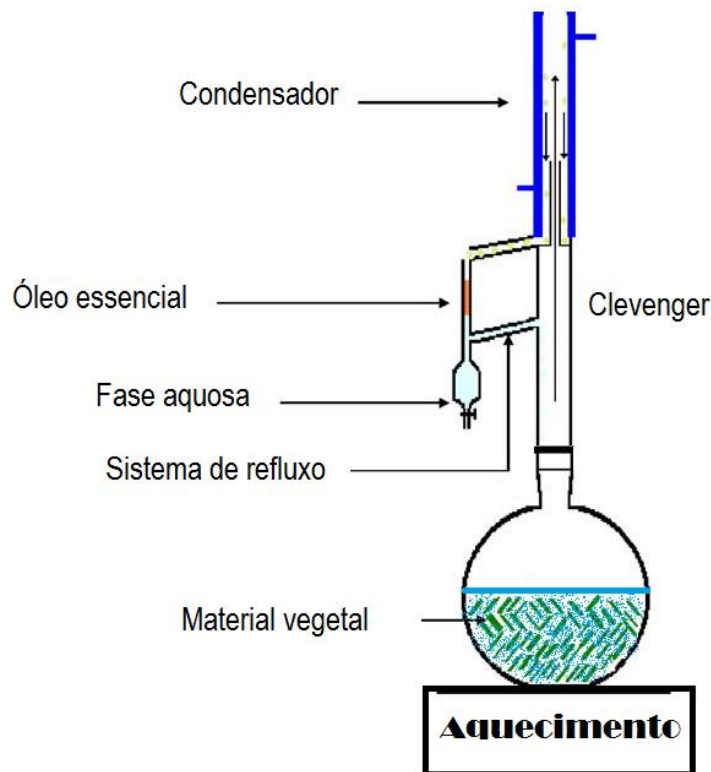


FIGURA 3.5: Sistema de hidrodestilação conectado ao extrator do tipo Clevenger. (Fonte: adaptado de LUCCHESI et al., 2004)

Esse sistema pode ainda ser melhorado pela adaptação de reatores de micro-ondas para aumento do rendimento do óleo, diminuição do tempo e custo do processo de extração e melhoramento da qualidade dos compostos extraídos. Nesse caso, é possível até mesmo se obter uma extração á seco, ou seja, uma

extração sem a necessidade do uso de água para auxiliar na evaporação dos voláteis da planta. Golmakani e Rezaei (2008) constataram que hidrodestilação assistida por micro-ondas, de acordo com a Figura 3.6, não apresenta diferença na composição do óleo essencial quando comparado a hidrodestilação comum. Porém pode significar um ganho em termos de tempo e energia. Enquanto a hidrodestilação comum necessitou de 4 horas para ser completada a hidrodestilação assistida por micro-ondas foi realizada em 75 min. LUCCHESI et al. (2004) perceberam, no entanto, que esse método pode ser melhorado se a água não for usada nesse processo. Nesse caso, o tempo de extração foi de 30 min, para o sistema adaptado sem água, versus 4,5 horas para a hidrodestilação normal. Os autores constataram ainda um ganho também na qualidade do óleo essencial que apresentou uma maior quantidade de compostos oxigenados que são mais valiosos para esse tipo de extrato.

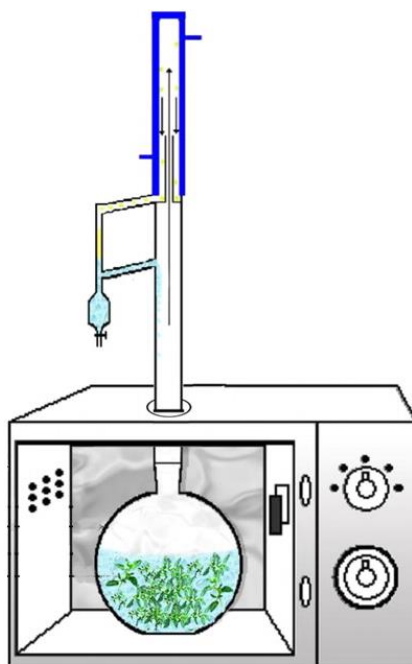


FIGURA 3.6: Representação esquemática da hidrodestilação assistida por micro-ondas. (Fonte: adaptado de GOLMAKANI e REZAEI 2008).

Uma forma moderna da extração de óleos essenciais de plantas, que tem crescido muito nas últimas décadas, conta com um sistema a base de fluido supercrítico, geralmente CO_2 , para se obter uma extração rápida e ambientalmente correta. Porém, o apelo ambiental se baseia na garantia de não se utilizar solventes orgânicos para a extração além do CO_2 no estado crítico, todavia até 20% desses

solventes ainda podem ser usados nesse método. Nesse caso, a extração tem uma vantagem adicional, visto que a adição de solventes orgânicos específicos leva a uma extração mais seletiva dos voláteis para os quais se tem um maior interesse (POURMORTAZAVI e HAJMIRSADEGHI, 2007).

Métodos modernos, no entanto, não eliminaram por completo da literatura a referência a métodos mais tradicionais de extração, principalmente quando se tem o objetivo do estabelecimento de novas metodologias. Métodos que utilizam extrator do tipo Soxhlet, por exemplo, ainda são bastante utilizados. OZEL e KAYMAZ (2004) relatam que obtiveram rendimentos em óleo essencial muito próximos para as extrações realizadas por destilação a vapor (4 h), extração com água super-aquecida (150 C°) e soxhlet (12 h). Porém, vale ressaltar que esses autores comentaram em seu trabalho que uma gama de compostos de menor peso molecular estava ausente nas amostras extraídas por soxhlet. Nesse caso, eles não deram muita ênfase a esse problema, pois como já comentado inicialmente, o objetivo do trabalho era o estabelecimento de uma nova metodologia de extração baseada em super-aquecimento da água no processo de hidrodestilação.

b) Análise

Extrações de óleos essenciais são necessárias toda vez que se deseja a aplicação desses em análises práticas, como adição a alimentos, bebidas e perfumes, determinação da ação antimicrobiana ou mesmo determinação de rendimento para fins comerciais. Quando apenas uma análise da composição química é desejada, procedimentos mais diretos podem ser empregados para esse fim, como por exemplo, a utilização de análise por *headspace*. Óleos essenciais, por serem compostos muito voláteis, são convenientemente analisados por técnicas de cromatografia gasosa. Técnicas de injeção do *headspace* da amostra, constituindo a parte volatilizada desta, é um procedimento completamente compatível com a cromatografia a gás. No entanto, esse método constitui-se apenas como um método de análise, desde que a extração da amostra é processada em microescala com um fim exclusivo de se analisar no cromatógrafo. Contudo, essa técnica é amplamente utilizada na literatura para a análise de pimentas do gênero *Capsicum*. Luning et al. (1994) detectaram 64 compostos voláteis por meio de *headspace* dinâmico proveniente da espécie de pimenta *Capsicum annum*. Essa técnica foi utilizada na avaliação dos estágios de maturação dessa pimenta, permitindo a percepção do

desaparecimento de alguns voláteis típicos para a pimenta verde. Rodríguez-Burruezo et al. (2010) detectaram por meio da técnica de *headspace* por microextração em fase sólida (HS-SPME) mais de 300 compostos de 16 acessos de *Capsicum* de um complexo *annuum-chinense-frutescens*. Esses autores utilizaram os dados obtidos para realizar um estudo acerca da reprodução e filogenia dessas plantas.

3.2 - Objetivos

3.2.1 - Objetivo Geral:

Avaliar técnicas de extração e análises cromatográficas para o óleo essencial de pimentas do gênero *Capsicum*.

3.2.2 - Objetivos específicos

- a) Extrair o óleo essencial de sete pimentas diferentes por soxhlet e hidrodestilação.
- b) Analisar os componentes de cada extração por GC-MS.
- c) Analisar o óleo essencial das sete espécies por *headspace* acoplado a GC-MS.
- d) Comparar os diferentes tipos de extração por Análise de Componentes Principais (PCA).

3.3 - Procedimento Experimental

3.3.1 – Pimentas utilizadas no trabalho

As pimentas utilizadas no trabalho foram Dedo de moça e Chapéu de frade verde, (*Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* (Willd.), Malagueta (*Capsicum frutescens*), Biquinho, Cumari do Pará verde, Pimenta Bode e Pimenta Neyde - exótica roxa Figura 3.7 (*Capsicum chinense*). As primeiras foram adquiridas no mercado local, com exceção das duas últimas que foram doadas por produtores.



FIGURA 3.7: Pimenta Neyde – exótica roxa (*Capsicum chinense*).

3.3.2 – Extração do óleo essencial

Duas formas de extração foram utilizadas para a obtenção do óleo essencial: soxhlet e hidrodestilação.

3.3.2.1 – Soxhlet

Para a extração por soxhlet as pimentas foram congeladas em nitrogênio líquido e moídas em moinho analítico. Depois de moídas, o pó de pimenta ainda congelado, foi pesado diretamente num cartucho feito com papel filtro. Os cartuchos com 10 g de amostra foram transferidos para um extrator soxhlet acoplado a um balão de fundo chato contendo 180 mL de acetato de etila grau HPLC. A extração foi de 7 h, completando cerca de 21 ciclos. O extrato foi seco com Na_2SO_4 e transferido para um frasco de fundo redondo para a concentração da amostra em rotaevaporador até o volume de 10 mL. O volume coletado foi transferido para frascos âmbar e armazenado a 4°C até o momento da análise em GC-MS. As extrações por soxhlet foram feitas em triplicata.

3.3.2.2 – Hidrodestilação

Para a extração por hidrodestilação primeiramente cerca de 100 g da amostra foi triturada em liquidificador por 1 min em 500 mL de água. O conteúdo do liquidificador foi transferido para um balão de fundo redondo de 1 L e conectado a um extrator clewenger. Após 2 horas de extração o óleo essencial obtido foi diluído em 2 mL de éter etílico grau HPLC e coletado com uma pipeta de Pasteur.

Posteriormente, o óleo essencial foi seco em Na₂SO₄ e o extrato foi transferido para um frasco âmbar armazenado a 4 °C até o momento da análise em GC-MS. As extrações por hidrodestilação foram feitas em triplicata em extrator Clevenger modificado.

3.3.3 – Análise por GC-MS

Todas as análises cromatográficas foram feitas em equipamento GC-MS (Shimadzu TQ-8040), equipado com auto-injetor (PAL AOC-5000) e coluna Rtx-5 (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm) Restek. O mentol foi utilizado como padrão interno na concentração de 1 µg.mL⁻¹ e adicionando-se 100 µL diretamente sobre a amostra a ser analisada. A Tabela 3.3 apresenta os parâmetros do equipamento GC-MS utilizados na análise.

TABELA 3.3: Parâmetros operacionais GC-MS.

Gás de arraste:	hélio
Volume de injeção:	1 µL
Temperatura de injeção:	230 °C
Fluxo:	1,2 mL.min ⁻¹
Fluxo de purga:	3 mL.min ⁻¹
Divisão de fluxo:	1:10/1:50
Corte do solvente:	3,5 min
Temperatura da fonte:	280 °C
Temperatura da interface:	280 °C
Ionização:	70 eV
Intervalo de massa:	<i>m/z</i> 40-400

3.3.3.1 – Análise do extrato obtido por soxhlet

A Tabela 3.4 abaixo descreve o gradiente de aquecimento empregado na análise do extrato obtido por soxhlet.

TABELA 3.4: Gradiente de temperatura do forno da coluna para as análises dos extratos de pimenta obtidos por soxhlet.

Taxa de aumento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)
---	40	0
3	290	1

3.3.3.2 – Análise do extrato obtido em equipamento Clevenger

A Tabela 3.5 descreve o gradiente de aquecimento empregado na análise do extrato obtido por hidrodestilação

TABELA 3.5: Gradiente de temperatura do forno da coluna para as análises dos extratos de pimenta obtidos por hidrodestilação.

Taxa de aumento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)
---	40	0
3	280	1

3.3.3.3 – Análise das pimentas por *headspace* (HS) acoplado a GC-MS

Para a extração por HS, primeiramente foi feito um planejamento experimental do tipo 4² para determinar as melhores condições de análise. Nesse planejamento foram avaliados quatro variáveis sendo a temperatura do forno, tempo de extração, massa de pimenta e massa de sal Na₂SO₄ em dois níveis, alto e baixo, de acordo com a Tabela 3.6. O resultado desse planejamento foi avaliado em termos de número e área dos picos cromatográficos.

TABELA 3.6: Planejamento experimental com dois níveis e quatro variáveis.

	Nível baixo(-1)	Nível alto (+1)
Temperatura (°C)	60	80
Tempo (min)	20	40
Massa de amostra (g)	0,5	1,0
Massa de sal Na ₂ SO ₄ (g)	1,0	2,0

As amostras de pimenta foram picadas em pedaços pequenos, pesadas diretamente em frascos vials de 10 mL, próprios para HS, e misturadas com bastão de vidro com o sal Na₂SO₄ que foi pesado e adicionado sobre a amostra

de pimenta. Os frascos de HS foram colocados em sequência no amostrador do GC-MS de onde foram transportados por um braço mecânico para um forno aquecido previamente na temperatura determinada para o experimento. Depois de transcorrido o tempo de forno, 500 μ L da amostra volatilizada foi injetada no equipamento de GC automaticamente por um seringa Hamilton de 1 mL própria para esse tipo de análise adaptada com sistema de aquecimento. Cada frasco foi utilizado apenas uma vez, sendo as análises feitas em triplicata. A Figura 3.8 mostra a localização do forno no GC-MS utilizado na análise.

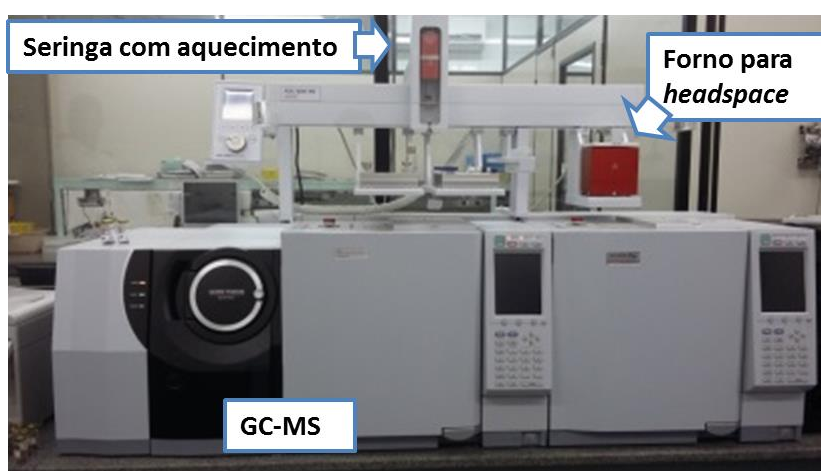


FIGURA 3.8: GC-MS adaptado para a análise por headspace.

A Tabela 3.7 descreve o gradiente de aquecimento empregado na análise por *headspace*.

TABELA 3.7: Gradiente de temperatura do forno da coluna para as análises de pimentas por *headspace*.

Taxa de aumento (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de espera (min)
---	40	0
3	280	1

3.3.4 – Análise e tratamento de dados

Os componentes voláteis do óleo essencial das pimentas foram identificados através da comparação do espectro de massa com aquele existente no

livro Adams (2007) , na biblioteca (NIST 11.0), NIST Web Book e por comparação com o índice de retenção proposto por Van den Dool e Kratz. Os índices de retenção (IR) foram determinados utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos, preparados a partir da diluição de uma solução padrão em hexano e analisados nas mesmas condições cromatográficas das amostras.

A partir dos cromatogramas obtidos em GC-MS para as amostras de pimentas, uma matriz de dados foi montada no programa Excel[®] e transferida para o programa Matlab 2016a. Os dados foram autoescalados e processados para a obtenção de uma PCA – Análise de Componentes Principais. Esse tipo de análise foi realizada a fim de comparar as diferentes extrações e análise GC-MS para as pimentas.

3.4 – Resultados e discussão

3.4.1 – Extração dos óleo essenciais das pimentas por soxhlet e hidrodestilação

A extração das pimentas em extrator Soxhlet foi realizada após moagem dos frutos em um pó fino sob resfriamento em nitrogênio líquido. O esquema montado para a extração é mostrado na Figura 3.9.



FIGURA 3.9: Extração de óleo essencial de pimenta por soxhlet.

Na figura 3.9 é possível perceber que os extratos obtidos foram coloridos, indicando ser possível por meio dessa técnica a extração dos carotenóides que compõe a cor das pimentas. O solvente utilizado nessa extração foi o acetato de etila, o qual tem uma polaridade intermediária influenciando na extração desse tipo de pigmento com estruturas mais apolares. Na literatura foram encontrados o relato do uso de solventes tais como éter de petróleo, hexano e acetato de etila (OZEL e KAYMAZ, 2004; KUMAR TRIPATHI, 2011; WU et al., 2015). O solvente acetato de etila, nesse caso, foi escolhido propositalmente, visto que por meio de pesquisa prévia a literatura (Pino et al. 2006, 2007 e 2011; Kollmannsberger et al. 2011), onde percebeu-se que no óleo de pimenta predominaram componentes voláteis com funções do tipo álcoois, aldeídos e ésteres, sendo esse solvente, portanto, adequado. Solventes mais apolares como o éter de petróleo e hexano foram recomendados principalmente para a extração de voláteis baseados em estruturas do tipo terpenoide.

A extração por hidrodestilação foi processada após moagem em liquidificador de 100 g da fruta em água. Essa metodologia foi utilizada por Forero et al. (2009) e por Pino et al. (2006, 2007 e 2011). O esquema montado para a

realização da hidrodestilação pode ser visualizado na Figura 3.10A e o óleo obtido após a extração é mostrado na Figura 3.10B.

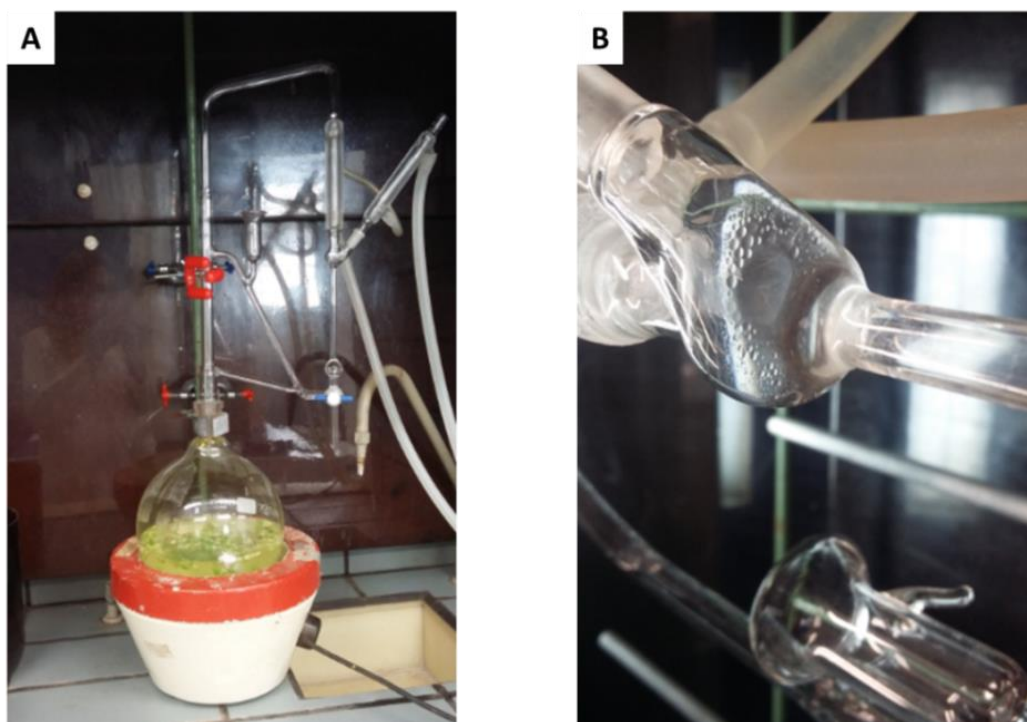


FIGURA 3.10: Extração de óleo essencial de pimenta por hidrodestilação. A) Foto do extrator Clevenger montado para a extração; B) Foto do óleo obtido após extração da pimenta Bode (*Capsicum chinense*).

Como pode ser visto na Figura 3.10 B a quantidade de óleo obtido do fruto das pimentas foi extremamente pequena, tendo em vista a massa usada na extração (100 g). A foto mostra apenas pequenas gotículas flutuando sobre a água. Sendo assim, o cálculo de rendimento para esse óleo não foi possível devido a dificuldade encontrada na separação da mistura óleo/hidrolato. Como mencionado, esse óleo possui maior polaridade em relação àquela comumente encontrada para óleos essenciais devido ao tipo de moléculas que o constituem. Logo, apresentou forças adesivas em relação ao vidro das pipetas Pasteur que foram utilizadas para a sua coleta. Uma vez sendo coletados, por esse tipo de pipeta, formavam uma película sobre o vidro, impossibilitando a sua separação. A única forma possível de se coletar o óleo de pimenta foi, portanto, pelo uso de 2,0 mL do solvente éter dimetílico. Esse mesmo solvente foi utilizado na extração do óleo essencial de pimenta a partir do hidrolato nos trabalhos de Forero et al. (2009) e Pino et al. (2011). Em trabalhos de Pino et al. (2006 e 2007) foi utilizado o solvente diclorometano para o mesmo fim. Uma vez coletados os óleos em éter dimetílico, o

extrato foi guardado em frasco ambar excessivamente vedado por batoque e uma combinação de parafilme e filme de PVC. Essa providência foi tomada devido a observação da completa evaporação das primeiras amostras obtidas, para as quais não havia sido adotado esse método. Mesmo com o uso de batoque, tampa e armazenamento sob refrigeração, as perdas das primeiras amostras foi inevitável. Nem o armazenamento em freezer a -20 °C impediu a evaporação do solvente juntamente com o óleo.

Dois tempos de extração foram investigados para o método de hidrodestilação, o tempo de 2 e 4 h. Por fim optou-se pelo tempo menor, visto a grande volatilidade apresentada pelo óleo das pimentas. No tempo de 4 h observou-se nitidamente a diminuição da quantidade de gotículas de óleo sobre o hidrolato, muito embora não tenha sido possível medir essa perda. Todos os autores citados acima trabalharam com o tempo de 1 h para a extração de óleo essencial de pimenta do gênero *Capsicum*. Para as pimenta Dedo de moça e Chapéu de frade, no entanto, mesmo sendo utilizando o tempo de 2 h não foi observado nenhuma gota de óleo essencial. Para a malagueta a quantidade obtida foi mínima (uma gotícula quase não perceptível). O maior rendimento de óleo essencial foi obtido para o gênero *Capsicum chinense*. Essa espécie, como visto na introdução desse trabalho, é conhecida por apresentar pimentas extremamente aromáticas o que pode ser relacionado diretamente com uma maior produção de óleo essencial pela espécie (CARVALHO et al., 2006).

3.4.2 – Análise por *headspace*

A análise do *headspace* dos frutos de pimenta foram feitas pelo método de *headspace* estático, sendo esse o método mais prático por estar acoplado ao equipamento GC-MS utilizado nesse trabalho e ser totalmente automatizado. A Figura 3.11 traz a foto de vials contendo o fruto da pimenta picado e misturado com Na₂SO₄ anidro. Nesse experimento o sal Na₂SO₄ foi adicionado a pimenta com dupla finalidade. A primeira foi auxiliar no rompimento das células do vegetal a fim da liberação do seu conteúdo interno. A segunda foi atuar como secante diminuindo a quantidade de vapor de água que seria injetado no equipamento GC-MS. Geralmente, as colunas de GC costumam ser construídas para o uso quase que exclusivo com solventes orgânicos, não sendo compatíveis com a água que, devido

a sua alta polaridade, leva a um sangramento da coluna, significando a deteriorização da mesma por perda da fase estacionária. Sangramentos são muito prejudiciais ao equipamento de GC-MS, pois além de causar uma diminuição da eficiência da coluna, levam sujeira para dentro da fonte de íons, onde podem acabar por diminuir a sensibilidade desse equipamento. Outra vantagem da diminuição da formação de vapor de água no *headspace* da amostra é a formação de vapores mais concentrados dos voláteis oleosos, pois no equilíbrio a pressão de vapor total terá uma maior contribuição desse tipo de composto.



FIGURA 3. 11: Frascos de 10 mL contendo amostras de 1 g de pimenta juntamente com 2 g de sal Na_2SO_4 preparados para análise por *headspace*.

Para o trabalho com *headspace* estático o primeiro passo foi a determinação dos parâmetros do preparo da amostra e operação do forno. Os principais fatores determinantes do preparo da amostra que foram escolhidos para serem trabalhados foram a massa de pimenta que variou entre 1 e 0,5 g e a massa de sal Na_2SO_4 que variou entre 1 e 2 g. Os parâmetros do forno que foram trabalhados foram temperatura (60 e 80 °C) e tempo de permanência (20 e 40 min). É importante destacar que a temperatura do forno de *headspace* pode chegar até 200 °C, no entanto, temperaturas muito altas não foram selecionadas devido a existência de água na amostra. Em temperaturas muito altas necessariamente haveria um aumento da pressão de vapor de água que acabaria por interferir na pressão total do sistema e, portanto, na fração de óleo essencial na fase de vapor. Todos estes fatores foram trabalhados por meio do desenvolvimento de um planejamento experimental do tipo 4^2 , ou seja, um planejamento que avalia simultaneamente os quatro parâmetros em dois níveis. Nesse caso, um total de 16 experimentos foram executados onde cada parâmetro e nível foi variado de modo a avaliar as condições ótimas para a definição do melhor protocolo de análise. A

pimenta utilizada nesse experimento foi a pimenta bode que, por ser uma pimenta bastante aromática, apresentou uma boa quantidade de picos na análise por *headspace*. Os fatores investigados nesse experimento (variáveis dependentes) foram maior área dos sinais e maior número de picos no tempo de análise que teve um total de 55 minutos. A Tabela 3.8 descreve os níveis trabalhados e as respostas obtidas para o planejamento fatorial executado.

TABELA 3.8: Representação da matriz do planejamento fatorial com os níveis estudados e as respostas obtidas em função do número de picos e área dos picos cromatográficos.

Ensaio n ^o	Níveis codificados ^a				Respostas ^b				
	A	B	C	D	Número de picos	Resposta área sinal 1	Resposta área sinal 2	Resposta área sinal 3	Resposta área sinal 4
1	1	1	1	1	63	11818518,00	2783979,00	10488023,00	3948209,00
2	-1	1	1	1	39	1463707,00	504410,00	1752676,00	968083,00
3	1	-1	1	1	58	5985453,00	2852749,00	8119139,00	5722003,00
4	-1	-1	1	1	35	1117111,00	605342,00	2299044,00	1578972,00
5	1	1	-1	1	57	6488662,00	2331906,00	9084818,00	4086445,00
6	-1	1	-1	1	49	2941396,00	840591,00	2521339,00	1518680,00
7	1	-1	-1	1	43	2379314,00	1414678,00	4303396,00	3596965,00
8	-1	-1	-1	1	34	753512,00	426803,00	1663848,00	1313895,00
9	1	1	1	-1	56	5338590,00	1815649,00	7865333,00	4632157,00
10	-1	1	1	-1	39	1741008,00	618269,00	2181053,00	1167068,00
11	1	-1	1	-1	48	3140026,00	1921839,00	4662495,00	3327815,00
12	-1	-1	1	-1	32	791531,00	495205,00	1988465,00	1656802,00
13	1	1	-1	-1	53	2609564,00	1968196,00	6012483,00	3371445,00
14	-1	1	-1	-1	44	3867276,00	1139906,00	3789662,00	2197382,00
15	1	-1	-1	-1	42	1574474,00	1169780,00	3196803,00	2668416,00
16	-1	-1	-1	-1	48	3079409,00	1680140,00	4728269,00	3254619,00

A = temperatura (60 e 80°C); B = tempo (20 e 40 min); C = massa de amostra (0,5 e 1 g); D = massa de sal Na₂SO₄ (1 e 2 g); -1 = nível inferior e 1 = nível superior das variáveis avaliadas. ^aVariáveis independentes; ^bVariáveis dependentes. Sinais: 1 = Isopentanoato de hexila; 2 = éster não identificado; 3 = 3,3-dimetilciclo-hexanol; 4 = δ-Himacaleno.

A Figura 3.12 ilustra dois gráficos mostrando o efeito sobre a área e o número de picos no cromatograma obtido a partir da variação nos níveis de cada parâmetro testado nos 16 ensaios para a pimenta Bode.

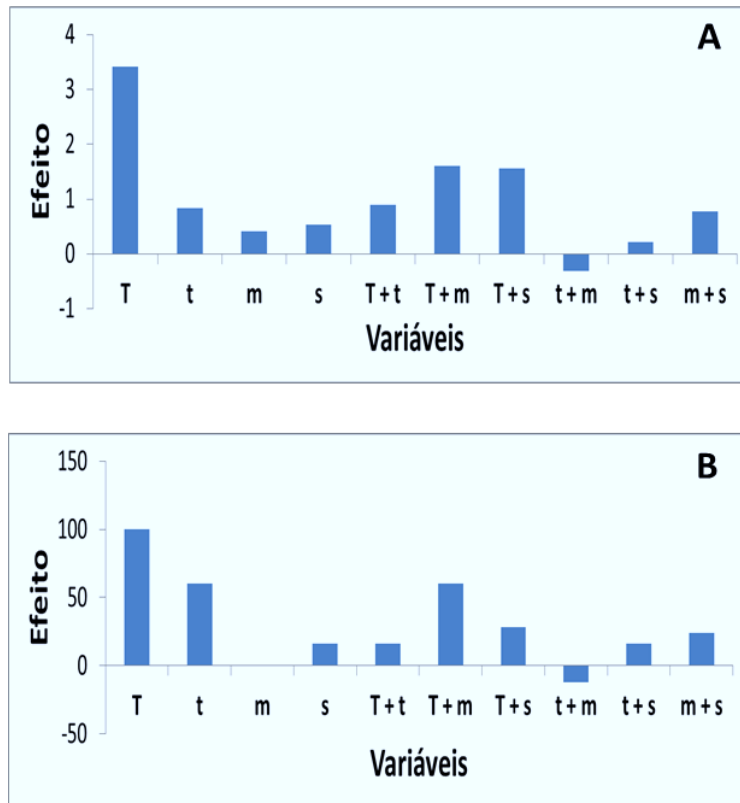


FIGURA 3.12: Representação dos efeitos sobre as variáveis dependentes investigadas sendo A) a área dos picos obtidos e B) o número de picos, para o cromatograma do headspace da pimenta Bode, onde T = temperatura; t = tempo; m = massa de pimenta; s = massa de sal Na_2SO_4 .

Como pode ser observado na Figura 3.12, o parâmetro temperatura do forno e temperatura combinada a massa da amostra foram responsáveis pelos maiores efeitos sobre o número de picos e área dos sinais. O tempo de permanência no forno teve um maior efeito sobre o número de sinais, enquanto que a temperatura combinada com a massa de sal teve maior efeito sobre a área do sinais. É possível notar também que o efeito isolado da massa de amostra não foi muito significativo sob nenhum dos parâmetros investigados. Todos esses parâmetros citados tiveram um efeito positivo, ou seja, quanto maior seu valor, maior foi o efeito nas variáveis dependentes, número de picos e área do sinal. Os parâmetros combinados, tempo de permanência no forno e massa de amostra, foram os únicos que tiveram efeito negativo, onde quanto menor seus valores, melhores foram os efeitos sobre o experimento. No entanto, esse efeito negativo foi muito pouco relevante em relação aos outros efeito, significando que no efeito geral, não são determinantes para a escolha dos parâmetros de análise. Logo, percebeu-se que quanto maior o valor dos parâmetros melhor seria a resposta da análise, por isso foram escolhidos os maiores

valores para todos os parâmetros investigados. Portanto, a temperatura do forno selecionada nas análises seguintes foi 80 °C, o tempo de permanência 40 min, a massa de amostra 1,0 g e a massa de sal 2,0 g Na₂SO₄.

A Figura 3.13 abaixo apresenta os cromatogramas obtidos nos experimentos que ilustram a importância dos parâmetros citados para intensidade (e área) do sinal analítico.

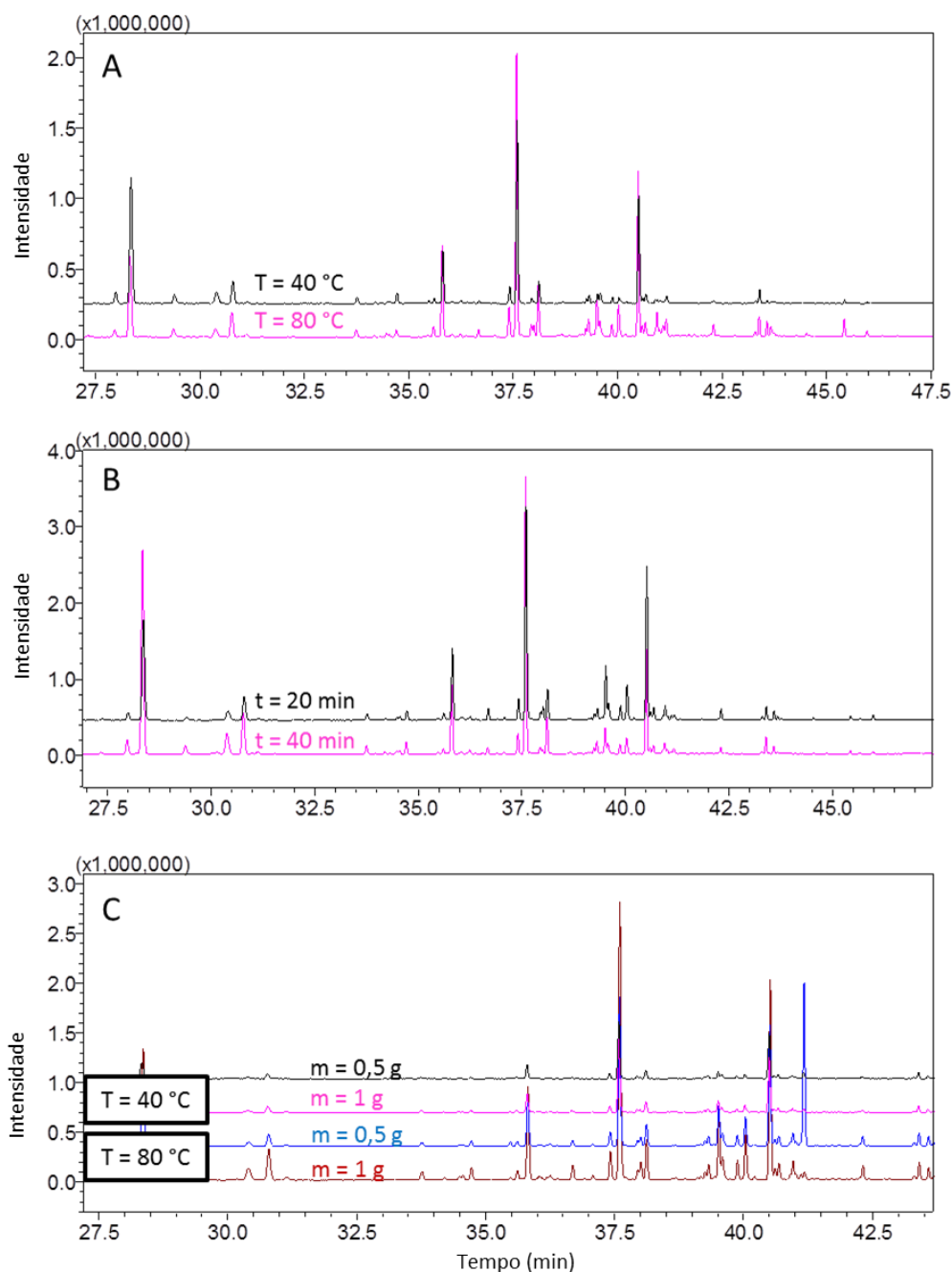


FIGURA 3.13: Cromatogramas do *headspace* da pimenta Bode mostrando os efeitos A) da temperatura, B) do tempo de permanência no forno e C) da temperatura combinada a massa da amostra.

Mestres et al. (1997) otimizaram temperatura e tempo de permanência no forno de amostras de vinho para os quais foi utilizada a metodologia de *headspace* estático para a análise de compostos sulfurados. Segundo os autores, temperatura e tempo maiores de permanência no forno favorecem a análise, no entanto, temperaturas muito altas pode levar a oxidação de alguns compostos e, por isso, não foram indicadas. Sitaramaraju et al. (2008) utilizaram *headspace* estático para analisar compostos semi-voláteis em produtos farmacêuticos de uso tópico. Os autores explicaram que a presença de água nos frascos de HS restringe as temperaturas de termostatização a temperaturas abaixo de 90°C. Esse limite deve ser aplicado para evitar a sobrepressurização no frasco contendo a amostra devido à evaporação da água. Desse modo, a temperatura definida para o trabalho deles foi 85°C.

3.4.3 – Comparação entre as diferentes análises do óleo essencial de pimenta

O óleo essencial das diferentes pimentas obtidos por soxhlet e hidrodestilação foram analisados por GC-MS por injeção direta e comparado a análise do *headspace* da amostra a fim de se entender as diferenças e as semelhanças que seriam obtidas para cada análise.

A Figura 3.14 mostra os cromatogramas para a pimenta Vermelha e a pimenta Chapeu de frade cujo óleo essencial foi obtido por soxhlet, hidrodestilação e do *headspace* da amostra. Como pode ser observado, essas pimentas apresentaram um número de sinais muito pequeno (menos de 15 sinais por cromatograma) e pouco intenso (com a maior parte dos picos de intensidade menor que 10^5), quando comparadas as demais pimentas analisadas (Figura 3.15). Deste modo, essas duas pimentas acabaram não entrando nas análise de dados feitas a fim de comparar os diferentes métodos de análise para o óleo essencial de pimentas do gênero *Capsicum*. Essas duas pimentas são plantas da mesma espécie *Capsicum baccatum*. É importante destacar que a espécie *Capsicum baccatum* não recebe uma ênfase muito grande na análise de óleos essenciais na literatura. Muito pouco material é encontrado citando essa espécie em comparação com a espécie *Capsicum chinense* que se destaca por ser uma espécie bastante aromática e utilizada comercialmente. Ao comparar pimentas da espécie *Capsicum baccatum*

com uma pimenta da espécie *Capsicum chinense* os autores Kollmannsberger et al. (2011) perceberam que a maioria dos sinais encontrados para a última espécie estavam ausentes no cromatograma obtido para a primeira. Mesmo os poucos sinais de ésteres encontrados estavam em intensidade extremamente baixa quando comparados aos ésteres presentes na *Capsicum chinense*.

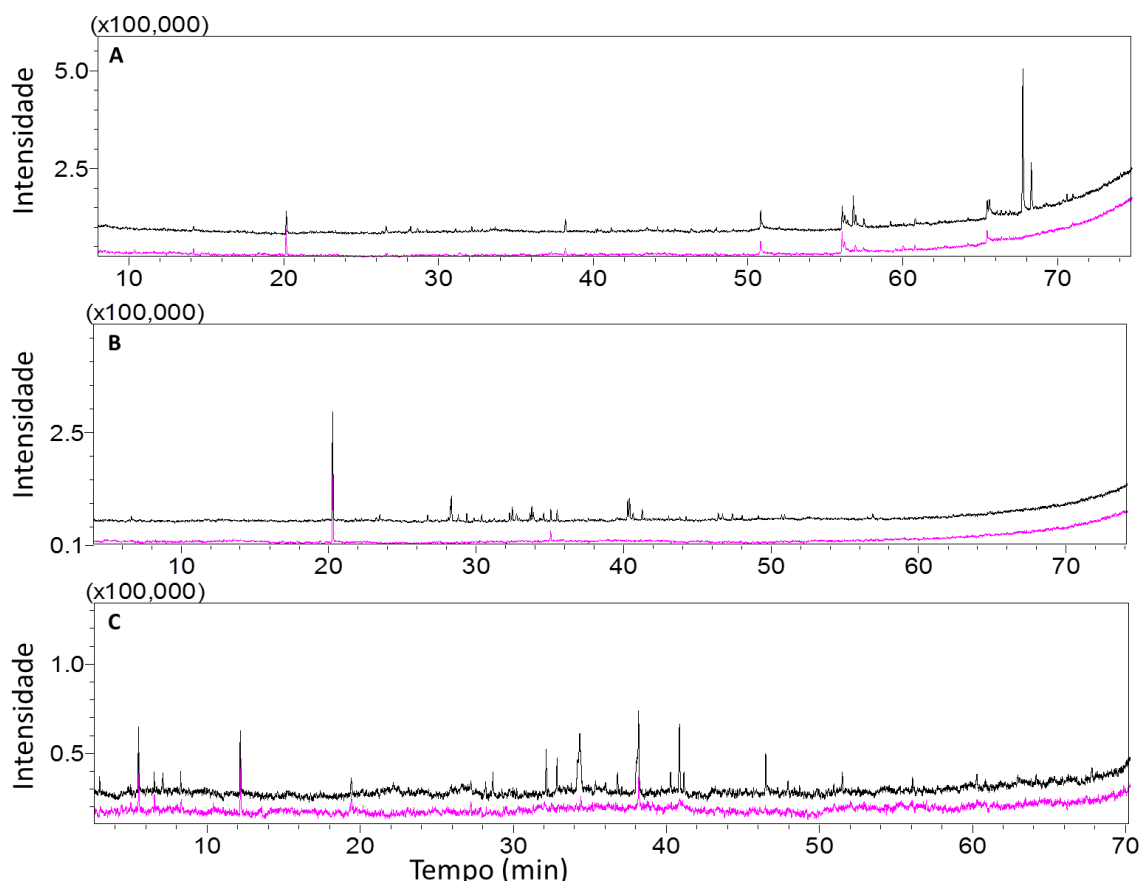


FIGURA 3.14: Cromatogramas para o óleo essencial obtido para a pimenta vermelha (em preto) e Chapéu de padre (em rosa) obtida A) por soxhlet, B) hidrodestilação e C) a partir do headspace da amostra.

Os resultados obtidos para as demais pimentas (malagueta, pimenta bode, pimenta Neyde, pimenta biquinho e cumari) pode ser visualizado nos cromatogramas sobrepostos na Figura 3.15 que ilustra a análise para as pimentas biquinho em preto, bodinha em rosa, cumari em azul, malagueta em vermelho e roxa em verde, cujo óleo essencial analisado foi obtido por soxhlet, hidrodestilação e a partir do *headspace* da amostra.

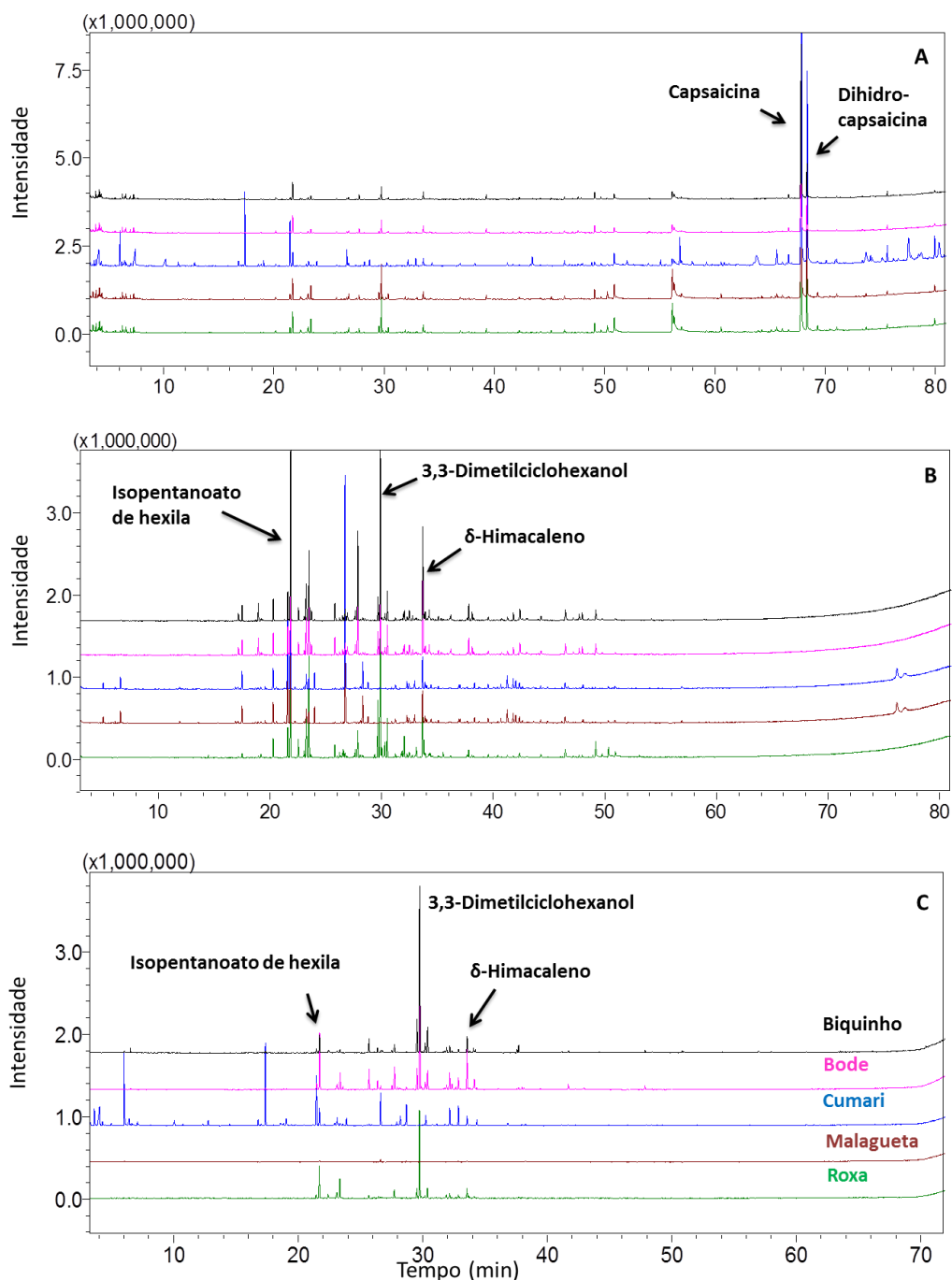


FIGURA 3.15: Cromatogramas para o óleo essencial obtido a partir das pimentas biquinho, bode, cumari, malagueta e roxa obtido por soxhlet, B) hidrodestilação e C) *headspace* da amostra, com destaque para as substâncias presentes para alguns dos picos mais intensos.

Uma análise primária dos cromatogramas da Figura 3.15 todos ilustrados no mesmo valor de intensidade (10^6) para os diferentes métodos permite perceber que os sinais mais intensos são encontrados para o óleo obtido por hidrodestilação. Um maior número de sinais também foi obtido para esse tipo de extração (134 picos). Para a extração por soxhlet foram obtidos 110 e para a análise

do *headspace* foram obtidos 79. Isso, provavelmente, ocorre devido a natureza do óleo essencial de pimenta que tem em sua composição, em sua grande maioria, ésteres de cadeia curta sendo, portanto, extremamente volátil (SOUSA et al. 2006; PINO et al. 2006 e 2007; RODRÍGUEZ-BURRUEZO et al., 2010; PINO et al., 2011; KOLLMANNSBERGER et al. 2011). Desse modo, é bastante coerente que o método que mais irá favorecer a extração desse tipo de composto será a hidrodestilação que se trata de uma extração do tipo mais branda no que se refere ao aquecimento do extrato depois do processo de extração. Apesar de se utilizar de aquecimento para a obtenção do óleo essencial, esse método conta com um sistema de refrigeração assegurando uma menor perda dos voláteis. O soxhlet, por outro lado, mesmo apresentando um sistema de refrigeração, através de um condensador de modo semelhante a hidrodestilação, não pode assegurar uma recuperação satisfatória desses compostos já que cada vez que o solvente sifona ele retorna ao balão onde sofrerá vários ciclos de aquecimentos sucessivos favorecendo as perdas dos voláteis. A hidrodestilação, por outro lado mantém o óleo extraído sob constante refrigeração, já que esse se mantém sobre o hidrolato que se encontra na parte mais fria do extrator Clevenger. A análise do *headspace*, por sua vez, tem a vantagem de sofrer uma menor manipulação, porém, por se tratar de uma análise do tipo estática, não possui nenhuma etapa de concentração dos voláteis, o que é mais comum para outras metodologias de análise do *headspace*, como HS dinâmico e HS-SPME (SNOW e SLACK, 2002). Nesse caso, obtem-se voláteis muito diluídos e uma consequente perda de intensidade do sinal. Ainda é importante destacar que, durante as análises do *headspace*, observou-se que sinais mais intensos são obtidos para os frutos cujo tempo de armazenamento foi menor. Todos os frutos foram armazenados sob refrigeração a -80 °C, assim que foram adquiridos. Os frutos que foram analisados na mesma semana, como é o caso daqueles utilizados para o planejamento experimental (Figura 3.13), apresentaram sinais cerca de 10 vezes mais intensos do que aqueles que foram analisados posteriormente, Figura 3.15.

Na literatura a forma de análise mais comumente utilizada para os voláteis da pimenta é sem dúvida a hidrodestilação e *headspace* por SPME (MAZIDA et al. 2005; FORERO et al. 2009; RODRÍGUEZ-BURRUEZO et al., 2010; PINO et al., 2011). Apenas um trabalho foi encontrado para o *headspace* do tipo dinâmico (LUNING et al. 1994), que concentra a amostra antes da injeção. De fato,

não foram encontrados na literatura trabalhos citando o uso de análise do *headspace* estático para os voláteis de pimenta do gênero *Capsicum*.

A Figura 3.16 ilustra o gráfico de escores PC1 x PC2 x PC3, obtido a partir da análise dos componentes principais (PCA) para o óleo essencial de pimenta proveniente da extração por soxhlet, hidrodestilação e por meio do *headspace* da amostra. A análise de componentes principais (PCA) é frequentemente aplicada com objetivo de visualizar a estrutura de dados, encontrar similaridade entre amostra, detectar amostras anômalas e reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados (WU et al., 1997).

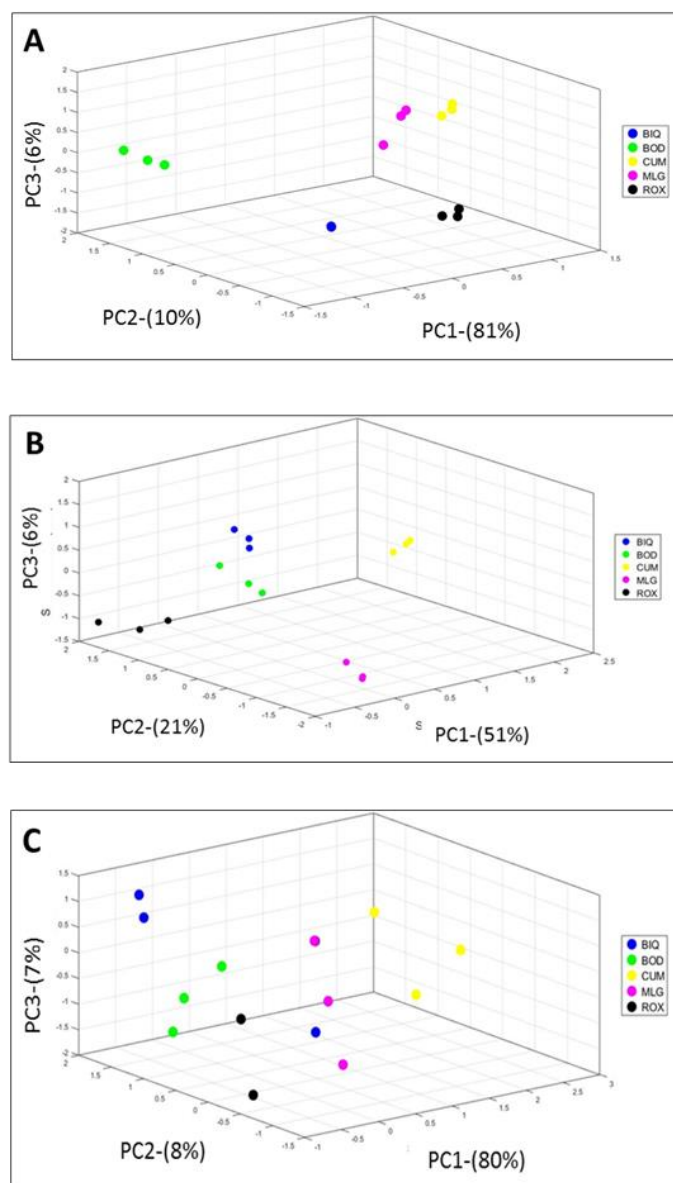


FIGURA 3.16: Gráfico de escores da PC1 x PC2 x PC3 o óleo essencial de cinco pimentas obtidos em A) por soxhlet, em B) por hidrodestilação e em C) a partir do *headspace* estático da amostra.

Como pode ser visualizado na Figura, a PCA permitiu a redução do número de dados obtidos nas análises cromatográficas a três componentes principais responsáveis por semelhanças e diferenças entre o óleo essencial das pimentas. Uma análise inicial comparativa entre os gráficos possibilita uma percepção de que a análise do *headspace* das pimentas proporcionou as respostas com os maiores desvios, visto que os pontos das triplicatas se encontram extremamente espalhados na PCA da Figura 3.16C. Esse fato ocorre especialmente para o *headspace*, pois nesse tipo de análise não foi possível utilizar nenhum padrão interno para corrigir os desvios da análise comum para a cromatografia gasosa. Para as análises dos extratos provenientes do Soxhlet e hidrodestilação o composto mentol, dissolvido no respectivo solvente de cada extrato, foi utilizado como padrão interno. Na análise do *headspace*, no entanto, a amostra não está dissolvida em nenhum solvente orgânico, mas imersa na água proveniente do próprio fruto, deste modo, ao se adicionar um padrão interno contendo solvente orgânico ocorreu uma inibição da volatilização do óleo da amostra. Isso pode ter ocorrido por dois motivos em especial sendo: a) ao se adicionar um solvente orgânico, os compostos podem ter maior solubilidade nesse solvente o que diminui a volatilização dos mesmos, já que a polaridade desses combina mais com aquelas dos solventes orgânicos do que com a água das células e/ou b) a adição de um solvente mais volátil pode saturar o ambiente do *headspace* com vapores desse solvente diminuindo a pressão de vapor dos componentes do óleo essencial que se tratam de moléculas menos voláteis.

Outra observação que pode ser feita a partir dos gráficos de componente principal apresentado na Figura 3.16 é que em todos os métodos de análise o componente que explica a maior parte dos dados é o PC1, que explica 81%, 51% e 80% para a amostra proveniente da extração por Soxhlet, hidrodestilação e do *headspace*, respectivamente. Uma análise mais refinada, pode ser feita pelos gráficos de PC bidimensionais que são mostrados na Figura 3.17. Nessa figura são apresentados os gráficos de escores da PC1 x PC2 e PC1 x PC3 referente as 5 amostras de *Capsicum* spp. proveniente dos diferentes métodos. Ao lado da Figura 3.17 encontra-se a Figura 3.18 que ilustra o gráfico dos pesos da PC1 para cada método. Esses gráficos de pesos indicam quais foram as principais variáveis responsáveis por semelhanças e diferenças entre as pimentas.

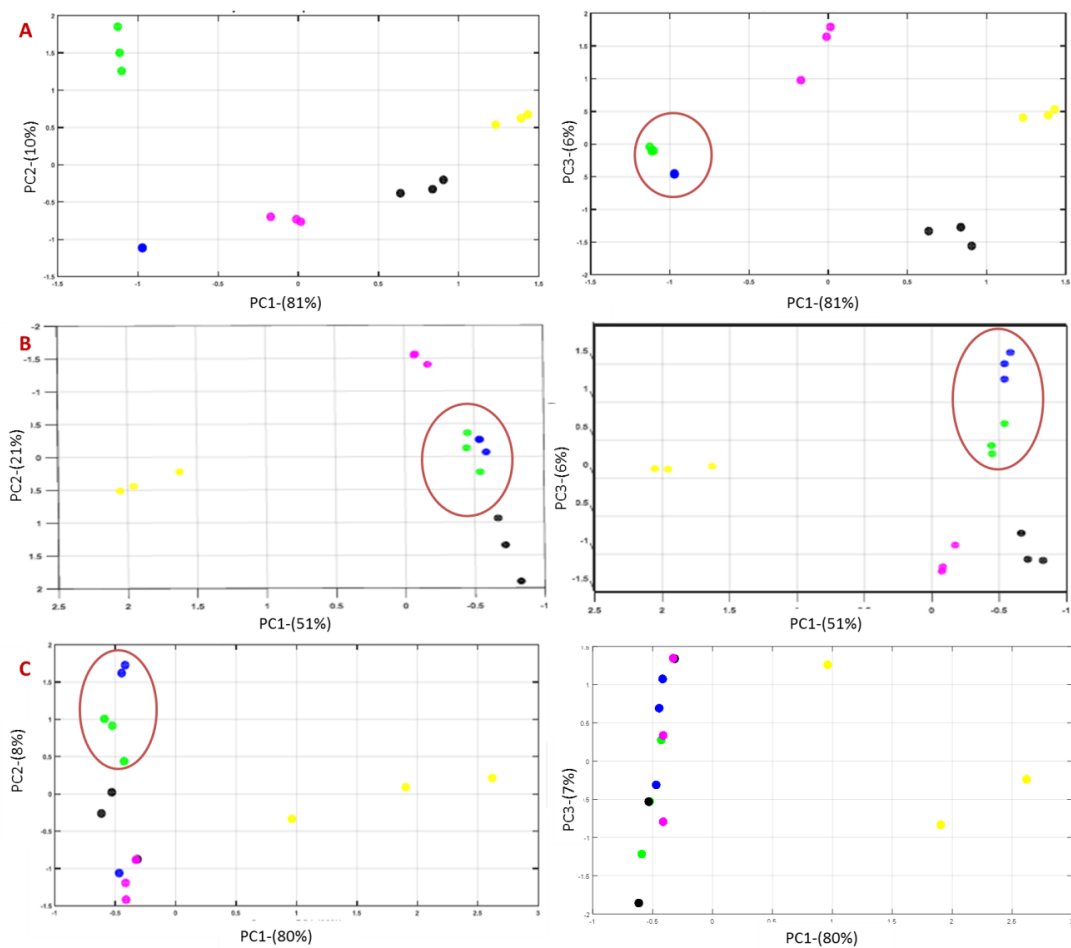


FIGURA 3.17: Gráfico de escores da PC1 x PC2 e PC1 x PC3 referente a 5 amostras de pimentas *Capsicum* provenientes das análises do óleo essencial obtido por A) soxhlet; B) hidrodestilação e C) *headspace* da amostra.

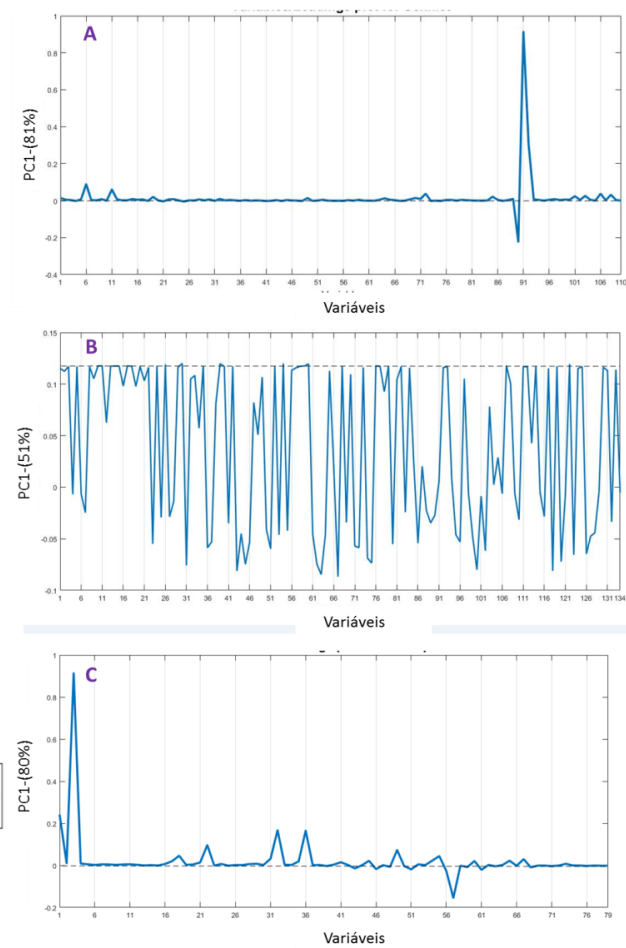


FIGURA 3.18: Gráfico dos pesos da PC1 para a análise dos voláteis das pimentas obtido por A) soxhlet; B) hidrodestilação e C) *headspace* da amostra.

Ao se analisar a Figura 3.17, percebe-se que os gráficos isolados para os diferentes métodos não trazem informações suficiente para um agrupamento claro das espécies analisadas. No entanto, ao se comparar todas as extrações juntas é possível observar um padrão interessante na maioria dos gráficos de escores. Esse padrão está relacionado a pimenta Bode e a pimenta Biquinho que aparecem agrupadas no gráfico de PC1 x PC3, para o extrato proveniente do soxhlet, no gráfico de PC1 x PC2 e na PC1 x PC3, para o extrato proveniente da hidrodestilação e na PC1 x PC2, derivado do *headspace* da amostra. Os gráficos de pesos proveniente das PC1 mostram que para o soxhlet a maior parte dos dados são explicados pelos picos da capsaicina, o que esclarece a falta de agrupamento na PC1 x PC2 para essas pimentas, pois a pimenta biquinho sendo uma pimenta doce não apresentou pico de capsaicina, ao contrário da pimenta Bode, que por ser altamente pungente apresentou um sinal bastante pronunciado para esse composto. Na PC1 x PC3, onde a importância desse sinal diminui um pouco, essas pimentas acabam sendo, então, agrupadas. Para a hidrodestilação o agrupamento das duas pimentas ocorreu tanto na PC1 x PC2, quanto na PC1 x PC3, isso porque esse método não extraiu nenhum capsaicinoide, mas somente os compostos mais voláteis das pimentas. Essa extração forneceu também um maior número de sinais de razoável intensidade que acabaram dividindo a contribuição pela semelhança entre as duas pimentas (Figura 3.18C). Pode se dizer, então, que a extração por hidrodestilação gerou um óleo essencial mais fiel aos voláteis das pimentas, pois as duas pimentas apresentadas possuem um aroma sensivelmente muito próximo. Essas pimentas, ambas da espécie *Capsicum chinense*, podem ser destacadas, ainda, pela capacidade de realizar cruzamento, se forem cultivadas em ambientes próximos, o que indica uma semelhança genética, também, muito grande. Esse tipo de cruzamento é comumente responsável por trazer certo teor de pungência à pimenta biquinho que é uma pimenta tipicamente doce (CARVALHO et al., 2010).

O agrupamento na PC1 x PC2 derivado do *headspace* da amostra é baseado num composto bastante volátil que se caracteriza por uma cadeia curta e menor tempo de retenção, o qual foi encontrado somente na análise do *headspace* (Figura 3.17C e 3.18 C). Segundo a biblioteca NIST 11.0, esse pode ser um derivado do aminoácido alanina. Observando-se o gráfico que trás o perfil das amostras na figura 3.15, esse composto é facilmente percebido, pois se trata de um sinal muito intenso que aparece logo nos primeiros minutos de eluição. Por conta

dessa substância representar um peso muito grande sobre o PC1, como pode ser visto no gráfico de pesos na Figura 3.18C, o Gráfico de escores da PC1 x PC2 mostra um agrupamento das pimentas bode, biquinho, Neyde (roxa) e malagueta. No entanto, o gráfico de pesos ainda mostra que o agrupamento das amostras está baseado em outras 3 variáveis correspondendo aos sinais 31, 36 e 56 (espectros apresentados no Apêndice B). A biblioteca NIST 11.0 apresenta os dois primeiros compostos como sendo correspondentes a ésteres de estruturas muito próximas que não puderam ser identificados. O sinal 56, por outro lado, corresponde a um composto característico de pimentas da espécie *Capsicum chinense* o 3,3-dimetilciclo-hexanol, que tem aroma de carvão queimado e pimentão (FORERO et al. 2009; PINO et al., 2007 e 2011; ALMEIDA, 2015). Segundo Forero et al. (2009) o 3,3-dimetilciclo-hexanol é um composto que tipicamente aumenta quando as pimentas passam do estágio verde para o estágio maduro.

Outra consideração que pode ser feita a partir dos gráficos de PCA está relacionada à semelhança apresentada entre as pimentas Neyde, malagueta e cumari para o teor de capsaicina (extração por Soxhlet). Esses resultados indicam que essa pimenta pode ser altamente pungente, tanto quanto as pimentas as quais ela se assemelha. Quando outros compostos presentes no óleo essencial dessa pimenta são responsáveis pelo agrupamento, no entanto, essas pimentas passam a ser mais parecidas com a pimenta bode e a pimenta biquinho, como pode ser visto na PC1 x PC2 e na PC1 x PC3, para o extrato proveniente da hidrodestilação (Fig. 3.17 B). Esse resultado é bastante apropriado, já que ambas as pimentas pertencem ao gênero (*Capsicum chinense*).

A pimenta Cumari do Pará apresentou o perfil químico mais diferente de todas as outras analisadas, apesar dessa pimenta também pertencer ao gênero *Capsicum chinense*, como é caso da pimenta Bode, biquinho e pimenta Neyde. No entanto, é necessário considerar que todas as outras pimentas analisadas para os componentes principais nesse estudo estavam no estágio maduro, enquanto que a pimenta Cumari do Pará estava no estágio verde. Como já foi visto na introdução desse trabalho, a literatura aponta uma grande variação dos voláteis presentes nas pimentas ao longo do processo de maturação (LUNING et al. 1994; MAZIDA et al. 2005). Logo, pode ter sido esse o fator determinante para uma diferença tão marcante em relação a essa pimenta.

TABELA 3.9: Compostos voláteis identificados nas pimentas analisadas por hidrodestilação.

Voláteis	Bo	Bi	R	C	M	D	CF	IR	IR -NIST	IR -Ad	IR-lit
3-metilbutanoato de 3-metilbutil	P	P	P	P	P	P	NP	1108			1103
2-metilpropanoato de 4-metilpentila	P	P	P	P	P	NP	NP	1115			1109
2-metilbutanoato de pentila	P	NP	NP	P	NP	NP	NP	1141			1142
3-metilbutanoato de pentila	P	NP	NP	P	NP	NP	NP	1146			1139
Isobutanoato de hexila	P	P	P	P	P	NP	NP	1151			1149
Salicilato de metila	P	NP	NP	NP	P	NP	NP	1196			1192
2-metilbutanoato de hexila	P	P	NP	P	P	P	P	1203	1203		
Isopentanoato de hexila	P	P	P	P	P	P	NP	1208			1244
(E)-pentanoato de 2- hexenila	P	P	P	P	NP	P	NP	1247			1300
Pentanoato de hexila	P	NP	NP	P	P	NP	NP	1256	1247		
3,3-Dimetilciclohexanol	P	P	P	NP	NP	NP	NP	1389			1392
α -Himacaleno	P	P	P	P	P	NP	NP	1452	1447		
δ-Himacaleno	P	P	P	P	P	P	NP	1481		1481	
Germacreno D	P	P	P	NP	NP	P	P	1484	1480		

Bo – Bode

Bi - Biquinho

R – Roxa

C – Cumari do Pará

M – Malagueta

D – dedo de moça

CF – Chapéu de frade

IR-lit = IR = índice de retenção calculado usando a equação de Van den Dool e Kratz.

IR-Ad = Índice de retenção da literatura (ADAMS, 2007)

IR lit = Kollmannsberger, et al., 2011; Rodríguez-Burruezo et al., 2010; Pino et al., 2011.

IR-NIST = identificado pelo NIST Web Book, webbook.nist.gov

P – o composto está presente

NP – o composto não está presente

A Tabela 3.9 descreve alguns compostos identificados para as pimentas analisadas. Os compostos destacados em azul (Isopentanoato de hexila, 3,3-Dimetilciclohexanol, δ -Himacaleno) foram os compostos encontrados como sendo majoritários para as pimentas do gênero *Capsicum chinense*, nesse trabalho. Pino et al. (2011) num trabalho com a pimenta cubana Cachucha que pertence a esse mesmo gênero também encontraram esses três compostos como sendo majoritários para aquela pimenta. Os autores também destacam que, além desses três compostos, foram majoritários para a pimenta Cachucha, os compostos gemacreno D, pentanoato de hexila e 2-metilbutanoato de hexila.

Na sua grande maioria, os compostos presentes nas pimentas analisadas foram indicados pela biblioteca NIST 11.0 como sendo compostos do tipo éster. Por terem estruturas muito parecidas e fragmentações semelhantes, muito pouco desses compostos puderam ser identificados. Trabalhos presentes na literatura para pimentas desse gênero costumam trazer extensas tabelas de ésteres, o que está de acordo com o resultado obtido nesse estudo. Constatou-se, porém que os trabalhos encontrados na literatura apresentaram uma identificação desses compostos baseada principalmente na injeção de padrões para a confirmação do tempo de retenção (RODRÍGUEZ-BURRUEZO et al., 2010; KOLLMANNBERGER, et al., 2011; PINO et al., 2011).

3.5 – Conclusão

Dois métodos diferentes foram utilizados para a extração de óleo essencial de pimenta do gênero *Capsicum* nesse estudo, soxhlet e hidrodestilação. A análise por GC-MS desses extratos mostrou que as extrações por meio dos diferentes métodos apresentam perfis de voláteis com algumas características distintas. A metodologia que empregou soxhlet na extração do óleo essencial levou a extração de compostos menos voláteis, como é o caso dos capsaicínides, que são os compostos responsáveis pela pungência nas pimentas. A metodologia que emprega hidrodestilação, por outro lado, possibilitou uma melhor recuperação dos compostos aromáticos do fruto, uma vez que, sendo esses compostos extremamente voláteis, se tratam de substâncias que necessitam de metodologias

com menor tempo de aquecimento, impedindo a perda dessas por evaporação depois do processo de extração.

A análise do *headspace* dos frutos, mostrou um perfil de voláteis bastante parecido com aquele apresentado na hidrodestilação. Verificou-se, ainda, que esse método possibilita o diagnóstico de compostos muito mais voláteis do que aqueles obtidos por hidrodestilação. Isso ocorre devido a menor manipulação sofrida pela amostra, o que evita perdas das substâncias com essa característica. Um inconveniente, porém encontrado para essa técnica, quando utilizada para fins quantitativos é a dificuldade de reprodução das análises nas replicatas injetadas. Isso ocorre devido a impossibilidade de se aplicar um padrão interno a amostra para a correção dos desvios da análise. Como os padrões são empregados em soluções contendo solventes orgânicos, esses solventes acabam por inibir os sinais da amostra. O ideal, portanto, seria o emprego nessa técnica de uma substância padrão volátil suficiente para ser recuperada no *headspace* da amostra, mas que pudesse ser dissolvida em água.

A PC1, na análise de componentes principais explicou a maior percentual de diferenças e semelhanças entre as pimentas nas diferentes metodologias empregadas na análise do óleo essencial das pimentas. Essa análise mostrou que as pimentas que mais se parecem, em termos do perfil de voláteis, são a pimenta bode e a pimenta biquinho. A pimenta Neyde (exótica roxa) também teve um perfil de voláteis bastante parecido com essas duas pimentas na maioria das análises. A pimenta com perfil mais diferenciado foi a Cumari do Pará, embora essa pimenta seja classificada como uma *Capsicum chinense* como as primeiras. Esse perfil diferenciado, porém, pode estar relacionado ao fruto dessa pimenta ser o único analisado no estágio verde, o que acaba gerando um perfil próprio desse estágio de desenvolvimento da planta.

3.6 – Referências bibliográficas

ADAMS, R. P. "Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/mass spectroscopy". Allured: Carol Stream, 2007.

ALMEIDA, A. S. S. S. Perfil de voláteis de variedades melhoradas de pimentas "Capsicum chinenses" utilizando técnicas de HS-SPME, CG-EM e CG-olfatometria. Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal do Ceará, 2015. Dissertação de Mestrado, 70 p.

Amaro, G. B. Agência de informação Embrapa: pimenta. Embrapa, sem data <<https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/pimenta/arvore/CONT000gn0frh1202wx5ok0liq1mqfl1jyer.html#topoPagina>> Acesso: 28 de dezembro de 2018.

BOSLAND, P.W., VOSTAVA, E.J. "Peppers: Vegetable and Spice Capsicums." CABI Publishing, New York, USA, 2000.

BURT, S. "Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review". *International Journal of Food Microbiology*, **94**(3): 223–253, 2004.

CARVALHO, S. I. C.; BIANCHETTI, L. B.; RIBEIRO, C. S. C.; LOPES, C. A. "Pimentas do gênero *Capsicum* no Brasil". Embrapa Hortaliças: Brasília, DF, Brasil, 2006.

CHEMAT, F., e BOUTEKEDJIRET, C. "Extraction // Steam Distillation". *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*.1-12, 2015.

DÍAZ-LAVIADA, I. e RODRÍGUEZ-HENCHE, N. "The potential antitumor effects of capsaicin". *Prog Drug Res*. **68**: 181-208, 2014.

ESHBAUGH, W. H. "A Biosystematic and Evolutionary Study of *Capsicum baccatum* (Solanaceae)". *Brittonia*, **22**(1): 31, 1970.

FUSCO B. M. e GIACOVAZZO M. "Peppers and pain". *The promise of capsaicin*. *Drugs* **53**: 909–914, 1997.

GOLMAKANI, M.-T. e REZAEI, K. "Comparison of microwave-assisted hydrodistillation with the traditional hydrodistillation method in the extraction of essential oils from *Thymus vulgaris* L." *Food Chemistry*, **109**(4): 925–930, 2008.

IP, S.-W.; LAN, S.-H.; LU, H.-F.; HUANG, A.-C.; YANG, J.-S.; LIN, J.-P. HUANG, H.-Y.; LIEN, J.-C.; HO, C.-C.; CHIU, C.-F.; WOOD, W. G.; CHUNG, J.-G. "Capsaicin mediates apoptosis in human nasopharyngeal carcinoma NPC-TW 039 cells through mitochondrial depolarization and endoplasmic reticulum stress". *Human & Experimental Toxicology*, **31**(6): 539–549, 2011.

KOKETSU, M.; GONÇALVES, S.L. "Óleos essenciais e sua extração por arraste a vapor". Rio de Janeiro: EMBRAPA/RJ, 1991. 24p. (Documentos, 8).

KOLLMANNBERGER, H.; RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A.; NITZ, S.; NUEZ, F. "Volatile and capsaicinoid composition of ají (*Capsicum baccatum*) and rocoto (*Capsicum pubescens*), two Andean species of chile peppers". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **91**(9): 1598–1611, 2011.

KUMAR, R. e TRIPATHI, Y. C. Training Manual on Extraction Technology of Natural Dyes & Aroma Therapy and Cultivation Value Addition of Medicinal Plants, Edition: 1, Chapter: Getting Fragrance from Plants, Publisher: Forest Research Institute, Dehradun (India), pp.77 – 102, 2011.

LIU, R.; XIONG, K.; CHAO-LUO, Y.; ZE-DAI, X.; MIN-LIU, Z.; TONG-XUE, W. "Changes in volatile compounds of a native Chinese chilli pepper (*Capsicum frutescens* var) during ripening". *International Journal of Food Science & Technology*, **44**(12): 2470–2475, 2009.

LUCCHESI, M. E.; CHEMAT, F.; SMADJA, J. "Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation". *Journal of Chromatography A*, **1043**(2): 323–327, 2004.

LUNING, P. A.; DE RIJK, T.; WICHERS, H. J.; ROOZEN, J. P. "Gas Chromatography, Mass Spectrometry, and Sniffing Port Analyses of Volatile Compounds of Fresh Bell Peppers (*Capsicum annuum*) at Different Ripening Stages". *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **42**(4): 977–983, 1994.

MAZIDA, M. M.; SALLEH, M. M.; OSMAN, H. "Analysis of volatile aroma compounds of fresh chilli (*Capsicum annuum*) during stages of maturity using solid phase microextraction (SPME)". *Journal of Food Composition and Analysis*, **18**(5): 427–437, 2005.

MESTRES, M.; BUSTO, O.; GUASCH, J. "Chromatographic analysis of volatile sulphur compounds in wines using the static *headspace* technique with flame photometric detection". *Journal of Chromatography A*, **773**: 261–269, 1997.

MORI, A.; LEHMANN, S.; O'KELLY, J.; KUMAGAI, T.; DESMOND, J. C.; PERVAN, M.; MCBRIDE, W. H.; KIZAKI, M.; KOEFFLER, H. P. "Capsaicin, a Component of Red Peppers, Inhibits the Growth of Androgen-Independent, p53 Mutant Prostate Cancer Cells". *Cancer Research*, **66**(6): 3222–3229, 2006.

NEITZKE R. S.; BARBIERI R. L.; RODRIGUES W. F.; CORRÊA I. V.; CARVALHO F. I. F. "Dissimilaridade genética entre acessos de pimenta com potencial ornamental". *Horticultura Brasileira*, **28**: 47-53, 2010.

OZEL, M., e KAYMAZ, H. "Superheated water extraction, steam distillation and Soxhlet extraction of essential oils of *Origanum onites*". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **379**(7-8), 2004.

PINO, J.; FUENTES, V.; BARRIOS, O. "Volatile constituents of Cachucha peppers (*Capsicum chinense* Jacq.) grown in Cuba". *Food Chemistry*, **125**(3): 860–864, 2011.

PINO, J.; GONZALEZ, M.; CEBALLOS, L.; CENTURIONYAH, A.; TRUJILLOAGUIRRE, J.; LATOURNERIEMORENO, L.; SAURIDUCH, E. "Characterization of total capsaicinoids, colour and volatile compounds of Habanero chilli pepper (*Capsicum chinense* Jack.) cultivars grown in Yucatan". *Food Chemistry*, **104**(4), 1682–1686, 2007.

PINO, J.; SAURI-DUCH, E.; MARBOT, R. "Changes in volatile compounds of Habanero chile pepper (*Capsicum chinense* Jack. cv. Habanero) at two ripening stages". *Food Chemistry*, **94**(3): 394–398, 2006.

PINTO, C. M. F.; PINTO, C. L. O.; DONZELES, S. M. L. "Pimenta *Capsicum*: propriedades químicas, nutricionais, farmacológicas e medicinais e seu potencial

para o agronegócio”. *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS)*, **3**(2): 108-120, 2013.

PONCE, A. G.; ROURA, S. I.; DEL VALLE, C. E.; MOREIRA, M. R. “Antimicrobial and antioxidant activities of edible coatings enriched with natural plant extracts: In vitro and *in vivo* studies”. *Postharvest Biology and Technology*, **49**(2): 294–300, 2008.

POURMORTAZAVI, S. M., e HAJIMIRSADEGHI, S. S. “Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis”. *Journal of Chromatography A*, **1163**(1-2): 2–24, 2007.

RÊGO, E. R.; RÊGO, M. M.; CRUZ, C. D.; FINGER, F. L.; CASALI, V. W. D. “Phenotypic diversity, correlation and importance of variables for fruit quality and yield traits in Brazilian peppers (*Capsicum baccatum*)”. *Genetic Resources and Crop Evolution*, **58**(6): 909–918, 2010.

RIBEIRO-SANTOS, R.; ANDRADE, M.; MELO, N. R.; SANCHES-SILVA, A. “Use of essential oils in active food packaging: Recent advances and future trends”. *Trends in Food Science & Technology*, **61**: 132–140, 2007.

RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A.; GONZÁLEZ-MAS, M. DEL C.; NUEZ, F. “Carotenoid Composition and Vitamin A Value in Ají (*Capsicum baccatum* L.) and Rocoto (*C. pubescens* R. & P.), 2 Pepper Species from the Andean Region”. *Journal of Food Science*, **75**(8): S446–S453, 2010.

RODRÍGUEZ-BURRUEZO, A.; KOLLMANNBERGER, H.; GONZÁLEZ-MAS, M. C.; NITZ, S.; FERNANDO, N. “HS-SPME Comparative Analysis of Genotypic Diversity in the Volatile Fraction and Aroma-Contributing Compounds of Capsicum Fruits from the *annuum*–*chinense*–*frutescens* Complex”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **58**(7): 4388–4400, 2010.

RUMSFIELD, J. A., e WEST, D. P. “Topical Capsaicin in Dermatologic and Peripheral Pain Disorders”. *DICP*, **25**(4): 381–387, 1991.

SITARAMARAJU, Y.; van HUL, A.; WOLFS, K.; van SCHEPDAEL, A.; HOOGMARTENS, J.; ADAMS, E. “Static headspace gas chromatography of (semi-)volatile drugs in pharmaceuticals for topical use”. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **47**: 834–840, 2008.

SOUSA, E. T.; RODRIGUES, F. M.; MARTINS, C. C.; DE OLIVEIRA, F. S.; PEREIRA, P. A. P.; DE ANDRADE, J. B. “Multivariate optimization and HS-SPME/GC-MS analysis of VOCs in red, yellow and purple varieties of *Capsicum chinense* sp. Peppers”. *Microchemical Journal*, **82**(2): 142–149, 2006.

VIRIDEA, Empresa agrícola Srl Viale Europa, 2018. Disponível em: <<https://www.viridea.it/superofferte/peperoncino-pimenta-da-neyde/>> Acesso: 28 de dezembro de 2018.

WILSON, C. L.; SOLAR, J. M.; EL GHAOUTH, A.; WISNIEWSKI, M. E. "Rapid Evaluation of Plant Extracts and Essential Oils for Antifungal Activity Against *Botrytis cinerea*". *Plant Disease*, **81**(2): 204–210, 1997.

WU, W.; MASSART, D. L.; DE JONG, S. "The kernel PCA algorithms for wide data. Part I: Theory and algorithms". *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, **36**(2): 165–172, 1997.

WU, C.; WANG, F.; LIU, J.; ZOU, Y.; CHEN, X. "A comparison of volatile fractions obtained from *Lonicera macranthoides* via different extraction processes: ultrasound, microwave, Soxhlet extraction, hydrodistillation, and cold maceration". *Integrative Medicine Research*, **4**(3): 171–177, 2015.

ZHANG, W. Y., e LI WAN PO, A. "The effectiveness of topically applied capsaicin". *European Journal of Clinical Pharmacology*, **46**(6): 517-522, 1994.

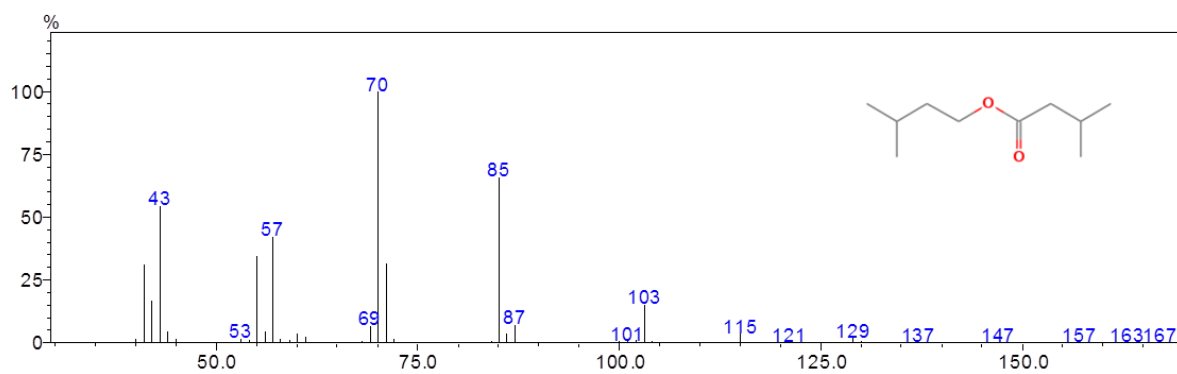
ZIINO, M.; CONDURSO, C.; ROMEO, V.; TRIPODI, G.; VERZERA, A. "Volatile compounds and capsaicinoid content of fresh hot peppers (*Capsicum annum*L.) of different Calabrian varieties". *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **89**(5): 774–780, 2009.

APÊNDICE A

Espectros de massa com a respectiva estrutura para os compostos identificados no trabalho.

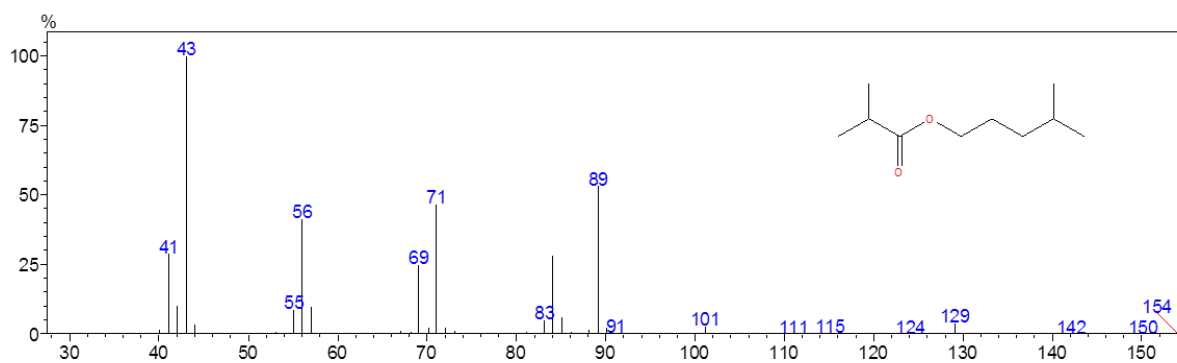
3-metilbutanoato de 3-metilbutil

IR = 1108



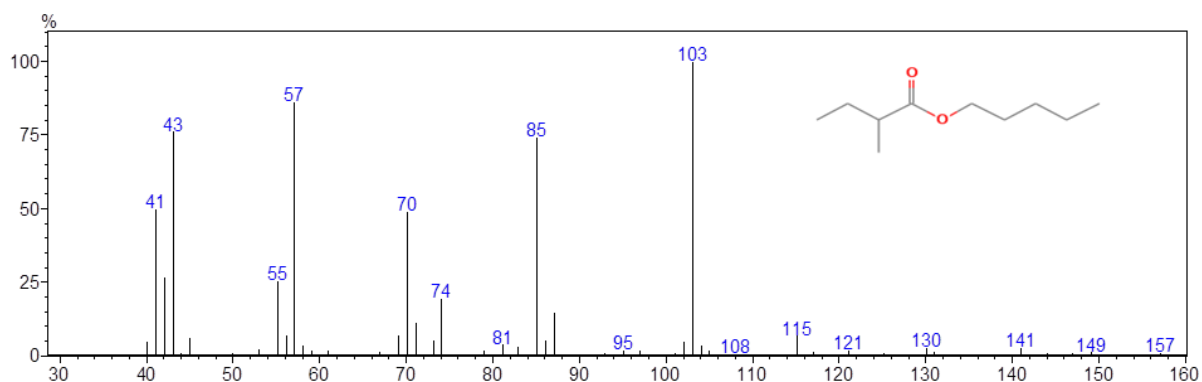
2-metilpropanoato de 4-metilpentila

IR = 1115



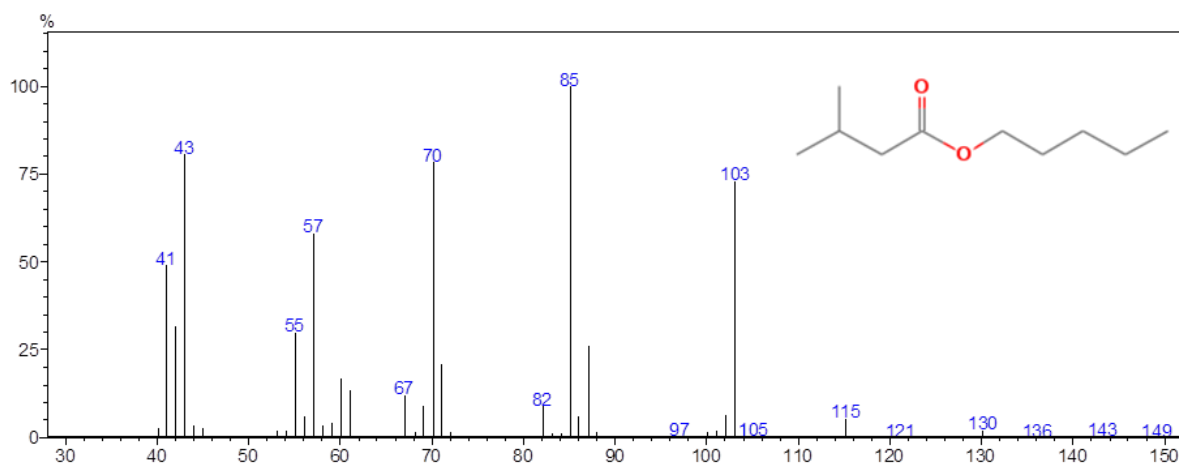
2-metilbutanoato de pentila

IR = 1141



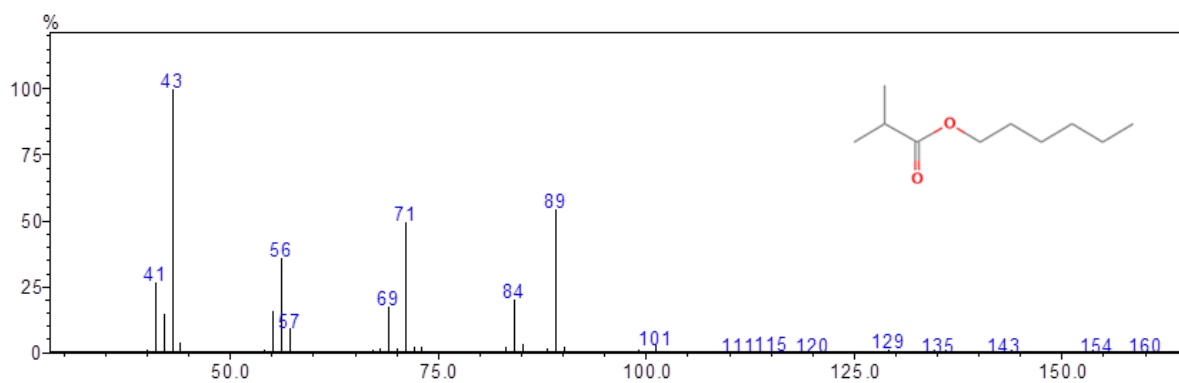
3-metilbutanoato de pentila

IR = 1146



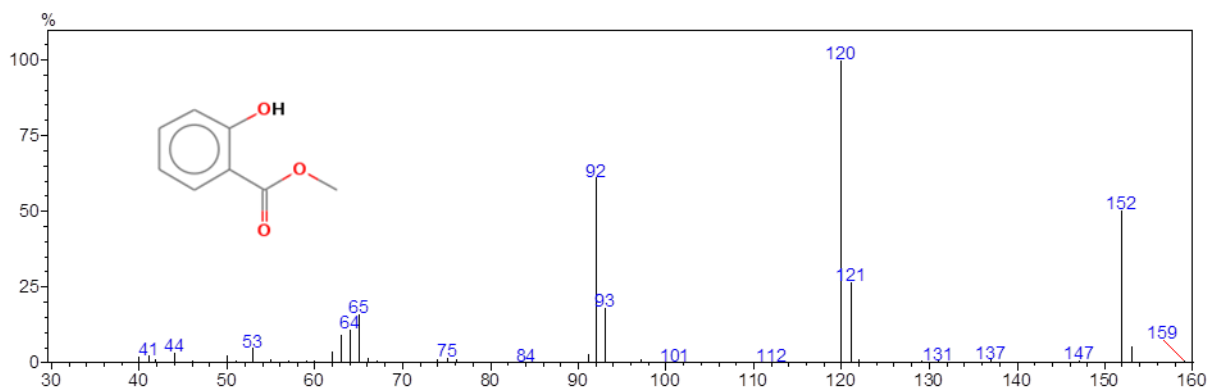
Isobutanoato de hexila

IR = 1151



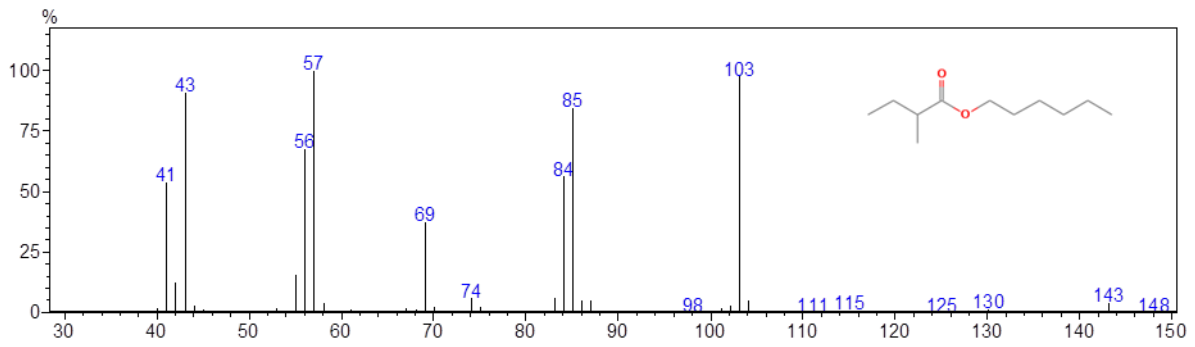
Salicilato de metila

IR = 1196



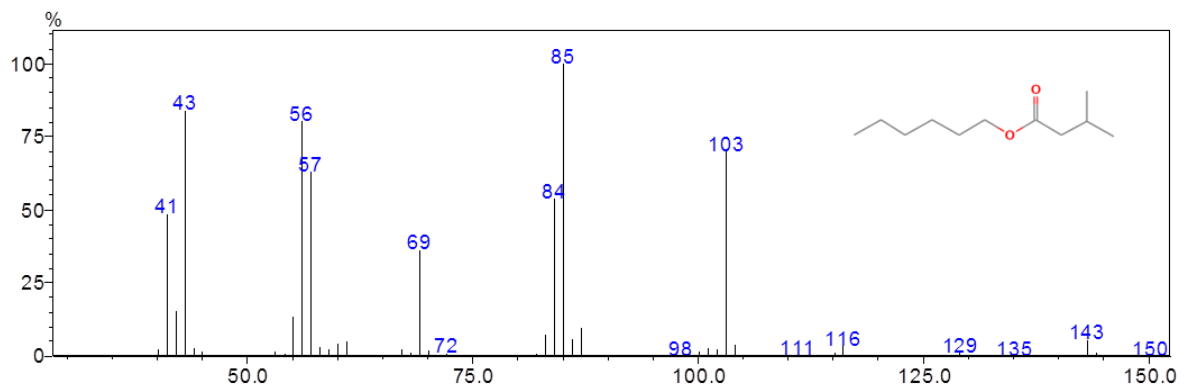
2-metilbutanoato de hexila

IR = 1203



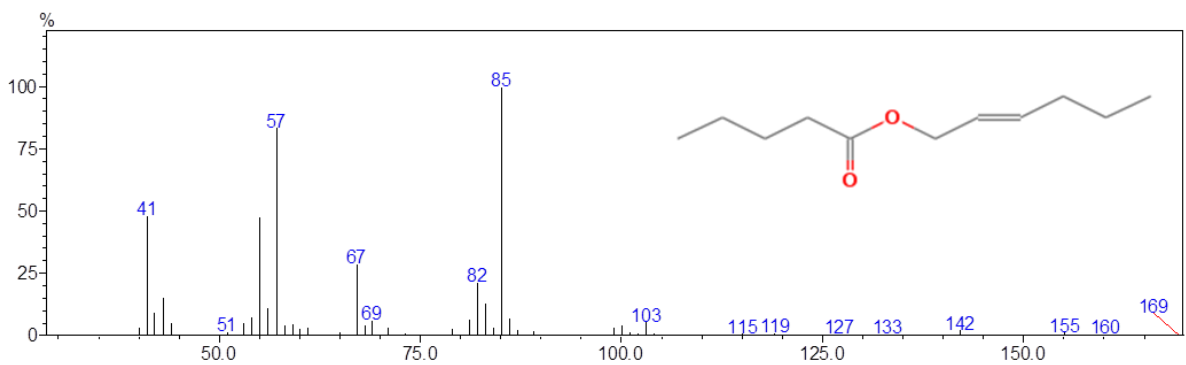
Isopentanoato de hexila

IR = 1208



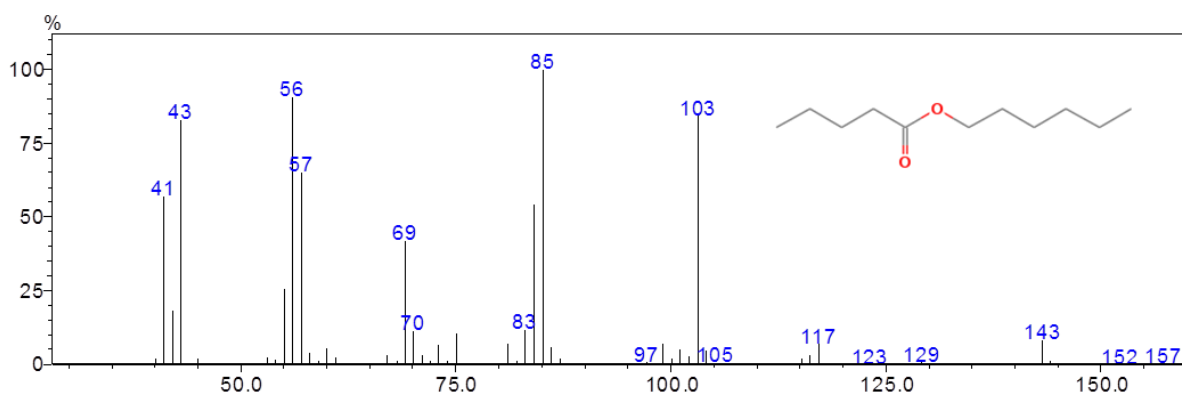
(E)-pentanoato de 2- hexenila

IR = 1247



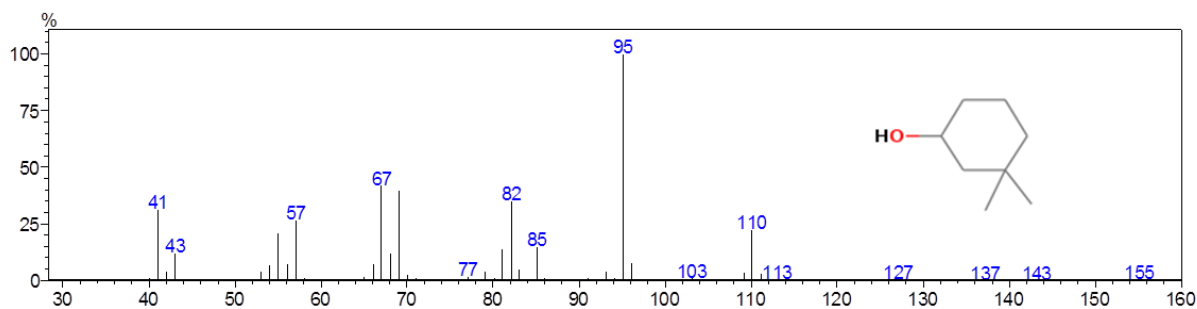
Pentanoato de hexila

IR = 1256



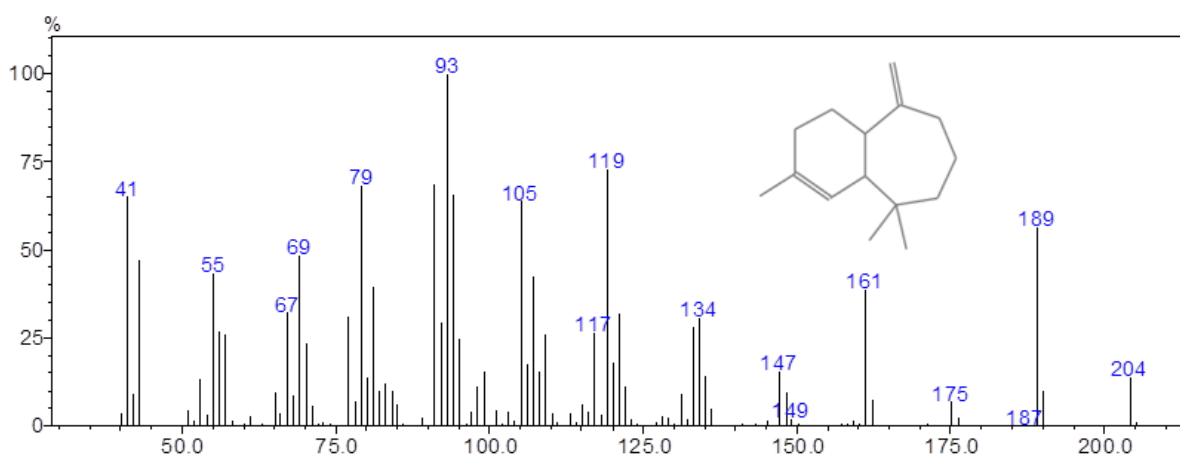
3,3-Dimetilciclohexanol

IR = 1389



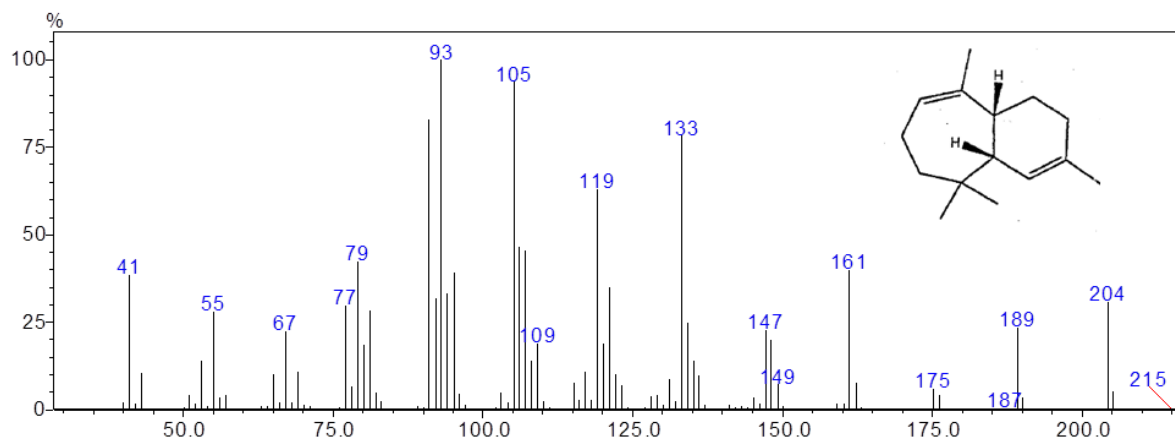
α -Himacaleno

IR = 1452



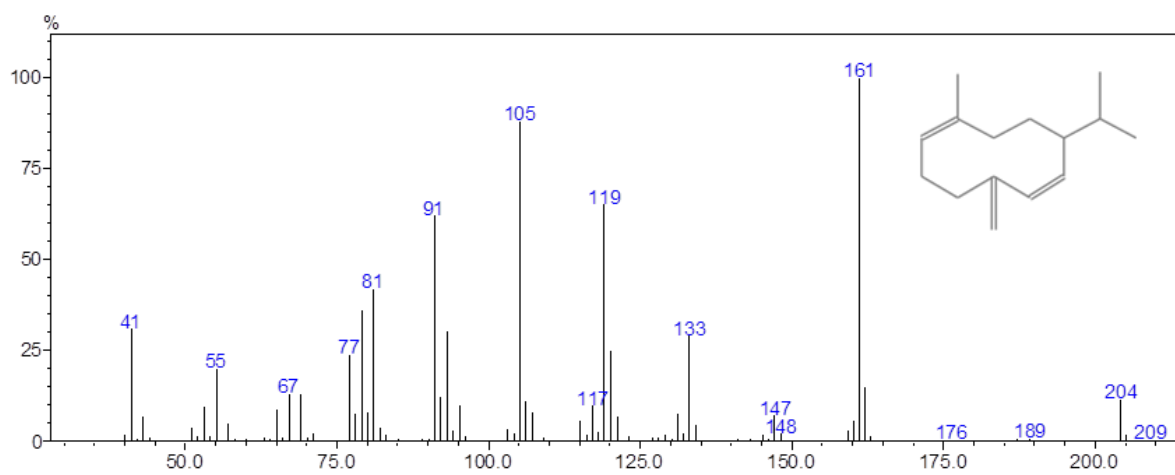
δ -Himacaleno

IR = 1481



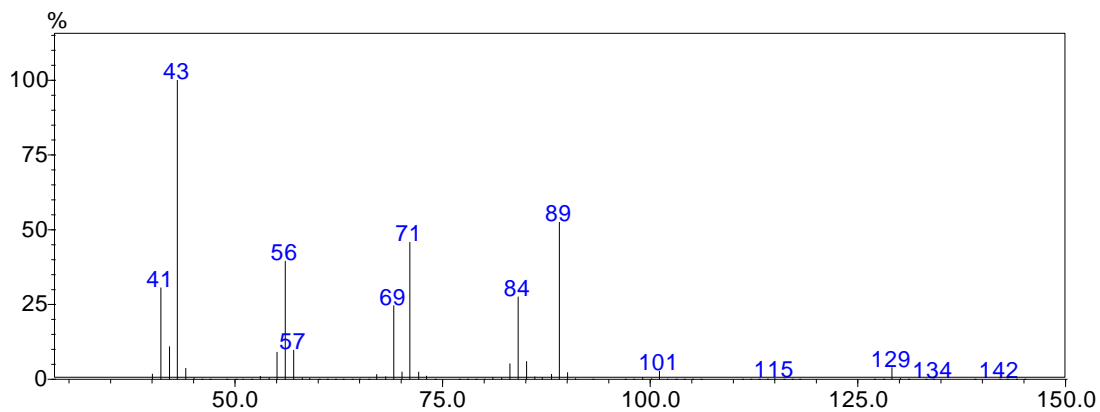
Germacreno D

IR = 1484

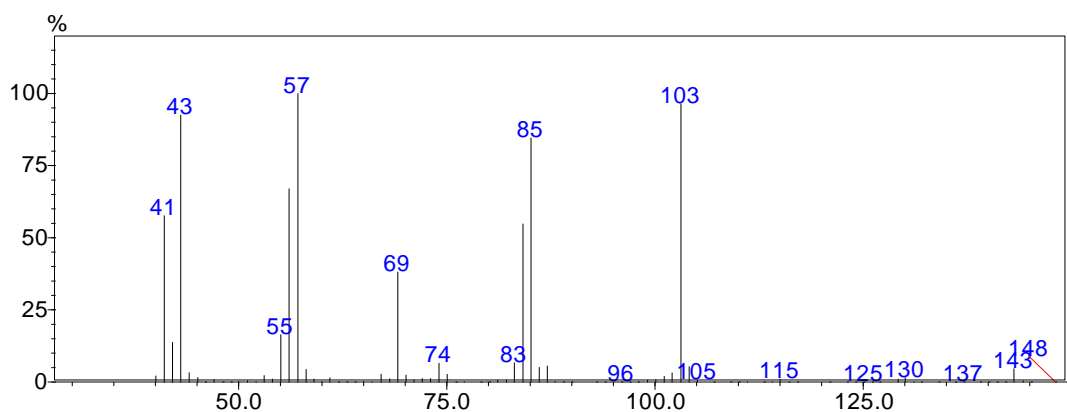


APÊNDICE B

Espectro para o composto 31 obtido por HS



Espectro para o composto 36 obtido por HS



Espectro para o composto 56 (3,3-Dimetilciclohexanol) obtido por HS

