UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**Biodegradação dos pesticidas esfenvalerato,
espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido por
linhagens bacterianas isoladas do cerrado reflorestado
e citricultura da laranja**

Charlene Souza dos Anjos

São Carlos
2018

Charlene Souza dos Anjos

Biodegradação dos pesticidas esfenvalerato, espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido por linhagens bacterianas isoladas do cerrado reflorestado e citricultura da laranja

Tese apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

São Carlos

2018

*Aos meus pais João dos Anjos e
Maria Telma de Souza dos Anjos*

AGRADECIMENTOS

Uma grande vitória se aproxima e com ela mais uma etapa chega ao fim a sensação de dever cumprido me enche de orgulho, uma vitória conquistada com muitas lágrimas, porém com muitas coisas boas, sorrisos, companheirismo, aprendizado tanto na ciência como humanamente e nada disso faria sentido se o amor ao que faço e a dedicação a que presto não existisse. Um ciclo acaba e com ele chega o momento de agradecer pelas dádivas alcançadas e assim como em tudo o meio científico não se faz sozinho.

Agradeço a Deus e a minha Virgem tão amada pela dádiva da minha existência, pela oportunidade de fazer parte de uma família que luta pela minha vida desde o momento em que nasci, pela força nos momentos difíceis são eles, meus pais João e Maria Telma que fazem disso tudo que hoje vivo ser possível por dedicarem a vida por mim e aos meus irmãos, por darem a base do que é certo ou errado e fazer de mim uma cidadã hoje formada e em breve Doutora. Ao meu irmão Alan por ser meu companheiro em todos os momentos vividos, as minhas irmãs Joseane e em especial a Angela por me escutar, não me julgar, compreender quando falho em algo, por ser um dos meus portos seguros durante estes quatro anos, onde posso voltar sempre. A Ana minha afilhada pelos bons dias e os “eu te amo madrinha” que me ajudaram e ajudam tanto. “AMO VOCÊS”

Ao Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto por me proporcionar a oportunidade de fazer parte do seu grupo e mostrar-me diariamente como um bom orientador deve se portar diante dos seus alunos, sem diferenciar uns dos outros, estando todos os dias presente e procurando ajudar em tudo. Foram quatro anos de muito aprendizado.

A Prof. Dr. Maria Bernadete do Departamento de Ambiental e a técnica do respectivo laboratório que me auxiliaram nas análises de PCR.

Aos colegas de laboratório Iara, Erika, David, Willian, Juliana Galan, Juliana Barreiro, Irlon, Darlisson, Lucas, Samuel, Matheus, Jaqueline pelos momentos vividos e a troca de aprendizado diariamente. A técnica do laboratório Marília Perret pelo auxílio sempre que necessário, ao Fabiano Roberto e Gislei secretários do IQSC- Campus II, pela disponibilidade em ajudar sempre e a Edivânia por ser tão carinhosa com seus “filhinhos”.

Aos amigos da Universidade Federal de Sergipe que estão espalhados nesse Brasil mais nunca deixam de estar presentes, fazem da distância uma tristeza menor sempre que precisei. Aonde quer que vamos sempre estaremos juntos do Iapó ao Chuí. A Alessandra

Keiko e Patrícia Kaori, por ajudar-me a levantar em todas as quedas durante esse período e fazerem parte dos momentos mais felizes que passei nessa etapa em São Carlos.

E em especial a minha amiga, irmã, parceira por estar ao meu lado todos os dias, todos os minutos e segundo Rafaely. Vivemos juntas momentos importantes de crescimento durante esses quatro anos. Chegamos juntas e agora cada uma vai seguir um caminho, mais nunca deixaremos de ser o que aprendemos juntas nesses oito anos de convivência.

Não deixaria de agradecer a Sandra minha “*Sandrinha*” que virou um anjo, há três anos, foi quem me ingressou no mundo científico quando fui sua IC ainda em Sergipe. Te amo, nunca jamais vou te esquecer, Deus e a Virgem te levaram muito cedo mais tenho certeza que houve um propósito. Obrigada!!

A CAPES pelo auxílio financeiro e ao IQSC pela estrutura.

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)

RESUMO

A biorremediação tornou-se uma das soluções viáveis para a remoção de xenobióticos do meio ambiente ou convertendo estes em produtos não tóxicos para o ecossistema e para o ser humano. Desta forma, a biodegradação do pesticida esfenvalerato (100 mg L^{-1}) foi realizada pelas linhagens de *Serratia marcescens* 6A, *Bacillus* sp. 6D, 6E, 6F, 6H, 6I e 6L, dentre estas as estirpes de *Bacillus* sp. 6D, 6F, 6H e 6I apresentaram melhores valores de biodegradação com 48%, 90%, 90% e 62% respectivamente em 12 dias de reação. Com o intuito de otimizar o processo foram então realizados experimentos em consórcio bacteriano com estas linhagens, obtendo 90% de biodegradação do esfenvalerato no mesmo período. Microrganismos da citricultura foram isolados para estudos de biodegradação. Assim, foram realizados o isolamento de 55 estirpes de bactérias e 18 de fungos e posteriormente as bactérias foram identificadas pela técnica de 16S rDNA. Dentre estas a bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 apresentou potencial para desenvolver-se em meio de cultura sólido na presença de 100 mg L^{-1} dos pesticidas espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido os quais também foram utilizados para estudos posteriores de biodegradação. A bactéria *Bacillus* sp. 6F foi a que melhor biodegradou o pesticida esfenvalerato, o *Planejamento fatorial* foi aplicado e permitiu a otimização da biodegradação do pesticida espiroclorfenol em 88% para a bactéria *Bacillus* sp. 6F. Utilizando a condição experimental otimizada *meio de cultura Peptona G*, pH 5, temperatura de 40°C e rotação de 200 rpm pela linhagem de *Bacillus* sp. 6F, o pesticida espiroclorfenol foi biodegradado em 96% em 2 dias de reação com a bactéria *Bacillus* sp. CSA-21. Nesta condição os pesticidas tiametoxam e imidacloprido não foram biodegradados no período de 9 dias, então três metodologias foram avaliadas MCT-1 para o tiametoxam e MCI-1 para o imidacloprido (com união celular), MCT-2 e MCI-2 (sem união celular e com período de adaptação de 24 h) e MCT-3 e MCI-3 (sem a união das células e sem período de adaptação de 24 h). Assim, foram possíveis a biodegradação do pesticida tiametoxam em 92% para MCT-1, 82% para MCT-2 e 95% para MCT-3 no período de 9 dias. O pesticida imidacloprido foi biodegradado em 62% para MCI-1 e 67% para MCT-2 e MCT-3. Os metabólitos formados para cada pesticida foram identificados por LC-MS/MS e as rotas de biodegradação foram propostas, sendo as principais enzimas envolvidas nas reações carboxilesterase (E_1), haloalcano desalogenase (E_4), alcano hidroxilase (E_7) e hidroxilase (E_9). A biodegradação em solo esterilizado e não esterilizado para os pesticidas espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido também foram realizadas, possibilitando a biodegradação de 92% para o solo esterilizado e 43% para o não esterilizado para o espiroclorfenol; 19% para o solo esterilizado e 44% para o não esterilizado, para o tiametoxam e 27% para o solo esterilizado e 15% para o não esterilizado para o imidacloprido no período de 12 dias de reação. Com este estudo foi possível realizar a biodegradação dos pesticidas esfenvalerato, espiroclorfenol, tiametoxam, imidacloprido e do metabólito 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespиро[4.5]dec-3-en-2-ona **H1** utilizando linhagens bacterianas isoladas do cerrado reflorestado (Campus II) e da citricultura da laranja, possibilitando propor rotas de biodegradação para os mesmos e assim demonstrar a sustentabilidade e a química verde hoje como métodos importantes para a descontaminação de agroquímicos no meio ambiente.

Palavra-chave: Biodegradação, *Bacillus* sp. CSA-21, pesticidas

ABSTRACT

Bioremediation has become one of the viable solutions for the removal of xenobiotics from the environment or by converting these into non-toxic products to the ecosystem and to humans. Thus, the biodegradation of the pesticide esfenvalerate (100 mg L^{-1}) was carried out by the strains of *Serratia marcescens* 6A, *Bacillus* sp. 6D, 6E, 6F, 6H, 6I and 6L, among these strains *Bacillus* sp. 6D, 6F, 6H and 6I presented better biodegradation values with 48%, 90%, 90% and 62% respectively in 12 days of reaction. In order to optimize the process, experiments were carried out in bacterial consortium with these strains, obtaining 90% of biodegradation of the esfenvalerate in the same period. Microorganisms were isolated from citriculture for subsequeute biodegation studies. Thus, 55 strains of bacteria and 18 of fungi were isolated, and the bacteria were later identified by the 16S rDNA technique. Among these, the bacterium *Bacillus* sp. CSA-21 showed potential to develop in solid culture medium in the presence of 100 mg L^{-1} of the pesticides spiroticlofen, thiamethoxam and imidacloprid which were used for the biodegradation study. Using the bacterium *Bacillus* sp. 6F that better biodegraded the esfenvalerate pesticide, the *Factorial Planning* was applied and allowed the optimization of the biodegradation of the pesticide spiroticlofen in 88% by bacterium *Bacillus* sp. 6F. Using the experimental condition optimized *culture medium Peptone G*, *pH 5*, *temperature of 40°C* and *rotation of 200 rpm* by the strain of *Bacillus* sp. CSA-21 the spiroticlofen pesticide was biodegraded in 96% in 2 days of reaction. In this condition the thiamethoxam and imidacloprid pesticides were not biodegraded within 9 days, then three methodologies were evaluated MCT-1 for thiamethoxam and MCI-1 for imidacloprid (with cell union), MCT-2 and MCI-2 (without cell union and with adaptation period of 24 h) and MCT-3 and MCI-3 (without cell union and without adaptation period of 24 h). Thus conditions, were possible the biodegradation of the pesticide thiamethoxam in 92% for MCT-1, 82% for MCT-2 and 95% for MCT-3 in 9 days. The imidacloprid pesticide was biodegraded in 62% for MCI-1 and 67% for MCT-2 and MCT-3. The metabolites formed for each pesticide were identified by LC-MS / MS and the biodegradation routes were proposed. The major enzymes involved in the reactions were carboxylesterase (E_1), haloalcan dehalogenase (E_4), alkane hydroxylase (E_7) and hydroxylase (E_9). The biodegradation in sterilized and non- sterilized soil for the pesticides spiroticlofen, thiamethoxam and imidacloprid were also carried out enabling the biodegradation of 92% to sterilized soil and 43% non- sterilized for spiroticlofen; 19% for sterilized soil and 44% non- sterilized for thiamethoxam and 27% for sterilized soil and 15% non- sterilized for imidacloprid in the reaction 12-day period. The biodegradation of the pesticides esfenvalerate, spiroticlofen, thiamethoxam, imidacloprid and the metabolite 3-(2,4-dichlorophenyl)-4-hydroxy-1-oxaspiro[4.5]dec-3-en-2-one **H1** using bacterial strains isolated from reforested Savanna (Campus II) and of the citriculture, making it possible to propose biodegradation routes for them and thus demonstrate sustainability and green chemistry today as important methods for the decontamination of agrochemicals in the environment.

Keywords: Biodegradation, *Bacillus* sp. CSA-21, pesticides

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Alguns processos que afetam o transporte e degradação de agroquímicos no meio ambiente - Adaptado de Rebelo e Caldas (2014).....	35
Figura 2. Alguns agroquímicos utilizados em diversas culturas e suas classes.	36
Figura 3. Pesticidas encontrados como resíduos em frutos de laranjas pós colheitas. ..	38
Figura 4. Mecanismo catalítico para a metilação do 4-nitrofenol por metiltransferase via SAM para produzir o 1-metoxi-4-nitrobenzeno.	41
Figura 5. Esquema da hidrólise de ligações ésteres por carboxilesterase (acil-enzima SeCbE). Onde R e R' são grupamentos alquílicos ou arílicos.	42
Figura 6. Mecanismo catalítico de hidrólise do espiroclorfenol por carboxilesterase para produzir um ácido carboxílico.	42
Figura 7. Mecanismo catalítico de oxidação de um álcool primário a aldeído por álcoois desidrogenases.	44
Figura 8. Mecanismo catalítico da reação realizada por monamino oxidases para a produção de imina.	46
Figura 9. Mecanismo catalítico da reação de transaminação do composto (S)-1-feniletilamina para a formação da acetofenona.	48
Figura 10. Mecanismo catalítico da reação de haloalcano desalogenases do 2,4-diclorofenol para produzir o 4-clorobenzeno-1,2-diol.	49
Figura 11. Pesticidas da classe ácidos de tetrônicos espirociclos.	55
Figura 12. Produtos de biodegradação dos estereoisômeros de <i>paichongding</i> em sistema anaeróbio por bactérias do solo.	65
Figura 13. Fluxograma dos estudos que serão apresentados neste trabalho da biodegradação dos pesticidas esfenvalerato, espiroclorfenol, imidacloprido e tiametoxam.	74
Figura 14. Etapas envolvidas no cultivo das bactérias <i>Serratia marcescens</i> 6A, <i>Bacillus</i> sp. 6D, <i>Bacillus</i> sp. 6E, <i>Bacillus</i> sp. 6F, <i>Bacillus</i> sp. 6H, <i>Bacillus</i> sp. 6I, e <i>Bacillus</i> sp. 6L em meio de cultura líquido para a biodegradação do pesticida esfenvalerato.	78
Figura 15. Etapas envolvidas no cultivo das bactérias <i>Serratia marcescens</i> 6A, <i>Bacillus</i> sp. 6D, <i>Bacillus</i> sp. 6E, <i>Bacillus</i> sp. 6F em meio de cultura líquido para a biodegradação do pesticida esfenvalerato*.	79

Figura 16. Etapas envolvidas no processo de extração do esfenvalerato e seus metabólitos das culturas bacterianas.....	80
Figura 17. Etapas envolvidas no cultivo bacteriano em meios de cultura sólido (na presença de 100 mg L ⁻¹ de esfenvalerato) e líquido com as bactérias <i>Bacillus</i> sp. 6D- 6I.	82
Figura 18. Etapas envolvidas no cultivo das bactérias em meio de cultura líquido separadamente e posteriores estudos de biodegradação com o consórcio bacteriano com as linhagens de <i>Bacillus</i> sp. 6D- 6I na presença e ausência de esfenvalerato (100 mg L ⁻¹)	83
Figura 19. Etapas envolvidas no cultivo da bactéria <i>Bacillus</i> sp. 6F em meio de cultura líquido para a biodegradação do espirodiclofeno de acordo com o <i>Planejamento fatorial</i>	88
Figura 20. Etapas envolvidas no cultivo da bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 em meio de cultura líquido para a biodegradação dos pesticidas tiametoxam- MCT-1 e imidacloprido- MCI-1.....	90
Figura 21. Etapas envolvidas no cultivo da bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 em meio de cultura líquido para a biodegradação dos pesticidas tiametoxam- MCT-2 e imidacloprido- MCI-2.....	91
Figura 22. Etapas envolvidas no cultivo da bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 em meio de cultura líquido para a biodegradação dos pesticidas tiametoxam- MCT-3 e imidacloprido- MCI-3.....	92
Figura 23. Etapas envolvidas no cultivo da bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 em meio de cultura líquido para a biodegradação dos pesticidas espirodiclofeno, tiametoxam e imidacloprido em solo.....	100
Figura 24. Etapas envolvidas no processo de extração do espirodiclofeno, tiametoxam e imidacloprido e seus metabólitos em solo esterilizado e não esterilizado.	102
Figura 25. Crescimento de bactérias (A) <i>Bacillus</i> sp. 6F e (B) <i>Bacillus</i> sp. 6I em meio de cultura sólido Caldo Nutriente na presença de 100 mg L ⁻¹ esfenvalerato (32°C, 24 h).	104
Figura 26. Cromatogramas obtidos pela biodegradação do pesticida esfenvalerato (100 mg L ⁻¹) por CLAE-UV sob agitador orbital a 130 rpm, 32°C e 5 dias.	105

Figura 27. Biodegradação de esfenvalerato (100 mg L ⁻¹) do ácido 3-fenoxibenzoico e ácido 2- (4-clorofenil) -3-metilbutanoico utilizando um consórcio bacteriano do gênero <i>Bacillus</i>	109
Figura 28. Proposta de biodegradação do esfenvalerato por linhagens bacterianas de diferentes biomas e por linhagens do gênero <i>Bacillus</i> sp. isolados do Cerrado reflorestado (Campus II).....	113
Figura 29. Cromatograma do espirodiclofeno padrão analítico obtido por análise de CLAE-UV na concentração de 100 mg L ⁻¹	116
Figura 30. Influências das variáveis e níveis na biodegradação do espirodiclofeno pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. 6F obtido através do <i>Planejamento fatorial</i>	119
Figura 31. Gráfico de superfície de resposta obtido por meio do <i>Planejamento fatorial</i> para as variáveis <i>temperatura</i> e <i>rotação</i> na biodegradação do espirodiclofeno pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. 6F.	121
Figura 32. Gráfico de superfície de resposta obtido por meio do <i>Planejamento fatorial</i> para as variáveis <i>pH</i> e <i>rotação</i> na biodegradação do espirodiclofeno pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. 6F.	122
Figura 33. Gráfico de superfície de resposta obtido por meio do <i>Planejamento fatorial</i> para as variáveis <i>temperatura</i> e <i>pH</i> na biodegradação do espirodiclofeno pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. 6F.	124
Figura 34. Dendograma representando os agrupamentos das condições obtidas por meio do <i>Planejamento fatorial</i> sem interferência do meio abiótico mostrando as similaridades das condições em relação a biodegradação do espirodiclofeno pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. 6F.	125
Figura 35. Dendograma representando os agrupamentos das condições obtidas por meio do <i>Planejamento fatorial</i> com a interferência do meio abiótico mostrando as similaridades das condições com relação a biodegradação do espirodiclofeno pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. 6F com 3 dias de reação.	126
Figura 36. Gráfico da reação para a biodegradação do espirodiclofeno (100 mg L ⁻¹) <i>versus</i> tempo de reação (dias) para o metabólito H1 durante 3, 6 e 9 dias em agitador orbital (130 rpm, 40°C) utilizando a linhagem da bactéria <i>Bacillus</i> sp. 6F para a <i>condição</i> 7.	127

Figura 37. Gráfico da reação de biodegradação do espiroclorfenol (100 mg L ⁻¹) versus tempo de reação (dias) e para o metabólito H1 durante 3, 6 e 9 dias em agitador orbital (60 rpm, 24°C- condição 1; 200 rpm, 32°C- condição 5; 130 rpm, 24°C- condição 6; 200 rpm, 24°C- condição 8; 60 rpm, 24°C- condição 9) utilizando a linhagem da bactéria <i>Bacillus</i> sp. 6F.	128
Figura 38. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV (A) e suas ampliações (B) para a biodegradação do espiroclorfenol (100 mg L ⁻¹) durante 3, 6 e 9 dias em agitador orbital (130 rpm, 40°C) utilizando a linhagem da bactéria <i>Bacillus</i> sp. 6F para a condição 7.	131
Figura 39. Gráfico da reação para a biodegradação do espiroclorfenol (100 mg L ⁻¹) versus tempo de reação (dias) e para o metabólito H1 durante 3, 6 e 9 dias em agitador orbital (200 rpm, 40°C) utilizando a linhagem da bactéria <i>Bacillus</i> sp. 6F para <i>Planejamento fatorial</i>	132
Figura 40. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV (A) e suas ampliações (B) para a biodegradação do espiroclorfenol (100 mg L ⁻¹) durante 2 e 3 dias em agitador orbital (200 rpm, 40°C) utilizando a linhagem da bactéria <i>Bacillus</i> sp. 6F para <i>Planejamento fatorial</i>	132
Figura 41. Gráfico da reação para a biodegradação do espiroclorfenol (100 mg L ⁻¹) versus tempo de reação (dias) e para o metabólito H1 durante 2 e 3 dias em agitador orbital (200 rpm, 40°C) utilizando a linhagem da bactéria isoladas das folhas de laranja <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 para <i>Planejamento fatorial</i>	133
Figura 42. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV (A) e suas ampliações (B) para a biodegradação do espiroclorfenol (100 mg L ⁻¹) durante 2 e 3 dias em agitador orbital (200 rpm, 40°C) utilizando a linhagem da bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 para <i>Planejamento fatorial</i>	134
Figura 43. Cromatograma obtido por CG-EM (70 eV) do composto sintetizado o 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaspiro[4.5]dec-3-en-2-ona H1	136
Figura 44. Espectro de massas obtido por CG-EM (70 eV) do composto sintetizado o 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaspiro[4.5]dec-3-en-2-ona H1	136
Figura 45. Espectro de infravermelho do composto 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaspiro[4.5]dec-3-en-2-ona H1	137
Figura 46. Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) para o composto 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaspiro [4.5] dec-3-en-2-ona H1	138

Figura 47. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) para o composto 3-(2,4 diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespíro [4.5] dec-3-en-2-ona H1	139
Figura 48. Cromatograma do composto de biodegradação H1 e do pesticida espiroclorfenol por CLAE-UV obtido pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. 6F.	140
Figura 49. Cromatogramas obtidos por análises de LC-MS. (A) Comparação do controle biótico e a reação de biodegradação do espiroclorfenol (100 mg L^{-1}) pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 32°C e 3 dias. (B) Cromatogramas dos possíveis metabólitos obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida espiroclorfenol.	141
Figura 50. Espectro de massas obtidos por LC-MS/MS para a obtenção de possíveis metabólitos da biodegradação do espiroclorfenol pelas bactérias <i>Bacillus</i> sp. 6F e <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 40°C em 3 dias.	142
Figura 51. Via de biodegradação proposta para o pesticida espiroclorfenol pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.....	150
Figura 52. Comparação entre os cromatogramas obtidos por análises de LC-MS/MS. (A) Comparação do controle biótico e a reação de biodegradação do metabólito H1 (100 mg L^{-1}) pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 32°C e 3 dias. (B) Cromatogramas dos possíveis metabólitos obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do H1	151
Figura 53. Espectro de massas obtidos por LC-MS/MS para a obtenção de possíveis metabólitos da biodegradação do metabólito H1 pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 40°C em 3 dias.	152
Figura 54. Possíveis metabólitos obtidos da biodegradação do composto H1 pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21, nas condições de 200 rpm, 40°C , 3 dias de reação.	154
Figura 55. Pesticida residual <i>versus</i> tempo de reação para a biodegradação do tiametoxam (100 mg L^{-1}) pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a condição MCT-1.	157
Figura 56. Pesticida residual <i>versus</i> tempo de reação para a biodegradação do tiametoxam (100 mg L^{-1}) pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a condição MCT-2.	158

Figura 57. Pesticida residual <i>versus</i> tempo de reação para a biodegradação do tiametoxam (100 mg L ⁻¹) pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21, nas condições de 200 rpm 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a condição MCT-3.	159
Figura 58. Pesticida residual <i>versus</i> tempo de reação para a biodegradação do tiametoxam (100 mg L ⁻¹) pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para as condições MCT-1, MCT-2 e MCT-3.....	160
Figura 59. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida tiametoxam por <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 para a metodologia MCT-1. (A) Comparação entre controle biótico e a reação de biodegradação para a replicata 2 em 3 dias. (B) Cromatograma da reação de biodegradação para a replicata 2 no período de 3 dias e os picos detectados com suas referentes <i>m/z</i>	162
Figura 60. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 para a metodologia MCT-1. (A) Cromatograma da reação de biodegradação para a replicata 1 em 6 dias e os picos detectados com suas referentes <i>m/z</i> . (B) Cromatograma da reação de biodegradação para a replicata 2 em 9 dias e os picos detectados com suas referentes <i>m/z</i>	163
Figura 61. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 para a condição MCT-2. (A) Cromatograma da reação de biodegradação para a replicata 1 em 3 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes <i>m/z</i> . (B) Cromatograma da reação de biodegradação para a replicata 3 em 6 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes <i>m/z</i> . (C) Cromatograma da reação de biodegradação para a replicata 3 em 9 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes <i>m/z</i>	165
Figura 62. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 para a condição MCT-3. (A) Cromatograma da reação de biodegradação para a replicata 3 em 3 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes <i>m/z</i> . (B) Cromatograma da reação de biodegradação para a replicata 1 em 6 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes <i>m/z</i> . (C) Cromatograma da reação de biodegradação para a replicata 1 em 9 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes <i>m/z</i>	167
Figura 63. Proposta de via de biodegradação para o pesticida tiametoxam pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.....	171

Figura 64. Pesticida residual <i>versus</i> tempo de reação para a biodegradação do imidacloprido (100 mg L ⁻¹) pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a metodologia MCI-1.....	175
Figura 65. Pesticida residual <i>versus</i> tempo de reação para a biodegradação do imidacloprido (100 mg L ⁻¹) pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a metodologia MCI-2.....	176
Figura 66. Pesticida residual <i>versus</i> tempo de reação para a biodegradação do imidacloprido (100 mg L ⁻¹) pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a condição MCI-3.	177
Figura 67. Comparação das metodologias MCI-1, MCI-2 e MCI-3 para o pesticida residual imidacloprido (100 mg L ⁻¹) <i>versus</i> tempo de reação pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias.	178
Figura 68. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida imidacloprido pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 para MCI-1. (A) Comparação entre controle biótico e a reação de biodegradação para a replicata 2 em 3 dias. (B) Cromatograma da reação de biodegradação replicata 2 em 3 dias e os picos detectados com suas referentes <i>m/z</i>	180
Figura 69. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida imidacloprido pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 para a metodologia MCI-1. (A) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 1 em 6 dias e os picos detectados com suas referentes <i>m/z</i> . (B) Cromatograma da reação da biodegradação replicata 2 em 9 dias e os picos detectados com suas referentes <i>m/z</i>	181
Figura 70. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida imidacloprido pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21, MCI-3. (A) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 2 em 3 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes <i>m/z</i> . (B) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 3 em 6 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes <i>m/z</i> . (C) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 3 em 9 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes <i>m/z</i>	183
Figura 71. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida imidacloprido pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 para a metodologia MCI-3. (A) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 1 em 3 dias e os respectivos	

picos detectados com suas referentes <i>m/z</i> . (B) Cromatorama da reação de biodegradação da replicata 3 em 6 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes <i>m/z</i> . (C) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 3 em 9 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes <i>m/z</i>	185
Figura 72. Poposta de via de biodegradação para o pesticida imidacloprido pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.....	190
Figura 73. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV das reações de biodegradação do pesticida espiroclorfenol pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 no período de 12 dias. (A) Comparação da reação de biodegradação do pesticida espiroclorfenol com o controle abiótico e biótico em solo esterilizado. (B) Comparação da reação de biodegradação do pesticida espiroclorfenol com controle abiótico e biótico em solo não esterilizado....	193
Figura 74. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV das reações de biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 no período de 12 dias. (A) Comparação da reação de biodegradação do pesticida tiametoxam com o controle abiótico e biótico em solo esterilizado. (B) Comparação da reação de biodegradação do pesticida tiametoxam com controle abiótico e biótico em solo não esterilizado.....	195
Figura 75. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV das reações de biodegradação do pesticida imidacloprido pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 no período de 12 dias. (A) Comparação da reação de biodegradação do pesticida imidacloprido com o controle abiótico e o biótico em solo esterilizado. (B) Comparação da reação de biodegradação do pesticida imidacloprido com controle abiótico e biótico em solo não esterilizado.	197
Figura 76. Fotos mostrando algumas etapas da coleta realizada na cidade de Tabatinga-SP. A- Musgos presente no caule. B- Frutos verdes. C- Armazenamento das amostras.	227
Figura 77. Adição das amostras em meio de cultura sólido bacteriano e fúngico. A- Frutos verdes. B- Florescência.	228
Figura 78. Etapas para a fixação do microrganismo nas lâminas para posteriores realização do teste de Gram.....	230
Figura 79. Etapas de adição dos corantes para a coloração de Gram.	231
Figura 80. Primeira etapa para a realização da reação de cadeia polimerase.....	232
Figura 81. Segunda etapa para a realização da reação de cadeia polimerase.....	233
Figura 82. Terceira etapa para a reação de cadeia polimerase.	234

Figura 83. Etapas de isolamento de microrganismos em meio de cultura sólido presente em amostras coletadas em pomar de <i>Citrus sinensis</i> .	236
Figura 84. Gráfico da presença de estirpes de bactérias e fungos isolados de amostras coletadas da plantação de <i>Citrus sinensis</i> .	239
Figura 85. Árvore filogenética dos microrganismos isolados e identificados na 1 ^o cluster (frutos do solo). <i>Methanosaeta harundinacea</i> foi utilizada como grupo externo. A barra de escala indica a distância filogenética.	241
Figura 86. Árvore filogenética dos microrganismos isolados e identificados no 2 ^o cluster (folhas do solo, solo e musgo do caule). <i>Methanosaeta harundinacea</i> foi utilizado como grupo externo. A barra de escala indica a distância filogenética.	242
Figura 87. Árvore filogenética dos microrganismos isolados e identificados no 3 ^o cluster (folhas sadias e doentes). <i>Methanosaeta harundinacea</i> foi utilizada como grupo externo. A barra de escala indica a distância filogenética.	243
Figura 88. Árvore filogenética dos microrganismos isolados e identificados no 4 ^o cluster (frutos verdes, pétalas, fluorescência e galhos). <i>Methanosaeta harundinacea</i> foi utilizada como grupo externo. A barra de escala indica a distância filogenética.	244
Figura 89. Algumas formas morfológicas de células bacterianas.	246
Figura 90. Estrutura esquemática de peptidoglicanas que constituem a parede celular das bactérias.	247
Figura 91. Parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.	249
Figura 92. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 para a metodologia MCT-1. (A) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 1 em 3 dias. (B) Comparação dos cromatogramas da reação de biodegradação no período de 3, 6 e 9 dias.	262
Figura 93. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 para a metodologia MCT-2. (A) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 1 em 3 dias. (B) Comparação dos cromatogramas da reação de biodegradação no período de 3, 6 e 9 dias.	263
Figura 94. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 para a metodologia MCT-3. (A) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 3 em 3 dias. (B) Comparação dos cromatogramas da reação de biodegradação no período de 3, 6 e 9 dias.	264

Figura 95. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 para a metodologia MCI-1. (A) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 3 em 3 dias. (B) Comparação dos cromatogramas da reação de biodegradação no período de 3, 6 e 9 dias..... 267

Figura 96. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 para a metodologia MCI-2. (A) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 3 em 3 dias. (B) Comparação dos cromatogramas da reação de biodegradação no período de 3, 6 e 9 dias..... 268

Figura 97. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 para a metodologia MCI-3. (A) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 3 em 3 dias. (B) Comparação dos cromatogramas da reação de biodegradação no período de 3, 6 e 9 dias..... 269

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Curva analítica obtida por CLAE-UV para o pesticida esfenvalerato de 50-1050 mg L ⁻¹	84
Tabela 2. Curva analítica obtida por CLAE-UV para o ácido 3-fenoxibenzoico A (5-33 mg L ⁻¹) e B (25- 245 mg L ⁻¹).	85
Tabela 3. Curva analítica obtida por CLAE-UV para o 2-(4-cloreofenil)-3-metilbutanoico A (5-33 mg L ⁻¹) e B (25-245 mg L ⁻¹).	86
Tabela 4. Condições obtidas para o <i>Planejamento fatorial</i>	89
Tabela 5. Curva analítica obtida por CLAE-UV para o espiroclorfenol na faixa de concentração entre 50-1200 mg L ⁻¹	95
Tabela 6. Curva analítica para o metabólito H1 na faixa de concentração entre 25-1000 mg L ⁻¹	96
Tabela 7. Curva analítica obtida por CLAE-UV para o tiametoxam na faixa de concentração entre 10-1000 mg L ⁻¹	97
Tabela 8. Curva analítica obtida por CLAE-UV para o imidacloprido na faixa de concentração entre 50-1200 mg L ⁻¹	98
Tabela 9. Quantificação do pesticida esfenvalerato (100 mg L ⁻¹), ácido 3-fenoxibenzoico (PBAC), 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico (CIAC) e 3-fenoxibenzaldeído (PBALD) nas condições de 130 rpm, 32°C e 120 h, em meio de cultura líquido de Caldo Nutriente. 106	
Tabela 10. Quantificação do pesticida esfenvalerato (100 mg L ⁻¹), ácido 3-fenoxibenzoico (PBAC), 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico (CIAC) e 3-fenoxibenzaldeído (PBALD) nas condições de 130 rpm, 32°C e 120 h, em meio de cultura líquido com Solução Salina.	108
Tabela 11. Quantificação de esfenvalerato (concentração inicial de 100 mg L ⁻¹), ácido 3-fenoxibenzóico (PBAC) e ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanóico (CIAC) após a biodegradação usando um consórcio bacteriano (288 h, 32 °C, 32 rpm). ^a	109
Tabela 12. Condições obtidas para o <i>Planejamento fatorial</i> aplicado à biodegradação do <i>Esp.</i> pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. 6F em 3 dias de reação.	117
Tabela 13. Análise de variância para <i>Planejamento fatorial</i> aplicado à biodegradação do espiroclorfenol pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. 6F.	118

Tabela 14. Biodegradação do pesticida tiametoxam (100 mg L ⁻¹) pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a condição MCT-1.....	156
Tabela 15. Biodegradação do pesticida tiametoxam (100 mg L ⁻¹) pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21, nas condições de 200 rpm 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a condição MCT-2.....	157
Tabela 16. Biodegradação do pesticida tiametoxam (100 mg L ⁻¹) pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21, nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para MCT-3.	159
Tabela 17. Biodegradação do pesticida imidacloprido (100 mg L ⁻¹) por <i>Bacillus</i> sp. CSA-21, nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a condição MCI-1.	174
Tabela 18. Biodegradação do pesticida imidacloprido (100 mg L ⁻¹) por <i>Bacillus</i> sp. CSA-21, nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a condição MCI-2.	175
Tabela 19. Biodegradação do pesticida imidacloprido (100 mg L ⁻¹) por <i>Bacillus</i> sp. CSA-21, nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a condição MCI-3.	177
Tabela 20. Comparação dos valores de biodegradação do imidacloprido (100 mg L ⁻¹) obtidos para as metodologias MCI-1, MCI-2 e MCI-3 após 3, 6 e 9 dias de reação pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.....	178
Tabela 21. Estirpes de bactérias isoladas do pomar de <i>Citrus sinensis</i> em meio de cultura sólido.	237
Tabela 22. Estirpes de fungos isolados do pomar de <i>Citrus sinensis</i> em meio de cultura sólido.	238
Tabela 23. Identificação de estirpes bacterianas isoladas do 1, 2, 3 e 4º cluster por biologia molecular, teste de Gram e morfologia	250
Tabela 24. Espectro de massas obtidos por LC-MS/MS para a obtenção dos possíveis metabólitos da biodegradação do tiametoxam por <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.....	265
Tabela 25. Espectro de massas obtidos por LC-MS/MS para a obtenção dos possíveis metabólitos de biodegradação do imidacloprido por <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.....	270

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Biodegradação do pesticida ($\pm$)-lambda-cialotrina por fungos de origem marinha.....	43
Esquema 2. Biodegradação do pesticida femprofatrina pela bactéria <i>Bacillus cereus</i> ZH-3 em solo.	52
Esquema 3. Biodegradação do pesticida deltametrina por linhagens de <i>Serratia marcescens</i> DeI-1 e DeI-2 em meio de cultura mineral.....	52
Esquema 4. Biodegradação do pesticida ciflutrina por <i>Brevibacterium aureum</i> DG-12.	53
Esquema 5. Biodegradação do pesticida fenpropatrina por <i>Sphingobium</i> sp. JZ-2.....	54
Esquema 6. Síntese do pesticida espiroclorfenol para obtenção de novos compostos.	56
Esquema 7. Síntese para a obtenção de compostos derivados do pesticida espiroclorfenol.	57
Esquema 8. Biodegradação e biotransformação do pesticida espiroclorfenol pelo ácaro <i>Tetranychus urticae</i>	57
Esquema 9. Biodegradação da acetamiprida por <i>Ensifer meliloti</i> e <i>Escherichia coli</i> Rosett.....	58
Esquema 10. Biodegradação de acetamiprida por <i>Ochrobacterium</i> sp. estirpe D-12.	59
Esquema 11. Biodegradação do clotiadina em sistemas anaeróbicos e aeróbicos.	59
Esquema 12. Biotransformação do pesticida clotiadina pela bactéria <i>Phanerochaete sordida</i>	60
Esquema 13. Biodegradação do pesticida imidacloprido por <i>Bacillus thuringiensis</i>	60
Esquema 14. Biodegradação do pesticida imidacloprido por <i>Pseudomonas</i> sp. RPT 52.	61
Esquema 15. Biodegradação do pesticida imidacloprido por <i>Klebsiella pneumoniae</i> estirpe de BCH1.....	62
Esquema 16. Biodegradação do pesticida imidacloprido por <i>Pseudoxanthomonas indica</i> CGMCC 6648.....	62
Esquema 17. Biodegradação dos pesticidas imidacloprido e tiametoxam por <i>Pseudomonas</i> sp. 1G.....	63

Esquema 18. Biodegradação do pesticida tiametoxam por meio de cultura de bactérias do solo em meio de cultura mineral.	64
Esquema 19. Biodegradação do pesticida imidaclopriz por <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> CGMCC 1.1788.	64
Esquema 20. Biodegradação dos pesticidas acetamiprida e tiacloprido por <i>Rhodotorula mucilaginosa</i> IM-2.	66
Esquema 21. Síntese de 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespíro[4.5] dec-3-en-2-ona H1	93
Esquema 22. Biodegradação do esfenvalerato pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CBMAI 1833.	106
Esquema 23. Hidrólise do esfenvalerato por carboxilesterases do consórcio bacteriano isolado do Cerrado reflorestado (Campus II).	110
Esquema 24. Biotransformação de 2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil) acetonitrila em ácido 3-fenoxibenzoico por consórcio bacteriano isolado do Cerrado reflorestado (Campus II).	111
Esquema 25. Biodegradação do pesticida esfenvalerato pela bactéria <i>Sphingomonas</i> sp.	112
Esquema 26. Reação de biodegradação da predimetilina pelo microrganismo <i>Bacillus subtilis</i> Y3.	130
Esquema 28. Biodegradação do espirodiclofeno pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. 6F e <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.	144
Esquema 28. Biodegradação do fitalato de etila por <i>Sphingobium yanoikuyae</i> SHJ. .	144
Esquema 29. Proposta de biotransformação do metabólito 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespíro[4.5]dec-3-en-2-ona H1 pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.	145
Esquema 30. Biotransformação do composto 3,4-di-idrobenzaldeído por metiltransferase.	146
Esquema 31. Proposta de biotransformação do metabólito 3-(4-cloro-2-(metilamina)fenil)-4-metoxi-1-oxiespíro[4,5]dec-3-em-2-ona) Esp.- M2 em 4-cloro-2-(metilamina)fenol Esp.- M3 pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.	147
Esquema 32. Proposta de biotransformação do intermediário (Z)-3-cloro-2-(metilamina)fenil-2-metoxiprop-2-en-1-ol Esp.- I4 no metabólito metil 2-(4-cloro-2-	

(metilamina)fenil)acetato ou (Z)-2-(4-cloro-2-(metilamina)fenil-1-metoxieten-1-ol Esp.- M4 pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.....	147
Esquema 33. Proposta de biotransformação do 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespиро[4.5]dec-3-en-2-ona (H1) no metabólito (Z)-hidroxi-3-fenilaldeído Esp.- M5 e 2-metoxi-1-fenilpropano-1,3-diol Esp.- M6 pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.....	149
Esquema 34. Biodegradação do metabólito 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespиро[4.5]dec-3-en-2-ona H1 em (E)-1-fenilprop-1-eno-1,2,3-triol H1-1 e este por sua vez em (E)-2,3-dimetoxi-3-fenilprop-2-eno-1-ol H1-2 pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.....	153
Esquema 35. Biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria <i>Ensifer adharens</i> TMX-23.....	161
Esquema 36. Proposta de biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21	168
Esquema 37. Proposta de biotransformação do metabólito (E)-1-((clorotiazol-4-il)metil)-2-nitroguanidina TM- T1 em N-((2-clorotiazol-4-il)metil)metanetrina TM- T2 e este em 1-((2-clorotiazol-4-il)metil)ureia TM- T3 pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.	168
Esquema 38. Biotransformação do metabólito 1-((2-clorotiazol-4-il)metil)ureia TM- T3 em metabólito (Z)-N-((2-clorotiazol-4-il)metileno)formamida TM- T4 e amino(((2-clorotiazol-4-il)metil)amino)metanol TM- T5 , e este em (((2-clorotiazol-4-il)metil)amina)metanodiol TM- T6 pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.....	169
Esquema 40. Proposta de biotransformação do pesticida tiametoxam no metabólito 5-((2-clorotiazol-4-il)metil)-4-hidrazinil-1,3-oxazinano) TM- T7 pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.....	170
Esquema 41. Biotransformação do intermediário TM- I3 (E)-N-(3-((2-clorotiazol-4-il)metil)-1,3,5-oxadiazinan-4-ilideno)nitramida em N-((E)-N-((Z)-(2-clorotiazol-4-il)metileno)-N'-nitrosocarbamimidoil)formamida TM- T8 pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.....	170
Esquema 42. Biodegradação do tiametoxam por consórcio bacteriano (ZHOU, et al., 2013).	172
Esquema 43. Biodegradação do pesticida imidacloprido por consórcio bacteriano em solo (ZHANG, et al., 2018).	184

Esquema 44. Proposta de biodegradação do pesticida imidacloprido por <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.....	186
Esquema 45. Proposta de biotransformação do metabólito 1-((6-cloropiridin-3-il)metil)-imidazolidin-2-imina IM- I1 em 5-((2-imino-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)metil)piridina-2-ol IM- I2 pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.....	187
Esquema 46. Proposta de biotransformação do metabólito 5-((2-imino-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)metil)piridina-2-ol IM- I2 em 5-((2-aminoimidazoldin-1-il)metil)piridina-2-ol IM- I3 pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.	187
Esquema 47. Proposta de biotransformação de imina por <i>Paenibacillus lactis</i> (LI, et al., 2015).	187
Esquema 48. Biotransformação do metabólito 5-((2-imino-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -imidazol-1-il)metil)piridina-2-ol IM- I2 em 1-((6-cloropiridin-3-il)metil)-imidazolidin-2-amina IM- I4 e este em 3-((6-cloropiridin-3-il)metil)-2,5-dihidro-1 <i>H</i> -imidazol-2-amina IM- I5 pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.....	188
Esquema 49. Proposta de biotransformação do metabólito 1-((6-cloropiridin-3-il)metil)-imidazolidin-2-amina IM- I4 em no metabólito IM- I6 pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.....	189
Esquema 50. Propodsta de biotransformação do metabólito 1-((6-cloropiridin-3-il)metil)-imidazolidin-2-imina IM- I1 em 3-(imidazolidin-1-metil)piridina IM- I7 pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.....	189

LISTA DE ABREVIATURAS

- E₁ – Carboxiesterase
- E₂ – Amidase
- E₃ – Metiltransferase
- E₄ – Haloalcano desalogenase
- E₅ – Superóxido Dismutase de Manganês
- E₆ – Nitro Redutase
- E₇ – Alcano Hidroxilase
- E₈ – Descarboxilase
- E₉ – Hidroxilase
- E₁₀ – Álcool Desidrogenase
- E₁₁ – Formaldeído Desidrogenase
- E₁₂ – Hidrogenase
- E₁₃ – *N*- dimetilação
- E₁₄ – Isoclorísmatase
- E₁₅ – Amino Oxidase
- E₁₆ – Transaminase
- E₁₇ – Imina redutase
- E₁₈ – Monoamina Oxidase
- E₁₉ – Enolase
- E₂₀ – Aldeído deidrogenase
- E₂₁ – Álcool deidrogenase

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	34
1.1. Enzimas que são produzidas por microrganismos e que atuam na biodegradação e na biotransformação de xenobióticos	40
1.2. Biodegradação ou biotransformação para os pesticidas piretroides	50
1.3. Biodegradação ou biotransformação para os pesticidas ácidos tetrônicos espirociclos (cetoenois)	55
1.4. Biodegradação ou biotransformação para os pesticidas neonicotinoides	58
1.5. Considerações finais sobre estudos de biodegradação.....	67
2. OBJETIVOS	70
2.1. Objetivo geral	70
2.2. Objetivos específicos	70
3. ETAPAS DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO	73
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	76
4.1. Reagentes e solventes	76
4.2. PRIMEIRA ETAPA: Biodegradação e biotransformação do pesticida esfenvalerato por linhagens isoladas do Cerrado reflorestado (Campus II).....	76
4.2.1. Crescimento das bactérias selecionadas para a realização da triagem de biodegradação e biotransformação do esfenvalerato (na presença e ausência) em meio de cultura sólido	76
4.2.2. Crescimento das bactérias selecionadas para a realização da triagem de biodegradação e biotransformação do esfenvalerato (na presença e ausência) em meio de cultura líquido	77
4.2.3. Procedimento de extração dos metabólitos obtidos pela biodegradação do pesticida esfenvalerato pelas linhagens <i>Serratia marcescens</i> 6A, <i>Bacillus</i> sp. 6D, <i>Bacillus</i> sp. 6E, <i>Bacillus</i> sp. 6F, <i>Bacillus</i> sp. 6H, <i>Bacillus</i> sp. 6I e <i>Bacillus</i> sp. 6L	80
4.3. SEGUNDA ETAPA: Biodegradação e biotransformação do pesticida esfenvalerato por consórcio bacteriano com as bactérias isoladas do Cerrado reflorestado (Campus II).....	81
4.3.1. Crescimento das bactérias selecionadas para o consórcio bacteriano em meio de cultura sólido, na presença e ausência de esfenvalerato	81

4.3.2.	Crescimento das bactérias <i>Bacillus</i> sp. 6D, <i>Bacillus</i> sp. 6F, <i>Bacillus</i> sp. 6H e <i>Bacillus</i> sp. 6I em meio de cultura líquido	81
4.3.3.	Biodegradação e biotransformação do esfenvalerato em meio de cultura líquido pelo consórcio bacteriano	82
4.3.4.	Processo de extração do esfenvalerato e seus metabólitos obtidos pelo consórcio bacteriano	83
4.3.5.	Quantificação por CLAE do esfenvalerato (padrão analítico) e seus metabólitos obtidos pela biodegradação e biotransformação (padrão analítico)	83
4.4.	D) Biodegradação dos pesticidas espiroclorfenol (<i>Bacillus</i> sp. 6F e <i>Bacillus</i> sp. CSA-21), tiametoxam e imidacloprido (<i>Bacillus</i> sp. CSA- 21).....	87
4.4.1.	Crescimento da bactéria <i>Bacillus</i> sp. 6F em meio de cultura sólido na presença e ausência do espiroclorfenol (comercial).....	87
4.4.2.	Crescimento do microrganismo <i>Bacillus</i> sp. 6F em meio líquido para a biodegradação do espiroclorfenol (comercial) aplicando <i>Planejamento fatorial</i> ...	87
4.4.3.	Crescimento da bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 isolada da cultura da laranja em meio de cultura sólido na presença e na ausência dos pesticidas espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido (comercial)	89
4.4.4.	Crescimento da bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 em meio de cultura líquido na presença e na ausência dos pesticidas, tiametoxam e imidacloprido (comercial).....	89
4.4.5.	Processo de extração dos pesticidas remanescentes e seus frente a biodegradação do espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 utilizando a melhor condição obtida pelo <i>Planejamento fatorial</i>	92
4.5.	Síntese do metabólito 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespíro[4.5]dec 3-en-2-ona H1	92
4.6.	Análise por Espectrometria na região do infravermelho (IV).....	93
4.7.	Cromatografia a Gás-Espectrometria de Massas (CG-EM).....	93
4.8.	Análise por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	94
4.9.	Quantificação dos pesticidas por CLAE- UV. A- espiroclorfenol, B- tiametoxam, C- imidacloprido e D- 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespíro [4.5] dec-3-en-2-ona H1.....	94

4.10.	Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Performance LC-MS/MS	98
4.11.	QUARTA ETAPA: Biodegradação dos pesticidas espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido em solo por <i>Bacillus</i> sp. CSA-21	99
4.11.1.	Crescimento da bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 em meio de cultura líquido para posteriores estudos de biodegradação em solo	99
4.11.2.	Processo de extração do espiroclorfenol, imidacloprido e imidacloprido e seus metabólitos obtidos pela biodegradação em solo esterilizado e não esterilizado.....	101
4.11.3.	Quantificação dos pesticidas por CLAE- UV. A- espiroclorfenol, B- tiametoxam e C- imidacloprido	102
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	104
5.1.	PRIMEIRA ETAPA: Biodegradação e biotransformação do pesticida esfenvalerato por bactérias isoladas do Cerrado reflorestado (Campus II)	104
5.1.1.	Resultados obtidos por meio dos experimentos realizados com as células cultivadas em meio de cultura líquido em Caldo Nutriente	104
5.1.2.	Resultados obtidos por meio dos experimentos realizados com a união das células bacterianas, cultivadas em meio de cultura líquido em solução salina (0,86%).....	107
5.2.	SEGUNDA ETAPA: Biodegradação e biotransformação do pesticida esfenvalerato por consórcio utilizando bactérias isoladas do Cerrado reflorestado (Campus II)	108
5.3.	TERCEIRA ETAPA:	114
A)	Aplicação do <i>Planejamento fatorial</i> método Taguchi para a obtenção da melhor condição de biodegradação, através da linhagem <i>Bacillus</i> sp. 6F para o pesticida espiroclorfenol.....	114
B)	Controle do tempo reacional pelas bactérias <i>Bacillus</i> sp. 6F e <i>Bacillus</i> sp. CSA-21.....	114
C)	Identificação do metabólito 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespíro[4,5] dec-3-em-2-ona H1.	114
D)	Aplicação da melhor condição obtida para a biodegradação dos pesticidas tiametoxam pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 isolada da citricultura da laranja. ...	114

E)	Aplicação da melhor condição obtida para a biodegradação dos pesticidas imidacloprido pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 isolada da citricultura da laranja.	114
F)	Isolamento dos microrganismos da citricultura da laranja.	114
5.3.1.	A) Aplicação do <i>Planejamento fatorial</i> método Taguchi para a obtenção da melhor condição de biodegradação através da linhagem <i>Bacillus</i> sp. 6F	114
5.3.1.	B) Biodegradação do espiroclorofeno <i>versus</i> tempo de reação (min) pelas bactérias <i>Bacillus</i> sp. 6F e <i>Bacillus</i> sp. CSA-21	126
5.3.2.	C) Identificação do metabólito 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespíro [4.5] dec-3-en-2-ona H1 obtido pela biodegradação do espiroclorofeno por meio das bactérias <i>Bacillus</i> sp. 6F e <i>Bacillus</i> sp. CSA-21	135
5.3.1.	D) Aplicação da melhor condição obtida para a biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 isolada da citricultura da laranja.	155
5.3.2.	E) Aplicação da melhor condição obtida para a biodegradação do pesticida imidacloprido pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21 isolada da citricultura da laranja	173
5.4.	QUARTA ETAPA: Biodegradação dos pesticidas espiroclorofeno, tiametoxam e imidacloprido em solo pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21	191
5.4.1.	Biodegradação do pesticida espiroclorofeno em solo pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21	192
5.4.2.	Biodegradação do pesticida tiametoxam em solo pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21	194
5.4.3.	Biodegradação do pesticida imidacloprido em solo pela bactéria <i>Bacillus</i> sp. CSA-21	196
6.	CONCLUSÃO	199
7.	REFERÊNCIAS	203
8.	APÊNDICE	226
8.1.	Apêndice- A	226
8.2.	TERCEIRA ETAPA: F) Isolamento dos microrganismos da citricultura da laranja	226
8.2.1.	MATERIAIS E MÉTODOS	226
8.2.2.	Teste de coloração de Gram para as bactérias isoladas da citricultura	229
8.2.3.	Reação de cadeia polimerase (<i>polymerase chain reaction</i> - PCR)	232

8.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	235
8.3.1. Isolamento dos microrganismos isolados da citricultura da laranja.....	235
8.3.2. Identificação dos microrganismos isolados da citricultura da laranja.....	240
8.4. Apêndice- B.....	262

GLOSSÁRIO

➤ Agroquímicos

“Produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, destinados ao uso nos setores de produção, em armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, nas pastagens, na proteção de florestas nativas, plantadas, e de outros ecossistemas, de ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos, bem como as substâncias e produtos empregados para o desfolhantes, dessecantes, estimuladores e inibidores de crescimento” ([PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA CASA CIVIL, 2018](#)).

➤ Agroquímicos, pesticidas e herbicidas

“Agroquímico é um termo legal e está definido na Lei 7802/89, também chamada Lei de Agroquímicos. Nos quais os termos pesticida, praguicida e defensivos agrícolas também são utilizados. A palavra está associada aos setores que a utilizam: como exemplo, as empresas de agroquímicos preferem utilizar “defensivos agrícolas” já que na visão deles os produtos são utilizados com o objetivo de proteger a produção agrícola. A Anvisa usa a palavra “agroquímicos”, que traduz bem os riscos potenciais do produto e alerta os trabalhadores e a população. “Praguicida” é derivado de *plaguicidas*, denominação utilizada pelos países de língua espanhola e “pesticida” tem como equivalente o termo *pesticide*, utilizado na língua inglesa. Os agroquímicos possuem várias Classes Agronômicas: inseticidas (controlar insetos), acaricidas (ácaros), nematicidas (nematóides), fungicidas (fungos), herbicidas (plantas daninhas), reguladores de crescimento, entre outras” ([ANVISA, 2018](#)).

➤ Biodegradação

“A destruição de materiais orgânicos por bactéria ou processo natural de transformação microbiana em produtos químicos” ([SPEIGHT, J. G.; EI-GENDY, N. S. 2018](#)).

“Quebra de uma substância tóxicas, catalisada por enzimas *in vitro* ou *in vivo*. Isto pode ser caracterizado através da alteração primária na estrutura química de uma substância,

resultando na perda da propriedade específica dessa substância. Ambientalmente aceitável. Biodegradação de tal forma que remova as propriedades indesejáveis do composto. Isso geralmente corresponde à biodegradação primária, mas depende das circunstâncias em que os produtos são lançados no meio ambiente e a quebra completa de um composto para moléculas simples totalmente oxidadas ou reduzidas (como dióxido de carbono/metano, nitrato/amônio e água” (IUPAC GOLD BOOK, 2018).

➤ **Biotecnologia**

“A biotecnologia é a tecnologia baseada na biologia que utiliza processos celulares e biomoleculares para desenvolver tecnologias e produtos que ajudam a melhorar nossas vidas e a saúde de nosso planeta. Como exemplo de processos biológicos que é denominado como uma biotecnologia é a utilização de microrganismos. A biotecnologia não é um processo novo, pois, por mais de 6.000 anos a utilizamos para produzir produtos alimentícios úteis, como pão e queijo, e para preservar produtos lácteos” (BIOTECHNOLOGY INNOVATION ORGANIZATION, 2018).

➤ **Biotransformação**

“A conversão de um composto orgânico (ou composto inorgânico) em outro composto através da ação de microrganismos” (SPEIGHT, J. G.; EI-GENDY, N. S. 2018).

➤ **Biorremediação**

“O uso de microrganismos para destoxificar ou degradar poluentes” (TORTA, 2012).

“Uma estratégia de intervenção para melhorar a biodegradação de óleo despejado (ou outros contaminantes), variando ações corretivas diferentes (atenuação natural) para adição de nutrientes (bioestimulação) e para a inoculação com comunidades microbianas competentes (bioaugmentação). A biorremediação é uma “limpeza” para os derramamentos de petróleo e/ ou derivados de petróleo, redução de pesticida em meio ambientes entre outros contaminantes, fazendo uso de agentes microbianos” (SPEIGHT, J. G.; EI-GENDY, N. S. 2018).

➤ **Microorganismos ou micróbios**

“São formas de vida diminuta individualmente muito pequenas para serem vistas a olho nú. O grupo inclui bactérias, fungos (leveduras e fungos filamentosos), protozoários e algas microscópicas. Neste grupo também estão os vírus, entidades acelulares algumas vezes consideradas a fronteira entre seres vivos e não vivos” (TORTA, 2012).

“São organismos microscópicos unicelulares ou aglomerados celulares. Incluindo eucariontes, como fungos, protistas e procariontes, como bactérias e certas algas. Além dos vírus que também estão incluídos” (TORRÓ, L. M. P.; MORALES, J-L. 2018).

Introdução

1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Lei nº 7802 de 11 de julho de 1989 “*Agroquímicos são produtos e agentes de processos físicos, químicos ou biológicos, utilizados nos setores de produção, armazenamento e beneficiamento de produtos agrícolas, pastagens, proteção de florestas, ambientes urbanos, hídricos e industriais, cuja finalidade seja alterar a composição da flora ou da fauna, a fim de preservá-las da ação danosa de seres vivos considerados nocivos*” (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA e ABASTECIMENTO, 2016).

A Revolução Verde teve início em 1950 com o objetivo de desenvolver procedimentos inovadores para o sistema de agricultura. Neste processo buscou-se introduzir tecnologias com o propósito de aumentar a produção das safras em diferentes culturas. Para a realização destas práticas foi necessário desenvolver ao máximo a eficiência nas lavouras visando as condições ideais de cultivo, bem como, o controle de pragas pelo uso de agroquímicos - pesticidas. Quanto mais diversificadas as culturas em um mesmo campo de plantação, menores eram as necessidades de utilização dos agroquímicos, pois estas modificações proporcionavam um período de restabelecimento do solo, e juntamente com o remanejamento de cultura houve um aumento no controle da utilização dos agroquímicos, assim iniciou-se a chamada Revolução Verde (MATOS, 2010).

Contudo, a utilização de agroquímicos tornou-se cada vez maior, tendo como consequências inúmeros problemas ambientais em termos de perdas de biodiversidade, aumento da poluição das águas e do ar, além da contaminação do solo e do próprio ser humano (BAYRAMOGLU; CHAKIR, 2016). A disponibilidade dessas substâncias no meio ambiente é afetada por diversos processos, tais como, a fotodegradação, o transporte pelos ventos, a precipitação pelas chuvas, a volatilização, o escoamento superficial, a degradação química, a adsorção e desorção em diferentes agentes (solos, raízes e plantas, a degradação biológica e a lixiviação (Figura 1) (REBELO; CALDAS, 2014).

Figura 1. Alguns processos que afetam o transporte e degradação de agroquímicos no meio ambiente - Adaptado de Rebelo e Caldas (2014).

Os agroquímicos são amplamente empregados em diferentes culturas, por exemplo de trigo, cevada, aveia, milho, arroz, soja, algodão, feijão, feijão verde, lentilha, ervilha, grão de bico, amendoim, tomate, pimentão, berinjela, alface, espinafre, melancia, maçã, pêra, kiwi, citros e frutos em geral (KOPRINA et al., 2016).

Segundo Jeanmart, Edmunds e Pouliot (2016) dentre os agroquímicos mais utilizados nestas culturas têm-se os fungicidas (fluxapiraxade e benzovindiflupir) herbicidas (tolpiralato, fenquiotriona, ciclopiromato e iofensulfuron) inseticidas e nematicidas (triflumezopirim, dicloromezotiaz e flupiradifurona) (Figura 2).

Figura 2. Alguns agroquímicos utilizados em diversas culturas e suas classes.

A citricultura é um dos setores agrícolas altamente organizados e competitivos no Brasil, o qual é responsável por 60% da produção mundial de suco de laranja, tornando-se líder de exportação do produto. A cultura da laranja se dividiu em dois momentos distintos. O primeiro, de 1990 a 1999, que foi caracterizado pelo aumento da produção e conquista da posição de líder no setor e a partir de 1999, foi o momento de concretização da capacidade de produção e exportação.

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE no mês de março de 2018 foram colhidas no país, 685.896 milhões de toneladas de laranja, ou cerca de 30% da safra mundial. Dados mostram que 50% da produção mundial de laranja e 855.8 mil toneladas da produção brasileira resultam em sucos industrializados. A União Europeia é a principal compradora dos sucos produzidos no Brasil, contribuindo para um aumento significativo no percentual de importação (IBGE, 2018).

Segundo o [IBGE \(2018\)](#) no mês de março de 2018, o estado de São Paulo foi o maior produtor de laranja do país com 14.300.000 de toneladas, sendo responsável por mais de 83% do total produzido, seguido pelos EUA, com 15%, principalmente o estado da Flórida.

Segundo a Secretaria de Comércio Exterior (Secex) em 2018 as exportações de laranja em todo o Brasil somaram US\$ 1.556 bilhões, sendo que 98% desse montante consistiu em suco de laranja. O estado de São Paulo conta com usinas de processamento de suco de laranja em aproximadamente 20 municípios, localizadas principalmente ao longo da Rodovia Washington Luiz e parte da Rodovia Anhanguera ([FUNDECITRUS, 2018](#)).

De acordo com a Organização de Eventos Técnico- Científicos (Infobibos) a produção de laranja no estado de São Paulo encontra-se distribuída em duas regiões: A tradicional, constituída pelos Escritórios Regionais de Desenvolvimento Rural - EDRs composta pelas cidades de Araraquara, Barretos, Catanduva, Fernandópolis, General Salgado, Jaboticabal, Limeira, Mogi Mirim, Ribeirão Preto, São João da Boa Vista, São José do Rio Preto e Votuporanga; e a região nova, constituída pelas cidades de Avaré, Bauru, Botucatu, Itapetininga, Itapeva, Jales, Jaú, Lins, Piracicaba e Sorocaba ([IBGE, 2012](#)).

A produção de citros envolve a aplicação de altas cargas de agroquímicos em níveis pré e pós-colheitas. A alta frequência de eventos de pulverização realizada em pomares de citros para evitar as infestações por pragas que causam doenças, aumentam o risco de contaminação do local de origem devido aos derrames acidentais durante a manipulação e preparação e aplicação ([HILLOCKS, 2012](#)).

Existe uma diversidade de pesticidas que são utilizados na produção integrada na citricultura, que incluem inseticidas, fungicidas e acaricidas. Devido a excessiva utilização desses produtos, [Golge e Kabak \(2015\)](#) avaliaram a presença de resíduos de 115 pesticidas empregados na citricultura, pertencentes a classe dos neocotinóides, piretroides, lactonas macrocíclicas, carbamatos, organofosforados e cetenois. Dentre estes, foram encontrados resíduos de neocotinóides, organofosforados, estrobilurina e cetenois (ácidos tetrônicos espirociclos) (Figura 3).

Figura 3. Pesticidas encontrados como resíduos em frutos de laranjas pós colheitas.

Com o crescente aumento da contaminação do meio ambiente por diversos agentes xenobióticos iniciou-se uma busca para minimizar os danos causados pelos mesmos. [Tauz e Donath \(1998\)](#) propuseram o uso de microrganismos como uma forma de remediar o solo contaminado com derivados de petróleo e assim deu-se início ao processo de biorremediação ([DIZIONEK, A.; WOJCIESYŃSKA, D.; GUZIK, U. 2016](#)).

Atualmente a biorremediação tornou-se um dos métodos mais utilizados e eficazes para reparar os ambientes contaminados, sendo considerado o processo biotecnológico mais recomendado pela comunidade científica ([DIZIONEK, A.; WOJCIESYŃSKA, D.; GUZIK, U. 2016](#)). A biorremediação é considerada ambientalmente eficaz, não invasiva comparado com outros processos, além de ser processo natural contínuo promovendo a degradação ou a biotransformação de xenobióticos em metabólitos menos tóxicos ([DIZIONEK, A.; WOJCIESYŃSKA, D.; GUZIK, U. 2016](#)); ([PERELO, L. W. 2010](#)); ([KULIK, N.; GOI, A.; TRAPIDO, M.; TUHKANEN T, 2006](#)); ([GARBUSU, C.; ALKORTA, I. 2003](#)); ([XU, Y.; LU, M. 2010](#)). Esse tipo de processo pode ser aplicado para recuperar águas superficiais e subterrâneas, solos, descontaminação de ambientes específicos por resíduos e efluentes industriais, aterros sanitários, áreas de contenção dentre outros ambientes ([GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. 2005](#)).

O processo de biorremediação pode ocorrer nas formas *in situ* ou *ex situ*, o mais utilizado é o *in situ*, empregando microrganismos, os quais podem ocorrer de três formas,

sendo estas, a *atenuação natural*, a *bioaumentação* e a *bioestimulação*. O processo de *atenuação natural* ocorre quando os microrganismos do próprio ambiente realizam a degradação dos contaminantes restabelecendo o ecossistema de origem. Este tipo de processo acontece em um longo período de tempo, visto que apenas 10% dos microrganismos presentes no solo são degradantes. A *bioaumentação* ocorre quando os microrganismos degradantes são inseridos no solo para auxiliar os já existentes, para que a degradação ocorra de forma eficaz é importante que os microrganismos sejam capazes de sobreviverem em ambientes distintos. A *bioestimulação* ocorre em parceria com a *bioacumulação*, podendo estimular o crescimento dos microrganismos variando as condições físicas e químicas (DIZIONEK, A.; WOJCIESYŃSKA, D.; GUZIK, U. 2016); (PERELO, L. W. 2010).

Os procedimentos *ex situ* promovem a remoção dos contaminantes, devido ser possível controlar os parâmetros físicos-químicos e assim diminuir o tempo de recuperação do ambiente, porém possui desvantagens como alto custo, riscos com a possibilidade de dispersão do agente contaminante durante o manuseio e o transporte, dentre outros (DIZIONEK, A.; WOJCIESYŃSKA, D.; GUZIK, U. 2016); (GEORGIEVA et al., 2010); (TOMEI, M. C.; DAUGULIS, A. J. 2013); (XU, Y.; LU, M.; 2010).

Dentre os alicerces da *biorremediação* têm-se a *biodegradação* e a *biotransformação*. A *biodegradação* é um processo no qual os microrganismos ou outros agentes biológicos atuam para realizar a reciclagem de compostos tóxicos ou xenobióticos variando-se a preservação, a recuperação e proteção do ambiente natural (TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, L. C. 2012). A *biotransformação* é o processo semelhante à biodegradação, porém nesse caso ocorre a modificação na estrutura do agente poluente, deste modo produzindo um composto preferencialmente menos tóxico ao meio ambiente. Assim, o processo de desintoxicação do ambiente contaminado utilizando agentes biológicos possibilita a *biodegradação* e/ ou *biotransformação*, maximizando a *biorremediação*, que ao longo do tempo promove a total eliminação do composto (PINHATI et al., 2014).

1.1. Enzimas que são produzidas por microrganismos e que atuam na biodegradação e na biotransformação de xenobióticos

Durante o processo de biodegradação ou biotransformação de um xenobiótico diferentes enzimas podem ser utilizadas. Segundo [Brenda- The Comprehensive Enzyme Information System](#), atualmente são conhecidas 7.341 enzimas. As bases de dados *Scifinder*, *ScienceDirect* e *Web of Science* trazem estudos realizados utilizando algumas destas enzimas para a biorremediação como é o caso de [Alvarino et al. \(2018\)](#) que realizou a biotransformação de micro poluentes orgânicos por monoxigenase via consórcio bacteriano. Assim, neste tópico serão abordadas algumas enzimas, que já são conhecidas na literatura e que podem estar relacionadas a biodegradação dos compostos estudados nesta tese.

Os microrganismos são fontes ricas de diversas enzimas capazes de realizar diferentes funções, cada linhagem pode produzir uma enzima específica, como também, pode produzir outras que não são específicas à sua linhagem. Quando um microrganismo está em seu habitat este contém enzimas que são necessárias para se manter em atividade de acordo com aquele ambiente, assim modificando o meio em que as linhagens estão outras enzimas podem ser produzidas, ou mesmo aumentar a sua produção. É nessa diversidade de enzimas que os microrganismos em geral, possuem uma variedade de enzimas, o que fazem deles agentes biotecnológicos de relevância científica.

Algumas enzimas já são conhecidas no processo de biodegradação ou biotransformação como a metiltransferase e há diversas variedades desta segundo o Comitê Internacional, a Comissão de Enzimas, que já atribuiu mais de 250 tipos de metiltransferases. Estas, podem ser utilizadas na regulamentação de proteínas, em DNA/RNA metiltransferase, em produtos naturais, entre outros ([LENNARD, L.; WANG, L. 2018](#)).

A maior parte das metiltransferases (95%) realizam a doação de um grupo metila por meio da *S*-adenosil-L-metionina (SAM). Como exemplo de reações por metiltransferases a Figura 4 mostra, a metilação do 4-nitrofenol. As reações ocorrem quando os pares de elétrons presente no resíduo do aminoácido histidina-257 captura o hidrogênio da hidroxila, deixando o oxigênio do mesmo mais eletronegativo e fazendo com que este realize um ataque nucleofílico ao grupo metila da SAM. Assim há a

formação do composto metilado, o 1-metoxi-4-nitrobenzeno e a *S*-adenosil-L-homocisteína. Por seguinte, uma molécula de água reestabelece o aminoácido (Figura 4). Essas reações são muito importantes no metabolismo de fármacos e xenobióticos (LENNARD, L.; WANG, L. 2018).

Figura 4. Mecanismo catalítico para a metilação do 4-nitrofenol por metiltransferase via SAM para produzir o 1-metoxi-4-nitrobenzeno.

As carboxilesterases são hidrolases classificadas pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular como E.C. 3.1.1.1, sendo um subconjunto de esterases que hidrolisam ligações ésteres, solúveis ou parcialmente solúveis em água, resultando

na formação de um álcool e um ácido carboxílico (Figura 5) (QUAX; BROEKHUIZEN, 1994); (STEENKAMP; BRADY, 2008).

Figura 5. Esquema da hidrólise de ligações ésteres por carboxilesterase (acil-enzima SeCbE). Onde R e R' são grupamentos alquílicos ou arílicos.

De acordo com Ollis et al. (1992) as carboxilesterases apresentam sítios catalíticos e não catalíticos. Os elementos catalíticos atuam na clivagem de substratos. Estes contêm a sequência de aminoácidos com regiões preservadas (sítio catalítico), principalmente nas dobras entre as estruturas secundárias (dobra α/β hidrolase).

A hidrólise enzimática de ésteres por carboxilesterases ocorre em um resíduo de serina no sítio ativo. O processo de acilação acarreta na liberação de um álcool do éster carboxílico e da enzima acilada. O intermediário acil-enzima é posteriormente hidrolisado pelo ataque nucleofílico da água, que libera o ácido carboxílico e a enzima é então regenerada (Figura 6) (SOGORB; VILANOVA, 2002; BIROLI, 2013).

Figura 6. Mecanismo catalítico de hidrólise do espiroclorofeno por carboxilesterase para produzir um ácido carboxílico.

Dados na literatura relatam a biodegradação do pesticida ($\pm$)-lambda-cialotrina por fungos de origem marinha, como, *Aspergillus* sp. CBMAI 1829, *Acremonium* sp. CBMAI 1676, *Microsphaeropsis* sp. CBMAI 1675 e *Westerdykella* sp. CBMAI 1679. Foram utilizados 100 mg L⁻¹ do pesticida e após a reação de biodegradação obteve-se 20,8-44,8% de cialotrina remanescente, obtiveram como principal metabólito o ácido 3-fenoxibenzoico (Esquema 1). A formação do metabólito foi observada por CG-EM. Essa reação foi promovida por carboxilesterase de fungos de ambiente marinho (BIROLI, W. G. et al., 2018).

Esquema 1. Biodegradação do pesticida ($\pm$)-lambda-cialotrina por fungos de origem marinha.

As hidroxilases são enzimas que realizam a adição de grupos hidroxílicos em substratos durante uma reação de oxidação, com a utilização de NAD⁺ e NADH, e são classificadas em E.C. 1.1. As hidroxilases possuem diferentes separações podendo ser enzimas de triptofano-hidroxilase, esteroide 11- β hidroxilase, entre outras (XIONGYI, H.; GROVES, J. T. 2017). A classe está contida no grupo das oxido-redutases que podem reduzir ou oxidar moléculas, essas enzimas são extremamente significativas, pois transformam compostos lipofílicos em hidrofílicos (XIONGYI, H.; GROVES, J. T. 2017).

Outras enzimas pertencentes à classe das oxido-redutases são as álcoois desidrogenases, as quais realizam reações em álcool primário ou secundário com a presença do cofator NAD⁺ oxidando cetonas. Os sítios catalíticos destas enzimas possuem o átomo de Zn(II), o qual é estabilizado por átomo de azoto do aminoácido histidina e por grupos de sulfetos do aminoácido cisteína (Figura 7) (JÖRNVALL, H. 2017).

O centro de Zn(II) atua como ácido de Lewis, favorecendo que o substrato (álcool primário, para este caso) se ligue ao centro de Zn(II), seguidamente uma das ligações de hidrogênio do substrato que é transferido na forma de íon hidreto para o cofator oxidado NAD^+ ; produzindo assim o aldeído e reestabelecendo o centro de Zn(II) ligado ao aminoácido histidina e o cofator na forma NADH reduzida.

Figura 7. Mecanismo catalítico de oxidação de um álcool primário a aldeído por álcoois desidrogenases.

B: Base geralmente um resíduo de aminoácido.

De acordo com Kadri et al. (2018) as enzimas hidroxilases foram utilizadas para promover a biodegradação de hidrocarbonetos (petróleo), através da linhagem de *Alcanivorax borkumensis*. A reação ocorreu a 30°C, 100 rpm em 7 dias. Foram utilizados hidrocarbonetos nas concentrações de 1000, 5000 e 6000 mg L⁻¹ e obteve-se cerca de 83%, 74% e 88%, respectivamente dos hidrocarbonetos remanescentes. Os produtos obtidos foram naftaleno (44%), benzeno (30%), tolueno (44%) e etil-tolueno (84%).

As monamina oxidases são enzimas capazes de catalisar a oxidação de aminas para iminas tanto em neurotransmissores como também em xenobióticos. Os produtos obtidos são posteriormente hidrolizados em processos não enzimáticos a aldeídos ou cetonas. As monoamina oxidases podem existir de duas maneiras distintas as monamina

oxidases A e as monaminas oxidases B, ambas possuem um percentual de 70% de aminoácidos e apresentam um cofator FAD ligado covalentemente ao aminoácido cisteína (ATALAY, A. E.; ERDEM, S. S., 2013); (KIM. J.; LEE, I. N., 2017); (MU, D. et al., 1994).

Atualmente os mecanismos que são aceitos foram propostos por Orru et al. (2013), no qual propuseram mecanismos nucleofílicos polares para as monamina oxidases A por transferência de íon hidreto para a monamina oxidases B. Apenas o mecanismo para monoamina oxidases A será apresentado na Figura 8 (ATALAY, A. E.; ERDEM, S. S., 2013); (KIM. J.; LEE, I. N., 2017).

60% e para a *Sporobolomyces* sp. LF1 46%. O metabólito obtido não foi identificado nestes estudos (YANG, L. Q. et al. 2015).

Outras classes de enzimas presentes em muitos microrganismos e que promoveram a biorremediação são as transaminases ou aminotransferases. Estas são consideradas enzimas com alto potencial para a produção de compostos químicos e farmacêuticos. Geralmente os produtos dessas reações com transaminases possuem grande valor e ampla gama de aplicações como em reações de biocatálises em cascata (CLAPÉS, P. et al., 2010); (TUFVESSON, P. et al., 2011); (GOMM, A.; O'REILLY, E. 2018).

Em reações de transaminação, o grupo NH_2 de um composto orgânico é substituído por o grupo ceto ($=\text{O}$) de outra molécula orgânica. As transaminases estão sendo muito utilizadas por desempenharem funções importantes em processos biocatalíticos assimétricos, tendo sido sintetizados novos compostos (GAO, S. et al., 2017); (KOHLS, H. et al., 2014); (MARCHLER-BAUER, A. et al., 2015).

Outro exemplo de transaminases foi a biotransformação do nitropireno em aminopireno e hidroxipireno pela bactéria *Pseudomonas* sp. A obtenção do metabólito hidroxipireno partindo do substrato nitropireno como produto de biodegradação foi relatado pela primeira vez nestes estudos. Esta biotransformação ocorreu via transferência do grupo amino por uma catálise de transaminases (FABER, 2011) ou por uma redução do grupo carbonílico de uma cetona. Para o metabólito aminopireno já existe dados na literatura com a biodegradação do pireno por *Mycobacterium* sp. (HEITKAMP et al., 1991) e pode ser produzido pela ação de uma nitroreductase (DURCHSCHEIN, et al., 2013); (HEITKAMP, M. A. et al. 1991).

Cassimjee et al. (2015) relataram via mecanismo enzimático a transaminação de (S)-1-feniletilamina. Nesse estudo o substrato foi convertido em acetofenona e a enzima utilizada coenzima piridoxal-5'-fosfato foi convertida a piridoxamina-5'-fosfato (Figura 9).

Figura 9. Mecanismo catalítico da reação de transaminação do composto (*S*)-1-feniletilamina para a formação da acetofenona.

As haloalcano desalogenases (Figura 10) são enzimas que catalisam a desalogenação hidrolítica de haloalcanos através da clivagem da ligação carbono-halogênio tanto para compostos alifáticos como aromáticos (CHOVANCOVA, E. et al., 2007). A tríade catalítica dessas enzimas é formada pela presença dos aminoácidos aspartato, histidina e asparagina (SCHANSTRA, J.; KINGMA, J.; JANSSEN, D. B. 1996); (VERSCHUEREN, K. H. et al., 1993); (LAU, E. Y. et al., 2000).

O mecanismo de reação para as enzimas haloalcano-desalogenases é semelhante a uma reação S_N2 , visto que seu sítio ativo é hidrofóbico, ao se ligar ao substrato este sofre a retirada do halogênio pelo ataque nucleofílico do resíduo de aspartato. Essas enzimas possuem grande interesse para os pesquisadores, devido serem capazes de reagir com compostos halogenados, como exemplo, os pesticidas, além de poderem reagirem em condições brandas ou não (Figura 10) (SCHANSTRA, J.; KINGMA, J.; JANSSEN, D. B. 1996); (VERSCHUEREN, K. H. et al., 1993); (LAU, E. Y. et al., 2000); (STUCKI, G.; THÜER, M. 1997).

Figura 10. Mecanismo catalítico da reação de haloalcano desalogenases do 2,4-diclorofenol para produzir o 4-clorobenzeno-1,2-diol.

A biodegradação do hexaclorociclo-hexano por *Sphingobium japonicum* converteu este ao respectivo 4-clorobenzeno-1,2-diol, via enzima haloalcano desalogenase. A quantificação do reagente residual foi através de CLAE, podendo assim observar que ocorreu 97% da biodegradação do hexaclorociclo-hexano (JANSSEN, D. B. 2004); (PAGE, M. J.; CERA, E. D. 2008); (BARRET, A. J.; TOLLE, D. P.; RAWLINGS, N. D. 2003).

1.2. Biodegradação ou biotransformação para os pesticidas piretroides

As bactérias pertencem ao grupo de microrganismos microscópicos, encontrando-se aos milhares e em diferentes tipos de habitat, têm crescimento rápido na presença de condições favoráveis de temperatura, pH, oxigenação e nutrientes (HUSSAIN, et al., 2016). Nestas condições, são capazes de produzir e transportar enzimas que auxiliam o processo de biodegradação e biotransformação de agroquímicos (SHAHGHOLI e AHANGAR, 2014).

A biodegradação bacteriana pode ser dividida em dois grupos: por culturas puras e por consórcios de microrganismos. Além de que, a biodegradação pode ser catabólica, quando o pesticida é utilizado como uma fonte de carbono ou nitrogênio ou co-metabólica, em que existe a necessidade de suplementação com fontes adicionais de carbono e/ou nitrogênio (HUSSAIN, et al., 2016).

Os metabólitos obtidos variam de acordo com a estrutura química do agroquímico e da atividade catabólica do microrganismo biodegradante, sob as condições utilizadas. Muitos metabólitos de neocotinóides podem ser mais tóxicos e persistentes do que o agroquímico de origem, por isso é importante averiguar a toxicidade dos mesmos. Assim, alguns exemplos de biodegradação e biotransformação de agroquímicos por bactérias foram descritos na literatura, serão discutidos a seguir (HUSSAIN, et al., 2016; MEIRA, et al., 2016).

Piretroides são inseticidas sintéticos derivados de piretrinas, pesticidas naturais encontrados na planta *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Eles foram comercializados desde a década de 1970 e hoje são caracterizados por várias estruturas diferentes. No entanto, os piretroides mais comumente usados são geralmente ésteres de dimetilciclopropano com anéis aromáticos e seus derivados (ENSLEY, 2018).

Diversas modificações foram realizadas em piretrinas naturais com o objetivo de aumentar sua atividade inseticida. Entre essas mudanças, a adição de um grupo ciano promoveram o aumento da atividade inseticida de piretroides. Os piretroides que contêm um grupo ciano são conhecidos como Tipo II, e os compostos sem este grupo são conhecidos como piretroides Tipo I. Outras modificações, como a inserção de halogênios e grupos hidrofóbicos, também foram usadas para aumentar o desempenho desses inseticidas. Várias estruturas químicas modificadas foram desenvolvidas, incluindo

compostos sem o anel ciclopropano, por exemplo, fenvalerato (DUTTA, R. N. 2011); (MA, Y. et al., 2009); (MÜLLER, P. et al., 2008).

Os piretroides têm baixa toxicidade em mamíferos, baixo impacto ambiental, alta eficiência contra um amplo espectro de insetos, e requerem o uso de doses baixas para alcançarem resultados satisfatórios (VARRÓ, P.; KOVÁSCB, M.; VILÁGIA, I. 2017). Portanto, esta classe química de inseticidas é atualmente uma das mais utilizadas e é empregada em todas as regiões do mundo, em diferentes tipos de culturas, e contra várias classes de insetos. Entretanto, testes laboratoriais mostraram que os piretroides são muito tóxicos para peixes, abelhas e artrópodes aquáticos, como lagostas e camarões. Portanto, os piretroides podem ter efeitos sobre espécies acidentalmente expostas durante, a aplicação ou ingestão de alimentos contaminados (ALLINSON, G. et al.; 2015).

Entre os piretroides comercialmente disponíveis utilizados como inseticidas, o esfenvalerato é um isômero biologicamente ativo do piretroide fenvalerato. É eficaz contra espécies-alvo (*Anticarsia gemmatilis* *Scaptocoris castanea* e *Atarsocoris brachiariae*) e é tóxico para espécies aquáticas que não são alvos de interesse (RASMUSSEN, et al., 2015); (SAILLENFATR, A. M.; NDIAYE, D.; SABATÉ, J. P. 2015).

Alguns exemplos de biodegradação de piretroides por bactérias foram descritos na literatura. O extrato livre de células de *Bacillus cereus* ZH-3 isolado de lodo ativado, o qual, se refere a degradação acelerada de matéria orgânica presente em esgoto sanitário e industrial realizadas por um consórcio bacteriano em sistemas aeróbios, foi aplicado com sucesso na biodegradação de fempropatrina, com redução de 50 mg L⁻¹ para 4,9 e 3,2 mg L⁻¹ em solo esterilizados e não esterilizados, respectivamente. A quantificação do pesticida residual foi realizada por CLAE- UV. As reações ocorreram em modo estático e em incubadora à temperatura de 30°C durante 30 dias. Os produtos identificados de biodegradação foram 3-fenoxibenzaldeído, α -hidroxi-3-fenoxi-benzeno acetonitrila e o fenol os quais não foram quantificados (Esquema 2) (LIU, et al., 2015).

Esquema 2. Biodegradação do pesticida femprofatrina pela bactéria *Bacillus cereus* ZH-3 em solo.

Conc. inicial de femprofatrina: 50 mg L⁻¹
 Conc. residual- solo esterilizado: 4,9 mg L⁻¹
 Conc. residual- solo não esterilizado: 3,2 mg L⁻¹

Em outro estudo, Cycoń, M.; Zmijowska, A.; Piotrowska-Seget, Z. (2014) descreveram a biodegradação da deltametrina por duas estirpes de *Serratia marcescens* DeI-1 e DeI-2. As biodegradações foram realizadas em meio de cultura mineral, a 30°C, 120 rpm e 72 horas. Foi possível obter um percentual de 12% de deltametrina residual com *S. marcescens*, DeI-1 e 17% com *S. marcescens* DeI-2, partindo da concentração de 50 mg L⁻¹ do pesticida. O único metabólito detectado e quantificado foi o 3-fenoxibenzaldeído com percentual de 13,2 mg L⁻¹ para de *S. marcescens* DeI-1 e 11,2 mg L⁻¹ para *S. marcescens* DeI-2 (Esquema 3). As quantificações foram realizadas por CLAE e as identificações por CG-EM.

Esquema 3. Biodegradação do pesticida deltametrina por linhagens de *Serratia marcescens* DeI-1 e DeI-2 em meio de cultura mineral.

Conc. inicial de deltametrina: 50 mg L⁻¹
 Pesticida residual: 12%

Conc. inicial de deltametrina: 50 mg L⁻¹
 Pesticida residual: 17%

O *Brevibacterium aureum* DG-12, similar à bactéria *S. marcescens* (DeI-1 e DeI-2), biodegradou a ciflutrina, obtendo 11% do pesticida residual. A concentração inicial da ciflutrina foi de 50 mg L⁻¹, e as reações ocorreram em meio de cultura Caldo Nutriente, 27°C, 120 rpm por 5 dias. Uma via de biodegradação foi proposta para ciflutrina, resultando nos metabólitos 2,2,3,3-tetrametil-ciclopropanometanol, ácido 4-flúor-3-fenoxi-benzóico, 3,5-dimetoxifenol e fenol. A identificação da ciflutrina e seus metabólitos foram realizados por CG-EM. Não foram realizadas as quantificações para os metabólitos obtidos (Esquema 4) (CHEN, et al. al., 2013).

Esquema 4. Biodegradação do pesticida ciflutrina por *Brevibacterium aureum* DG-12.

Já a biodegradação dos pesticidas fempropatrina e cipermetrina foram realizadas pela bactéria *Pseudomonas putida* KT2440, a reação ocorreu em meio de cultura Caldo Nutriente, 30°C, pH 7,0 e 200 rpm. A concentração inicial dos pesticidas utilizados foi de 50 mg L⁻¹, e a detecção dos compostos foram realizadas por CLAE e CG-EM. Foi possível biodegradar 30% de ambos os piretroides. Os metabólitos obtidos não foram quantificados nestes estudos (GONG, et al., 2018).

Similarmente a biodegradação de fempropatrina e cipermetrina também foram avaliadas, por meio da linhagem de *Sphingobium* sp. JZ-2. As reações ocorreram em meio mineral, 30 °C, 180 rpm por 120 horas. Os metabólitos obtidos para fempropatrina foram o 3-fenoxibenzaldeído e o ácido 2,2,3,3-tetrametilciclopropanocarboxílico. As identificações foram realizadas por CG-EM, porém não foram quantificados. Contudo, para a cipermetrina os metabólitos não foram identificados. Foi possível constatar a total degradação de ambos os pesticidas pela bactéria (Esquema 5) (GUO, et al., 2009).

Esquema 5. Biodegradação do pesticida fenpropatrina por *Sphingobium* sp. JZ-2.

1.3. Biodegradação ou biotransformação para os pesticidas ácidos tetrônicos espirociclos (cetoenóis)

Pouco estudos tem sido descrito na literatura envolvendo a classe de ácidos tetrônicos espirociclos em especial quando se trata de biorremediação. Possivelmente por se tratar de uma classe nova de agroquímico, o qual foi inserida no mercado a partir de 2010 (DEMAEGHT, et al., 2013).

O pesticida espirodiclofeno é derivado do núcleo natural do ácido tetrônico sendo considerado um acaricida não sistêmico, o qual foi desenvolvido pela empresa *Bayer CropScience*. É pertencente a classe química dos espirociclicos, além do espirodiclofeno outros dois similares ácidos tetrônicos foram desenvolvidos, o espiromesifeno e espirotetramato (Figura 11) (KE, et al., 2010).

Figura 11. Pesticidas da classe ácidos de tetrônicos espirociclos.

Para o nosso conhecimento até o presente não existem estudos de biodegradação de pesticidas derivados de ácidos tetrônicos espirociclos. Em geral as bases de dados *SciFinder*, *ScienceDirect* e *Web of Science* trazem apenas artigos que propõem sínteses orgânicas ou a quantificação dos mesmos em análises de solo. Ke et al. (2010) relataram a produção de novos compostos por via sintética partindo do espirodiclofeno, tendo como objetivo a produção de substâncias mais eficientes na inibição de ácaros (Esquema 6). Neste estudo foi possível a obtenção de 20 compostos, os quais foram testados contra as linhagens de ácaros *Lemma minor* Linn., *Cynodon dactylon* L., *Brassica chinensis*, *Aphid*, *Plutella xylostella* e *Cotton bollworm*.

Esquema 6. Síntese do pesticida espirodiclofeno para obtenção de novos compostos.

R	X	Rend. (%)	R	X	Rend. (%)	R	X	Rend. (%)
2,4-Cl	SO ₂ Me	76	<i>o</i> -Me	COCMe ₂ Et	88	4-F	COCMe ₂ Et	90
2,4-Cl	COOEt	78	<i>o</i> -Me	SO ₂ Me	83	4-F	SO ₂ Me	72
2,4-Cl	COCH ₂ -C ₆ H ₅	80	<i>o</i> -Me	COOEt	75	4-F	COOEt	76
2,4-Cl	COCH ₂ -2,4-Cl ₂ -C ₆ H ₃	72	<i>o</i> -Me	COCH ₂ -2,4-Cl ₂ -C ₆ H ₃	82	H	COCMe ₂ Et	90
2,4-Cl	COH ₂ -2-Me-C ₆ H ₄	81	<i>o</i> -Me	COH ₂ -2-Me-C ₆ H ₄	85	H	SO ₂ Me	80
2,4-Cl	CO-3,4,5-(MeO) ₃ -C ₆ H ₂	86	<i>o</i> -Me	CO-3,4,5-(MeO) ₃ -C ₆ H ₂	94	H	COOEt	84
2,4-Cl	CO-4-F-C ₆ H ₄	68	<i>o</i> -Me	CO-4-F-C ₆ H ₄	74			

Com o mesmo propósito [Xian-guo et al. \(2011\)](#) produziram novos compostos derivados do ácido tetrônico, utilizando como precursor o ácido 1-hidroxiciclo-hexano-1-carboxílico para obter o 2-(2,4-diclorofenil)-3-oxospiro[4.5]dec-1-en-1-olato de sódio, que posteriormente foi derivatizado produzindo 22 compostos (Esquema 7).

Esquema 7. Síntese para a obtenção de compostos derivados do pesticida espirodiclofeno.

Estudos na literatura relataram a resistência do ácaro *Tetranychus urticae* frente ao pesticida espirodiclofeno, espiromesifeno e espirotetramato. Foi observado que o ácaro foi 680 vezes mais resistente ao espirodiclofeno quando comparado aos outros dois ácaros tetrônicos. Também foi possível observar que ocorreu a biotransformação e biodegradação do espirodiclofeno em enol-espirodiclofeno e 4-hidroxi-espirodiclofeno. A reação foi realizada em meio de cultura Caldo Nutriente, 32°C, 130 rpm, 12 dias e com concentração inicial de 60 mg L⁻¹ e foi possível obter 22% do pesticida residual. A formação dos metabólitos foram detectados por LC-MS, porém ambos os produtos não foram quantificados (Esquema 8) (DEMAEGHT, et al., 2012).

Esquema 8. Biodegradação e biotransformação do pesticida espirodiclofeno pelo ácaro *Tetranychus urticae*.

1.4. Biodegradação ou biotransformação para os pesticidas neonicotinoides

A biodegradação do inseticida acetamiprida foi realizada pelos microrganismos *Ensifer meliloti* e *Escherichia coli* Rosetta utilizando as condições de 30°C, 220 rpm e 96 horas; e 30°C, 220 rpm, 100 e 120 minutos, respectivamente. Com *Ensifer meliloti* foi possível obter 35% de acetamiprida remanescente o metabólito obtido da reação foi a *N*-carbamoilimina (48%). Para a biodegradação via *Escherichia coli* Rosett obteve-se 3% do remanescente de pesticida em 100 min e 94% em 120 min. O mesmo metabólito foi obtido em ambas as condições com porcentagem de 48% quando utilizada *E. meliloti* em 96 h; e 95% em 100 min e 98% em 120 min para *E. coli* Rosett (Esquema 9) (ZHOU, L. Y, et al., 2014).

Esquema 9. Biodegradação da acetamiprida por *Ensifer meliloti* e *Escherichia coli* Rosett.

A linhagem de *Ochrobacterium* sp. Estirpe D-12 isolada de solo agrícola foi capaz de biodegradar a acetamiprida até 3000 mg L⁻¹ após 48 horas (Esquema 10). A biodegradação foi aumentada pela adição de co-substratos como a glicose (100 mg L⁻¹) e o cloreto de amônio (300 mg L⁻¹), neste caso degradou 200 mg L⁻¹ de acetamiprida após 10 horas e 300 mg L⁻¹ após 12 horas, e as reações ocorreram em meio de cultura mineral, pH 7 e 30°C. A biodegradação foi detectada por LC-MS e o metabólito obtido não foi quantificado (WANG, et al., 2013a).

Esquema 10. Biodegradação de acetamiprida por *Ochrobacterium* sp. estirpe D-12.

A biodegradação do pesticida clotiadina foi realizada pelo consórcio de bactérias pertencentes aos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Chryseobacterium*, *Enterobacteriaceae* e *Oxalbacteraceae* em sistemas aeróbeos com temperatura entre 22-35°C e sistemas anaeróbeos com temperatura entre 25-35°C, ambos em 100 rpm e 40 µg de clotiadina (Esquema 11). Com o sistema aeróbeo foi obtido 24% do pesticida residual em 59 dias e para sistema anaeróbeo o percentual de pesticida residual foi de 46% em 24 dias ambos por consórcio. Os metabólitos obtidos foram identificados por LC-MS/MS, em ambos os sistemas foram identificados nitroguanidina, nitroguanidina metil, tiazolmetilureia, tiazolinitroguanidina, clotianidina-*d*3, os quais não foram quantificados (MULLIGAN, et al., 2016).

Esquema 11. Biodegradação do clotiadina em sistemas anaeróbeos e aeróbeos.

O pesticida imidacloprido foi também biodegradado pela linhagem de bactéria *Pseudomonas* sp., a qual foi isolada de solo agrícola. O experimento foi realizado nas condições de 37°C, 200 rpm e 7 dias, partindo da concentração inicial de 0,5 mM de imidacloprido (Esquema 14). Após este período o percentual de pesticida remanescente foi de 54%, e os metabólitos obtidos foram imidacloprido ureia e um metabólito inédito. A quantificação da degradação do imidacloprido foi realizada por CLAE-UV e os metabólitos foram identificados por espectrometria de massas por ionização *electrospray*, os quais não foram quantificados. Os metabólitos mostraram-se possuir menor toxicidade que o pesticida de partida frente as células de câncer de mama MCF- 7 (GUPTA et al., 2016).

Esquema 14. Biodegradação do pesticida imidacloprido por *Pseudomonas* sp. RPT 52.

Sabourmoghaddam et al. (2015) descreveram a biodegradação do inseticida imidacloprido por linhagens de *Bacillus* sp., *Brevibacterium* sp., *Pseudomonas putida* F1, *Bacillus subtilis* e *Rhizobium* sp. A porcentagem de biodegradação do pesticida foi de 45%, 37%, 32%, 30% e 25% respectivamente. A degradação foi avaliada por CLAE-UV e as reações ocorreram nas condições de 28°C, 120 rpm e 25 dias. Os metabólitos obtidos das reações de biodegradação foram nitrosoguanidina, imidacloprido guanidina e ácido 6-cloronicotínico. As identificações dos mesmos foram realizadas por CG-EM e não houve a quantificação dos metabólitos.

O imidacloprido (50 mg L⁻¹) também foi biodegradado pela bactéria *Klebsiella pneumoniae* BCH1, após 7 dias de reação em modo estático o pesticida residual foi de 22%. A biodegradação e os metabólitos obtidos foram monitorados pelas técnicas de CLAE-UV e CG-EM. Três produtos foram identificados, sendo estes a nitrosoguanidina, a guanidina e o ácido 6-cloronicotínico (Esquema 15). Os metabólitos obtidos apresentaram menor toxicidade para as abelhas quando comparado ao imidacloprido

(PHUGARE et al., 2013). Destaca-se que o ácido 6-cloronicotínico foi proveniente da guanidina, uma vez que realizou-se a biotransformação deste metabólito separadamente com a *K. pneumoniae* BCH1.

Esquema 15. Biodegradação do pesticida imidacloprido por *Klebsiella pneumoniae* estirpe de BCH1.

Pseudoxanthomonas indica CGMCC 6648, uma bactéria proveniente do solo degradou o pesticida imidacloprido (1,22 mmol L⁻¹) obtendo 70% do agroquímico residual quando adicionou glicose como co-substrato em 6 dias de reação (Esquema 16). Os principais metabólitos produzidos foram o 5-hidroxi imidacloprido (0,93 mmol L⁻¹) e a olefina imidacloprido (0,05 mmol L⁻¹) (Esquema 16). Para a identificação dos compostos foi utilizada a técnica de LC-MS. Um efeito significativo na produção de olefina imidacloprido foi observado quando a glicose foi substituída por piruvato ou malato (0,11 e 0,17 mmol L⁻¹) se comparado a outros carboidratos e ácidos orgânicos (<0,05 mmol L⁻¹, 48-96 h) (Ma et al., 2014).

Esquema 16. Biodegradação do pesticida imidacloprido por *Pseudoxanthomonas indica* CGMCC 6648.

Os neonicotinoides imidacloprido e tiametoxam (Esquema 17) foram biotransformados nos metabólitos de nitrosoguanidina, desnito e tiourea por *Pseudomonas* sp. 1G. A bactéria proveniente do solo foi capaz de reduzir ambos os pesticidas, tendo como residual para ambos 30%. As reações ocorreram em meio de

cultura de Caldo Nutriente, modo estático, 28°C, 14 dias e foram utilizados 50 µg mL⁻¹ dos pesticidas de partida. Os metabólitos obtidos não foram quantificados, porém a identificação e a quantificação do imidacloprido remanescente foram avaliados por CLE-UV e LC-MS (PANDEY et al., 2009).

Esquema 17. Biodegradação dos pesticidas imidacloprido e tiametoxam por *Pseudomonas* sp. 1G.

A linhagem de bactéria *Ensifer adhaerens* isolada do solo rizosférico TMX-23, responsável pela fixação do nitrogênio, foi avaliada quanto à degradação do tiametoxam e quanto ao aumento do crescimento de plantas. A bactéria promoveu a redução de 22% do inseticida o qual teve como concentração inicial 200 mg L⁻¹. Os metabólitos nitrosoimino e análogos da ureia foram identificados após 5 dias de reação. O tiametoxam também foi considerado capaz de amplificar a germinação das sementes de soja em até a 30% (ZHOU et al., 2013).

O tiametoxam foi degradado por uma cultura bacteriana enriquecida no solo após 30 dias de reação em meio de cultura mineral (pH 7,0), partindo da concentração inicial de 200 mg L⁻¹. A reação mostrou-se eficiente, visto que, o pesticida residual foi de apenas 4%. Um total de trinta (~ 22%) bactérias cultivadas foram isoladas desta amostra, sendo 78% não cultiváveis. Algumas das bactérias isoladas pertenciam a seis gêneros distintos (*Pseudoxanthomonas*, *Agromyces*, *Mesorhizobium*, *Achromobacter*, *Ensifer* e *Microbacterium*). E, doze das bactérias do gênero *Ensifer* foram capazes de degradar o tiametoxam. A *Ensifer adhaerens* TMX-23, produziu o ácido indol-3-acético, a qual, foi uma bactéria fixadora de N₂ e teve o crescimento melhorado pela presença de tiametoxam

(Esquema 18). Os metabólitos formados foram identificados por análises de LC-MS (ZHOU et al., 2014).

Esquema 18. Biodegradação do pesticida tiametoxam por meio de cultura de bactérias do solo em meio de cultura mineral.

Stenotrophomonas maltophilia CGMCC 1.1788 foi avaliada frente à biotransformação de tiametoxam, clotiadina e imidaclopriz nas concentrações de 0,066 mg L⁻¹. Apenas o imidaclopriz com a concentração residual de 0,21 mmol L⁻¹ foi biodegradado. Os metabólitos obtidos foram o 5-hidroxi-imidaclopriz (0,16 mmol L⁻¹) e olefina-tianicotinila (0,04 mmol L⁻¹) (Esquema 19). Os metabólitos de 5-hidroxi-imidaclopriz (LC₅₀ 0,67 > 4 e 0,68) e olefina-imidaclopriz (LC₅₀ 0,29, 1,83 e 0,58) apresentaram melhor atividade e inibiram a reprodução do pulgão *Aphis craccivora* (72 horas), *Nilaparvata lugens* (96 horas) e da larva *Culex pipiens* (24 horas) quando comparado ao imidaclopriz (LC₅₀ 0,15, 1,67, 0,45), respectivamente. A quantificação do pesticida foi realizada por CLAE-UV e a identificação dos metabólitos por GC-MS (DAI et al., 2010).

Esquema 19. Biodegradação do pesticida imidaclopriz por *Stenotrophomonas maltophilia* CGMCC 1.1788.

A biodegradação em sistema anaeróbio para os estereoisômeros do neonicotinoide *paichongding* foi descrita por Li et al. (2016). O experimento foi realizado em solo flúvio-marinho, o qual foi coletado em Hangzhou, Zhejiang, China. A reação ocorreu em um período de 100 dias. Os resultados foram obtidos através da marcação do ^{14}C e demonstraram que a biodegradação foi melhor para os estereoisômeros (5*S*,7*R*) e (5*R*,7*S*) -*paichongding* com 19% e 2%, respectivamente, em comparação com (5*R*,7*R*) com 27% e (5*S*,7*S*) com 24% respectivamente. Foram obtidos nove produtos de biodegradação, sendo o 7-metilimidazo[1,2- α]piridina (Figura 12) o metabólito mais abundante com 47% (Figura 12).

Figura 12. Produtos de biodegradação dos estereoisômeros de *paichongding* em sistema anaeróbio por bactérias do solo.

MPD = 7-metilimidazo [1,2- α] piridina/ **MPP** = 1- ((6-cloropiridin-3-il) metil) -7-metil-8-nitro-5-hidroxi-1,2,3,5,6,7 hexa-hidroimidazo [1,2- α] piridina/ **MDP** = 1-((6-cloropiridin-3-il) metil) -2,3-di-hidro-5-ona 7-metilimidazo [1,2- α] piridina/ **MHP** = 5-hidroxi-7-metil-1-(piridina-3-ilmetil)hecahidroimidazo[1,2- α]piridina-8(5H)-one/ **MMP** = 1-((6-cloropiridin-3-il) metil)-7-metil-5-propoxi-1,2,3,5,6,7-hexa-hidroimidazo [1,2- α] piridina/ **MTP** = 1- ((6-cloropiridin-3-il) metil)-2,3-dihidroxi-7-metil-8-nitro-2,3,6,7-tetra-hidroimidazo[1,2- α]piridin-5(1H)-ona/ **MED** = 1-((6-cloropiridin-3-il) metil)-7-metil-2,3,6,7-tetrahidroimidazo[1,2- α]piridina-5(1H)-ona/ **MNP** = 1-((6-cloropiridin-3-il) metil)-7-metil-8-nitroso-5-propoxi-1,2,3,5,6,7-hexa-hidroimidazo [1,2- α] piridina/ **MMN** = 1- ((6-cloropiridin-3-il) metil)) - 7-metil-8-nitroso-5- propoxi-1,2,3,5,6,7-hexa-hidroimidazo [1,2- α]piridina-6-ol.

O microrganismo *Rhodotorula mucilaginosa* IM-2 foi utilizado para promover a biodegradação dos pesticidas imidacloprido, imidaclopriz, tiacloprido e acetamiprida, nas condições de 30°C, pH 6, em meio de cultura mineral, 220 rpm, na concentração de 200 mg L⁻¹. Após os 14 dias de reação observou-se que a linhagem não foi capaz de biodegradar imidacloprido e imidaclopriz, porém a acetamiprida foi biodegradada obtendo como remanecente 6,5% e o tiacloprido em 40% em 20 dias de reação (Esquema 20). Foram obtidos os metabólitos amida-acetamiprida com 68% e a amida-tiacloprido com 15%.

Ensaio utilizando a *R. mucilaginosa* no solo (20 mg/ g solo) demonstraram 40% de redução de acetamiprida e 40% de tiacloprido, mas controles abióticos também degradaram em 15% e 30%, respectivamente após 20 dias de reação. O bioensaio contra o pulgão *Aphis craccivora* por teste de imersão e ingestão oral demonstrou que os subprodutos dos inseticidas apresentaram atividade superior quando comparados aos pesticidas de origem (LC₅₀ < 0,15). O amida-acetamiprida apresentou LC₅₀ > 40 para ambos os ensaios, e o amida-tiacloprido apresentou LC₅₀ de 5,79 e 2,49, respectivamente (DAI et al., 2010).

Esquema 20. Biodegradação dos pesticidas acetamiprida e tiacloprido por *Rhodotorula mucilaginosa* IM-2.

1.5. Considerações finais sobre estudos de biodegradação

Os processos estatísticos multivariados consideram as amostras e as variáveis em seu conjunto, permitindo extrair informações complementares que a análise univariada não pode evidenciar. Um dos objetivos na utilização da análise multivariada é reduzir a representação dimensional dos dados, organizando-os em uma estrutura que facilita a visualização de todo o conjunto de dados (MOURA et al., 2006).

Alguns programas foram desenvolvidos para obter gráficos que possam representar todas as informações possíveis contidas em um conjunto de análises, dentre esses gráficos pode-se destacar a análise por agrupamento hierárquico (AHA), parâmetro Taguchi e o método de superfície de resposta (CORREIA; FERREIRA, 2007). Tais análises permitem a observação dos dados em conjunto mesmo que haja uma grande quantidade de informação.

Sendo assim, diante das informações adquiridas nesta *Introdução*, têm-se que o uso excessivo de agroquímicos na cadeia produtiva da citricultura brasileira gera problemas ambientais, tais como contaminação do solo, lençóis freáticos e de organismos vivos dentro de um ambiente.

Por outro lado, a utilização dos pesticidas é fundamental as necessidades alimentares da população mundial. Portanto, torna-se imprescindível identificar e quantificar os processos químicos e biológicos que controlam o comportamento dos pesticidas no ambiente para minimizar a contaminação dos recursos naturais e, principalmente, remediar e recuperar áreas contaminadas e, conseqüentemente, reduzir o impacto destes poluentes que são lançados na natureza pelo homem.

A biorremediação é uma alternativa promissora para reduzir a concentração de pesticidas acumulados no meio ambiente. Além de possibilitar o tratamento *in situ*, reduz gastos com transportes e materiais. A biorremediação permite o tratamento em áreas ambientais e, de resíduos considerados de difícil degradação e remoção que sejam persistentes ao meio ambiente. Para tornar os processos de biorremediação mais eficazes, é importante a seleção de microrganismos degradadores de pesticidas e a possível identificação das vias envolvidas na degradação (presentes na Fase I e II), para o uso direto dos mesmos ou das respectivas enzimas envolvidas.

A utilização de microrganismos endofíticos e patógenos associados à citricultura apresenta grande potencial, porém estes não têm sido explorados na biodegradação de

pesticidas organofosforados, carbamatos, piretroides, neonicotinóides e cetoenóis. Além de que, para investigar um estudo de biodegradação e biorremediação inúmeros parâmetros estão envolvidos (meio de cultura, temperatura, pH, tempo etc). Assim, métodos via *Planejamento fatorial* são úteis para selecionar as melhores condições para as variáveis estudadas. Logo, o presente trabalho visou à investigação da reação de biodegradação por bactérias frente aos pesticidas esfenvalerato, espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido que apresentam toxicidade ao meio ambiente, bem como, outros agentes patológicos à citricultura, ao homem e a diversos organismos, mas que são necessários para o controle de ácaros e outras pragas na citricultura utilizando *Planejamento fatorial (PF)*.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Estudar a biodegradação dos pesticidas espiroclorfenol (ceto-enol), tiametoxam (neonicotinoide), imidacloprido (neonicotinoide) e esfenvalerato (piretroide) por linhagens de bactérias isoladas da cultura da laranja e do Cerrado reflorestado (Campus II).

2.2. Objetivos específicos

- ✓ Aplicar as bactérias isoladas do Cerrado reflorestado (Campus II) para a biodegradação do esfenvalerato;
- ✓ Realizar consórcio bacterianos por linhagens do Cerrado reflorestado (Campus II) (*Bacillus* sp. 6D, 6F, 6H e 6I);
- ✓ Isolar, purificar e caracterizar as bactérias da cultura da laranja;
- ✓ Aplicar um *Planejamento fatorial – Método Taguchi* com a bactéria *Bacillus* sp. 6F frente ao pesticida espiroclorfenol;
- ✓ Utilizar a melhor condição obtida pelo *Planejamento fatorial* para o estudo de biodegradação dos pesticidas espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido pela linhagem *Bacillus* sp. CSA-21;
- ✓ Realizar as reações de biodegradação com a bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 isolada da citricultura da laranja em solo esterilizado e não esterilizado, para os pesticidas espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido podendo assim simular um ambiente similar ao natural;
- ✓ Quantificar o residual dos pesticidas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);

- ✓ Identificar o metabólito do espirodiclofeno pelas técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) 1D- ^1H e ^{13}C ;
- ✓ Identificar os metabólitos das reações por Cromatografia Líquida – Espectometria de Massas (LC-MS);
- ✓ Propor rotas de biodegradação para os pesticidas esfenvalerato, espirodiclofeno, tiametoxam, imidacloprido e para o metabólito 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespиро[4.5]dec-3-en-2-ona **H1**.

Etapas de apresentação do trabalho

3. ETAPAS DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO

O trabalho apresentado foi realizado em etapas diferentes, porém interligando-as umas as outras no decorrer dos estudos, e assim para um melhor entendimento, um breve resumo será apresentado.

Neste trabalho foram estudados a biodegradação de pesticidas utilizados na citricultura da laranja: esfenvalerato, espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido. Com o objetivo de estudar a degradação por microrganismos isolados da própria citricultura da laranja foi necessário realizar o isolamento dos microrganismos em colaboração com a empresa FUNDECITRUS.

Como no grupo já havia estudos também realizados com o pesticida esfenvalerato com várias linhagens de bactérias preservadas no laboratório, resolveu-se então dar continuidade aos estudos prévios realizados. Assim, iniciou-se a triagem de biotransformação do esfenvalerato por meio de bactérias isolados da Cerrado reflorestado (Campus II) – (*Serratia marcescens* 6A e *Bacillus* sp. 6D, 6E, 6F, 6H, 6I e 6L).

A partir dos resultados obtidos escolheu-se as melhores linhagens (*Bacillus* sp. 6D, *Bacillus* sp. 6F, *Bacillus* sp. 6H e *Bacillus* sp. 6I) para a realização de um consórcio bacteriano com a finalidade de obter a melhor biodegradação do esfenvalerato e aplicar o *Planejamento fatorial* com a linhagem *Bacillus* sp. 6F, que já havia fornecido bons resultados com esfenvalerato.

Paralelamente foram isoladas bactérias da citricultura da laranja, após realizado o processo de isolamento estas foram testadas com o pesticida espiroclorfenol e então os resultados não foram promissores, nas condições utilizadas (Caldo Nutriente, pH 7, 32°C e 132 rpm).

Com a obtenção da melhor condição obtida pelo *Planejamento fatorial* utilizando a linhagem *Bacillus* sp. 6F, resolveu-se então aplicar as condições para a linhagem *Bacillus* sp. CSA-21 isolada da citricultura da laranja, frente aos pesticidas espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido, posteriormente a mesma foi aplicada em experimento com solo, para os mesmos pesticidas (Figura 13). As metodologias utilizadas e os resultados com as discussões serão apresentados a seguir.

Figura 13. Fluxograma dos estudos que serão apresentados neste trabalho da biodegradação dos pesticidas esfenvalerato, espiroclorfenol, imidacloprido e tiametoxam.

Materiais e métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes e Solventes

Esfenvalerato, espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido (Sigma Aldrich, 99,5% e Bayer CropScience), hidróxido de sódio (Synth), cloreto de sódio (Synth), sulfato de sódio anidro (Synth), acetato de etila (Synth, P.A.), acetonitrila grau CLAE (Panreac, 99,9%), metanol grau CLAE (Panreac, 99,9%), Agar (Kasvi), Caldo Nutriente (Acumedia), Malte (Acumedia), Peptona G (Acumedia), Kit PCR Master Mix (LOT 0000216483)- REF (M7502)-PROMEGA.

4.2. PRIMEIRA ETAPA: Biodegradação e biotransformação do pesticida esfenvalerato por linhagens isoladas do Cerrado reflorestado (Campus II)

4.2.1. Crescimento das bactérias selecionadas para a realização da triagem de biodegradação e biotransformação do esfenvalerato (na presença e ausência) em meio de cultura sólido

O crescimento de cada bactéria foi realizado em placas de Petri (90 x 15 mm²) contendo 25 mL de meio de cultura [15 g L⁻¹ Agar, 8 g L⁻¹ de Caldo Nutriente, pH 7] e 100 mg L⁻¹ de esfenvalerato. Também foram realizados o crescimento de cada microrganismo na ausência do agroquímico. A ausência de contaminação em cada meio de cultura sólido foi confirmada por incubação prévia das placas em uma incubadora B.O.D. (Nova Ética) a 32°C durante 24 h. Após, as bactérias (*Serratia marcescens* 6A, *Bacillus* sp. 6D, *Bacillus* sp. 6E, *Bacillus* sp. 6F, *Bacillus* sp. 6H e *Bacillus* sp. 6I e *Bacillus* sp. 6L) foram inoculadas isoladamente no meio de cultura sólido na presença e na ausência do pesticida e posteriormente foram mantidas em incubadora B.O.D nas condições de 32°C e 24 h. Todo o crescimento bacteriano em meio de cultura sólido foi realizado em triplicata e o pesticida utilizado foi comercial.

4.2.2. Crescimento das bactérias selecionadas para a realização da triagem de biodegradação e biotransformação do esfenvalerato (na presença e ausência) em meio de cultura líquido

Para a realização da biodegradação do esfenvalerato pelas linhagens *Serratia marcescens* 6A, *Bacillus* sp. 6D, *Bacillus* sp. 6E, *Bacillus* sp. 6F, *Bacillus* sp. 6H, *Bacillus* sp. 6I e *Bacillus* sp. 6L, foram realizados dois experimentos em meio de cultura líquido, *a- Experimento realizado sem a união das células bacterianas para a biodegradação do esfenfalerato em meio de cultura Caldo Nutriente* e *b- Experimento realizado com a união das células para a biodegradação do esfenvalerato em Solução Salina*.

a- Experimento realizado sem a união das células para a biodegradação do esfenvalerato em meio de cultura Caldo Nutriente

Os experimentos de biodegradação foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio de cultura Caldo Nutriente inoculado com 1 mL de uma suspensão de 10^8 UFC/ mL utilizando aparelho espectrofotômetro, aparelho Shimadzu modelo UV-1800, obtida após 24 h de crescimento em meio de cultura sólido como descrito na Seção 4.2.2. Também foram realizados controles em meio de cultura Caldo Nutriente na ausência e na presença de 100 mg L^{-1} de esfenvalerato (Figura 14). Posteriormente os frascos Erlenmeyer foram incubados em um agitador orbital a 132 rpm, 32°C durante 3, 5 e 9 dias. Todos os experimentos foram realizados com o pesticida esfenvalerato comercial.

Figura 14. Etapas envolvidas no cultivo das bactérias *Serratia marcescens* 6A, *Bacillus* sp. 6D, *Bacillus* sp. 6E, *Bacillus* sp. 6F, *Bacillus* sp. 6H, *Bacillus* sp. 6I, e *Bacillus* sp. 6L em meio de cultura líquido para a biodegradação do pesticida esfenvalerato.

b- Experimento realizado com a união de células bacterianas para a biodegradação do esfenvalerato em Solução Salina

A reação de biodegradação do esfenvalerato pelas linhagens *Serratia marcescens* 6A, *Bacillus* sp. 6D, *Bacillus* sp. 6E, *Bacillus* sp. 6F, *Bacillus* sp. 6H, *Bacillus* sp. 6I e *Bacillus* sp. 6L foram realizadas com as células bacterianas originais e adaptadas na presença do pesticida. Os experimentos de biodegradação foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura Caldo Nutriente e inoculado com 1 mL de uma suspensão de 10^8 UFC/ mL, obtida após 24 h de crescimento em meio de cultura sólido. Para cada linhagem foram realizados o crescimento bacteriano em cinco frascos Erlenmeyer independentes.

Cada frasco Erlenmeyer foi incubado em um agitador orbital (132 rpm, 32°C) durante 24 h, e subsequentemente a suspensão de bactéria foi transferida para um tubo de centrífuga de 250 mL e centrifugado a 5.000 rpm em uma Centrífuga Refrigerada de Alta Velocidade, modelo CR22GIII-HITACH, a 4°C por 2 min. Em seguida, o sobrenadante

foi descartado e o *pellet* (bactéria) foi coletado e transferido para novos frascos Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de solução salina (0,86%). Posteriormente, o esfenvalerato (100 mg L^{-1}) foi adicionado, e os frascos foram incubados em um agitador orbital (132 rpm, 32°C , 120 h). Controles bióticos e abióticos foram realizados para todas as linhagens, todos os experimentos foram feitos em triplicata, no período de 3, 6 e 9 dias e o pesticida esfenvalerato utilizado foi de origem comercial. A Figura 15 ilustra as etapas de cultivo e crescimento bacteriano em meio de cultura líquido.

Figura 15. Etapas envolvidas no cultivo das bactérias *Serratia marcescens* 6A, *Bacillus* sp. 6D, *Bacillus* sp. 6E, *Bacillus* sp. 6F em meio de cultura líquido para a biodegradação do pesticida esfenvalerato*.

*Os mesmos procedimentos foram realizados para as linhagens *Bacillus* sp. 6H, *Bacillus* sp. 6I e *Bacillus* sp. 6L.

4.2.3. Procedimento de extração dos metabólitos obtidos pela biodegradação do pesticida esfenvalerato pelas linhagens *Serratia marcescens* 6A, *Bacillus* sp. 6D, *Bacillus* sp. 6E, *Bacillus* sp. 6F, *Bacillus* sp. 6H, *Bacillus* sp. 6I e *Bacillus* sp. 6L

Após 120 h de reação, o esfenvalerato e seus metabólitos foram extraídos da suspensão bacteriana usando 50 mL de acetato de etila (AcOEt) em agitação vigorosa por 30 min em um agitador magnético. Em seguida, a mistura foi transferida para um tubo de centrífuga de 250 mL (10.000 rpm, 20 min) e o sobrenadante foi então transferido para um novo frasco Erlenmeyer de 250 mL. O pH foi ajustado para pH 7,0 e foram realizados três passos de extração líquido-líquido com 30 mL de AcOEt. À fase orgânica adicionou-se Na₂SO₄ anidro, filtrou-se e o solvente foi removido a pressão reduzida em um rotaevaporador. A amostra obtida foi suspensa em metanol grau CLAE em um balão volumétrico de 5 mL e analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Figura 16) (BIROLI et al., 2016).

Figura 16. Etapas envolvidas no processo de extração do esfenvalerato e seus metabólitos das culturas bacterianas.

4.3. SEGUNDA ETAPA: Biodegradação e biotransformação do pesticida esfenvalerato por consórcio bacteriano com as bactérias isoladas do Cerrado reflorestado (Campus II)

4.3.1. Crescimento das bactérias selecionadas para o consórcio bacteriano em meio de cultura sólido, na presença e ausência de esfenvalerato

Para os experimentos em consórcio bacteriano com o esfenvalerato (comercial) foram selecionadas as linhagens que apresentaram os melhores resultados na Primeira Etapa (Seção 4.2.1.), sendo estas, *Bacillus* sp. 6D, *Bacillus* sp. 6F, *Bacillus* sp. 6H e *Bacillus* sp. 6I. O crescimento em meio de cultura sólido foi realizado utilizando os mesmos procedimentos relatados na Seção 4.2.1.

4.3.2. Crescimento das bactérias *Bacillus* sp. 6D, *Bacillus* sp. 6F, *Bacillus* sp. 6H e *Bacillus* sp. 6I em meio de cultura líquido

Após o crescimento em meio de cultura sólido por 24 h os microrganismos foram inoculados em quatro frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura Caldo Nutriente e 1 mL de uma suspensão de 10^8 UFC/ mL (*Bacillus* sp. 6D, *Bacillus* sp. 6F, *Bacillus* sp. 6H e *Bacillus* sp. 6I). Finalmente, cada meio de cultura foi incubado em um agitador orbital (132 rpm, 32°C, 24 h). Todo o crescimento bacteriano em meio de cultura líquido foi realizado em triplicata. A Figura 17 ilustra as etapas de cultivo e crescimento das linhagens bacterianas em meio de cultura sólido e líquido.

Figura 17. Etapas envolvidas no cultivo bacteriano em meios de cultura sólido (na presença de 100 mg L⁻¹ de esfenvalerato) e líquido com as bactérias *Bacillus* sp. 6D- 6I.

4.3.3. Biodegradação e biotransformação do esfenvalerato em meio de cultura líquido pelo consórcio bacteriano

A suspensão bacteriana obtida em meio de cultura líquido foi transferida para um tubo de centrífuga de 250 mL e os sedimentos foram extraídos por centrifugação (5.000 rpm (7.700 G, 2 min). Em seguida, o sobrenadante foi descartado e os *pelletes* de cada bactéria (*Bacillus* sp. 6D, *Bacillus* sp. 6F, *Bacillus* sp. 6H e *Bacillus* sp. 6I) foram transferidos para um único frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 50 mL de solução salina de NaCl 0,86%. Posteriormente o esfenvalerato (comercial, 100 mg L⁻¹) foi adicionado à suspensão do consórcio bacteriano e o frasco foi levado para um agitador orbital (132 rpm, 32°C, 3, 6 e 9 dias). Todas as reações com as culturas de consórcio bacteriano na presença e na ausência do pesticida esfenvalerato em meio de cultura líquido foram realizadas em triplicata. A Figura 18 ilustra as etapas de cultivo e crescimento separadamente das bactérias em meio de cultura líquido, para posteriores estudos de biodegradação do esfenvalerato com o consórcio dos microrganismos.

Figura 18. Etapas envolvidas no cultivo das bactérias em meio de cultura líquido separadamente e posteriores estudos de biodegradação com o consórcio bacteriano com as linhagens de *Bacillus* sp. 6D-6I na presença e ausência de esfenvalerato (100 mg L^{-1})

4.3.4. Processo de extração do esfenvalerato e seus metabólitos obtidos pelo consórcio bacteriano

Após 3, 6 e 9 dias de biodegradação utilizando o consórcio bacteriano, o esfenvalerato e seus metabólitos foram extraídos da suspensão utilizando os mesmos procedimentos relatados na Seção 4.2.3.

4.3.5. Quantificação por CLAE do esfenvalerato (padrão analítico) e seus metabólitos obtidos pela biodegradação e biotransformação (padrão analítico)

As análises por CLAE foram realizadas em um cromatógrafo Shimadzu, composto pelos módulos: sistema de bombeamento LC-20AT, desgaseificador DGU-20A5, amostrador automático SIL-20AHT, detector UV-VIS SPD-M20A, forno de

coluna CTO-20A e controlador de sistema CBM-20A. As separações foram realizadas utilizando uma coluna Phenomenex (250 x 4.6 mm) com pré-coluna.

Os estudos de biodegradação do pesticida esfenvalerato e seus metabólitos foram avaliados utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para a quantificação do pesticida residual e dos metabólitos formados foram utilizadas curvas analíticas obtidas pelo método de padrão externo. Para o esfenvalerato, as concentrações do pesticida foram de 50, 300, 550, 800 e 1050 mg L⁻¹ (Tabela 1). Obtiveram-se duas curvas analíticas para o ácido 3-fenoxibenzoico e o ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico. A primeira curva foi realizada em uma faixa de concentração de 5-33 mg L⁻¹ com soluções padrão de 5, 12, 19, 26 e 33 mg L⁻¹ (Tabela 2-A) e uma segunda curva analítica na faixa de 25-245 mg L⁻¹ com soluções padrão de 50, 80, 135, 190 e 250 mg L⁻¹ (Tabela 2-B). Também foram realizadas curvas para o 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico com soluções de 5-33 mg L⁻¹ (Tabela 3-A) e 25-245 mg L⁻¹ (Tabela 3-B). Todas as soluções foram preparadas em metanol grau CLAE.

Tabela 1. Curva analítica obtida por CLAE-UV para o pesticida esfenvalerato de 50-1050 mg L⁻¹.

Tabela 2. Curva analítica obtida por CLAE-UV para o ácido 3-fenoxibenzoico A (5-33 mg L⁻¹) e B (25-245 mg L⁻¹).

A

B

Tabela 3. Curva analítica obtida por CLAE-UV para o 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico A (5-33 mg L⁻¹) e B (25-245 mg L⁻¹).

4.4. D- Biodegradação dos pesticidas espiroclorfenol (Bacillus sp. 6F e Bacillus sp. CSA-21), tiametoxam e imidacloprido (Bacillus sp. CSA- 21)

4.4.1. Crescimento da bactéria Bacillus sp. 6F em meio de cultura sólido na presença e ausência do espiroclorfenol (comercial)

O crescimento em meio de cultura sólido para a bactéria *Bacillus* sp. 6F e posteriores biodegradação foi realizado utilizando os mesmos procedimentos relatados na Seção 4.2.1.

4.4.2. Crescimento do microrganismo Bacillus sp. 6F em meio de cultura líquido para a biodegradação do espiroclorfenol (comercial) aplicando Planejamento fatorial

A primeira fase de crescimento em meio líquido foi realizada em cinco frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio de cultura Caldo Nutriente- 8 g L⁻¹ (Acumedia) e pH 7. Foram utilizados um inóculo contendo 1 mL de suspensão (10⁸ UFC/mL) da bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 obtidas a partir de um pré-cultivo de 24 h em meio de cultura sólido. Posteriormente os frascos Erlenmeyers foram incubados em agitador orbital nas condições de 132 rpm, 32°C por 24 h.

Subsequentemente, a suspensão de bactérias foi transferida para um tubo de centrífuga de 250 mL, 5.000 rpm, 4°C, 2 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento (*pellets*) foi adicionado a um outro frasco Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio de cultura nas condições fornecidas pelo Planejamento fatorial (PF). Posteriormente, o espiroclorfenol (100 mg L⁻¹) foi adicionado à suspensão bacteriana e então incubado em um agitador orbital nas condições realizadas pelo PF. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, controles bióticos e abióticos também foram realizados (Figura 19). As reações foram feitas no período de 3, 6 e 9 dias.

Figura 19. Etapas envolvidas no cultivo da bactéria *Bacillus* sp. 6F em meio de cultura líquido para a biodegradação do espiroclorofeno de acordo com o *Planejamento fatorial*.

Para o *PF* utilizou-se de quatro variáveis e três níveis. Neste caso, as variáveis utilizadas foram o meio de cultura, a temperatura, o *pH* e a rotação fornecidas pelo *PF* de 3^4 . Neste modelo de combinação totalizariam 81 experimentos, tendo um alto custo de processo e a demora na obtenção das condições ótimas. Optou-se por utilizar o método *Taguchi*, que usa matrizes ortogonais que reduzem significativamente o número de experimentos, neste caso, formando um total de nove experimentos, realizados em triplicatas gerando 27 experimentos (Tabela 4) (McEwan et al., 1993). O *PF* foi realizado através do *software* Statistic 10.0.

Tabela 4. Condições obtidas para o *Planejamento fatorial*

Condições	Meio de Cultura (1)	pH (2)	T (°C) (3)	Rotação (rpm) (4)	Meio de cultura	pH	Temperatura (°C)	Rotação (rpm)
1	1	1	1	1	Peptona G	5	24	60
2	1	2	2	2	Peptona G	7	32	130
3	1	3	3	3	Peptona G	9	40	200
4	2	1	2	3	Solução Salina	5	32	200
5	2	2	3	1	Solução Salina	7	40	60
6	2	3	1	2	Solução Salina	9	24	130
7	3	1	3	2	Caldo Nutriente	5	40	130
8	3	2	1	3	Caldo Nutriente	7	24	200
9	3	3	2	1	Caldo Nutriente	9	32	60

4.4.3. Crescimento da bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 isolada da cultura da laranja em meio de cultura sólido na presença e ausência dos pesticidas espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido (comercial)

O crescimento da bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 em meio de cultura sólido na presença e na ausência dos pesticidas espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido foram realizados utilizando os mesmos procedimentos relatados na Seção 4.2.1.

4.4.4. Crescimento da bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 em meio de cultura líquido na presença e na ausência dos pesticidas, tiametoxam e imidacloprido (comercial)

Para o crescimento da bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 em meio de cultura líquido na presença e na ausência dos pesticidas tiametoxam e imidacloprido foram realizados três diferentes experimentos, isso foi devido, pois não foi possível alcançar os resultados de biodegradação desejados quando utilizou a condição otimizada pelo *PF*. Logo, serão apresentados os experimentos que foram necessários serem realizados para a biodegradação dos neonicotinoides tiametoxam e imidacloprido.

Semelhante à metodologia demonstrada na Seção 4.5.2. foram realizados os primeiros experimentos com ambos os agroquímicos por *Bacillus* sp. CSA-21 (Figura 20). Esse procedimento será relatado como MCT-1 para tiametoxam e MCI-1 para imidacloprido.

Figura 20. Etapas envolvidas no cultivo da bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 em meio de cultura líquido para a biodegradação dos pesticidas tiametoxam- MCT-1 e imidacloprido- MCI-1.

Para o segundo experimento denominado MCT-2 para o tiametoxam e MCI-2 para o imidacloprido foram realizados o crescimento da bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 em meio de cultura sólido na presença dos neonicotinóides (100 mg L^{-1}) e na ausência dos mesmos separadamente, posteriormente as placas foram incubadas em B.O.D. Após as 24 h foi realizado um inóculo 10^8 UFC de *Bacillus* sp. CSA-21 em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultura Caldo Nutriente, estes foram então incubados em agitador orbital a 200 rpm , 40° C durante 24 h. Posteriormente, foi adicionado o pesticida tiametoxam ou imidacloprido. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os controles bióticos e abióticos também foram feitos (Figura 21).

Figura 21. Etapas envolvidas no cultivo da bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 em meio de cultura líquido para a biodegradação dos pesticidas tiametoxam- MCT-2 e imidacloprido- MCI-2.

Para o terceiro experimento denominado MCT-3 para o tiametoxam e MCI-3 para o imidacloprido foram realizados o crescimento da bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 em meio de cultura sólido da presença dos neonicotinoides (100 mg L^{-1}) e na ausência dos mesmos separadamente, posteriormente as placas foram incubadas em B.O.D. Após as 24 h foram realizados um inóculo 10^8 UFC de *Bacillus* sp. CSA-21 em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 50 mL de meio de cultura Caldo Nutriente e adicionado 100 mg L^{-1} de tiametoxam ou imidacloprido, estes foram então incubados em agitador orbital a 200 rpm, 40°C durante 3, 6 e 9 dias. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e os controles bióticos e abióticos também foram feitos (Figura 22).

Figura 22. Etapas envolvidas no cultivo da bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 em meio de cultura líquido para a biodegradação dos pesticidas tiametoxam- MCT-3 e imidacloprido- MCI-3.

4.4.5. Processo de extração dos pesticidas remanescentes e seus metabólitos frente a biodegradação do espiroclorofeno, tiametoxam e imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 utilizando a melhor condição obtida pelo *Planejamento fatorial*

Para a extração dos pesticidas remanescentes e seus metabólitos (espiroclorofeno, tiametoxam e imidacloprido) pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 foram utilizados os mesmos procedimentos relatados na Seção 4.2.3.

4.5. Síntese do metabólito 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespиро[4.5]dec 3-en-2-ona H1

Em um balão de 100 mL foram adicionados 0,200 g de hidróxido de sódio (Synth), 3 mL do espiroclorofeno (comercial-Bayer) e 70 mL de água destilada. Em seguida o balão foi mantido em agitação magnética e aquecimento (70°C , 24 h). Após o período de reação foi ajustado o pH da solução (pH 2) com ácido clorídrico a $0,5 \text{ mol L}^{-1}$. Posteriormente foram realizadas três extrações de 25 mL com AcOEt e à fase orgânica

foi adicionado o Na_2SO_4 anidro e então o solvente foi evaporado a pressão reduzida em rotaevaporador. O produto **H1** após a extração foi caracterizado por Infravermelho (IV), Cromatografia a Gás Espectrometria de Massas (CG-EM) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN- ^1H e ^{13}C) (Esquema 21).

Esquema 21. Síntese de 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespíro [4.5] dec-3-en-2-ona **H1**.

4.6. Análise por Espectrometria na região do infravermelho (IV)

A análise foi realizada em um equipamento Shimadzu, modelo IRAffinity-1, utilizando-se pastilha de brometo de potássio anidro (KBr) para a amostra sólida do metabólito **H1**. As absorções foram expressas em número de onda (cm^{-1}) com faixa de absorção entre 4000 a 400 cm^{-1} .

4.7. Cromatografia a Gás-Espectrometria de Massas (CG-EM)

As análises por CG-EM foram feitas em um cromatógrafo a gás (GCEMQP2010 Ultra, Shimadzu Corporation, Japão) equipado com um amostrador de injeção automática AOC-20i (Shimadzu). As separações foram realizadas em uma coluna capilar de sílica fundida (DB-5MS 5%-fenil-95%-dimetil arileno siloxano (30 m x 0,25 mm de diâmetro interno), 0,25 mm de espessura de filme).

As amostras foram injetadas com fluxo constante de gás hélio 5,0 de $0,75\text{ mL min}^{-1}$. A temperatura do injetor foi de 250°C e utilizou-se $1,0\text{ }\mu\text{L}$ de amostra. O espectro de massas foi obtido pela análise em aparelho quadrupolo com filtro de fragmentos m/z de 40 a 500 u.m.a. A temperatura da fonte de íons permaneceu em 200°C e da interface a 270°C .

A programação da temperatura do forno iniciou-se a partir de 90°C mantida durante 2 minutos, em seguida a temperatura foi elevada a 150°C na taxa de 6°C. min⁻¹ e mantida nesta temperatura por 1 minuto. Posteriormente a temperatura foi elevada até 180°C a 10°C. min⁻¹ e mantida durante 4 minutos. Em seguida a temperatura foi elevada até 280°C na taxa de aquecimento de 20°C e mantida durante 15 minutos. O tempo total de análise foi de 40 minutos.

4.8. Análise por espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Para as análises por RMN foi utilizado Aparelho Agilent de ressonância magnética nuclear (RMN ¹H e ¹³C), operando em 500 MHz para hidrogênio e 125 MHz para carbono.

A amostra foi solubilizada em solvente deuterado (DMSO- *d*₆) e os deslocamentos químicos foram expressos em ppm com relação ao padrão interno de tetrametilsilano (TMS). As constantes de acoplamentos (*J*) foram registradas em Hertz (Hz).

4.9. Quantificação dos pesticidas por CLAE- UV. A- espiroclorfenol, B- tiametoxam, C- imidacloprido e D- 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespíro [4.5] dec-3-en-2-ona (H1)

a- Espiroclorfenol (padrão analítico)

O pesticida foi eluído com uma mistura de 0,5% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,5% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-15 min, 20% B, 0,5 fluxo; 15-16 min, 20% B, 0,7 fluxo; 16-49 min em 75% B, 1,0 fluxo (gradiente linear). A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 0,5 mL min⁻¹ e volume de injeção de 10 µL. A detecção ultravioleta foi realizada em 266 nm. Foram preparadas soluções padrão nas concentrações de 50, 100, 150, 200, 400, 600, 800, 900, 1000 e 1200 mg L⁻¹ de espiroclorfenol em metanol grau CLAE. Através da curva obteve-se a equação linear $y = 3508,8x + 48420$ (Tabela 5).

Tabela 5. Curva analítica obtida por CLAE-UV para o espirodiclofeno na faixa de concentração entre 50-1200 mg L⁻¹.

b- 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespiro[4.5]dec-3-en-2-ona **H1**

O método utilizado para quantificação do metabólito **H1** foi o mesmo utilizado para o pesticida espirodiclofeno. Foram realizadas soluções padrão nas concentrações de 25, 50, 200, 400, 600, 800, e 1000 mg L⁻¹ de **H1** em metanol grau CLAE. A detecção ultravioleta foi realizada em 266 nm. Através da curva obteve-se a equação linear $c = 5018,1x - 61859$ (Tabela 6).

Tabela 6. Curva analítica para o metabólito **H1** na faixa de concentração entre 25-1000 mg L⁻¹.

c- Tiametoxam (Padrão analítico)

O pesticida foi eluído com uma mistura de 0,5% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,5% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-35 min, 10% B; 35-40 min, 90% B. A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 10 µL. O tempo de retorno foi de 10 min. A detecção ultravioleta foi realizada em 277 nm.

Foram preparadas soluções padrão nas concentrações de 10, 20, 40, 200, 650 e 1000 mg L⁻¹ de tiametoxam em metanol grau CLAE. Através da curva obteve-se a equação linear $c = 1248,8x - 6747,1$ (Tabela 7).

Tabela 7. Curva analítica obtida por CLAE-UV para o tiametoxam na faixa de concentração entre 10-1000 mg L⁻¹.

d- Imidacloprido

O método utilizado para quantificação do imidacloprido foi o mesmo utilizado para o tiametoxam. Foram realizadas soluções padrão nas concentrações de 50, 40, 200, 400, 800 e 1000 mg L⁻¹ de imidacloprido em metanol grau CLAE. A detecção ultravioleta foi realizada em 277 nm. Através da curva obteve-se a equação linear $c = 3923,5x + 247312$. (Tabela 8).

Tabela 8. Curva analítica obtida por CLAE-UV para o imidacloprido na faixa de concentração entre 50-1200 mg L⁻¹.

4.10. Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Performance LC-MS/MS

As operações em espectrômetro (MODO-MS) foram realizadas por ionização *electrospray* modo positivo [M-H⁺], voltagem capilar de -4500 V com pressão do gás nebulizador (nitrogênio) a 4 bar. Para a vazão do gás secante (nitrogênio) foram utilizados 8 L min⁻¹ com a temperatura de fonte de íons a 200 graus. O modo de aquisição dos dados foi *full-MS* (SCAN); entre 50-3000 DA e as taxas aquisições dos espectros foram em 1Hz.

O material foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-40 min, 5-100% B; 40-50 min, 100% B. A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, com split 1/4 pós- coluna e volume de injeção de 30 µL. O tempo de retorno foi de 10 min.

4.11. QUARTA ETAPA: Biodegradação dos pesticidas espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido em solo por *Bacillus* sp. CSA-21

4.11.1. Crescimento da bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 em meio de cultura líquido para posteriores estudos de biodegradação em solo

O solo utilizado para a biodegradação dos pesticidas espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 foi coletado do Cerrado reflorestado (Campus II). Foram feitos experimentos em solo esterelizado e não esterelizado. Quando esterelizado, foram pesados 60 g de solo em frasco Shott de 250 mL em seguida este foi autoclavado a 120°C por 20 min.

Os estudos de biodegradação dos pesticidas espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido foram realizados com as células bacterianas originais e adaptadas na presença do pesticida. Os experimentos foram realizados primeiramente em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio de cultura Caldo Nutriente e inoculado com 1 mL de uma suspensão de 10^8 UFC / mL, obtida após 24 horas de crescimento em meio de cultura sólido.

Cada Erlenmeyer foi incubado em um agitador orbital (200 rpm, 40°C) durante 24 h, e subsequentemente a suspensão de bactéria foi transferida para um tubo de centrifuga de 250 mL e centrifugado a 5.000 rpm, 4°C por 2 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* (bactéria) foi coletado e transferido para novos recipientes contendo 60 g de solo (esterilizado ou não esterilizado). Posteriormente, o espiroclorfenol (100 mg L⁻¹), o tiametoxam (100 mg L⁻¹) ou o imidacloprido (100 mg L⁻¹) foram adicionados, aos recipientes e então estes foram colocados ao meio ambiente. Controles bióticos e abióticos foram feitos para todas as linhagens e todos os experimentos foram feitos em triplicata. A Figura 23 ilustra as etapas de cultivo e crescimento bacteriano em meio de cultura líquido e posteriormente em solo.

Figura 23. Etapas envolvidas no cultivo da bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 em meio de cultura líquido para a biodegradação dos pesticidas espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido em solo.

4.11.2. Processo de extração dos pesticidas espirodiclofeno, tiametoxam, imidacloprido e seus metabólitos obtidos pela biodegradação em solo esterilizado e não esterilizado

Após 12 dias de reação, o espirodiclofeno, tiametoxam ou imidacloprido e seus metabólitos foram extraídos do solo esterilizado e não esterilizado. As amostras foram transferidas para um frasco Beacker com o auxílio de uma espátula, posteriormente foram adicionados 100 mL de acetato de etila (AcOEt). As misturas foram então colocadas em agitação vigorosa por 1 h em agitador magnético. O passo seguinte, as misturas foram filtradas em funil de Buchner e em seguida foram transferidas para um frasco Beacker. Foram realizados três passos de extração líquido-líquido com 70 mL de AcOEt. À fase orgânica adicionou-se Na_2SO_4 anidro, filtrou-se e o solvente foi removido a pressão reduzida em rotaevaporador. A amostra obtida foi suspensa em metanol grau CLAE em um balão volumétrico de 5 mL e analisada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Figura 24).

Figura 24. Etapas envolvidas no processo de extração do espirodiclofeno, tiametoxam e imidacloprido e seus metabólitos em solo esterilizado e não esterilizado.

4.11.3. Quantificação dos pesticidas por CLAE- UV. A- espirodiclofeno, B- tiametoxam e C- imidacloprido

Para a quantificação da biodegradação dos pesticidas espirodiclofeno, tiametoxam e imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 em solo esterilizado e não esterilizado, na presença e na ausência dos mesmos, foram utilizadas as equações lineares obtidas nas curvas analíticas apresentadas na Seção 4.9.

Resultado e discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PRIMEIRA ETAPA: Biodegradação e biotransformação do pesticida esfenvalerato por bactérias isoladas do Cerrado reflorestado (Campus II)

5.1.1. Resultados obtidos por meio dos experimentos realizados com as células cultivadas em meio de cultura líquido em Caldo Nutriente

As seis linhagens bacterianas *Serratia marcescens* 6A, *Bacillus* sp. 6D, *Bacillus* sp. 6E, *Bacillus* sp. 6F, *Bacillus* sp. 6H, *Bacillus* sp. 6I e *Bacillus* sp. 6L, isoladas do Cerrado reflorestado (Campus II) foram primeiramente avaliadas quanto ao crescimento na presença de 100 mg L⁻¹ do pesticida esfenvalerato em meio de cultura sólido (Figura 25). Após 24 h de crescimento em meio sólido, as bactérias *Serratia marcescens* 6A, *Bacillus* sp. 6E e *Bacillus* sp. 6L não apresentaram formação de colônias; então, estas cepas não foram cultivadas em meio líquido para os estudos de biodegradação.

As bactérias que cresceram em meio de cultura sólido foram individualmente avaliadas frente a biodegradação do esfenvalerato no próprio meio de cultura sólido de Caldo Nutriente onde foram cultivadas.

Figura 25. Crescimento de bactérias (A) *Bacillus* sp. 6F e (B) *Bacillus* sp. 6I em meio de cultura sólido Caldo Nutriente na presença de 100 mg L⁻¹ esfenvalerato (32°C, 24 h).

Os resultados mostraram que as cepas bacterianas de *Bacillus* sp. 6D, *Bacillus* sp. 6F, *Bacillus* sp. 6H e *Bacillus* sp. 6I que cresceram em meio de cultura sólido na ausência ou na presença de esfenvalerato promoveram a biodegradação do mesmo em meio de cultura líquido. A biodegradação foi observada por meio de análises por CLAE-UV, nos

cromatogramas obtidos foi possível observar a diminuição na concentração do esfenvalerato e simultaneamente o aumento na formação dos metabólitos. Na Figura 26 tem-se os cromatogramas dos estudos de biodegradação do esfenvalerato, bem como os controles bióticos e abióticos.

Figura 26. Cromatogramas obtidos pela biodegradação do pesticida esfenvalerato (100 mg L^{-1}) por CLAE-UV sob agitador orbital a 130 rpm, 32°C e 5 dias.

Condição de análise: Coluna C-18 phenomenex: 0-17 min, 60% B (isocrático); 17-18 min, 50-90% B (gradiente linear); 18-30min em 90% B (isocrático); 30-31min 90-50% (gradiente linear) e 31-45 min. (isocrático).

A bactéria *Bacillus* sp. 6F foi a linhagem mais eficiente no processo de biodegradação do esfenvalerato ($33 \pm 3 \text{ mg L}^{-1}$), reduzindo em cerca de 67% em relação a concentração inicial (100 mg L^{-1}). Os metabólitos de biodegradação detectados neste primeiro grupo de experimentos por *Bacillus* sp. 6F foram o ácido 3-fenoxibenzoico (PBAc) e o ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico (ClAc) nas concentrações de $18,2 \pm 2,3 \text{ mg L}^{-1}$ e $28 \pm 3 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

Controles abióticos, nos quais tem-se apenas o meio e o pesticida e controles bióticos, nos quais tem-se apenas o meio de cultivo e os microrganismos também foram realizados nas condições das reações de biodegradação (Tabela 9). Em ambos os casos como seria esperado, não houve a degradação do pesticida no período de 12 dias. Sendo que no controle abiótico praticamente recuperou-se $>98\%$ do pesticida e no controle biótico a recuperação foi de aproximadamente 90%.

Tabela 9. Quantificação do pesticida esfenvalerato (100 mg L^{-1}), ácido 3-fenoxibenzoico (PBAC), 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico (CLAc) e 3-fenoxibenzaldeído (PBAlde) nas condições de 130 rpm, 32°C e 12 dias, em meio de cultura líquido Caldo Nutriente.

Bactéria	c Esfenvalerato* (mg L^{-1})	c PBAC* (mg L^{-1})	c CLAc* (mg L^{-1})	c PBAlde* (mg L^{-1})
Controle abiótico	$99,0 \pm 2$	NQ ^a	ND	$1,1 \pm 0,1$
Controle biótico	$90,1 \pm 0,4$	$0,7 \pm 0,5$	$1,6 \pm 0,4$	$1,0 \pm 0,1$
<i>Bacillus</i> sp. 6D	$54,5 \pm 10,0$	$1,55 \pm 0,0$	$1,2 \pm 0,5$	ND
<i>Bacillus</i> sp. 6H	$63,4 \pm 6,1$	$1,6 \pm 0,5$	$1,1 \pm 0,4$	ND
<i>Bacillus</i> sp. 6F	$33,4 \pm 3,2$	$18,2 \pm 2,3$	$28,0 \pm 3,3$	ND
<i>Bacillus</i> sp. 6I	$87,0 \pm 10,3$	$1,9 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,5$	ND

*c = concentração determinada por CLAE-UV. ND = não detectado. NQ = não quantificado.

^aO composto foi detectado. Entretanto, sua concentração foi abaixo de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ e não foi determinada.

A bactéria *Bacillus* sp. 6I apresentou o mais baixo valor de biodegradação de esfenvalerato com $87 \pm 10 \text{ mg L}^{-1}$ do pesticida residual sendo recuperado (Tabela 9). A concentração dos metabólitos para esta reação foram de apenas $1,9 \pm 0,2 \text{ mg L}^{-1}$ para o ácido PBAC e $2,1 \pm 0,5 \text{ mg L}^{-1}$ para o ácido CLAc.

A biodegradação de esfenvalerato pelas bactérias *Bacillus* sp. P5CBNB, *Kosakonia* sp. CBMAI 1836, *Bacillus* sp. CBMAI 1833 e *Kosakonia* sp. CBMAI 1835 isoladas de diferentes biomas foi relatado por [Bioroli et al. \(2016\)](#). As reações ocorreram nas condições de 150 rpm, 30°C durante 5 dias e a concentração inicial do pesticida foi de 100 mg L^{-1} . Como resultado a linhagem que melhor biodegradou o agroquímico foi o *Bacillus* sp. CBMAI 1833 tendo como valor residual do pesticida 42%. Os metabólitos detectados foram também os ácidos PBAC e CLAc nas concentrações de $1,5 \pm 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ e $1,0 \pm 0,1 \text{ mg mL}^{-1}$ (Esquema 22).

Esquema 22. Biodegradação do esfenvalerato pela bactéria *Bacillus* sp. CBMAI 1833.

Comparando os resultados obtidos neste estudo com a bactéria *Bacillus* sp. 6F com os resultados demonstrados por [Birolli et al. \(2016\)](#) com *Bacillus* sp. CBMAI 1833 foi possível observar uma melhora na biodegradação de 9% quando foi utilizada a bactéria *Bacillus* sp. 6F no mesmo período de reação. Assim, a linhagem isolada do Cerrado reflorestado (Campus II) *Bacillus* sp. 6F foi a que apresentou melhor potencial para a biodegradação do pesticida esfenvalerato.

5.1.2. Resultados obtidos por meio dos experimentos realizados com a união das células bacterianas, cultivadas em meio de cultura líquido em solução salina (0,86%)

Com o intuito de melhorar o processo de biodegradação do pesticida esfenvalerato resolveu-se então realizar novos experimentos, nos quais realizou o crescimento da bactéria *Bacillus* sp. 6F no meio de cultura Caldo Nutriente durante 24 horas. O crescimento da bactéria foi similar ao procedimento anterior, porém neste caso foi realizado em cinco frascos Erlenmeyer, para posterior às 24 horas realizar a união das células dos mesmos em um único frasco Erlenmeyer contendo solução salina, e nesta etapa foi então adicionado o pesticida na concentração de 100 mg L^{-1} (Seção 4.2.2).

Para este estudo observou-se que a bactéria *Bacillus* sp. 6D foi o microrganismo que apresentou a melhor biodegradação para o esfenvalerato, resultando em $50 \pm 1 \text{ mg L}^{-1}$ de pesticida residual (Tabela 10), em relação a concentração inicial de 100 mg L^{-1} de esfenvalerato. A biodegradação do esfenvalerato diminuiu em relação ao procedimento anterior, porém foi possível obter maiores concentrações dos metabólitos de biodegradação com $43 \pm 6 \text{ mg L}^{-1}$ para ácido 3-fenozibenoico (PBAC) e $66 \pm 6 \text{ mg L}^{-1}$ para ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico.

A bactéria *Bacillus* sp. 6I continuou apresentando o menor valor de biodegradação para o esfenvalerato (Tabela 10). Neste estudo também observou-se que ocorreu a biodegradação no controle biótico da reação com $38 \pm 8 \text{ mg L}^{-1}$ do pesticida residual, assim como também houve a formação dos metabólitos PBAC e ClAc com $28 \pm 8 \text{ mg L}^{-1}$ e $41 \pm 8 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente; além de que ocorreu a formação dos metabólitos no controle abiótico com valores de $22 \pm 2 \text{ mg L}^{-1}$ e $25 \pm 8 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente.

Tabela 10. Quantificação do pesticida esfenvalerato (100 mg L⁻¹), ácido 3-fenoxibenzoico (PBAC), 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico (CIAC) e 3-fenoxibenzaldeído (PBAlD) nas condições de 130 rpm, 32°C e 120 h, em meio de cultura líquido com Solução Salina.

Bactéria	c Esfenvalerato (mg L ⁻¹)	c PBAC (mg L ⁻¹)	c CIAC (mg L ⁻¹)	c PBAlD (mg L ⁻¹)
Controle abiótico	90 ± 5	22 ± 2	25 ± 5	ND
Controle biótico	38 ± 8	28 ± 5	41 ± 9	ND
<i>Bacillus</i> sp. 6D	52 ± 11	43 ± 16	66 ± 16	ND
<i>Bacillus</i> sp. 6H	10 ± 12	1.4 ± 0.4	1.9 ± 0.8	ND
<i>Bacillus</i> sp. 6F	10 ± 5	22 ± 2	25 ± 5	ND
<i>Bacillus</i> sp. 6I	38 ± 8	28 ± 5	41 ± 9	ND

*c = concentração determinada por CLAE-UV. ND = não detectado. NQ = não quantificado.

^aO composto foi detectado. Entretanto, sua concentração foi abaixo de 0,1 mg L⁻¹ e não foi determinada.

Assim, foi possível observar que dentre as linhagens estudadas para a biodegradação do pesticida esfenvalerato a linhagem que teve melhor desempenho foi de *Bacillus* sp. 6F, visto que os controles tanto bióticos como abióticos não influenciaram na biodegradação do agroquímico.

5.2. SEGUNDA ETAPA: Biodegradação e biotransformação do pesticida esfenvalerato por consórcio utilizando bactérias isoladas do Cerrado reflorestado (Campus II)

Com o objetivo de aperfeiçoar a biodegradação do esfenvalerato optou-se por fazer um novo experimento utilizando como base os resultados obtidos na PRIMEIRA ETAPA (Seção 5.1). Logo, resolveu-se então utilizar os mesmos microrganismos *Bacillus* sp. 6D, *Bacillus* sp. 6F, *Bacillus* sp. 6H e *Bacillus* sp. 6I, porém em um consórcio bacteriano.

A concentração inicial de esfenvalerato foi de 100 mg L⁻¹. Neste estudo com 4 dias de reação foi possível observar a biodegradação do esfenvalerato resultando na concentração residual de 60,8 ± 6,8 mg L⁻¹ do pesticida. No mesmo período também foi observado a formação dos metabólitos PBAC e CIAC nas concentrações de 6,0 ± 1,8 mg L⁻¹ e 6,9 ± 2,3 mg L⁻¹, respectivamente (Tabela 11). Ao longo de 8 dias de reação, a concentração de esfenvalerato continuou a ser reduzida para 22,9±2,6 mg L⁻¹ obtendo a concentração de 10,6±4,0 mg L⁻¹ com 12 dias de reação. Foi observado também que com o decréscimo do pesticida no meio reacional ocorreu concomitantemente um aumento na concentração dos metabólitos com 16,2±3,4 mg L⁻¹ para o PBAC e 16,7±2,3 mg L⁻¹ para o CIAC no período de 8 dias e finalmente, após 12 dias de reação, a concentração de PBAC foi de 35,0±3,1 mg L⁻¹ e a de CIAC foi de 34,0±2,8 mg L⁻¹ (Tabela 11). Controles abióticos

e controles bióticos também foram realizados nas condições das reações de biodegradação e observou-se que em ambos os casos praticamente não ocorreu biodegradação onde o pesticida foi recuperado (>99%).

Tabela 11. Quantificação de esfenvalerato (concentração inicial de 100 mg L⁻¹), ácido 3-fenoxibenzoico (PBAC) e ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico (ClAc) após a biodegradação usando um consórcio bacteriano (12 dias, 32°C, 32 rpm).^a

Tempo de reação (dias)	c (mg L ⁻¹) Esfenvalerato	c (mg L ⁻¹) PBAC	c (mg L ⁻¹) ClAc	c (mg L ⁻¹) PBAlD
Controle abiótico*	99 ± 2	NQ ^b	ND	1,1 ± 0.1
Controle de células originais*	99 ± 0.3	0,3 ± 0.2	1,0 ± 0.5	0,3 ± 0.0
4	60,8 ± 6.8	6,0 ± 1.8	6,9 ± 2.3	ND
8	22,9 ± 2.6	16,2 ± 3.4	16,7 ± 2.3	ND
12	10,6 ± 4,0	35,0 ± 3,1	34,0 ± 2,8	ND

^aConsórcio bacteriano: *Bacillus* sp. 6D, *Bacillus* sp. 6F, *Bacillus* sp. 6H e *Bacillus* sp. 6I

^bO composto foi detectado. Entretanto, sua concentração foi abaixo de 0,1 mg L⁻¹ e não foi determinada.

c = concentração determinada por CLAE-UV. ND = não detectado. NQ = não quantificado.

*As reações dos controles bacterianos e controles abióticos foram realizadas em triplicatas no período de 4, 8 e 12 dias.

Na Figura 27 tem-se os cromatogramas dos estudos de biodegradação do esfenvalerato, bem como, os controles bióticos e abióticos frente ao consórcio bacteriano. Inicialmente, houve um decréscimo na concentração do esfenvalerato (concentração inicial de 100 mg L⁻¹) e, posteriormente um aumento na concentração dos metabólitos de biodegradação, ou seja, PBAC e ClAc.

Figura 27. Biodegradação de esfenvalerato (100 mg L⁻¹) do ácido 3-fenoxibenzoico e ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico utilizando um consórcio bacteriano do gênero *Bacillus*.

*Resultados obtidos dos experimentos realizados em triplicatas.

O esfenvalerato é um pesticida da classe dos piretroides que possui uma ligação éster que pode ser hidrolisada. Enzimas carboxilesterases catalisam a hidrólise de ésteres para produzir álcoois e ácidos carboxílicos (NESTLER, C. 2001). Portanto, a hidrólise do esfenvalerato via carboxilesterases pelo consórcio bacteriano produziu o metabólito ClAc, o qual foi detectado e quantificado pelas análises por CLAE. No entanto, a 2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil) acetonitrila não foi detectado neste estudo (Esquema 23).

Esquema 23. Hidrólise do esfenvalerato por carboxilesterases do consórcio bacteriano isolado do Cerrado reflorestado (Campus II).

Dados na literatura demonstram que a conversão de aldeídos em ácidos carboxílicos pode ser realizada por aldeído desidrogenases presentes no metabolismo bacteriano de *Bacillus* sp. (YAN, Z. et al., 2016). Sendo assim, para a formação do metabólito, o ácido 3-fenoxibenzoico, por consórcio bacteriano com a linhagem de *Bacillus* sp. é possível que tenha ocorrido a formação do metabólito 2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil) acetonitrila, este por sua vez foi convertido a 3-fenoxibenzaldeído, os quais não foram detectados (Esquema 24).

As enzimas que podem realizar a conversão de cianoidrinas a aldeídos e ácido cianídrico são as oxinitrilases (hidroxinitrila liases). (YAN, Z. et al., 2016). Assim, posteriormente, é provável que o metabólito 3-fenoxibenzaldeído tenha sido convertido ao ácido 3-fenoxibenzoico, por ação enzimática de forma abiótica. A reação controle, do 3-fenoxibenzaldeído não promoveu a oxidação do composto ao correspondente ácido carboxílico.

Esquema 24. Biotransformação de 2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil) acetonitrila em ácido 3-fenoxibenzoico por consórcio bacteriano isolado do Cerrado reflorestado (Campus II).

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram a formação dos metabólitos o ácido 2-(3-hidroxifenil)acético e 3-fenoxibenzaldeído, os quais não foram detectados neste estudo (BIROLI et al., 2016), logo é possível que a rota de biodegradação tenha seguido estas etapas, porém não se observou estes compostos nas análises realizadas.

O esfenvalerato pode ser biodegradado e biotransformado em diferentes metabólitos por diferentes linhagens de microrganismos, consequentemente pela atividade de diferentes enzimas, como foi relatado por Chen et al. (2013); Guo et al. (2009); Yu et al. (2013) e Birolli et al. (2016). Os autores detectaram a formação dos metabólitos PBAC e ClAC, os quais também foram identificados neste estudo. Na literatura também se observou a formação da 2-3-(fenoxifenil)acetonitrila obtido da biodegradação do pesticida esfenvalerato por processos via radicais livres e carboxilesterase, e este por sua vez possivelmente foi biodegradado nos metabólitos fenol e o ácido 2-(3-hidroxifenil)acético via atividade enzimática de eterases (Esquema 25).

Esquema 25. Biodegradação do pesticida esfenvalerato pela bactéria *Sphingomonas* sp.

Uma rota de biodegradação proposta é mostrada partindo do esfenvalerato, o qual foi biodegradado pela ação de carboxilesterase formando o metabólito 2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil)acetonitrila, que por sua vez foi biotransformado em 3-fenoxibenzaldeído por meio da atividade enzimática de oxinitrilases. O 3-fenoxibenzaldeído foi então biotransformado no metabólito o álcool 3-fenoxibenzílico via aldeído redutase e PBAC via aldeído desidrogenase. O metabólito PBAC pode ser biotransformado em 3-fenoxibenzoato de metila por um equilíbrio ácido base, além disso, pode ser biotransformado em ácido-3-hidroxibenzoico por uma monoxigenase, que posteriormente pode ser biodegradado em di-idroxibenzeno e ácido 3-hidroxibenzoico por atividades enzimáticas de eterases (Figura 28) (CHEN et al., 2013); (GUO et al., 2009); (YU et al., 2013); (BIROLI et al., 2016).

Figura 28. Proposta de biodegradação do esfenvalerato por linhagens bacterianas de diferentes biomas e por linhagens do gênero *Bacillus* sp. isolados do Cerrado reflorestado (Campus II).

Metabólitos obtidos no estudo de biodegradação e biotransformação do pesticida esfenvalerato por linhagens de *Bacillus* sp. 6D, 6H, 6F, 6I e consórcio bacteriano com as mesmas linhagens.

5.3. TERCEIRA ETAPA:

- A) Aplicação do *Planejamento fatorial* método Taguchi para a obtenção da melhor condição de biodegradação, através da linhagem *Bacillus* sp. 6F para o pesticida espirodiclofeno.**
- B) Controle do tempo reacional pelas bactérias *Bacillus* sp. 6F e *Bacillus* sp. CSA-21.**
- C) Identificação do metabólito 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespиро[4,5]dec-3-em-2-ona H1.**
- D) Aplicação da melhor condição obtida para a biodegradação dos pesticidas tiametoxam pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 isolada da citricultura da laranja.**
- E) Aplicação da melhor condição obtida para a biodegradação dos pesticidas imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 isolada da citricultura da laranja.**
- F) Isolamento dos microrganismos da citricultura da laranja.**

5.3.1. A) Aplicação do *Planejamento fatorial* método Taguchi para a obtenção da melhor condição de biodegradação através da linhagem *Bacillus* sp. 6F

O espirodiclofeno (*Esp.*) tem como função inibir a biossíntese lipídica de ácaros e é um pesticida cancerígeno para seres humanos de acordo com o Gabinete Ambiental de Proteção dos Estados Unidos (XIE et al., 2012). Sendo assim, os estudos de biodegradação realizados neste trabalho poderão trazer informações importantes para o processo de biorremediação, a partir da produção de metabólitos que sejam menos tóxicos que o produto aplicado na cultura de citros.

Inicialmente o processo de biodegradação do pesticida *Esp.* foi realizado com todas as bactérias isoladas das amostras coletadas da citricultura (APÊNDICE-A). Porém nenhum dos microrganismos promoveram a biodegradação do agroquímico frente a condição realizada (pH 7, 32°C, 132 rpm, 12 dias).

Sendo assim, novas bactérias foram avaliadas, oriundas do Cerrado reflorestado localizado próximo ao Campus II da Universidade de São Paulo (USP). As bactérias utilizadas inicialmente (1º *screening*) foram: *Serratia marcescens* 6A, *Bacillus* sp. 6D, *Bacillus* sp. 6E, *Bacillus* sp. 6F, *Bacillus* sp. 6H, *Bacillus* sp. 6I and *Bacillus* sp. 6L. Dentre estas a que melhor biodegradou o *Esp.* foi o *Bacillus* sp. 6F. Logo esta, foi selecionada para avaliar as diferentes condições no processo de melhoramento da biodegradação do *Esp.*

Assim, com o objetivo de biodegradar o *Esp.* foi aplicado um método estatístico (*Planejamento fatorial*- método Taguchi, Tabela 12, p. 89). O método Taguchi foi utilizado devido a metodologia propiciar diferentes combinações de fatores que podem ser controlados em um único experimento, e por diminuir o número de experimentos a serem realizados. Neste caso, os níveis foram para *meio de cultura* (*Peptona G*, *Solução Salina* e *Caldo Nutriente*), *pH* (5, 7 e 9), *temperatura* (24, 32 e 40°C) e *rotação* (60, 132 e 200 rpm), e as variáveis seriam *meio de cultura*, *pH*, *temperatura* e *rotação*. Utilizando o método Taguchi ocorreu a redução do número de experimentos para 9, realizados em triplicata totalizando 27 experimentos, mantendo as mesmas variáveis e níveis, não prejudicando o desempenho do processo, pois pela análise combinatória do método é possível obter as principais combinações (McEWAN; BELAVENDRAM; ALI, 1993).

As seleções das variáveis foram baseadas na literatura e, em estudos realizados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (BIROLI et al., 2016). As variações de pH, temperatura e concentração do pesticida foram selecionadas para o presente estudo baseado no trabalho de Phugare et al. (2013), o qual utilizou estirpes bacterianas para a biodegradação do pesticida imidacloprido. Devido ao baixo crescimento das bactérias em meio de cultura líquido, decidiu-se então avaliar também as variáveis meio de cultura e rotação visto que, o meio de cultura poderia influenciar significativamente no crescimento do microrganismo, bem como, a agitação orbital propiciando uma melhor oxigenação do sistema. A Figura 29, ilustra o cromatograma obtido para uma amostra padrão do *Esp.*

(100 mg L⁻¹) com tempo de retenção em 45,213 min, em comprimento de onda de 266 nm.

Figura 29. Cromatograma do espiroclorofeno padrão analítico obtido por análise de CLAE-UV na concentração de 100 mg L⁻¹.

Condições de análise: Coluna C-18: O material foi eluído com uma mistura de 0,5% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,5% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-15 min, 20% B, 0,5 fluxo; 15-16 min, 20% B, 0,7 fluxo; 16-49 min em 75% B, 1,0 fluxo (gradiente linear). A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 10 µL.

O estudo de biodegradação para as nove condições obtidas foram realizados em triplicatas e, em períodos de 3, 6 e 9 dias. Porém, para o tratamento estatístico (*Planejamento fatorial*) foram utilizados os dados da biodegradação no período de 3 dias de reação. O tempo de 3 dias de reação foi definido para o *PF* devido a *condição 3* (*Peptona G*, pH 9, 40°C, 200 rpm) apresentar valor elevado de biodegradação neste período, com 96,3±0,92 mg L⁻¹, sendo esta a melhor *condição* avaliada (Tabela 12).

A partir dos dados de biodegradação do *Esp.* obtidos para as nove *condições* (Tabela 12) foi possível observar que as condições que tiveram menores valores de biodegradação do *Esp.* foram as *condições 1* (*Peptona G*, pH 5, temperatura 24°C e rotação 60 rpm) com 0,00±0,00 mg L⁻¹ e a *condição 5* (*Solução Salina*, pH 7, temperatura 40°C e rotação 60 rpm) com 0,00±0,01 mg L⁻¹ (Tabela 12).

Tabela 12. Condições obtidas para o *Planejamento fatorial* aplicado à biodegradação do *Esp.* pela bactéria *Bacillus* sp. 6F em 3 dias de reação.

Condição	Condições obtidas para o <i>Planejamento fatorial - Método Taguchi</i>				Biodegradação do espiroclorofeno (mg L ⁻¹)			
	Meio de cultura	pH	Temperatura (°C)	Rotação (rpm)	Replicata 1	Replicata 2	Replicata 3	Média
1	Peptona G	5	24	60	0,00	0,00	0,00	0,00±0,00
2	Peptona G	7	32	130	47,41	56,7	53,1	52,4±3,84
3	Peptona G	9	40	200	95,1	96,6	97,3	96,3±0,92
4	Solução Salina	5	32	200	66,5	70,9	71,4	69,6±2,21
5	Solução Salina	7	40	60	0,02	0,00	0,00	0,00±0,01
6	Solução Salina	9	24	130	15,2	15,8	14,7	15,2±0,43
7	Caldo Nutriente	5	40	130	86,9	89,2	89,5	88, 5±1,19
8	Caldo Nutriente	7	24	200	21,4	14,2	28,4	21,3±5,79
9	Caldo Nutriente	9	32	60	5,8	8,1	9,5	7,81±1,55

Foram calculados também os valores de R^2 o qual corresponde “a porcentagem da variação da variável dependente que é explicada pelas variáveis independentes” (SCHWAAB; PINTO, 2007), na qual a variável dependente para os estudos foi a biodegradação do *Esp.* e as variáveis independentes foram o *meio de cultura*, o *pH*, a *temperatura* e a *rotação*. Segundo Naghettini e Pinto (2007) variáveis dependentes correspondem ao processo que está sendo explicado e, as independentes são aquelas modificadas para se obter resultados e entendimentos para a variável dependente.

Segundo a literatura os valores de R^2 devem estar entre 0 e 1, sendo assim, valores de R^2 próximos ou igual a 0 implicam que o *PF* não está bem ajustado para os dados utilizados; consequentemente valores de R^2 próximos ou igual a 1 mostram que o modelo está bem ajustado para os dados utilizados (SCHWAAB; PINTO, 2011). Como os resultados dos dados obtidos para a biodegradação do *Esp.* obteve-se valores de $R^2 = 0,7635$, conclui-se que o modelo estudado *PF* explica 76% do processo de biodegradação do *Esp.*

O teste de variância ANOVA foi também aplicado, visando, fundamentalmente, verificar a existência de diferença significativa entre as médias e, se os fatores [(para meio de cultura: *Peptona G*, *Solução Salina* e *Caldo Nutriente*); (para pH: 5, 7 e 9); (para temperatura: 24, 32 e 40°C) e (para rotação: 60, 130 e 200 rpm)] exerceram influência em

alguma variável dependente (biodegradação do *Esp.*). Pelo teste F que é “*uma medida de quão bem um conjunto de variáveis independentes, explica a variação na variável dependente*” (BERTOLO, 2000) (Tabela 13). A *rotação* (F=948,7413) teve o maior valor do Teste F dentre as variáveis testadas, assim foi a variável que mais influenciou a biodegradação do *Esp.*, destacando assim a importância na escolha adequada dos agentes modificadores no processo de biodegradação.

Meio de cultura e *pH* foram as variáveis que menos influenciaram nas condições de biodegradação do *Esp.* quando comparado com a *rotação* e a *temperatura*. Baixos valores de p (coeficiente de correlação linear) indicaram que a probabilidade desses resultados terem ocorridos ao acaso foi mínima. Logo, a probabilidade de os dados obtidos neste trabalho terem ocorrido ao acaso foi insignificante.

Possivelmente o *meio de cultura* e o *pH* foram as variáveis que menos influenciaram nas condições de biodegradação do esfenvalerato, pois foram isoladas do solo, o qual, pode estar sujeito a constantes mudanças sazonais de temperatura, lixiviação, umidade, etc.

Tabela 13. Análise de variância para *Planejamento fatorial* aplicado à biodegradação do espiroclorofeno pela bactéria *Bacillus* sp. 6F.

Variáveis	SQ*	GF*	QM*	F	p
Meio de cultura	2042,09	2	1021,045	105,2924	0,000000
pH	3566,46	2	1783,232	183,8908	0,000000
Temperatura (°C)	11239,90	2	5619,950	579,5415	0,000000
Rotação (rpm)	18400,33	2	9200,166	948,7413	0,000000
Residual	174,55	18	9,697		

*SQ = soma dos quadrados, GF = graus de liberdade, QM = quadrado médio.

Para uma melhor interpretação dos dados, um gráfico relacionando os níveis de fatores que podem interferir na biodegradação do *Esp.* (Figura 30) foi plotado, onde foi possível observar que para a variável *meio de cultura* o nível que mais interferiu foi para meio de cultura *Peptona G*, para a variável *pH* foi o *pH 5*, para a variável *temperatura* foi a *T = 40°C* e, por fim para a variável *rotação*, *200 rpm*.

Figura 30. Influências das variáveis e níveis na biodegradação do espiroclorofeno pela bactéria *Bacillus* sp. 6F obtido através do *Planejamento fatorial*.

Os gráficos de superfícies de respostas em três dimensões para as três variáveis que mais contribuíram para a biodegradação do *Esp.* foram obtidos. De acordo com [Comparini et al. \(2016\)](#) “a metodologia de superfície de resposta é uma técnica estatística utilizada para a modelagem e análise de problemas nos quais a variável resposta é influenciada por vários fatores, cujo objetivo é a otimização dessa resposta”.

A Figura 31, p. 121 ilustra o gráfico de superfície de resposta para a biodegradação do *Esp.* considerando as variáveis *temperatura* e *rotação*. A partir do gráfico, pode-se observar que valores elevados para a biodegradação do *Esp.* foram obtidos, quando níveis altos de *temperatura* (40°C) e *rotação* (200 rpm) foram utilizados. Estes valores foram observados no centro do gráfico de superfície de resposta em coloração vermelha. Ao diminuir os valores dos níveis houve uma diminuição na biodegradação; estes valores foram observados nas extremidades do gráfico em coloração verde.

Valores maiores para a biodegradação do *Esp.* em temperaturas elevadas podem ser devido ao fato de que, o microrganismo utilizado (*Bacillus* sp. 6F) ter melhor crescimento em temperaturas elevadas, visto que a coleta do mesmo foi realizada na

estação do verão (Campus II da Universidade de São Paulo). Durante o verão a temperatura do solo pode ser superior a 30°C (INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS, 2016b), sendo assim a biodegradação pode ter sido favorecida a partir do uso de temperaturas semelhantes ao ambiente natural.

Estudos na literatura mostraram que estirpes de microrganismos do gênero *Bacillus* têm apresentado melhores resultados em temperaturas mais elevadas. Como exemplo a biodegradação do ácido 3-clorobenzoico e do ácido 3-hidroxibenzoico utilizando *Bacillus* sp. OS13 reportada por Mulla et al. (2016), no qual através de tratamentos estatísticos conseguiram obter 65% de biodegradação do ácido 3-clorobenzoico e 98% para o ácido 3-hidroxibenzoico na temperatura de 40°C.

O melhor desempenho dos microrganismos do gênero *Bacillus* em temperaturas elevadas para biodegradar o *Esp.* pode ser devido a maior produção das enzimas carboxilesterases e amidases, que apresentam temperatura ótima entre 37-55°C as quais são responsáveis pela hidrólise de ligações ésteres (SONI et al., 2016).

Valores elevados para a biodegradação do *Esp.* foram obtidos quando maiores rotações (agitação) foram empregadas com a bactéria *Bacillus* sp. 6F (Figura 37), devido ao aumento da oxigenação durante o período de biodegradação. O processo de biodegradação foi realizado em meio de cultura líquido e, é neste momento que o microrganismo pode utilizar o O₂ dissolvido na camada superficial do meio.

Uma agitação mais vigorosa pode aumentar o fornecimento de O₂ dissolvido e, consequentemente produzir um maior estoque celular num tempo de incubação menor (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Logo, quando combinado as variáveis *temperatura* e *rotação* com níveis elevados (40°C e 200 rpm) obteve-se melhores valores para a biodegradação do *Esp.* como foi observado na *condição 3* com 96%, pois conseguiu-se ambientalizar o microrganismo *Bacillus* sp. 6F nestas condições. Neste caso também favoreceu o processo de biodegradação em um período de apenas 3 dias.

Figura 31. Gráfico de superfície de resposta obtido por meio do *Planejamento fatorial* para as variáveis *temperatura* e *rotação* na biodegradação do espiroclorofeno pela bactéria *Bacillus* sp. 6F.

O gráfico de superfície de resposta plotado com as combinações das variáveis *pH* e *rotação* (Figura 32) mostram que adotando um nível baixo ou alto para a variável *pH* e, assumindo nível alto para a variável *rotação* foram obtidos rendimentos mais elevados para a biodegradação do *Esp*. Isto pode ser observado no gradiente da coloração (Figura 38), onde a cor vermelha ficou mais intensa quando a variável *pH* 5 ou 9, tendo uma discreta tendência para *pH* 5. Foi possível observar também que, quando utilizou a variável *pH* 7 o gradiente de coloração decresceu para a tonalidade verde o que mostrou uma menor biodegradação.

A bactéria *Bacillus* sp. 6F utilizada para a biodegradação do espiroclorofeno é um microrganismo isolado do solo do Cerrado reflorestado, o qual segundo Yamanda et al. (2005) possui valores de pH entre 4,5 e 5,5, porém estes valores podem variar de acordo com a frequência das chuvas, acidez do subsolo, a quantidade de calcário presente no mesmo além das modificações que os microrganismos podem sofrer com essas variações. Logo, é possível que o microrganismo se desenvolva melhor no pH 5.

A otimização do processo de biodegradação do *Esp.* quando a variável *pH* estava em nível 5 ocorreu devido ao microrganismo ser isolado do solo, onde o *pH* pode variar entre 4 e 5 (INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS, 2016a). Sendo assim, ao ambientalizar o meio de cultura do microrganismo para o *pH* 5 conseguiu-se otimizar o processo de biodegradação. Por conseguinte, a combinação da variável *pH* com nível 5, com a variável *rotação* com nível 200 *rpm* a biodegradação do *Esp.* foi aprimorada, atingindo cerca de 98% de biodegradação do pesticida nesta condição. Vale ressaltar que para todas as condições foram feitos controles bióticos e abióticos e ambos não promoveram a biodegradação do pesticida.

Figura 32. Gráfico de superfície de resposta obtido por meio do *Planejamento fatorial* para as variáveis *pH* e *rotação* na biodegradação do espiroclorofeno pela bactéria *Bacillus* sp. 6F.

A Figura 33, p. 124 ilustra as combinações das variáveis *temperatura* e *pH* e quais dos níveis testados influenciaram na biodegradação do *Esp.* Observou-se uma tendência da coloração vermelha para as extremidades do gráfico quando associado *pH* 5 ou 9 à *temperatura* com nível mais alto (40°C), obtendo-se assim maiores valores de biodegradação.

Os resultados obtidos neste trabalho com base no *PF* corroboraram com a literatura, na qual, em processos de biodegradação para a betaína via consórcio bacteriano as variáveis que mais influenciaram foram a temperatura, oxigenação, seguida pelo pH (CIBIS, E., 2011). Assim, como observado no gráfico de superfície de resposta (Figura 33), a interferência do *pH* no processo de biodegradação do *Esp.* foi observado também quando foi realizada a análise de variância ANOVA (Tabela 13, pag. 117), na qual, foi a terceira variável dentre as estudadas que mais interferiu na biodegradação.

A obtenção da tendência no gráfico de superfície de resposta (Figura 39) para valores maiores de biodegradação do *Esp.* quando utilizou o pH mais ácidos ou básicos deveu-se à bactéria *Bacillus* sp. 6F ter sido isolada do solo do cerrado. Neste contexto segundo Shahgholi e Ahangar (2014) o pH do solo desempenha um papel importante, em particular para a adsorção de pesticidas e este processo afeta a biodegradação tanto no meio biótico como abiótico. Além de que, de acordo com Rath et al. (1998), o efeito do pH em biodegradação de xenobiótico por microrganismo isolados do solo dependerá também do fato do composto ser susceptível à hidrólise.

Sendo assim, o *Esp.* é um agroquímico em que a estrutura possui ligação éster, na qual, é susceptível a hidrólise, sendo esta, ácida ou básica, e assim pode-se justificar a tendência observada no gráfico (Figura 33) para *pH* 5 e 9 quando utilizado temperaturas maiores (IRANZO et al., 2001). Vale ressaltar como citado na metodologia que para todos os experimentos realizados os controles bióticos e abióticos foram feitos, os quais não tiveram interferência nas reações.

Figura 33. Gráfico de superfície de resposta obtido por meio do *Planejamento fatorial* para as variáveis *temperatura* e *pH* na biodegradação do espiroclorofeno pela bactéria *Bacillus* sp. 6F.

Para observar a similaridade existente nas condições realizadas para a biodegradação do *Esp.* plotou-se o diagrama de árvore para as nove condições realizadas (Figura 34). É importante destacar que a escolha do corte da linha de distância pelo diagrama de árvore (método de ligação simples) é realizada com base nos resultados que melhores se adaptaram ao diagrama de árvore e, que melhor possam justificar os resultados obtidos (HAIR et al., 2009). Assim, foi possível observar para os dados obtidos que propondo como linha de distância 20, tem-se a formação de dois *clusters*.

O primeiro *cluster* foi formado pelas condições 1, 5, 6, 8 e 9, a formação deste grupo deu-se devido às condições terem menores valores de biodegradação do pesticida com concentrações de $0,00 \pm 0,00$, $0,00 \pm 0,01$, $15,2 \pm 0,43$, $21,3 \pm 5,79$ e $7,8 \pm 1,55$ mg L⁻¹, respectivamente. O segundo *cluster* foi formado pelas condições 3 e 7 que foram as que melhores biodegradaram o *Esp.* com concentrações de $96,3 \pm 0,92$ mg L⁻¹ e $88,5 \pm 1,19$ mg L⁻¹, respectivamente. As condições 2 e 4 ficaram isoladas das demais, isto porque apresentaram valores de biodegradação que não foram similares as demais, para a

condição 2 obteve-se $52,4 \pm 3,84 \text{ mg L}^{-1}$ de biodegradação e, para a *condição 4* obteve-se $69,6 \pm 2,21 \text{ mg L}^{-1}$.

Logicamente estes resultados podem ser alterados, por exemplo, a extensão de biodegradação do *Esp.* pode ser maximizada por maior tempo de reação com as bactérias que apresentaram menores valores nestas condições.

Figura 34. Dendograma representando os agrupamentos das condições obtidas por meio do *Planejamento fatorial* sem interferência do meio abiótico mostrando as similaridades das condições em relação a biodegradação do espiroclorofeno pela bactéria *Bacillus* sp. 6F.

Obtendo as melhores condições (Figura 34) *meio de cultura Peptona G*, pH 5, temperatura 40°C e rotação 200 rpm o processo de biodegradação por meio do PF foi otimizado. Essa condição possibilitou a biodegradação de $87,6 \pm 1,17 \text{ mg L}^{-1}$ do *Esp.* por meio da bactéria *Bacillus* sp. 6F não havendo interferência do meio abiótico, ou seja, o microrganismo foi o único a promover a biodegradação.

Dentre as condições realizadas no PF apenas a *condição 3* apresentou interferência do meio abiótico, sendo os 96% de biodegradação obtido em 3 dias, 32% foi referente às condições do *meio de cultura* (abiótico).

5.3.1. B) Biodegradação do espiroclorofeno *versus* tempo de reação (min) pelas bactérias *Bacillus* sp. 6F e *Bacillus* sp. CSA-21

Um novo dendograma de árvore (Figura 35) foi plotado para as discussões sobre os estudos das reações realizadas, levando em consideração a interferência do meio abiótico no período de 3 dias de reação, visto que dentre as condições avaliadas a *condição 3* teve interferência do meio de cultura, sendo que do valor de 96% de biodegradação obtida em 3 dias, 32% foi referente ao *meio de cultura* (controle abiótico).

A partir do dendograma foi possível observar a formação de um grande *cluster* formado pelas *condições 1, 5, 6, 8 e 9* que tiveram menores valores para a biodegradação do *Esp.*, o qual foi similar ao obtido na Figura 13 (Seção 4.2.2). A *condição 7* ficou isolada dos demais *clusters*, tendo um melhor valor para a biodegradação do *Esp.*, similarmente ao ocorrido na Figura 13 (Seção 4.2.2).

Figura 35. Dendograma representando os agrupamentos das condições obtidas por meio do *Planejamento fatorial* com a interferência do meio abiótico mostrando as similaridades das condições com relação a biodegradação do espiroclorofeno pela bactéria *Bacillus* sp. 6F com 3 dias de reação.

Sendo assim, os estudos das condições realizadas foram discutidas em dois grupos, o *cluster* formado pelo melhor valor de biodegradação (*condição 7*) e o *cluster* formado pelos menores valores de biodegradação do *Esp.* (*condição 1, 5, 6, 8 e 9*) (Figura 26).

A melhor condição para a biodegradação foi a *condição 7* (*Caldo Nutriente, pH 5, 40°C, 130 rpm*) (Figura 42). Nesta condição, a reação ocorreu com 88% de biodegradação no período de 3 dias de reação. Com o avanço do tempo reacional obteve-se 93% de biodegradação com 9 dias de reação. Neste caso, não se verificou a influência do meio abiótico.

A formação do metabólito **H1** foi observado pelo estudo do tempo, porém a sua formação não acompanhou a biodegradação do pesticida, sendo de 43% em 3 dias de reação e 65% em 9 dias de reação. No entanto, foi observado uma biodegradação quase que total do pesticida, possivelmente outros metabólitos foram formados, os quais não foram detectados por CLAE-UV. Sendo assim, análises por LC-MS/MS foram realizadas e, os possíveis metabólitos de biodegradação serão discutidos mais adiante.

Figura 36. Gráfico da reação para a biodegradação do espiroclorofeno (100 mg L^{-1}) versus tempo de reação (dias) para o metabólito **H1** durante 3, 6 e 9 dias em agitador orbital (130 rpm, 40°C) utilizando a linhagem da bactéria *Bacillus* sp. 6F para a *condição 7*.

A *condição 1* (*Peptona G, pH 5, 24°C, 60 rpm*), *condição 5* (*Solução salina, pH 7, 40°C, 60 rpm*), *condição 6* (*Solução salina, pH 9, 24°C, 130 rpm*), *condição 8* (*Caldo Nutriente, pH 7, 24°C, 200 rpm*) e *condição 9* (*Caldo Nutriente, pH 9, 32°C, 60 rpm*) foram as que apresentaram menores valores de biodegradação, com 0% para a *condição*

1 e condição 5, 8% para a condição 9, 15% para a condição 6 e 21% para a condição 8 em 3 dias de reação utilizando a bactéria *Bacillus* sp. 6F (Figura 37).

Figura 37. Gráfico da reação de biodegradação do espirodiclofeno (100 mg L^{-1}) versus tempo de reação (dias) e para o metabólito **H1** durante 3, 6 e 9 dias em agitador orbital (60 rpm, 24°C- condição 1; 200 rpm, 32°C- condição 5; 130 rpm, 24°C- condição 6; 200 rpm, 24°C- condição 8; 60 rpm, 24°C- condição 9) utilizando a linhagem da bactéria *Bacillus* sp. 6F.

Observou-se um crescimento lento da bactéria *Bacillus* sp. 6F nos 3 primeiros dias de reação na presença do pesticida *Esp*. A lentidão no crescimento da bactéria pode ter ocorrido em virtude da condição do meio estar em temperatura baixa, como foi o caso das condições 1, 6 e 8 (24°C) ou rotação baixa, fornecendo pouca oxigenação para a bactéria utilizar, como foi o caso das condições 5 e 9 (60 rpm).

Com o decorrer do tempo de reação foi possível obter 28% de biodegradação do pesticida para a *condição 1*, 40% para a *condição 5* e 65% para a *condição 9* durante 9 dias de reação. Uma tendência no aumento da biodegradação com o decorrer do tempo foi observada a partir do estudo do tempo de reação. Sendo assim, como o microrganismo teve crescimento lento, seriam necessários maiores tempos de reação para que maiores valores de biodegradação ocorressem.

Para as *condições 6* e *8* com 9 dias de reação ocorreu 81% e 68% da biodegradação do *Esp.*, respectivamente. Durante o período de reação observou-se que a *condição 6* teve um bom crescimento do microrganismo a partir dos 6 dias de reação, tendo uma tendência para também aumentar a biodegradação do *Esp.* com o decorrer do tempo.

Para a *condição 8* também observou-se um bom desenvolvimento do microrganismo a partir do 6 dias de reação, porém para esta condição a biodegradação apresentou uma tendência de linearidade, possivelmente devido a temperatura da condição ser considerada baixa (24°C) para o crescimento de bactérias do gênero *Bacillus* e, combinando com o *pH 7* possibilitou uma baixa atividade enzimática do microrganismo nestas condições.

Assim, como os resultados obtidos em relação às temperaturas para este trabalho, estudos realizados por [Ni et al. \(2016\)](#) observaram que a biodegradação do pesticida pedimetalina por microrganismos do gênero *Bacillus* foram mais eficientes em temperatura acima de 30°C. Nestes estudos, os autores reportaram uma biodegradação de 99%, tendo como concentração inicial 100 mg L⁻¹ de pedimetalina (Esquema 26). A biodegradação não foi realizada em valores de menores temperatura devido a ausência de crescimento do *Bacillus subtilis* Y3.

Esquema 26. Reação de biodegradação da predimetalina pelo microrganismo *Bacillus subtilis* Y3.

Dentre as cinco condições realizadas observou-se que apenas na *condição 1* a percentagem de biodegradação do *Esp.* (27%) foi similar à obtida para o metabólito **H1** (23%). Tendo as demais condições a formação de 29% para a *condição 5*, 40% para a *condição 6*, 27% para a *condição 8* e 35% para a *condição 9* do metabólito **H1**. Logo, na maioria das condições realizadas possivelmente a biodegradação do *Esp.* pode ter formado outros metabólitos que não foram detectados por CLAE-UV, sendo assim, análises por LC-MS/MS foram realizadas para a identificação de possíveis outros metabólitos (dados discutidos adiante).

Para as análises obtidas por CLAE-UV será discutida a *condição 7*, pois foi a que melhor biodegradou o pesticida *Esp.*

Na Figura 38-A observou-se que na *condição 7* ocorreu apenas a formação do composto **H1** no tempo de retenção de 24,956 min. Foi possível observar quase que total desaparecimento do pesticida, além da formação de **H1** (Figura 38- B).

Assim, a reação ocorreu apenas via biótica. Sendo assim, a combinação dos níveis de *pH 5* e *temperatura 40°C* para a *condição 7* favoreceram o desenvolvimento do microrganismo e a formação de 65% do metabólito **H1** em 9 dias de reação. Sabendo-se que a enzima responsável pela hidrólise em cepas de *Bacillus* é a carboxilesterase, pode-se concluir que esta condição favoreceu uma maior produção da enzima por *Bacillus* sp. 6F. Nesta condição, a reação controle não degradou o pesticida.

Figura 38. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV (A) e suas ampliações (B) para a biodegradação do espirodiclofeno (100 mg L^{-1}) durante 3, 6 e 9 dias em agitador orbital (130 rpm , 40°C) utilizando a linhagem da bactéria *Bacillus* sp. 6F para a *condição 7*.

Condições de análise: Coluna C-18: O material foi eluído com uma mistura de 0,5% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,5% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-15 min, 20% B, 0,5 fluxo; 15-16 min, 20% B, 0,7 fluxo; 16-49 min em 75% B, 1,0 fluxo (gradiente linear). A temperatura do forno foi de 40°C , fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $10 \mu\text{L}$.

O estudo da melhor condição obtida pelo *PF* (*Peptona G*, *pH 5*, temperatura 40°C e rotação 200 rpm) para a biodegradação do *Esp.* foi realizada no período de 2 e 3 dias de reação. Pelo tempo da reação (Figura 39) foi possível observar que com 2 dias ocorreu 57% de biodegradação do pesticida e obteve-se 25% do metabólito **H1**, a reação finalizou-se com 88% de biodegradação do *Esp.* e 33% de formação do metabólito **H1**.

Foi observado também a partir da cinética das reações uma tendência no aumento da biodegradação do pesticida com o decorrer do tempo reacional. Comparando o resultado da *condição PF* com as demais condições realizadas pelo *PF* no período de 3 dias, tem-se que a *condição PF* apresentou resultados semelhantes à *condição 7*, sendo a biodegradação de 88% para ambas as condições e, a formação do metabólito **H1** de 65% para a *condição 7* e 33% para a *condição PF*.

Figura 39. Gráfico da reação para a biodegradação do espirodiclofeno (100 mg L^{-1}) versus tempo de reação (dias) e para o metabólito **H1** durante 3, 6 e 9 dias em agitador orbital (200 rpm, 40°C) utilizando a linhagem da bactéria *Bacillus* sp. 6F para *Planejamento fatorial*.

A partir dos cromatogramas obtidos por meio das análises de CLAE-UV para *PF* (Figura 40) foi possível observar a detecção do metabólito **H1** e a diminuição na intensidade de absorção do sinal no cromatograma de UV do *Esp.* Observou-se também que não houve a detecção do metabólito **H1** no controle abiótico, comprovando que esta reação ocorreu apenas por via biótica. Os demais picos detectados na reação foram metabólitos presentes no controle biótico da reação.

Figura 40. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV (A) e suas ampliações (B) para a biodegradação do espirodiclofeno (100 mg L^{-1}) durante 2 e 3 dias em agitador orbital (200 rpm, 40°C) utilizando a linhagem da bactéria *Bacillus* sp. 6F para *Planejamento fatorial*.

Condições de análise: Coluna C-18: O material foi eluído com uma mistura de 0,5% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,5% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-15 min, 20% B, 0,5 fluxo; 15-16 min, 20% B, 0,7 fluxo; 16-49 min em 75% B, 1,0 fluxo (gradiente linear). A temperatura do forno foi de 40°C , fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $10 \mu\text{L}$.

Após ter realizado os estudos para a biodegradação do *Esp.* com a bactéria *Bacillus* sp. 6F isolada do Cerrado reflorestado e, obtendo-se a condição *PF*, este foi aplicado à biodegradação do *Esp.* com um microrganismo isolado das folhas de laranjeiras nas condições *PF*, visto que, o objetivo inicial deste trabalho seria biodegradar o pesticida *Esp.* utilizado no cultivo de citros, através de microrganismos isolados do próprio habitat da cultura da laranja.

A reação de biodegradação do pesticida *Esp.* versus o tempo de reação (dias) pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 (Figura 41) mostrou que com 2 dias de reação obteve-se 93% de biodegradação do pesticida e, com 3 dias de reação alcançou 96%. A cinética da reação apresentou uma tendência de linearidade. Para a formação do metabólito **H1** foram obtidos 24% em 2 dias de reação e 36% para 3 dias.

Figura 41. Gráfico da reação para a biodegradação do espirodiclofeno (100 mg L^{-1}) versus tempo de reação (dias) e para o metabólito **H1** durante 2 e 3 dias em agitador orbital (200 rpm, 40°C) utilizando a linhagem da bactéria isoladas das folhas de laranjeira *Bacillus* sp. CSA-21 para *Planejamento fatorial*.

Os cromatogramas obtidos para a reação *PF* com a bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 (Figuras 42-A e 42-B) mostram a presença do composto **H1** e outros metabólitos com tempo de retenção em aproximadamente 6, 9 e 11 min que não foram identificados. A detecção do pico próximo em 10 min também foi confirmada nas condições 1, 3, 5, 7 e 9 que foram as condições realizadas em pH ácido ou básico.

Comparando os resultados obtidos pela *PF* tanto para a bactéria *Bacillus* sp. 6F quanto para *Bacillus* sp. CSA-21 observou-se que a biodegradação utilizando o

microrganismo isolado da citricultura apresentou melhor resultado, sendo a percentagem de biodegradação de 93% em 2 dias de reação, enquanto que para o *Bacillus* sp. 6F foi de 57% no mesmo período.

Figura 42. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV (A) e suas ampliações (B) para a biodegradação do espiroclorofeno (100 mg L^{-1}) durante 2 e 3 dias em agitador orbital (200 rpm , 40°C) utilizando a linhagem da bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 para *Planejamento fatorial*.

Condições de análise: Coluna C-18: O material foi eluído com uma mistura de 0,5% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,5% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-15 min, 20% B, 0,5 fluxo; 15-16 min, 20% B, 0,7 fluxo; 16-49 min em 75% B, 1,0 fluxo (gradiente linear). A temperatura do forno foi de 40°C , fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$ e volume de injeção de $10 \mu\text{L}$.

5.3.2. C) Identificação do metabólito 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespиро[4.5]dec-3-en-2-ona **H1** obtido pela biodegradação do espirodiclofeno por meio das bactérias *Bacillus* sp. 6F e *Bacillus* sp. CSA-21

Com os resultados obtidos para todas as nove condições testadas e para a melhor condição obtida pelo *PF* da biodegradação do *Esp.*, procedeu-se para a identificação do principal produto de biodegradação.

Segundo Demaeght et al. (2013) um dos metabólitos obtidos em análises após a biodegradação com o ácaro *Tetranychus urticae* partindo do composto *Esp.* foi o 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespиро [4.5] dec-3-en-2-ona **H1**. Este metabólito pode ser obtido pela hidrólise da ligação éster do *Esp.* por enzimas da classe das hidrolases. Assim, decidiu-se sintetizar o metabólito **H1** em meio básico. Após a reação de síntese do metabólito **H1** foi realizado o processo de extração, nesta etapa já foi possível a obtenção do metabólito puro com rendimento de 98%, não sendo necessários demais procedimentos de purificação.

Análises por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas, infravermelho e RMN (^1H e ^{13}C) foram realizadas para caracterizar o metabólito 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespиро [4.5] dec-3-en-2-ona **H1**. No cromatograma obtido por CG-EM (Figura 43) foi observado que a substância apresentou um tempo de retenção de 30,800 min. No espectro de massas (Figura 44) observou-se o íon molecular $\text{M}^+ 312$ u.m.a, o pico base foi o m/z 186 u.m.a (100%) seguido dos picos m/z 123 u.m.a (40%), m/z 249 u.m.a (40%), m/z 277 u.m.a (40%) e m/z 55 u.m.a (35%).

Figura 43. Cromatograma obtido por CG-EM (70 eV) do composto sintetizado o 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaspiro[4.5]dec-3-en-2-ona **H1**.

Figura 44. Espectro de massas obtido por CG-EM (70 eV) do composto sintetizado o 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaspiro[4.5]dec-3-en-2-ona **H1**.

Com o espectro de absorção na região do infravermelho (Figura 45) foi observado a banda em 3144 cm^{-1} característica de estiramento O-H. A presença das bandas na região entre 3000 e 2840 cm^{-1} são característicos da presença de carbonos sp^3 . Foi possível observar também, um estiramento de forte intensidade em 1705 cm^{-1} , característico de $\nu\text{ C=O}$, para absorção de carbonila de ésteres, devido a ocorrência do efeito de ressonância da ligação $\beta\text{-C=O}$ do composto, o qual promoveu uma diminuição na absorção do estiramento. A absorção na região de 1658 cm^{-1} é característica de estiramento C=C e, as bandas na região de 1598 e 1481 cm^{-1} são características de estiramento C=C do anel aromático (PAVIA et al., 2010).

Figura 45. Espectro de infravermelho do composto 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaspiro[4.5]dec-3-en-2-ona **H1**.

Pela análise do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6), (Figura 46) verificou-se a presença de três sinais em δ 7,66 (1H, *d*, $J = 1,96$ Hz), δ 7,44 (1H, *dd*, $J = 8,32$ e $2,20$ Hz) e δ 7,32 (1H, *d*, $J = 8,07$) atribuídos aos hidrogênios metínicos em C-3, C-5 e C-6 do anel aromático, respectivamente. Foi possível observar também os deslocamentos em δ 1,87 (2H, *m*), 1,71 (3H, *m*), 1,56 (4H, *m*) e 1,25 (2H, *m*) característicos de hidrogênios metilênicos do anel cicloexânico (PAVIA et al., 2010).

Figura 46. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) para o composto 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespiro [4.5] dec-3-en-2-ona **H1**

Pela análise de RMN-1D ^{13}C (Figura 47) verificou-se a presença de 16 sinais de carbono e que está de acordo com a estrutura do composto. Foi possível verificar a presença de um grupo carbonila em δ 180,9 (C-2') característico de função éster e, sinal característico de carbono insaturado ligado ao átomo de oxigênio em δ 170,9 (C-4'). Observou-se ainda o deslocamento em δ 82,6 (C-3') característico de carbono insaturado, bem como, deslocamento em δ 70,2 (C-1'). Na região do aromático foi possível observar os deslocamentos em δ 135,5 (C-4) e δ 134,4 (C-2) de carbonos ligados a halogênios e os deslocamentos em δ 128,6 (C-3), δ 133,6 (C-5) e δ 129,0 (C-6) característico de carbonos metínicos de aromáticos. Além de três sinais de carbonos metilênicos com deslocamento em δ 32,9 (C-5' e C-9'), δ 22,0 (C-6' e C-8') e δ 24,4 (C-7').

Todas as atribuições dos sinais de RMN ^1H e ^{13}C também foram comparadas com dados simulados obtidos no programa ChemBioFraw versão 11.0.

Figura 47. Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) para o composto 3-(2,4 diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespiro [4.5] dec-3-en-2-ona **H1**

Realizada as análises de IV, CG-EM e RMN para ^1H e ^{13}C comprovou-se que o composto sintetizado foi o 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespiro [4.5] dec-3-en-2-ona **H1**.

A partir da identificação do composto foi possível realizar a quantificação do mesmo nas nove condições estabelecidas na biodegradação e, na melhor condição obtida, realizadas por meio do *PF*. O composto **H1** foi analisado por CLAE- UV nas mesmas condições que as reações de biodegradação do *Esp*. O metabólito **H1** apresentou absorção no tempo de retenção de 24,956 min e foi observado também no mesmo comprimento de onda do *Esp*. em 266 nm (Figura 48).

Figura 48. Cromatograma do composto de biodegradação **H1** e do pesticida espiroclorfenol por CLAE-UV obtido pela bactéria *Bacillus* sp. 6F.

Condições de análise: Coluna C-18: O material foi eluído com uma mistura de 0,5% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,5% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-15 min, 20% B, 0,5 fluxo; 15-16 min, 20% B, 0,7 fluxo; 16-49 min em 75% B, 1,0 fluxo (gradiente linear). A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 10 µL.

O composto **H1** foi o único metabólito biodegradado do espiroclorfenol que pode ser sintetizado e isolado. Pelas quantificações realizadas por CLAE-UV todo o pesticida foi biodegradado, porém não foi detectado demais metabólitos pela análise por CG-EM. Então optou-se por realizar análises por LC-MS para detectar possíveis metabólitos formados, com a obtenção dos cromatogramas do controle biótico e com a reação de biodegradação do espiroclorfenol em 3 dias. Desta forma pode-se averiguar a detecção de outros picos, e assim confirmar que outros metabólitos foram formados, como pode ser observado na Figura 49.

Figura 49. Cromatogramas obtidos por análises de LC-MS. (A) Comparação do controle biótico e a reação de biodegradação do espiroclorfenol (100 mg L⁻¹) pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 32°C e 3 dias. (B) Cromatogramas dos possíveis metabólitos obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida espiroclorfenol.

Condições de análise: Coluna C-18: o material foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-40 min, 5-100% B; 40-50 min, 100% B. A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, com split 1/4 pós- coluna e volume de injeção de 30 µL. O tempo de retorno foi de 10 min.

Com isso, foram feitas novas análises, porém utilizando a técnica de espectrometria de massas com LC-MS para a obtenção das massas e a fragmentação, e assim possibilitar a identificação de possíveis metabólitos do espiroclorfenol obtidos pela bactéria *Bacillus* sp. 6F e *Bacillus* sp. CSA-21. A ionização realizada para a obtenção das massas dos metabólitos por LC-MS/MS foi realizada em modo *electrospray* positivo. Nessas fontes os íons são produzidos pela adição de um íon positivo podendo ser estes $[M+H]^+$, $[M+NH_4]^+$ e $[M+Na]^+$ (WEI 2018). Assim, todas as massas apresentadas nestes estudos tiveram o valor adicional de $[H]^+ = 1,0078$. Logo, foram detectados os fragmentos m/z 313, 5199, m/z 158, 0292, m/z 214, 0943, m/z 116, 1095 e m/z 121, 0331 (Figura 50). Estes fragmentos foram obtidos para os picos com tempo de retenção **H1** = 27,2 min, **Esp.- M1** = 24,3 min,

Esp.- M2 = 24,3 min, **Esp.- M3** = 11,8 min, **Esp.- M4** = 28,2 min e **Esp.- M5** = 35,1 min referente à Figura 55.

Figura 50. Espectro de massas obtidos por LC-MS/MS para a obtenção de possíveis metabólitos da biodegradação do espiroclorofeno pelas bactérias *Bacillus* sp. 6F e *Bacillus* sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 40°C em 3 dias.

Continuação

São poucos os dados na literatura que relataram a biodegradação do pesticida *Esp.* por microrganismos, como apresentado na *Introdução*. Grande parte dos estudos demonstraram os produtos obtidos a partir do pesticida *Esp.* por métodos sintéticos, os quais foram utilizados (Seção 1.4.) para auxiliar na identificação de alguns compostos e consequentemente propor uma possível rota de biodegradação do espirodiclofeno.

A Figura 51 (p. 150) mostra a proposta de uma provável via de biodegradação do espirodiclofeno, tendo os metabólitos detectados por LC-MS/MS neste estudo circutados em vermelho. Os primeiros metabólitos obtidos foram o 2,2-dimetilbutanamida **Esp.- M1** (m/z 115, 10) e o **H1** (m/z 312, 04), a enzima que pode possibilitar este tipo de biodegradação é a carboxilesterase (E_1). A carboxilesterase é uma enzima que atua em pH de 7 a 9 (ZHANG, J. et al., 2018). As reações realizadas por *Bacillus* sp. 6F e *Bacillus* sp. foram inicialmente preparadas em pH 5, porém foi observado que conforme ocorreu o crescimento das células bacterianas o pH das reações tornava-se mais básicos isso, pode ter favorecido a produção da enzima E_1 que foi responsável pela hidrólise da função éster em conjunto com a enzima amidase (E_2) que pode ter realizada a transformação da função ácido carboxílico em amida, consequentemente a atuação da mesma na biodegradação do espirodiclofeno (Esquema 28).

Esquema 27. Biodegradação do espirodiclofeno pela bactéria *Bacillus* sp. 6F e *Bacillus* sp. CSA-21.

Dados na literatura relataram a biodegradação do composto fitalato de etila pela linhagem de *Sphingobium yanoikuyae* SHJ por ação da enzima carboxilesterase. Neste estudo o composto foi biodegradado em ~85% em fitalato de monoetila nas condições 150 rpm, 30°C em 24 h (WANG, Y. et al., 2018) (Esquema 28). A linhagem *Bacillus* sp. é capaz de produzir a enzima carboxilesterase segundo Kumar et al. (2018). Sendo assim, sabendo que a E_1 pode realmente realizar hidrólise de ligação éster, possivelmente a biodegradação do pesticida *Esp.* pode ter ocorrido por E_1 .

Esquema 28. Biodegradação do fitalato de etila por *Sphingobium yanoikuyae* SHJ.

Já existe dados na literatura relatando a obtenção do metabólito **H1**. Demaeght et al. (2012) relataram a obtenção do metabólito **H1** através da biodegradação do espirodiclofeno utilizando o ácaro *Tetranychus urticae*. A toxicidade do composto **H1** foi testada frente a atuação do ácaro *T. urticae*, neste estudo foram avaliadas a toxicidade do composto no estágio de vida adulta do ácaro, visto que o pesticida não consegue atuar neste estágio, atuando na espécie apenas em período de larva. Como resultado foi observado que o composto **H1** foi 90 vezes mais tóxico ao ácaro do que o próprio espirodiclofeno. Não há dados na literatura sobre a obtenção da 2,2-dimetilbutanamida por biodegradação, sendo este possivelmente o primeiro relato do mesmo partindo do espirodiclofeno.

Para a obtenção do metabólito 3-(4-cloro-2-(metilamina)fenil)-4-metoxi-1-oxiespiro[4,5]dec-3-em-2-ona **Esp.- M2** (m/z 321,11) é possível que várias etapas

enzimáticas tenham acontecido para a sua formação. A obtenção do metabólito **Esp.- M2** a princípio parte do metabólito **H1** que pode sofrer uma metilação na hidroxila, pela atuação da enzima metiltransferase (E_3), formando assim o intermediário com **Esp.- I1** m/z de 326,05, em seguida ocorre a ação da enzima haloalcano desalogenase (E_4) realizando a retirada de um átomo de cloro do anel aromático. Posteriormente é possível que tenha ocorrido a ação de uma superoxidase dismutase de manganês (E_5), assim formando o intermediário **I3** m/z 337,07 e finalizando a enzima nitro redutase (E_6) com 2NAD(P)H para levar a formação do 3-(4-cloro-2-(metilamina)fenil)-4-metoxi-1-oxiespiro[4,5]dec-3-em-2-ona **Esp.- M2** (m/z 321,11). Os metabólitos intermediários para a formação do 3-(4-cloro-2-(metilamina)fenil)-4-metoxi-1-oxiespiro[4,5]dec-3-em-2-ona **Esp.- M2** (m/z 321,11) não foram detectados. Não há relatos na literatura da obtenção deste metabólito proveniente do **H1** por biodegradação (Esquema 29).

Esquema 29. Proposta de biotransformação do metabólito 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespíro[4.5]dec-3-en-2-ona **H1** pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21.

Kunjapur et al. (2016) e Bennett et al. (2017) relataram a biotransformação do composto 3,4-di-idroxibenzaldeído por metiltransferase (E_3) de linhagens bacterianas do gênero *Bacillus* sp. em 4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído (58%) e 3-hidroxi-4-metoxibenzaldeído (Esquema 30). Já as haloalcanos desalogenase (E_4) foi utilizada para a biodegradação do composto 1,2-dibrometano (98%) via *Bradyrhizobium japonicum*, a reação ocorreu em a 25°C em matriz de sol-gel.

Esquema 30. Biotransformação do composto 3,4-di-idrobenzaldeído por metiltransferase.

Outro possível metabólito do espiroclorofeno detectado foi o 4-cloro-2-(metilamina)fenol **Esp.- M3** com m/z 157,02 que pode ter sido obtido partindo da 3-(4-cloro-2-(metilamina)fenil)-4-metoxi-1-oxiespiro[4,5]dec-3-em-2-ona) **Esp.- M2** e posteriores atuação enzimáticas de alcanos hidroxilase (E₆) para a formação do intermediário **Esp.- I5** com m/z de 253,05, a carboxilesterase (E₁) pode produzir o intermediário **Esp.- I6** com m/z 271,06, posteriormente é possível que tenha ocorrido uma descarboxilação pela enzima descarboxilase (E₈) fornecendo o intermediário **Esp.- I7** com m/z de 227,07 seguida de uma hidroxilação pela enzima hidroxilase (E₉) para a formação do metabólito **Esp.- I8** com m/z de 243,07 e posteriormente a formação do metabólito detectado 4-cloro-2-(metilamina)fenol **Esp.- M3**. Assim, como citado anteriormente para os outros metabólitos, não há relatos na literatura da produção do metabólito **Esp.- M3** (m/z 157,02) por biodegradação do espiroclorofeno (Esquema 31).

Esquema 31. Proposta de biotransformação do metabólito 3-(4-cloro-2-(metilamina)fenil)-4-metoxi-1-oxiespiro[4,5]dec-3-em-2-ona) **Esp.- M2** em 4-cloro-2-(metilamina)fenol **Esp.- M3** pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21.

Uma das enzimas utilizadas no processo de biotransformação de **Esp.- M2** para **Esp.- M3** pode ser a alcano hidroxilase (E₇). As E₇ são enzimas muito utilizadas na biodegradação de hidrocarbonetos. Kadri et al. (2018) relataram a biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo por linhagens de *Alcanivorax borkumensis*. A biodegradação de biodiesel e diesel também foi realizada por E₇ via *Serratia marcescens* (SOUZA, et al. 2016).

O metabólito metil 2-(4-cloro-2-(metilamina)fenil)acetato **Esp.- M4** com m/z de 213,09 e em equilíbrio tautomerico com o (Z)-2-(4-cloro-2-(metilamina)fenil)-1-metoxieten-1-ol **Esp.- M4** também com m/z de 213,06, foram formados partindo-se do intermediário (Z)-3-cloro-2-(metilamina)fenil-2-metoxiprop-2-en-1-ol **Esp.- I4** (m/z 227,07), o qual sofreu uma biotransformação via álcool desidrogenase (E₁₀) com a atuação de NAD(P)⁺ e NAD(P)H, produzindo o composto **Esp.- I9** com m/z de 225,06, por seguinte foi biotransformado via formaldeído desidrogenase (E₁₁) produzindo o **Esp.- M4** (Esquema 32).

Esquema 32. Proposta de biotransformação do intermediário (Z)-3-cloro-2-(metilamina)fenil-2-metoxiprop-2-en-1-ol **Esp.- I4** no metabólito metil 2-(4-cloro-2-(metilamina)fenil)acetato ou (Z)-2-(4-cloro-2-(metilamina)fenil)-1-metoxieten-1-ol **Esp.- M4** pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21.

As álcool desidrogenases (E_{10}) são enzimas que realizam a oxidação ou redução de compostos carbonilados e são enzimas dependentes de NAD(P)^+ e NAD(P)H (CRABB, D. W.; MATSUMOTO, M.; CHANG, D.; YOU, M. 2004). Para este estudo é possível que tenha ocorrido a oxidação do álcool primário do intermediário **Esp.- I4** ao respectivo aldeído resultando no intermediário **Esp.- I5**. Outra enzima utilizada para a formação do metabólito **Esp.- M4** pode ser uma formaldeído desidrogenase (E_{11}) que realizou o processo descarboxilação do intermediário **Esp.- I5**. Segundo Irla et al. (2014) e Arfman et al. (1992) bactérias do gênero *Bacillus* podem produzir as enzimas E_{10} quando estão sob estresse, como a variação de temperatura, pH e oxigenação. Assim, levando em consideração que as condições utilizadas foram condições diferentes do ambiente a qual a bactéria foi isolada possivelmente *Bacillus* sp. 6F e *Bacillus* sp. CSA-21 podem ter produzido a enzima E_{10} .

Os últimos prováveis metabólitos formados da biodegradação do espiroclorfenol por meio das bactérias *Bacillus* sp. 6F e *Bacillus* sp. CSA-21 foram o (Z)-hidroxi-3-fenilaldeído **Esp.- M5** com m/z de 148,02 e o 2-metoxi-1-fenilpropano-1,3-diol **Esp.- M6** com m/z de 182,09. Para a obtenção do (Z)-hidroxi-3-fenilaldeído **Esp.- M5** sugere-se que este foi obtido a partir do metabólito **H1**, que posteriormente sofreu a atuação das enzimas metiltransferase (E_3) por duas vezes seguidas, e então houve a atuação de uma alceno hidroxilase (E_7), carboxilesterase (E_1) e álcool desidrogenase (E_{10}) na presença de NAD(P)D^+ e NADP(H) (Esquema 33).

Já para a obtenção do metabólito 2-metoxi-1-fenilpropano-1,3-diol **Esp.- M6**, pode ter sido por duas rotas, a primeira partindo do **H1** que por sua vez sofre várias biotransformações por meio das enzimas metiltransferase (E_3), haloalceno desalogenase (E_4), alceno hidroxilase (E_7), carboxilesterase (E_1), descarboxilase (E_8), hidroxilase (E_9) e hidrogenase (E_{12}) ou partindo do intermediário **Esp.- I1** com m/z de 326,05 que sofre biotransformação via enzimas haloalceno desalogenase (E_4), alceno hidroxilase (E_7), carboxilesterase (E_1), descarboxilase (E_8), hidroxilase (E_9) e hidrogenase (E_{12}) (Esquema 34).

Esquema 33. Proposta de biotransformação do 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespиро[4.5]dec-3-en-2-ona (**H1**) no metabólito (Z)-hidroxi-3-fenilaldeído **Esp.- M5** e 2-metoxi-1-fenilpropano-1,3-diol **Esp.- M6** pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21.

Vale ressaltar que pesquisas foram realizadas nas bases de dados SciFinder, *ScienceDirect* e *Web of Science* (acesso em maio de 2018) e acredita-se que este seja o primeiro relato destes possíveis metabólitos da biodegradação do pesticida espirodiclofeno por *Bacillus* sp. 6F e *Bacillus* sp. CSA-21.

Destaca-se que a rota proposta de biodegradação foi sugerida a partir de possíveis estruturas com base em LC-MS/MS. Contudo, a sequência da rota enzimática pode ter seguido outros caminhos, e não necessariamente os que foram exemplificados na Figura 51.

A biodegradação do metabólito **H1** por *Bacillus* sp. CSA-21 igualmente para o espiroclorofeno foi analisada por LC-MS/MS (Figura 52) e então foi constatado a detecção dos picos com m/z de 158,0297, 182,1370, 195,1543, 211,1115, 227,1438 e 261,1287 na forma $[M+H]^+$. Vale destacar que os controles bióticos e abióticos para a reação de biodegradação do metabólito **H1** foram realizadas e ambas não apresentaram influência sob a biodegradação do mesmo.

Figura 52. Comparação entre os cromatogramas obtidos por análises de LC-MS/MS. (A) Comparação do controle biótico e a reação de biodegradação do metabólito **H1** (100 mg L⁻¹) pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 32°C e 3 dias. (B) Cromatogramas dos possíveis metabólitos obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do **H1**.

Condições de análise: Coluna C-18: o material foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-40 min, 5-100% B; 40-50 min, 100% B. A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, com split 1/4 pós- coluna e volume de injeção de 30 µL. O tempo de retorno foi de 10 min.

Com os valores dos dados de massas obtidas por LC-MS/MS para a reação com o metabólito **H1** comparou-se então os metabólitos formados da biodegradação do espiroclorofeno. O único metabólito detectado em ambos os casos foi o 4-cloro-2-(metilamino)fenol **Esp.- M3** com m/z de 157,02 quando ionizado m/z de 158,02 $[M+H]^+$. Demais massas detectadas foram diferentes. Logo, buscou-se os prováveis metabólitos e conseguiu-se propor a obtenção do mais três metabólitos dentre os picos detectados,

sendo estes o (*E*)-1-fenilprop-1-eno-1,2,3-triol **H1-1** com m/z de 180,13, para o metabólito **H1-2** com m/z de 194,14, sendo este o metabólito 2,3-dimetoxi-3-fenilpropanal **H1-2**. O último metabólito identificado com m/z de 210,11, possivelmente pode ter sido o ácido 2,3-dimetoxi-3-fenilpropanoico **H1-3** (Figura 53). As enzimas envolvidas na biodegradação do metabólito **H1** pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 serão discutidas adiante.

Figura 53. Espectro de massas obtidos por LC-MS/MS para a obtenção de possíveis metabólitos da biodegradação do metabólito **H1** pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 40°C em 3 dias.

Continuação

A rota de biodegradação do metabólito 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespиро[4.5]dec-3-en-2-ona **H1** no metabólito 4-cloro-2-(metilamina)fenol **M3** com m/z 157,02, possivelmente foi similar a rota proposta partindo do pesticida espirodiclofeno. Sendo assim, o metabólito **H1** foi biodegradado envolvendo varias etapas. As quais já foram discutidas anteriormente (Figura 60).

Para obtenção do metabólito (*E*)-1-fenilprop-1-eno-1,2,3-triol **H1-1** com m/z de 180,13 considerou-se que este foi formado pela degradação do metabólito **H1** com atuação das enzimas haloalcano desalogenase (E_4), alcano hidroxilase (E_2), carboxilesterase (E_1), descarboxilase (E_8) e hidroxilase (E_9). Posteriormente **H1-1** foi biotransformado no metabólito (*E*)-2,3-dimetoxi-3-fenilprop-2eno-1-ol **H1-2** com m/z de 194,14 via metiltransferase (E_3) (Esquema 34).

Esquema 34. Biodegradação do metabólito 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespиро[4.5] dec-3-en-2-ona **H1** em (*E*)-1-fenilprop-1-eno-1,2,3-triol **H1-1** e este por sua vez em (*E*)-2,3-dimetoxi-3-fenilprop-2eno-1-ol **H1-2** pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21.

Por seguinte o composto (*E*)-2,3-dimetoxi-3-fenilprop-2eno-1-ol **H1-2** com m/z de 194,14 pode ter sido convertido no intermediário 2,3-dimetoxi-3fenilpropan-1-ol **I9** com m/z de 191,11 por ação enzimática de hidrogenase (E_{12}), este por sua vez possivelmente foi biotransformado no metabólito 2,3-dimetoxi-3-fenilpropanal **H1-2** por álcool desidrogenase (E_{21}) e finalizando a possível rota de biodegradação para o

metabólito **H1** por *Bacillus* sp. CSA-21 o composto 2,3-dimetoxi-3-fenilpropanal **H1-2** foi biotransformado no ácido 2,3-dimetoxi-3-fenilpropanoico **H1-3** por aldeído deisrogenase (E₂₀) (Figura 54).

Figura 54. Possíveis metabólitos obtidos da biodegradação do composto **H1** pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21, nas condições de 200 rpm, 40°C, 3 dias de reação.

Possíveis metabólitos detectados por LC-MS/MS.

Vale ressaltar que a rota proposta de biodegradação foi sugerida a partir de possíveis estruturas com base em LC-MS/MS. Entretanto, a via enzimática pode ter seguido outras alternativas, e não necessariamente as que foram demonstrada, isso também foi pertinente as rotas dos pesticidas tiametoxam e imidacloprido que serão discutidas adiante.

5.3.1. D) Aplicação da melhor condição obtida para a biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 isolada da citricultura da laranja

A partir da condição de biodegradação pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 otimizada para o pesticida espiroclorfenol, realizou-se então a biodegradação dos pesticidas tiametoxam e imidacloprido nas mesmas condições (200 rpm, 40°C) no período de 3, 6 e 9 dias com meio de cultura *Peptona G* e pH 5. Porém, quando realizou-se o crescimento em meio de cultura líquido as células bacterianas de *Bacillus* sp. CSA-21 não se desenvolveram durante as primeiras 24 h. O tempo de crescimento então foi estendido para 48 h, mesmo assim, não houve desenvolvimento microbiano. Assim, optou-se por modificar o meio de cultura, trocou-se a *Peptona G* por *Caldo Nutriente*, com a mudança do meio de cultivo as células bacterianas desenvolveram-se no período de 24 h.

É possível que o não crescimento do microrganismo no meio de cultura *Peptona G* não ocorreu devido as fontes de nutrientes não serem suficientes para a bactéria, visto que *Bacillus* sp. CSA-21 ficou um período de 6 meses preservada em -80°C. O meio de cultura *Caldo Nutriente* torna-se um meio mais enriquecido por ser proveniente de um extrato de carne bovina com vitaminas e aminoácidos (ACUMÉDIA, 2018). Logo, as reações de biodegradação com tiametoxam e imidacloprido por *Bacillus* sp. CSA-21 foram realizadas em *Caldo Nutriente*.

Como resultado da biodegradação do tiametoxam utilizando a condição MCT-1 foi possível alcançar 64% da biodegradação do pesticida tiametoxam em 3 dias de reação obtendo 36% de pesticida residual. Com o decorrer do tempo a bactéria continuou realizando a biodegradação do mesmo, atindo 86% de biodegradação, tendo como residual do tiametoxam 14%. A reação foi finalizada com 9 dias e o valor final de biodegradação do neonicotinoide foi de 92% com residual de 8%. Os controles abióticos

não demonstraram biodegradação do pesticida, logo a biodegradação foi realizada pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21, controles bióticos também foram realizados, não ocorrendo interferentes (Tabela 14).

O pesticida tiametoxam é um neonicotinoide muito utilizado em diversas fases na agricultura e em diversificadas culturas incluindo em citros. Dados na literatura relataram que o agroquímico possui rápida dissipação (3 dias) no solo quando aplicado fazendo com que venha causar uma maior contaminação do solo (JUNIOR, R. P. S.; RIGITANO, R. L. O. 2012). Lopes et al. (2015) relataram a biodegradação do pesticida tiametoxam por fungos filamentosos *Paecilomyces lilacinus* e *Trichoderma* sp. Realizou-se a biodegradação com 50 mg L⁻¹ do pesticida nas condições 130 rpm, 30°C em 72 h. Como resultado foi obtido o residual de 0,5% do tiametoxam via *Trichoderma* sp. e 0,6% via *Paecilomyces lilacinus*. Os metabólitos formados não foram detectados.

Tabela 14. Biodegradação do pesticida tiametoxam (100 mg L⁻¹) pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a condição MCT-1.

Tempo (3 dias)	Pest. Resi.* (%)	Tempo (6 dias)	Pest. Resi. (%)	Tempo (9 dias)	Pest. Resi. (%)
**Repli.-1	37	Repli.-1	16	Repli.-1	10
Repli.-2	35	Repli.-2	15	Repli.-2	7
Repli.-3	36	Repli.-3	12	Repli.-3	8
Média (%)	36		14		8
Desvio Padrão	1,11		2,20		1,73
Controle abiótico	>99		>99		>99
Desvio Padrão	0,59		0,43		0,67

*Pest. Resi. = Pesticida residual

**Repli. = Replicata

Estes resultados foram plotados em um gráfico para o pesticida residual *versus* o tempo de reação (Figura 61) para uma melhor visualização dos dados. Foi possível observar que durante os primeiros três dias a taxa de biodegradação do tiametoxam pelo microrganismo foi maior quando comparado com o decorrer do tempo de reação. A biodegradação continuou ocorrendo, porém em uma taxa menor do que nos primeiros dias. Isso pode ser devido as bactérias possuírem rápido desenvolvimento de suas células nos primeiros dias e com o passar do tempo as células bacterianas começam a morrer (BROCK, 2004). Vale ressaltar que após cada período de experimento um novo repique em meio de cultura líquido foi realizado e com isso foi observado menor crescimento de colônias com o decorrer dos dias.

Figura 55. Pesticida residual *versus* tempo de reação para a biodegradação do tiametoxam (100 mg L^{-1}) pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a condição MCT-1.

Como os resultados obtidos no primeiro experimento para o tiametoxam não foram tão satisfatórios como os realizados para o espiroclorfenol, o qual teve sua biodegradação quase que total em 2 dias. Então, resolveu-se realizar novos experimentos (Seção 4.5.4. - MCT-2). Nestas condições os resultados obtidos foram mais promissores quando comparado ao experimento anterior, visto que nos três primeiros dias de reação a média de pesticida residual foi de 18%, o que evidenciou que foi biodegradado cerca de 82% do pesticida. A reação continuou a ser mais eficiente com o decorrer da extensão do tempo reacional, finalizando a biodegradação com um residual de 7% do pesticida após 9 dias (Tabela 15).

Tabela 15. Biodegradação do pesticida tiametoxam (100 mg L^{-1}) pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21, nas condições de 200 rpm 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a condição MCT-2.

Tempo (3 dias)	Pest. Resi.* (%)	Tempo (6 dias)	Pest. Resi. (%)	Tempo (9 dias)	Pest. Resi. (%)
**Repli.-1	17	Repli.-1	11	Repli.-1	7
Repli.-2	15	Repli.-2	11	Repli.-2	7
Repli.-3	23	Repli.-3	11	Repli.-3	8
Média (%)	18		11		7
Desvio Padrão	4,27		0,12		0,29
Controle abiótico	>98		>98		>98
Desvio Padrão	1,05		0,40		0,98

*Pest. Resi. = Pesticida residual

**Repli. = Replicata

Estes resultados foram plotados em um gráfico para o pesticida residual *versus* o tempo de reação para a condição MCT-2 (Figura 62). Neste foi possível observar que a curva de decaimento do pesticida ficou mais acentuada quando comparado à condição MCT-1 (Figura 56). A percentagem de degradação em 6 dias em relação a 9 dias foi de apenas 3%, evidenciando que a reação poderia permanecer por mais tempo e assim estabilizar em um maior valor de biodegradação do pesticida.

Figura 56. Pesticida residual *versus* tempo de reação para a biodegradação do tiametoxam (100 mg L^{-1}) pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a condição MCT-2.

Ainda com o objetivo de melhorar o processo de biodegradação outro experimento foi realizado (Seção 4.5.4. - MCT-3). Este mostrou-se menos eficiente que a condição MCT-2. Com 3 dias de reação foi possível obter a média percentual de 45% de pesticida residual, decaindo para 8% com seis dias de reação e finalizando a biodegradação no período de 9 dias com 5% de residual de tiametoxam (Tabela 16).

Todas as três condições testadas mostraram-se menos eficientes comparada com a biodegradação do espiroclorfenol, porém foi possível reduzir e biodegradar o tiametoxam em 55% com 3 dias atingindo 95% de biodegradação com 9 dias (Tabela 16). Assim, estes resultados foram interessantes, pois praticamente ocorreu uma biodegradação total do pesticida. Na literatura em geral há estudos de biodegradação do tiametoxam com fungos, consórcio de microrganismos e em solo. Assim, a bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 isolada da citricultura da laranja apresentou um potencial para promover a biodegradação do tiametoxam.

Tabela 16. Biodegradação do pesticida tiametoxam (100 mg L^{-1}) pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21, nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para MCT-3.

Tempo (3 dias)	Pest. Resi.* (%)	Tempo (6 dias)	Pest. Resi. (%)	Tempo (9 dias)	Pest. Resi. (%)
**Repli.-1	47	Repli.-1	7	Repli.-1	6
Repli.-2	45	Repli.-2	7	Repli.-2	5
Repli.-3	423	Repli.-3	10	Repli.-3	5
Média (%)	445		8		5
Desvio Padrão	2,21		1,64		0,51
Controle abiótico	>99		>99		98
Desvio Padrão	0,34		1,33		2,21

*Pest. Resi. = Pesticida residual

**Repli. = Replicata

Os dados obtidos foram plotados em um gráfico do pesticida residual *versus* o tempo de reação para a condição MCT-3 (Figura 57). Neste foi possível observar o decaimento da biodegradação do tiametoxam no período entre 3 e 6 dias, constatando assim que a reação ocorreu praticamente nesse período. Enquanto no intervalo entre 6 e 9 dias foi possível analisar uma tendência para a linearidade da biodegradação nesta metodologia MCT-3. Assim, sugere-se que entre as três metodologias testadas, a se que apresentou mais eficiente foi a metodologia MCT-3, na qual o pesticida foi adicionado após o período de adaptação do microrganismo em 24 h, não sendo necessário fazer a união celular ou a adição do pesticida no mesmo dia em que realizou o inóculo da bactéria.

Figura 57. Pesticida residual *versus* tempo de reação para a biodegradação do tiametoxam (100 mg L^{-1}) pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21, nas condições de 200 rpm 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a condição MCT-3.

Os dados experimentais plotados no gráfico do pesticida residual *versus* o tempo de reação para as três metodologias foram obtidos (Figura 58). Assim, foi possível observar que das três metodologias MCT-2 mostraram-se eficientes para a biodegradação do tiametoxam. Também foi possível observar que todos os experimentos no final de 9 dias de reação tiveram valores de biodegradação bem próximos, cujas reações realizadas com as três metodologias tenderam a uma linearidade de biodegradação, assim para as demais se o tempo de reação fosse prolongado poderia apresentar menores valores do pesticida residual.

Figura 58. Pesticida residual *versus* tempo de reação para a biodegradação do tiametoxam (100 mg L^{-1}) pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para as condições MCT-1, MCT-2 e MCT-3.

Dados na literatura mostraram a biotransformação do pesticida tiametoxam pela rizobactéria *Ensifer adhaerens* TMX-23 nas condições de 220 rpm, 30°C e 5 dias na concentração inicial do pesticida de 200 mg L^{-1} em meio mineral. As reações foram realizadas em triplicatas e promoveram a biotransformação de 96% do pesticida produzindo como metabólitos o (*E*)-*N*-(3-((2-clorotiazol-5-il)metil)-5-1,3,5-oxidiazinan-4-ilidene)nitroso amida e o 3-((2-clorotiazol-5-il)metil)-5-metil-1-,3,5-oxidiazinan-4-ona, os quais não foram quantificados. Os metabólitos obtidos foram identificados por análise LC-MS/MS e estão no Esquema 35 (ZHOU, et al., 2013).

Esquema 35. Biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria *Ensifer adhaerens* TMX-23.

Comparando os resultados obtidos no estudo com a bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 com os dados descritos por Zhou et al. (2014) para a biodegradação do tiametoxam ambos foram muito eficientes, visto que com 6 dias de reação a biodegradação por *Bacillus* sp. CSA-21 foi de 92% e com a *E. adhaerens* TMX-23 foi de 96%.

Não foi possível realizar o isolamento dos metabólitos obtidos da biodegradação do tiametoxam por *Bacillus* sp. CSA-21 por cromatografia em coluna. Então optou-se por realizar as análises por LC-MS/MS, para possibilitar uma proposta para a biodegradação para do pesticida. Foram feitas análises para as três condições testadas e com os cromatogramas verificou-se a presença de diferentes metabólitos. A Figura 65 trás os cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para as reações realizada em 3 dias para a condição MCT-1 comparando com o controle biótico no mesmo período.

Na Figura 59-A foi possível verificar a presença de diferentes picos que não constam no controle biótico da reação. Vale ressaltar que para o controle abiótico não foram feitas as análises de LC-MS/MS, visto que não houve a degradação do pesticida no mesmo conforme foi verificado por análises de CLAE-UV. Observando os diferentes picos buscou-se interpretar quais as massas e fragmentos destes para em seguida elaborar uma possível via de biodegradação do tiametoxam por *Bacillus* sp. CSA-21.

Na Figura 59-B tem-se alguns valores de massas encontradas e os referentes picos detectados. Foi possível obter os compostos na forma de $[M+H]^+$ com m/z de 250,0100, m/z 245,1400, m/z 195,1500, m/z 183,1300, m/z 181,1000, m/z 292,0200, m/z 248,0200, m/z 235,9900, m/z 194,0100 e m/z 191,9900.

Figura 59. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida tiametoxam por *Bacillus* sp. CSA-21 para a metodologia MCT-1. (A) Comparação entre controle biótico e a reação de biodegradação para a replicata 2 em 3 dias. (B) Cromatograma da reação de biodegradação para a replicata 2 no período de 3 dias e os picos detectados com suas referentes m/z .

Condições de análise: Coluna C-18; o material foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-40 min, 5-100% B; 40-50 min, 100% B. A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, com split 1/4 pós- coluna e volume de injeção de 30 μ L. O tempo de retorno foi de 10 min.

Com os cromatogramas obtidos pelas análises de 6 e 9 dias foi possível observar a detecção dos mesmos metabólitos obtidos com 3 dias de reação, porém foram detectados mais três metabólitos com massas diferentes sendo estes, m/z 193,1, m/z 181,1 e m/z 192,0 para ambos os períodos (6 e 9 dias) (Figura 60-A e B). Os espectros de massas LC-MS/MS estão no Apêndice-B. As análises foram realizadas em modo positivo possibilitando obter os íons $[M+H]^+$.

Figura 60. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 para a metodologia MCT-1. (A) Cromatograma da reação de biodegradação para a replicata 1 em 6 dias e os picos detectados com suas referentes m/z . (B) Cromatograma da reação de biodegradação para a replicata 2 em 9 dias e os picos detectados com suas referentes m/z .

Condições de análise: Coluna C-18: o material foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-40 min, 5-100% B; 40-50 min, 100% B. A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, com split 1/4 pós- coluna e volume de injeção de 30 μ L. O tempo de retorno foi de 10 min.

As análises para a metodologia MCT-2 em 3, 6 e 9 dias (Figura 61- A, B e C) foram detectados os mesmos picos com m/z similares às análises realizadas para a metodologia MCT-1. Observou-se também a semelhança na intensidade de alguns picos com o passar dos dias, um exemplo foi o pico com m/z de 191,9900, que teve um aumento significativo na intensidade quando comparado com 3 e 9 dias de reação. Além deste, foi

observado que o pico com m/z de 235,9900 detectado na metodologia MCT-1 já com 3 dias de reação e com intensidade significativa, foi detectado com intensidade inferior com a extensão do tempo reacional. Embora trata-se de uma análise qualitativa sugere-se que este composto deve ser sido biotransformado com um maior tempo reacional. Isso foi comprovado quando analisou os possíveis produtos de biotransformação (dado discutido adiante).

A diferença nas intensidades dos metabólitos obtidos também é possível que tenha ocorrido devido a diferença nas metodologias utilizadas. Para a metodologia MCT-1 não houve um período de adaptação das células bacterianas durante 24 h, assim que cultivou a bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 o agroquímico foi acrescentado. Enquanto que para a metodologia MCT-2 houve um período de adaptação das células por 24 h e após este período é que o agroquímico foi adicionado na reação.

De acordo com [Rabouille; Alberti \(2017\)](#) cada célula bacteriana tem as suas peculiaridades, como por exemplo, tempo de desenvolvimento e crescimento, adaptação ao meio em que foi inserido com relação ao meio que foi isolada, além da existência de adaptação ao estresse que também afeta as mudanças nas propriedades da organização celular. Sendo assim, é possível que ao utilizar as metodologias MCT-1, MCT-2 e MCT-3 tenha submetido as células bacterianas a um estresse e isso pode ter acarretado a esta a produzir enzimas necessárias para promover a biodegradação do tiametoxam levando a formação de diferentes metabólitos.

Figura 61. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 para a condição MCT-2. (A) Cromatograma da reação de biodegradação para a replicata 1 em 3 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes m/z . (B) Cromatograma da reação de biodegradação para a replicata 3 em 6 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes m/z . (C) Cromatograma da reação de biodegradação para a replicata 3 em 9 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes m/z .

Condições de análise: Coluna C-18: o material foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-40 min, 5-100% B; 40-50 min, 100% B. A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, com split 1/4 pós- coluna e volume de injeção de 30 µL. O tempo de retorno foi de 10 min.

As análises para a metodologia MCT-3 auxiliaram nas informações obtidas pelos resultados com MCT-1 e MCT-2. Na reação de biodegradação com 3 dias (Figura 68-A) foi possível observar a formação de apenas cinco metabólitos de biodegradação do pesticida tiametoxam, sendo que o metabólito com m/z 235,9900 foi obtido com baixa intensidade, assim como os demais metabólitos obtidos para esta reação (Figura 62-B e C). Logo, é possível constatar que para a biodegradação do pesticida tiametoxam por *Bacillus* sp. CSA-21 a melhor metodologia a ser utilizada foi com o microrganismo não submetidos em condições de estresse, ou seja, com a adição do pesticida no mesmo dia em que se realizou o inóculo da bactéria.

Figura 62. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 para a condição MCT-3. (A) Cromatograma da reação de biodegradação para a replicata 3 em 3 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes m/z . (B) Cromatograma da reação de biodegradação para a replicata 1 em 6 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes m/z . (C) Cromatograma da reação de biodegradação para a replicata 1 em 9 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes m/z .

Condições de análise: Coluna C-18: o material foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-40 min, 5-100% B; 40-50 min, 100% B. A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, com split 1/4 pós- coluna e volume de injeção de 30 µL. O tempo de retorno foi de 10 min.

A via de biodegradação proposta para o pesticida tiametoxam pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 inclui muitas das enzimas utilizadas na proposta de biodegradação do espiroclorfenol pela mesma linhagem. Um dos possíveis metabólitos obtidos foi o (*E*)-1-((clorotiazol-4-il)metil)-2-nitroguanidina **TM- T1** (m/z 234,99). Para a obtenção deste metabólito foi proposto este tenha sido proveniente da biodegradação do tiametoxam (m/z 291,02) por atuação das enzimas hidroxilase (E_9), hidrogenase (E_{12}), nitro redutase (E_6) com 2 NAD(P)H e posteriormente isoclorismatase (E_{13}), álcool desidrogenase (E_{10}) em conjunto com NAD(P)D⁺ e NAD(P)H e descarboxilase (E_8) (Esquema 36).

Esquema 36. Proposta de biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21

Partindo do (*E*)-1-((clorotiazol-4-il)metil)-2-nitroguanidina **TM- T1** é possível que tenha ocorrido a formação do intermediário com **TM- I1** m/z 207,03 pela atuação da enzima nitro redutase (E_6) com 2 NAD(P)H. Posteriormente, o mesmo sofreu ação da enzima amina oxidase (E_{15}) para a formação do metabólito *N*-((2-clorotiazol-4-il)metil)metanetrina **TM- T2** com m/z 192,02. Partindo deste, ocorreu a ação da enzima transaminase (E_{16}) para a formação do metabólito 1-((2-clorotiazol-4-il)metil)ureia **TM- T3** com m/z de 190,99 (Esquema 37).

Esquema 37. Proposta de biotransformação do metabólito (*E*)-1-((clorotiazol-4-il)metil)-2-nitroguanidina **TM- T1** em *N*-((2-clorotiazol-4-il)metil)metanetrina **TM- T2** e este em 1-((2-clorotiazol-4-il)metil)ureia **TM- T3** pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21.

O metabólito **TM- T3** possivelmente pode ter sido biotransformado no metabólito amino(((2-clorotiazol-4-il)metil)amino)metanol **TM- T5** com m/z de 193,01, que seguidamente sofre ação das enzimas transaminase (E_{16}) e álcool desidrogenase (E_{10}) para a formação do (((2-clorotiazol-4-il)metil)amina)metanodiol **TM- T6** com m/z de 193,99 que por sua vez pode dar origem ao metabólito (Z)-N-((clorotiazol-4-il)metileno)formamida **TM- T4** com m/z de 173,97 por um equilíbrio ente um gem-diol com um aldeído (Esquema 38).

Esquema 38. Biotransformação do metabólito 1-((2-clorotiazol-4-il)metil)ureia **TM- T3** em metabólito (Z)-N-((2-clorotiazol-4-il)metileno)formamida **TM- T4** e amino(((2-clorotiazol-4-il)metil)amino)metanol **TM- T5**, e este em (((2-clorotiazol-4-il)metil)amina)metanodiol **TM- T6** pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21.

Outra possível via de biodegradação pode ter ocorrido para a formação dos últimos dois metabólitos que são o 5-((2-clorotiazol-4-il)metil)-4-hidrazinil-1,3-oxazinano) **TM- T7** e o N-((E)-N-((Z)-(2-clorotiazol-4-il)metileno)-N'-nitrosocarbamimidoil)formamida **TM- T8**. Para a formação do 5-((2-clorotiazol-4-il)metil)-4-hidrazinil-1,3-oxazinano) **TM- T7** foi proposto que a biodegradação partiu diretamente do pesticida tiametoxam que sofreu atuação da enzima hidroxilase (E_9) para a formação do intermediário **TM- I2** com m/z 307,01.

Logo o intermediário **TM- I2** sofreu a atuação da enzima N-desalquilação (E_{13}) formando o intermediário com **TM- I3** com m/z de 277,00, seguidamente ocorre a formação do intermediário **TM- I4** com m/z de 261,00 pela ação da enzima nitro redutase (E_6) em, em seguida o intermediário **TM- I4** foi biotransformado no intermediário **TM- I5** com m/z de 279,02 por isoclorismatase (E_{14}), este foi convertido em **TM- I6** com m/z

de 274,99 por ação da enzima álcool desidrogenase (E_{10}), finalmente **TM- I6** foi convertido ao metabólito *N*-((*E*)-*N*-((*Z*)-(2-clorotiazol-4-il)metileno)-*N*'-nitrosocarbamidol)formamide **TM- T7** com m/z de 244,12 por descarboxilase (E_8) em em conjunto com NAD(P) D^+ e NAD(P)H (Esquema 41).

Esquema 39. Proposta de biotransformação do pesticida tiametoxam no metabólito 5-((2-clorotiazol-4-il)metil)-4-hidrazinil-1,3-oxazinano) **TM- T7** pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21.

Uma possível formação do *N*-((*E*)-*N*-((*Z*)-(2-clorotiazol-4-il)metileno)-*N*'-nitrosocarbamidol)formamida **TM- T8** pode ter ocorrido iniciando-se pelo intermediário **TM- I3** com m/z de 277,00, que sofreu ação enzimática de uma nitro redutase (E_6) formando o intermediário **TM- I4** com m/z de 261,01 que pode ter sido biotransformado no intermediário **TM- I5** com m/z de 279,02 pela enzima isoclorismatase (E_{13}), e este posteriormente foi biotransformado no intermediário **TM- I6** com m/z de 274,99 pela enzima álcool desidrogenase (E_{10}) com NA(P) D^+ e NAD(P)H. Seguidamente partindo do intermediário **TM- I6** ocorreu a formação do metabólito *N*-((*E*)-*N*-((*Z*)-(2-clorotiazol-4-il)metileno)-*N*'-nitrosocarbamidol)formamida **TM- T8** pela enzima descarboxilase (E_8) em junção com NA(P) D^+ e NAD(P)H (Esquema 42).

Esquema 40. Biotransformação do intermediário **TM- I3** (*E*)-*N*-(3-((2-clorotiazol-4-il)metil)-1,3,5-oxidaiazinan-4-ilideno)nitramida em *N*-((*E*)-*N*-((*Z*)-(2-clorotiazol-4-il)metileno)-*N*'-nitrosocarbamidol)formamida **TM- T8** pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21.

Logo, com base nos possíveis metabólitos formados pela biodegradação do pesticida tiamexomam, foi possível propor uma rota de biodegradação pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 (Figura 63). Contudo a rota proposta é uma sugestão de vias enzimáticas, sendo possível outros caminhos para promover a biodegradação do tiametoxam.

Figura 63. Proposta de via de biodegradação para o pesticida tiametoxam pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21.

Possíveis metabólitos identificados por LC-MS/MS

Busca na literatura utilizando as bases de dados *ScienceDirect*, *SciFinder*, *Web of Science* e *Scopus* (Acesso: maio de 2018) foram realizadas para averiguar a presença dos metabólitos obtidos pela biodegradação do pesticida tiametoxam por linhagens bacterianas, e assim poder averiguar se alguns dos possíveis metabólitos formados neste estudo já foram relatados.

Logo, dados de biodegradação do tiametoxam por consórcio bacteriano por linhagens de culturas provenientes do solo (*Pseudoxanthomonas*, *Agromyces*, *Mesorhizobium*, *Achromobacter*, *Ensifer* e *Microbacterium*) foi realizada nas condições utilizando Caldo Nutriente, 130 rpm, 30°C e em 30 dias de reação, partindo da concentração inicial de 50 mg L⁻¹. Como resultado foi possível a biodegradação de 78% do pesticida tiametoxam formando os metabólitos (*E*)-1-((2-clorotiazol-5-il)metil)-3-metil-2-nitroguanidine (**1A**), 3-(((2-clorotiazol-5-il)metil)amino)-4,6-dimetil-1,2,4-triazin-5(4H)-one (**2A**), 3-(((2-clorotiazol-5-il)metil)amino)-4,6-dimetil-1,2,4-triazin-5-ol (**3A**), (*E*)-*N*-(3-((2-clorotiazol-5-il)metil)-5-metil-1,3,5-oxadiazinan-4-ilideno)nitroso amida (**4A**), 3-((2-clorotiazol-5-il)metil-4-(1-diazenildeno)-5-metil-1,3,5-oxadiazinana (**5A**) e 3-((2-clorotiazol-5-il)metil-1,3,5-oxadiazinan-4-ona (**6A**). Para a identificação dos metabólitos foi utilizado a técnica de LC-MS/MS os quais não foram quantificados (Esquema 43) (ZHOU et al., 2013).

Comparando os resultados alcançados neste estudo com a bactéria *Bacillus* sp. CSA-21, observou-se que não foram detectados compostos resultantes do consórcio bacteriano. Não há relatos na literatura para os demais metabólitos obtidos pela biodegradação do tiametoxam por *Bacillus* sp. CSA-21.

Esquema 41. Biodegradação do tiametoxam por consórcio bacteriano (ZHOU et al., 2013).

5.3.2. E) Aplicação da melhor condição obtida para a biodegradação do pesticida imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 isolada da citricultura da laranja

Como para o tiametoxam, a condição de biodegradação pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 que foi otimizada para o pesticida espiroclorfenol, foi aplicada para o imidacloprido e não houve o crescimento celular. Logo, optou-se em utilizar o meio de cultura Caldo Nutriente, que já havia apresentado resultado para o crescimento celular com o pesticida tiametoxam. Desta maneira as reações de biodegradação para o imidacloprido foram realizadas em 200 rpm, 40°C, Caldo Nutriente, pH 5, 100 mg L⁻¹ no período de 3, 6 e 9 dias.

O imidacloprido é um inseticida neonicotínico pertencente a um grupo de inseticidas referido como o grupo cloronicotínico (KIDD e JAMES et al., 1991; COX et al., 1997), suas propriedades físicoquímicas permitem que seja utilizado de várias maneiras, incluindo aplicação foliar em sementes e caules (NAUEN et al., 2003; TOKIEDA et al., 1997).

O pesticida possui ação estomática (sistêmica) e em contato com o agente, liga-se aos receptores nicotínicos de acetilcolina (Ach) nas membranas pós-sinápticas dos neurônios e, portanto, medeia sua toxicidade (KIDD e JAMES et al., 1991; STOUGHTON et al., 2008). O imidacloprido possui maior especificidade em relação aos receptores de invertebrados de Ach do que os receptores de Ach de vertebrados. Porém, o uso extensivo de imidacloprido e outros neonicotinóides exerce efeitos adversos sobre espécies não-alvos, especialmente em insetos como as abelhas e a contaminação do solo e água. Desta forma realizou-se, o processo de biodegradação do pesticida imidacloprido utilizando as mesmas metodologias (MCI-1, MCI-1 e MCI-3) que foram realizadas para o tiametoxam.

Semelhantemente ao tiametoxam a primeira metodologia utilizada para a biodegradação do imidacloprido foi a MCI-1, substituindo o meio de cultura de Peptona G para o Caldo Nutriente. Como resultado foi obtido a biodegradação de 12% do pesticida imidacloprido em 3 dias de reação alcançando 88% de pesticida residual. Com o decorrer da reação a bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 promoveu a biodegradação do pesticida, em 27%, tendo como atingido 73% do imidacloprido residual em 6 dias de reação. A reação

foi interrompida em 9 dias, finalizando a biodegradação do neonicotinóide imidacloprido nesse período com 38% e com residual de 62%. Os controles abióticos não demonstraram biodegradação do pesticida, logo a biodegradação foi promovida pela ação da bactéria *Bacillus* sp. CSA-21. Controles bióticos também foram realizados, não ocorrendo interferentes (Tabela 17).

Tabela 17. Biodegradação do pesticida imidacloprido (100 mg L⁻¹) por *Bacillus* sp. CSA-21, nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a condição MCI-1.

Tempo (3 dias)	Pest. Resi.* (%)	Tempo (6 dias)	Pest. Resi. (%)	Tempo (9 dias)	Pest. Resi. (%)
*Repli.-1	90	Repli.-1	71	Repli.-1	61
Repli.-2	88	Repli.-2	75	Repli.-2	63
Repli.-3	85	Repli.-3	74	Repli.-3	60
Média (%)	88		73		62
Desvio Padrão	2,25		2,27		1,62
Controle abiótico	97		>99		>99
Desvio Padrão	0,69		0,20		0,45

*Pest. Resi. = Pesticida residual

**Repli. = Replicata

Os dados experimentais foram plotados no gráfico para o pesticida imidacloprido residual *versus* o tempo de reação (Figura 64). Neste estudo foi possível observar que durante os primeiros três dias o tempo de biodegradação do pesticida pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 foi lento, e assim a reação permaneceu durante 9 dias de reação. Após este período obteve-se a média de 13% de biodegradação do imidacloprido. Também foi observado que a biodegradação seguiu uma tendência aumentando com o decorrer dos dias. Vale destacar que após cada período de experimento um repique do meio líquido foi realizado e com isso foi observado visualmente um menor crescimento das colônias com o decorrer dos dias.

Figura 64. Pesticida residual *versus* tempo de reação para a biodegradação do imidacloprido (100 mg L⁻¹) pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a metodologia MCI-1.

Com a aplicação da metodologia MCI-2 foi verificar averiguar que os resultados mais promissores não foram alcançados. Quando comparada as metodologias MCI-1 (62%) e MCI-2 (67%), observou-se que não houve variação significativa na biodegradação do pesticida no final da reação para ambos os casos, tendo uma diferença de 6% para MCI-2. Assim, o pesticida residual de imidacloprido variou entre 4,8% em 3 dias até 32% em 9 dias. (Tabela 18).

Tabela 18. Biodegradação do pesticida imidacloprido (100 mg L⁻¹) por *Bacillus* sp. CSA-21, nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a condição MCI-2.

Tempo (3 dias)	Pest. Resi.* (%)	Tempo (6 dias)	Pest. Resi. (%)	Tempo (9 dias)	Pest. Resi. (%)
**Repli.-1	94	Repli -1	72	Repli -1	70
Repli -2	94	Repli -2	71	Repli -2	67
Repli -3	97	Repli -3	71	Repli -3	67
Média (%)	94		71		67
Desvio Padrão	1,60		0,20		1,60
Controle abiótico	>99		>99		>99
Desvio Padrão	0,32		0,89		1,09

*Pest. Resi. = Pesticida residual

**Repli. = Replicata

A Figura 65 mostra o declínio do pesticida residual imidacloprido *versus* o tempo de reação para a metodologia MCI-2. Neste experimento observou-se que houve um decaimento discreto na degradação do pesticida entre o período de 3 e 6 dias. Ainda que foi possível constatar que no período de 6 dias para 9 dias a curva tendeu a uma linearidade. Portanto, sugere que a partir deste período a degradação tende a estabilizar-se. Após o período de 9 dias de reação foram feitas repiques dos meios líquidos e observou-se que não houve mais crescimento da bactéria. Logo, concluiu-se que já não havia mais células viáveis o que justifica o término de 9 dias a degradação atingir um limite estável.

Figura 65. Pesticida residual *versus* tempo de reação para a biodegradação do imidacloprido (100 mg L⁻¹) pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a metodologia MCI-2.

A Tabela 19 apresenta os valores obtidos para a reação de biodegradação do imidacloprido utilizando-se da metodologia MCI-3 após 3, 6 e 9 dias de reação. A metodologia, por sua vez, demonstrou ser similar as anteriores não havendo variações significantes na biodegradação do neonicotinóide.

Tabela 19. Biodegradação do pesticida imidacloprido (100 mg L⁻¹) por *Bacillus* sp. CSA-21, nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a condição MCI-3.

Tempo (3 dias)	Pest. Resi.* (%)	Tempo (6 dias)	Pest. Resi. (%)	Tempo (9 dias)	Pest. Resi. (%)
**Repli.-1	75	Repli.-1	68	Repli.-1	62
Repli.-2	72	Repli.-2	68	Repli.-2	57
Repli.-3	73	Repli.-3	68	Repli.-3	64
Média (%)	72		71		67
Desvio Padrão	1,60		0,20		1,60
Controle abiótico	98		>99		98
Desvio Padrão	0,28		1,32		0,33

*Pest. Resi. = Pesticida residual

**Repli. = Replicata

Na Figura 66 tem-se o gráfico referente ao pesticida residual *versus* o tempo de reação para a metodologia MCI-3, no qual foi possível observar que houve um decaimento discreto na curva de biodegradação do imidacloprido para esta metodologia, bem como, observado para as metodologias anteriores no mesmo período de reação. Assim, foi averiguado que entre as três metodologias testadas nenhuma apresentou diferença relevante para a biodegradação do imidacloprido.

Figura 66. Pesticida residual *versus* tempo de reação para a biodegradação do imidacloprido (100 mg L⁻¹) pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias para a condição MCI-3.

A partir da análise dos dados de biodegradação para as três metodologias (Tabela 20), foi possível visualizar que, a diferença entre as metodologias testadas esteve apenas nos três primeiros dias de reação, onde o percentual de pesticida residual variou entre 6-28%. Além disso, vale destacar que a biodegradação após 3 dias de reação, para todas as metodologias testadas, não teve variação significativa como já relatado anteriormente (Tabela 20). Assim, a Figura 67 mostra visualmente que a diferença entre as metodologias no final de 9 dias não foi significativa.

Tabela 20. Comparação dos valores de biodegradação do imidacloprido (100 mg L^{-1}) obtidos para as metodologias MCI-1, MCI-2 e MCI-3 após 3, 6 e 9 dias de reação pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21.

Metodologias	Percentual de pesticida residual		
	3 dias	6 dias	9 dias
MCI-1	12	27	38
MCI-2	6	29	33
MCI-3	28	32	37

Figura 67. Comparação das metodologias MCI-1, MCI-2 e MCI-3 para o pesticida residual imidacloprido (100 mg L^{-1}) versus tempo de reação pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 nas condições de 200 rpm, 40°C no período de 3, 6 e 9 dias.

Logo, como para o tiametoxam, não foi possível realizar o isolamento dos metabólitos obtidos da biodegradação do imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21. Desta forma foram realizadas análises por LC-MS/MS para auxiliar em uma proposta de via de biodegradação. Pelas análises processadas para as três condições testadas foram obtidos os cromatogramas nos quais pode-se observar a detecção de alguns metabólitos. A Figura 74 apresenta os cromatogramas obtidos para as reações realizadas em 3 dias com a replicata de número dois.

Na Figura 68-A observou-se a presença de alguns picos que não estavam presentes no controle biótico da reação. Vale informar que para o controle abiótico não foram feitas as análises de LC-MS/MS, uma vez que não houve degradação do pesticida pelas análises realizadas previamente por CLAE-UV. Detectados os diferentes picos investigou-se por meio dos dados de massas obtidas uma possível via de biodegradação do agroquímico.

Na figura 68-B, obteve-se algumas massas encontradas e os referentes picos detectados. Assim, verificou-se possíveis metabólitos com m/z de 256,0591, m/z 245,1485, m/z 212,0565, m/z 211,0728, m/z 195,1488, m/z 193,1325, m/z 186,1333 e m/z 164,1069. Os valores de m/z referem-se aos valores de massa dos metabólitos mais o íon hidreto $[M+H]^+$.

Figura 68. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 para MCI-1. (A) Comparação entre controle biótico e a reação de biodegradação para a replicata 2 em 3 dias. (B) Cromatograma da reação de biodegradação replicata 2 em 3 dias e os picos detectados com suas referentes m/z .

Condições de análise: Coluna C-18; o material foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-40 min, 5-100% B; 40-50 min, 100% B. A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, com split 1/4 pós- coluna e volume de injeção de 30 μ L. O tempo de retorno foi de 10 min.

A Figura 69-A e 69-B mostra os cromatogramas das análises realizadas em 6 e 9 dias. Neste caso observou-se a detecção dos mesmos metabólitos obtidos com 3 dias de reação e não houve um aumento na intensidade dos mesmos. Logo, para as reações realizadas para a metodologia MCI-1, a bactéria *Bacillus* sp. CSA-21, não produziu diferentes metabólitos durante o decorrer do tempo de biodegradação ou biotransformação do pesticida imidacloprido.

Figura 69. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 para a metodologia MCI-1. (A) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 1 em 6 dias e os picos detectados com suas referentes m/z . (B) Cromatograma da reação da biodegradação replicata 2 em 9 dias e os picos detectados com suas referentes m/z .

Condições de análise: Coluna C-18: o material foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-40 min, 5-100% B; 40-50 min, 100% B. A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, com split 1/4 pós- coluna e volume de injeção de 30 µL. O tempo de retorno foi de 10 min.

Na metodologia MCI-2 em 3, 6 e 9 dias (Figura 70- A, B e C) foram detectados picos com as mesmas massas que para a metodologia MCI-1 como m/z 245,1485, m/z 213,1583, m/z 212,0565, m/z 211,0728 e m/z 164,1069, com intensidades semelhantes a metodologia MCI-1 (Apêndice-B). Porém, não foram detectados os picos com m/z de 195,1488 e m/z de 181,1333, os quais foram observados na metodologia MCI-1, com intensidades relevantes durante toda a reação e o pico de m/z 164,1069.

Análogo ao que ocorreu com as metodologias aplicadas para MCT-1 e MCT-2, houve diferença na detecção de alguns picos como também nas intensidades dos metabólitos obtidos. É provável que isso tenha ocorrido devido a bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 necessitar de um período de adaptação com as condições impostas, para posteriormente promover a biodegradação do imidacloprido e assim obter os metabólitos com m/z de 195,1488, m/z de 181,1333 e m/z de 164,1069 no período de 3 dias.

Figura 70. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21, MCI-3. (A) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 2 em 3 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes m/z . (B) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 3 em 6 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes m/z . (C) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 3 em 9 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes m/z .

Condições de análise: Coluna C-18: o material foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-40 min, 5-100% B; 40-50 min, 100% B. A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, com split 1/4 pós- coluna e volume de injeção de 30 μ L. O tempo de retorno foi de 10 min.

O imidacloprido é um dos neonicotinóides com mais estudos de biodegradação tanto por microrganismos bacterianos e fúngicos como em solos. Zhang et al. (2018) relataram a biodegradação do agroquímico por meio de um consórcio bacteriano isolados do solo, durante o período de 40 dias em condições ambientes (modo estático e 25°C). Como o resultado foi possível a biodegradação de 67% do pesticida e foram identificados 4 metabólitos, tais como, o (*E*)-*N*-(1-((6-cloropiridin-3-il)metil)-3-imidazolidin-2-ilideno)nitroso amida (**1D**), 1-((6-cloropiridin-3-il)metil)-3-imidazolidin-2-imina (**2D**), 1-((6-cloropiridin-3-il)metil)imidazolidin-2-ona (**3D**) e a 1-(piridina-3-ilmetil)imidazolidin-2-ona (**4D**). Os metabólitos obtidos foram identificados por CLAE-MS/MS, porém não foram quantificados (Esquema 44).

Esquema 42. Biodegradação do pesticida imidacloprido por consórcio bacteriano em solo (ZHANG, et al., 2018).

A Figura 71-A, B e C mostra os cromatogramas obtidos pelas análises por LC-MS/MS no período de 3, 6 e 9 dias. Comparando os cromatogramas obtidos para as três metodologias aplicadas MCI-1, MCI-2 e MCI-3 observou-se que apenas a metodologia MCI-1 apresentou diferentes picos, como por exemplo m/z 181.1333 (que será discutido adiante) em relação as demais. Logo, é possível afirmar que para a biodegradação do pesticida imidacloprido por *Bacillus* sp. CSA-21 com a obtenção de diferentes metabólitos, a melhor metodologia a ser utilizada foi com MCI-1.

Figura 71. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 para a metodologia MCI-3. (A) Cromatograma da relação de biodegradação da replicata 1 em 3 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes m/z . (B) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 3 em 6 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes m/z e (C) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 3 em 9 dias e os respectivos picos detectados com suas referentes m/z .

Condições de análise: Coluna C-18: o material foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-40 min, 5-100% B; 40-50 min, 100% B. A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, com split 1/4 pós- coluna e volume de injeção de 30 μ L. O tempo de retorno foi de 10 min.

Com os dados obtidos por LC-MS/MS foi observado a presença de prováveis metabólitos da biodegradação do imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21, porém com intensidades baixas. Mesmo havendo essa baixa intensidade conseguiu-se obter as m/z dos prováveis metabólitos do imidacloprido e assim propor uma via de biodegradação para o pesticida imidacloprido. Logo, semelhante ao ocorrido para o tiametoxam muitas das enzimas que provavelmente possibilitaram realizar o processo de biodegradação do espirodiclofeno, estiveram presentes na proposta para o imidacloprido.

Um dos possíveis metabólitos obtidos foi o tautômero 1-((6-cloropiridin-3-il)metil)-imidazolidin-2-imina **IM- I1** com m/z de 210,07, através da perda do grupo nitro (NO_2) do pesticida tiametoxam. Dados na literatura relatam a obtenção do 1-((6-cloropiridin-3-il)metil)-imidazolidin-2-imina (Desnitroguanidina) pela biodegradação do pesticida imidacloprido por *Pseudomonas* sp. 1G, o metabólito não foi quantificado (PANDEY, et al., 2009) (Esquema 45).

Esquema 43. Proposta de biodegradação do pesticida imidacloprido por *Bacillus* sp. CSA-21.

Posteriormente o metabólito **IM- I1** foi biotransformado pela atuação das enzimas haloalcano desalogenase (E_4), hidroxilase (E_9) e hidrogenase (E_{12}) para a obtenção do 5-((2-imino-2,3-diidro-1*H*-imidazol-1-il)metil)piridina-2-ol **IM- I2** com m/z de 192,13, com o auxílio de NAD(P)H e NAD^+ (Esquema 44). A produção do composto 5-((2-imino-2,3-dihidro-1*H*-imidazol-1-il)metil)piridina-2-ol por biodegradação do imidacloprido pela bactéria *Klebsiella pneumoniae* BCH1, já foi relatado por Phugare et al. (2013), o qual fez a biodegradação nas condições de meio de cultura Caldo Nutriente, 30°C em 7 dias de reação (Esquema 46).

Esquema 44. Proposta de biotransformação do metabólito 1-((6-cloropiridin-3-il)metil)-imidazolidin-2-imina **IM- 11** em do 5-((2-imino-2,3-dihidro-1H-imidazol-1-il)metil)piridina-2-ol **IM- 12** pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21.

Em seguida é possível que tenha ocorrido a biotransformação do composto 5-((2-imino-2,3-diidro-1*H*-imidazol-1-il)metil)piridina-2-ol **IM- 12** por ação das enzimas hidrogenase (E_{12}) e imina redutase (E_{17}) para a formação do metabólito 5-((2-aminoimidazoldin-1-il)metil)piridina-2-ol **IM- 13** com m/z de 194,14 (Esquema 47). A utilização das enzimas imina redutase (E_{17}) com atuação de NAD(P)H e NA(P)D⁺ para a redução de grupos imina foi relatado por Li et al. (2015) na biotransformação do grupo indol por *Paenibacillus lactis*. As reações foram realizadas nas condições de 180 rpm, 30°C e 7 dias (Esquema 48).

Esquema 45. Proposta de biotransformação do metabólito 5-((2-imino-2,3-dihidro-1H-imidazol-1-il)metil)piridina-2-ol **IM- 12** em 5-((2-aminoimidazoldin-1-il)metil)piridina-2-ol **IM- 13** pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21.

Esquema 46. Proposta de biotransformação de imina por *Paenibacillus lactis* LI, et al., (2015).

Outra possível rota de biotransformação pode ter ocorrido partindo do metabólito 5-((2-imino-2,3-diidro-1*H*-imidazol-1-il)metil)piridina-2-ol **IM- 12**, este por sua vez foi biotransformado no metabólito 1-((6-cloropiridin-3-il)metil)-imidazolidin-2-amina **IM-**

I4 com m/z de 212,15 por uma monamina oxidase (E_{19}), levantamentos bibliográficos feitos nas bases de dados *SciFinder*, *ScienceDirect*, *Web of Science* e *Scopus* para este estudo não mostraram a formação do 1-((6-cloropiridin-3-il)metil)-imidazolidin-2-amina por biodegradação a partir do pesticida imidacloprido. Em seguida o metabólito **I4** foi biotransformado pela ação enzimática de hidrogenase (E_{12}) em conjunto com NAD(P)H e NAD^+ , e produziu o metabólito 3-((6-cloropiridin-3-il)metil)-2,5-dihidro-1H-imidazol-2-amina **IM- I5** (Esquema 49).

Esquema 47. Biotransformação do metabólito 5-((2-imino-2,3-dihidro-1H-imidazol-1-il)metil)piridina-2-ol **IM- I2** em 1-((6-cloropiridin-3-il)metil)-imidazolidin-2-amina **IM- I4** e este em 3-((6-cloropiridin-3-il)metil)-2,5-dihidro-1H-imidazol-2-amina **IM- I5** pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21.

Uma nova via de biodegradação pode ter ocorrido iniciando pelo metabólito **IM- I4**, o qual pode ter sofrido ação da enzima hidroquilase (E_9) para a produção do metabólito **IM- I6** (Esquema 50). O composto **IM- I6** foi assim denominado, devido a poder existir três possibilidades com a mesma m/z 244,14 ($C_9H_{13}ClN_4O_2$) e por ser de baixa intensidade o espectro de massas do composto não ficou visivelmente com considerável fragmentação. Sendo assim o **IM- I6** pode ser *N*-(1-((6-cloropiridin-3-il)metil)imidazolidin-2-il)hidroxilamina, 2-amino-1-((6-cloropiridin-3-il)metil)imidazolidin-4-ol ou 2-amino-1-((6-cloropiridin-3-il)metil)imidazolidina-4,5-diol. Dos três possíveis compostos para **IM- I6** na literatura tem a produção do 2-amino-1-((6-cloropiridin-3-il)metil)imidazolidina-4,5-diol por degradação do imidacloprido utilizando radiação ultravioleta (Esquema 50) (SCHIPPERS, et al., 2008).

Esquema 48. Proposta de biotransformação do metabólito 1-((6-cloropiridin-3-il)metil)-imidazolidin-2-amina **IM-14** em no metabólito **IM-16** pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21.

Iniciando a partir do metabólito **IM-11** foi possível propor a obtenção do metabólito 3-(imidazolidin-1-metil)piridina **IM-17** com m/z de 163,10. Para a formação deste, várias etapas de biotransformação podem ter ocorrido. Assim a enzima transaminase (E_{16}) possivelmente converteu o metabólito **IM-16** no intermediário **IM-11** com m/z de 177,09, que por sua vez sofreu ação de uma haloalcano desalogenase (E_4) para a formação do intermediário **IM-12** com m/z de 179,11, posteriormente pode ter ocorrido a produção do intermediário **IM-13** com m/z de 161,10 pela enzima enolase (E_{20}) e finalmente este foi biotransformado no metabólito detectado 3-(imidazolidin-1-metil)piridina **IM-18** por hidrogenase (E_{12}) (Esquema 51).

Esquema 49. Proposta de biotransformação do metabólito 1-((6-cloropiridin-3-il)metil)-imidazolidin-2-imina **IM-11** em 3-(imidazolidin-1-metil)piridina **IM-17** pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21.

Dentre os picos detectados por LC-MS/MS não foi possível encontrar uma possível enzima capaz de realizar biotransformação do metabólito com m/z de 181,13. Sugere-se que este seja o 5-((3-imidazolidin-1-il)metil)-2,3-di-idropiridin-2-ol **IM-19** com fórmula molecular $C_9H_{14}N_3O$, que corrobora com os dados fornecidos pelo software do LC-MS/MS. A Figura 72 mostra uma possível rota de biodegradação do pesticida imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 sugerida neste estudo.

haloalcano desalogenase (E₄) NAD(P)H; NAD⁺
hidroxilase (E₉)
hidrogenase (E₁₂)
transaminase (E₁₆)
imina redutase (E₁₇)
monoamina oxidase (E₁₉)

5.3.3. F- Isolamento dos microrganismos da citricultura da laranja

A metodologia e resultado e discussão realizados no processo de isolamento dos microrganismos da citricultura da laranja estão descritos na Seção 7.1. Apêndice- A.

5.4. QUARTA ETAPA: Biodegradação dos pesticidas espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido em solo pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21

O processo de biodegradação de pesticidas *in situ* é uma das vias de sustentabilidade com maior estudo dentre os pesquisadores, tendo avançado com o decorrer dos últimos anos. A busca pela desintoxicação realizada ao meio ambiente pelo ser humano vem tornando-se uma prioridade entre os países, visto que, a contaminação das áreas agrícolas promove danos a curto e longo prazo. Logo, com o avanço desta linha de pesquisa, muitos pesquisadores procuram realizar os experimentos *in situ* simulando o próprio meio ambiente, ou seja, no solo e assim poder avaliar como ocorreria o processo de biodegradação de pesticida no solo ([HARMSSEN, H.; RIETRA, R. P. J. J. 2018](#)); ([JANCZAK et al. 2018](#)).

Sendo assim, após a obtenção dos resultados alcançados, estudos em solo foram realizados para averiguar a biodegradação dos pesticidas espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 isolada da citricultura da laranja. Os estudos foram realizados em solo recolhido do Cerrado reflorestado (Campus II) e os experimentos foram feitos em solo estéril e não esterilizado no período de 12 dias de reação (Seção 4.12).

Vale ressaltar que quando mencionado solo esterilizado refere-se ao solo autoclavado por 20 min à 120°C e o não esterilizado refere-se ao solo da maneira que está no meio ambiente.

5.4.1. Biodegradação do pesticida espirodiclofeno em solo pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21

Com a reação de biodegradação do pesticida espirodiclofeno pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 foi possível biodegradar 92% do pesticida, obtendo um residual de 7% do pesticida espirodiclofeno no período de 12 dias de reação, quando utilizado solo esterilizado. Já para o solo não esterilizado ocorreu a biodegradação de 43% do pesticida, obtendo assim o residual de 57% do espirodiclofeno.

A obtenção do melhor resultado para o solo esterilizado demonstrou que o microrganismo *Bacillus* sp. CSA-21 possui um potencial para a biodegradação do espirodiclofeno, porém foi possível observar pelos cromatogramas obtidos (Figura 73-A) que houve biodegradação do pesticida no controle abiótico, tendo ambos a detecção de três picos com alta intensidade em 25 min, e dois com intensidade menores com tempos de retenção de 22 e 26 min, os quais não foram identificados. Também foi observado a formação de um metabólito (**ESE-1**) que não estava presente no controle biótico e nem no abiótico.

A Figura 73-B mostra a comparação dos controles bióticos e abióticos com a reação de biodegradação em solo não esterilizado e observou-se que também ocorreu a degradação no controle abiótico produzindo o pico com elevada intensidade com tempo de retenção em 25 min, sendo este o mesmo detectado para o estudo em solo esterilizado. Além de averiguar a detecção de dois possíveis metabólitos (**ESN-1** e **ESN-2**) de biodegradação pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 com tempos de retenção de 19 e 31 min, os quais não foram identificados.

Logo, foi possível concluir que os controles abióticos interferiram na biodegradação do pesticida espirodiclofeno em ambos os solos (esterilizado e não esterilizado). Os possíveis metabólitos não foram identificados, pois não foi possível fazer as análises por LC-MS/MS.

Figura 73. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV das reações de biodegradação do pesticida espiroclorfenol pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 no período de 12 dias. (A) Comparação da reação de biodegradação do pesticida espiroclorfenol com o controle abiótico e biótico em solo esterilizado. (B) Comparação da reação de biodegradação do pesticida espiroclorfenol com controle abiótico e biótico em solo não esterilizado.

Condição de análise: Coluna C-18: o material foi eluído com uma mistura de 0,5% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,5% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-15 min, 20% B, 0,5 fluxo; 15-16 min, 20% B, 0,7 fluxo; 16-49 min em 75% B, 1,0 fluxo (gradiente linear). A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 10 µL. A detecção ultravioleta foi realizada em 266 nm.

5.4.2. Biodegradação do pesticida tiametoxam em solo pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21

Com a reação de biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 foi possível biodegradar 19% do pesticida, possibilitando um residual de 81% do pesticida no período de 12 dias de reação quando foi utilizado solo esterilizado. Já para o solo não esterilizado ocorreu a biodegradação de 44% do pesticida, obtendo assim o residual de 56% do tiametoxam. A obtenção do melhor resultado para o solo não esterilizado possivelmente pode ter ocorrido devido a presença de outros microrganismos que provavelmente influenciaram no processo de biodegradação. Vale ressaltar que foram realizados controles bióticos e abióticos e em ambos não ocorreu a biodegradação. [Zhou et al. \(2014\)](#) relataram a biodegradação de 78% do pesticida tiametoxam em solo esterilizado pela bactéria *Ensifer adhaerens* TMX-23 no período de 30 dias.

Comparando os dados obtidos neste estudo com a literatura em relação ao tempo de reação, observou-se que o período de reação para a biodegradação do tiametoxam pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 para o solo esterilizado foi curto.

A Figura 80 mostra os cromatogramas obtidos por CLAE-UV para os estudos de biodegradação do pesticida tiametoxam. Na Figura 74-A foi possível observar a comparação dos controles bióticos e abióticos com a reação de biodegradação em solo esterilizado e observou-se a detecção de um único possível metabólito (**TSE-1**) de biodegradação pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 com o tempo de retenção em 15 min, o qual não foi identificado. A Figura 74-B mostra a comparação dos controles bióticos e abióticos com a reação de biodegradação em solo não esterilizado e observou-se a detecção de dois possíveis metabólitos (**TSN-1** e **TSN-2**) de biodegradação pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 com tempos de retenção de 25,91 e 26 min, os quais não foram identificados. Os possíveis metabólitos não foram identificados, pois não foi possível fazer as análises por LC-MS/MS.

Figura 74. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV das reações de biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 no período de 12 dias. (A) Comparação da reação de biodegradação do pesticida tiametoxam com o controle abiótico e biótico em solo esterilizado. (B) Comparação da reação de biodegradação do pesticida tiametoxam com controle abiótico e biótico em solo não esterilizado.

Condição de análise: Coluna C-18: o material foi eluído com uma mistura de 0,5% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,5% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-35 min, 10% B; 35-40 min, 90% B. A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 10 µL. O tempo de retorno foi de 10 min. A detecção ultravioleta foi realizada em 277 nm.

5.4.3. Biodegradação do pesticida imidacloprido em solo pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21

Com a reação de biodegradação do pesticida imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 foi possível biodegradar 27% do pesticida, possibilitando um residual de 73% no período de 12 dias de reação quando foi utilizado solo esterilizado. Já para o solo não esterilizado ocorreu a biodegradação de 15% do pesticida, obtendo assim um residual de 85% do imidacloprido. A obtenção do melhor resultado para o solo esterilizado, mostrou que a bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 foi previamente adaptada para promover a biodegradação do imidacloprido em solo. Vale ressaltar que foram realizados controles bióticos e abióticos e em ambos não ocorreu a biodegradação do imidacloprido.

Comparando os dados obtidos neste estudo com a literatura citados na *Introdução* em relação ao tempo de reação observou-se que o período de reação para a biodegradação do imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 para o solo esterilizado foi curto.

A Figura 81 mostra os cromatogramas obtidos por CLAE-UV para os estudos de biodegradação do pesticida imidacloprido. Na Figura 75-A foi possível observar a comparação dos controles bióticos e abióticos com a reação de biodegradação em solo esterilizado e constatou-se a detecção de dois possíveis metabólitos (**IS-1** e **IS2**) de biodegradação pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 com tempos de retenções em 8,33 e 15,0 min, os quais não foram identificados. A Figura 75-B mostra a comparação dos controles bióticos e abióticos com a reação de biodegradação em solo não esterilizado e observou-se que não houve a detecção de possível metabólito de biodegradação do imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21.

Figura 75. Cromatogramas obtidos por CLAE-UV das reações de biodegradação do pesticida imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 no período de 12 dias. (A) Comparação da reação de biodegradação do pesticida imidacloprido com o controle abiótico e o biótico em solo esterilizado. (B) Comparação da reação de biodegradação do pesticida imidacloprido com controle abiótico e biótico em solo não esterilizado.

Condição de análise: Coluna C-18: o material foi eluído com uma mistura de 0,5% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,5% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-35 min, 10% B; 35-40 min, 90% B. A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 10 µL. O tempo de retorno foi de 10 min. A detecção ultravioleta foi realizada em 277 nm.

Conclusão

6. CONCLUSÃO

As bactérias *Bacillus* sp. 6D, *Bacillus* sp. 6F, *Bacillus* sp. 6H e *Bacillus* sp. 6I, foram capazes de realizar a biodegradação do pesticida esfenvalerato em meio de cultura Caldo Nutriente, obtendo o residual de 55%, 33%, 63% e 87%, respectivamente em 12 dias. A biodegradação do pesticida foi otimizada quando realizou-se o processo com com união das células em meio de cultura líquido com Solução Salina 0,86, alcançando o valor residual de 52% para *Bacillus* sp. 6D, 10% para *Bacillus* sp. 6F, 10% para *Bacillus* sp. 6H e 38% para *Bacillus* sp. 6I em 12 dias. Com as mesmas linhagens foi realizado estudo em consórcio, o qual possibilitou a a biodegradação 89% do esfenvalerato em 12 dias. Logo, concluiu-se que para os estudos com o esfenvalerato a metodologia com união das células em meio de cultura líquido com Solução Salina e a com consórcio bacteriano foram metodologias viáveis para a biodegradação do esfenvalerato.

Os metabólitos de biodegradação do pesticida esfenvalerato foram identificados e quantificados por padrão externo aplicando a técnica de CLAE-UV. Sendo estes, o ácido 3-hidroxibenzoico (22%) e o ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico (25%).

Para os estudos realizados para a biodegradação dos pesticidas espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido foram isoladas 55 linhagens de bactérias e 18 de fungos da espécie *Citrus sinensis*. Sendo as bactérias utilizadas para uma triagem com os pesticidas espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido.

Com a aplicação do *Planejamento fatorial*- Método Taguchi, para a biodegradação do pesticida espiroclorfenol com a bactéria *Bacillus* sp. 6F foi possível observar que dentre as nove condições testadas a que melhor biodegradou sem a interferência abiótica foi a *condição 7* (*Caldo Nutriente, pH 5, temperatura 40°C e rotação 130 rpm*) com 88% de biodegradação durante 3 dias de reação. O principal metabólito formado foi a 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaespíro [4.5] dec-3-en-2-ona **H1**.

A análise combinatória do planejamento indicou que as variáveis e níveis que mais influenciaram na biodegradação do espiroclorfenol foram *rotação (200 rpm)* e a *temperatura (40°C)*. A melhor condição obtida pelo *Planejamento fatorial*- Método Taguchi foram *meio de cultura Peptona G, pH 5, temperatura 40°C e rotação 200 rpm*. Aplicando esta condição para a biodegradação do espiroclorfenol pela bactéria *Bacillus*

sp. 6F obteve-se 88% de biodegradação e para a bactéria isolada da citricultura *Bacillus* sp. CSA-21 obteve-se 96% de biodegradação; ambos sem a interferência do meio abiótico no período de 3 dias.

Para a biodegradação dos pesticidas tiametoxam e imidacloprido três metodologias foram avaliadas a condição MCT-1 para tiametoxam e a condição MCI-1 para imidacloprido (com a união das células), MCT-2 e MCI-2 (sem a união das células e com período de adaptação de 24 h) e MCT-3 e MCI-3 (a união das células e sem período de adaptação de 24 h). Assim, foram possíveis a biodegradação do pesticida tiametoxam em 92% para a condição MCT-1, 82% para a condição MCT-2 e 95% para a condição MCT-3 no período de 9 dias. O pesticida imidacloprido foi biodegradado em 62% para MCI-1 e 67% para MCT-2 e MCT-3. Logo, para a biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 a melhor condição foi a condição MCT-3 e para o imidacloprido as metodologias não apresentaram diferenças significativas no percentual de biodegradação.

Os metabólitos formados para cada pesticida foram identificados por LC-MS/MS, para o espiroclorfenol foram identificados sete possíveis metabólitos, para o tiametoxam e imidacloprido foram identificados oito prováveis metabólitos e para o composto 3-(2,4-diclorofenil)-4-hidroxi-1-oxaspiro [4.5] dec-3-en-2-ona **H1** 4 metabólitos. As rotas de biodegradação foram propostas, sendo apontadas, a atuação de 21 enzimas.

Para as reações de biodegradação em solo esterilizado e não esterilizado para os pesticidas espiroclorfenol, tiametoxam e imidacloprido também foram realizadas, possibilitando a biodegradação de 92% para solo esterilizado e 43% não esterilizado para o espiroclorfenol em 12 dias de reação, porém com interferência do meio abiótico; 19% para solo esterilizado e 44% não esterilizado para o tiametoxam; 27% para solo esterilizado e 15% não esterilizado para o imidacloprido não havendo interferência dos controles bióticos e abióticos no período de 12 dias de reação.

Conclui-se assim, que as linhagens de bactérias *Bacillus* sp. 6F e *Bacillus* sp. CSA-21 apresentaram um elevado potencial para a biodegradação de pesticidas da classe dos piretróides, ácidos tetrônicos espirociclos (cetoenóis) e nicotínicos, possibilitando propor rotas de biodegradação para os mesmos e assim demonstrar a sustentabilidade e a

química verde hoje como métodos importantes para a descontaminação de agroquímicos no meio ambiente.

Referências

7. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA- ANVISA. **Agroquímico, herbicidas e pesticidas**. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 20 abril. 2018.

AHLSTEN, F. M.; POHJANVIRTA, K.; ANTTILA, T.; KOKKONEN, M.; JENSEN, T. T. K.; BOYE, M.; SUKURA, A.; PELKOLA, K.; PELKONEN, S. Neither hippurate-negative *Brachyspira pilosicoli* nor *Brachyspira pilosicoli* type strain caused diarrhoea in early-weaned pigs by experimental infection. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 46, n. 4, p. 257-267, 2005.

ALEKU, G. A.; FRANCE, S. P.; MAN, H.; MANGAS-SANCHEZ, J.; MONTGOMERY, S. L.; SHARMA, M.; LEIPOLD, F.; HUSSAIN, S.; GROGAN, G.; TURNER, N. J. A reductive aminase from *Aspergillus oryzae*. **Nature Chemistry**. v. 9, p. 961-969, 2017.

ALLINSON, G.; ZHANG, P.; BUI, A.; ALLINSON, M.; ROSE, G.; MARSHAL, S.; PETTIGROVE, V. Pesticide and trace metal occurrence and aquatic benchmark exceedances in surface waters and sediments of urban wetlands and retention ponds in Melbourne, Australia. **Environmental Science and Pollution Research**. v. 13, p.10214-10226, 2015.

ALVARINO, T.; SUAREZ, S.; LEMA, J.; OMIL, F. Understanding the sorption and biotransformation of organic micropollutants in innovative biological wastewater treatment Technologies- Review. **Science of the Total Environment**. v. 615, p. 297-306, 2018.

ALVES, A.; CORREIA, A.; IGUAL, J. M.; TRUJILLO, M. E. *Microbacterium endophyticum* sp. nov. and *Microbacterium halimidaclopridoonae* sp. nov., endophytes isolated from the salt-marsh plant *Halimidaclopridoone portulacoides* and emended

description of the genus *Microbacterium*. **Systematic and Applied Microbiology**. v. 37 p. 474-479, 2014.

AKINSEMOLU, A. A. The role of microorganisms in achieving the sustainable development goals. **Journal of Cleaner Production**, v. 182, p. 139-155, 2018.

ARFMAN, N.; DIJKHUIZEN, L.; KIRCHHOF, G.; LUDWIG, W., SCHLEIFER, K. H.; BULYGINA, E. S.; CHUMAKOV, K. M.; GOVORUKHINA, N. I.; TROTSSENKO, Y. A.; WHITE, D.; SHARP, R. J. *Bacillus methanolicus* sp. nov., a new species of thermotolerant, methanol-utilizing, endospore-forming bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**. v. 42, p. 439-445, 1992.

ARIFFIN, H.; ABDULLAH, N.; KALSOM, M. S. U.; SHIRAI, Y.; HASSAN, M. A. Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. **International Journal of Engineering & Technology**. v. 3, p. 4753, 2006.

AYTAR, P.; AKSOY, D. O.; TOPTAS, Y.; ÇABUK, A.; KOCA, S.; KOCA, H. Isolation and characterization of native microorganism from Turkish lignite and usability at fungal desulphurization. **Fuel**. v. 116, p. 634-641, 2014.

ATALAY, V. E.; ERDEM, S. S. A comparative computational investigation on the proton and hydride transfer mechanisms of monoamine oxidase using model molecules. **Computational Biology and Chemistry**. v. 47, p. 181-191, 2013.

BACH, E.; FERNANDES, G. C; PASSAGLIA, L. M. P. How to transform a recalcitrant *Paenibacillus* strain: From culture medium to restriction barrier. **Journal of Microbiological Methods**. v. 131, p. 135-143, 2016.

BACH, E.; LOPES, F. C.; BRANDELLI, A. Biodegradation of α and β -keratins by Gram-negative bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 104, p. 136-141, 2015.

- BACH, E.; DAROIT, D. J.; CORRÊA, A. P. F.; BRANDELLI, A. Production and properties of keratinolytic proteases from three novel Gram-negative feather-degrading bacteria isolated from Brazilian soils. **Biodegradation**. v. 22, p. 1191-1201, 2011.
- BARRETT, A. J.; TOLLE, D. P.; RAWLINGS, N. D. Managing peptidases in the genomic era. **Biological Chemistry**. v. 384, p. 873-882, 2003.
- BAYRAMOGLU, B; CHAKIR, R. The impact of high crop prices on the use of agro-chemical inputs in France: A structural econometric analysis. **Land Use Policy**. v. 55, p. 204-211, 2016.
- BASSY, O.; J-M, O.; ORTEGA, M. V.; GRANJA, C.; CABRIA, J. C. Rapid identification of *Bacillus anthracis* by real-time PCR with dual hybridization probes in environmental swabs. **Molecular and Cellular Probes**. v. 37, p. 22-27, 2018.
- BENKIAR, A.; NADIA, Z. J.; BADIS, A.; REBZANI, F.; SORAYA, B. T.; REKIK, H.; NAILI, B.; ZOHRA, F. F.; Bejar, S.; BASSEM, J. Biochemical and molecular characterization of a thermo- and detergent-stable alkaline serine keratinolytic protease from *Bacillus circulans* strain DZ100 for detergent formulations and feather-biodegradation process. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 83, p. 129-138, 2013.
- BENNETT, M. R.; SHEPHERD, S. A.; CRONIN, V. A.; MICKELFIELD, J. Recent advances in methyltransferase biocatalysis. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 37, p. 97-106, 2017.
- BIOTECHNOLOGY INNOVATION ORGANIZATION. **Join BIO as we champion for the biotechnology industry**. Washington, 2018. Disponível em: <<https://www.bio.org/what-biotechnology>>. Acesso em: 21 abril. 2018.

BIROLI, W. G.; VACONDIO, B.; ALVARENGA, N.; SELEGHIM, M. H. R.; PORTO, A. L. M. Enantioselective biodegradation of the pyrethroid ($\pm$)-lambdacyhalothrin by marine-derived fungi. **Chemosphere**. v. 197, p. 651-660, 2018.

BIROLI, W. G.; BORGES, E. M.; NITSCHKE, M.; ROMÃO, L. P. C.; PORTO, A. L. M. Biodegradation pathway of the pyrethroid pesticide esfenvalerate by bacteria from Different Biomes. **Water Air Soil Pollutants**. p. 227-271, 2016.

BORDOLOI, N. K.; RAI, S.; CHAUDHURI, M. K.; MUKHERJEE, A. K. Deep-desulfurization of dibenzothiophene and its derivatives present in diesel oil by a newly isolated bacterium *Achromobacter* sp. to reduce the environmental pollution from fossil fuel combustion, **Fuel Processing Technology**. v. 119, p. 236-244, 2014.

BRAH, T. S.; DIALLO, B. A.; DIALLO, A.; SOKHNA, C.; BAPTISTE, E.; LEVASSEUR, A.; FOURNIER, P. -E.; CADORET, F.; RAOULT, D.; PHAM, T. -P. - T.; M. ALOU, T. S. I. Noncontiguous finished genome sequences and descriptions of *Paenibacillus bouchesdurhonensis*, *Paenibacillus rubinfantis*, *Paenibacillus senegalimassiliensis* and *Paenibacillus tuaregi* identified by culturomics. **New Microbe and New Infect**. v. 20, p. 1-13, 2017.

BRENDA THE COMPREHENSIVE INFORMATION SYSTEM. **All enzyme in BRENDA™**. Disponível em: <<https://www.brenda-enzymes.org/>>. Acesso em: 22 abril. 2018.

BROCK, T. D.; MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; PARKER, J. **Microbiologia de Brock**. 14ª edição, Artmed, 2004.

CADORET, F.; ALOU, M. T.; AFOUDA, P.; TRAORE, I. S.; BRÉCHARD, L.; MICHELLE, C.; PINTO, F. D.; ANDRIEU, C.; DELERCE, J.; LEVASSEUR, A.; FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. Noncontiguous finished genome sequences and description of *Bacillus massiliglaeii*, *Bacillus mediterraneensis*, *Bacillus*

massiliniensis, *Bacillus phocaeensis* and *Bacillus tuaregi*, five new species identified by culturomics. **New Microbe and New Infect.** v. 19, p. 45-59, 2017.

CASSIMJEE, K. E.; MANTA, B.; HIMO, F. A quantum chemical study of the ω -transaminase reaction mechanism. **Royal Society of Chemistry.** v. 13, p. 8453-8464, 2015.

CHEN, S.; DONG, Y. H.; CHANG, C.; DENG, Y.; ZHANG, X. F.; ZHONG, G.; SONG, H.; HU, M.; ZHANG, L-H. Characterization of a novel cyfluthrin-degrading bacterial strain *Brevibacterium aurem* and its biochemical degradation pathway. **Bioresource Technology.** v. 132, p. 16-23, 2013.

CHOVANCOVA, E.; KOSINSKI, J.; BUJNICKI, J. M.; DAMBORSKY, J. Phylogenetic analysis of haloalkane dehalogenases. **Proteins.** v. 67, p.305-316, 2007

CHOI, K. K.; PARK, C. W.; KIM, S. Y.; LYOO, W. S.; LEE, S. H.; LEE, J. W. Polyvinyl alcohol degradation by *Microbacterium barkeri* KCCM 10507 and *Paenibacillus amylolyticus* KCCM 10508 in dyeing wastewater. **Journal of Microbiology and Biotechnology.** v. 14, p. 1009-13, 2004.

CIBIS, E.; RYZNAR-LUTY, A.; KRZYWONOS, M.; LUTOSLAWSKI, K.; MISKIEWICZ, T. Betaine removal during thermo- and mesophilic aerobic batch biodegradation of beet molasses vinasse: Influence of temperature and pH on the progress and efficiency of the process. **Journal of Environmental Management.** v. 92, p. 1733-1739, 2011.

CLAPÉS, P.; FESSNER, W. -D.; SPRENGER, G. A.; SAMLAND, A. K. Recent progress in stereoselective synthesis with aldolases. **Current Opinion in Chemical Biology.** v. 14, p. 54-167, 2010.

COX, L.; KOSKINEN, W. C.; YEN, P. Y. Sorption–desorption of imidacloprid and its metabolites in soils. **Jornal of Agricultural Food Chemistry.** v. 45, p. 1468-1472, (1997).

CORREIA, P. R. M.; FERREIRA, M. M. C. Reconhecimento de padrões por métodos não supervisionados: explorando procedimentos quimiométricos para tratamento de dados analíticos. **Química Nova**, v. 30, p. 481-487, 2007.

CYCON, M.; ZMIJOWSKA, A.; PIOTROWSKA-SEGET, Zofia. Enhancement of deltamethrin degradation by soil bioaugmentation with two different strains of *Serratia marcescens*. **International Journal Environmental Science and Technology**. v. 11, p. 1305-1316, 2014.

CRABB, D. W.; MATSUMOTO, M.; CHANG, D.; YOU, M. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. **The Proceedings of the Nutrition Society**. v. 63, p. 49-63, 2004.

DAI, Y.-J.; JI, W.-W.; CHEN, T.; ZHANG, W.-J.; LIU, Z.-H.; GE, F.; SHENG, Y. Metabolism of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and thiacloprid by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain IM-2. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 58, p. 2419-2425, 2010.

DEMAEGHT, P.; DERMAUW, W.; TSAKIRELI, D.; KHAJEHALI, J.; NAUEN, R.; TIRRY, L.; VONTAS, J.; LÜMMEN, P.; LEEUWEN, T. V. Molecular analysis of resistance to acaricidal spirocyclic tetrone acids in *Tetranychus urticae*: CYP392E10 metabolizes spiroticlofen, but not its corresponding enol. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 23, p. 544-554, 2013.

DURCHSCHEIN, K.; HALL, M.; FABER, K. Unusual reactions mediated by FMN-dependent ene- and nitro-reductases. **Green Chemistry**. v. 15, p. 1764-1772, 2013.

DUTTA, R. N. Immunomodulation of serum complement (C3) and macrophages by synthetic pyrethroid fenvalerate: in vitro study. **Toxicology**. v. 285, p. 26-132, 2011.

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

ENSLEY, S. M. Pyrethrins and pyrethroids. **Veterinary Toxicology (Third Edition)**. v. 39, p. 515-520, 2018.

LAU, E. Y.; KAHN, K.; BASH, P. A.; BRUCE, T. C. The importance of reactant positioning in enzyme catalysis: A hybrid quantum mechanics/molecular mechanics study of a haloalkane dehalogenase. **Biochemistry**. v. 97, p. 9937-9942, 2000.

FERREIRA, L.; ROSALES, E.; DANKO, A. S.; SANROMÁN, M. A.; PAZOS, M. M. *Bacillus thuringiensis* a promising bacterium for degrading emerging pollutants. **Process Safety and Environmental Protection Journal**. V. 101, p. 19-26, 2016.

FONSECA, F. S. A.; ANGOLINI, C. F. F.; ARRUDA, M. A. Z.; JUNIOR, C. A. L.; SANTOS, C. A.; SARAIVA, A. M.; PILAU, E.; SOUZA, A. P.; LABORDA, P. R.; OLIVEIRA, P. F. L.; OLIVEIRA, V. M.; REIS, F. A. M.; MARSAIOLI, A. J. Identification of oxidoreductases from the petroleum *Bacillus safensis* strain, **Biotechnology Reports**. v. 8, p. 152-154, 2015.

FRITZE D. Taxonomy of the genus *Bacillus* and related genera: the aerobic endospore-forming bacteria. **Physiopathology**. v. 94, p. 1245-8, 2004.

FUNDO DE DEFESA DA CITRICULTURA. **Exportação de suco avança**. Araraquara, 2018. Disponível em: <<http://www.fundecitrus.com.br/>>. Acesso em: 21 abril. 2018.

GAO, S.; Su, Y.; ZHAO, L.; LI, G.; ZHENG, G. Characterization of a (*R*)-selective amine transaminase from *Fusarium oxysporum*. v. 63, p. 130-136, 2017.

GARBISU, C.; ALKORTA, I. Basic concepts on heavy metal soil bioremediation. **European journal of mineral processing and environmental protection**. v.3, p. 58-66, 2003.

GBEDED OA, M. A.; LIYANAGEA, K.; GARZA-REYESB, J. A. Towards a life cycle sustainability analysis: A systematic review of approaches to sustainable manufacturing. **Journal of Cleaner Production**. In press, Accepted Manuscript. doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.02.310, 2018.

GEORGIEVA, S.; GODJEVARGOVA, T.; MITA, D. G.; DIANO, N.; MENALE, C.; NICOLUCCI, C. Nonisothermal bioremediation of waters polluted by phenol and some of its derivatives by laccase covalently immobilized on polypropylene membranes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. v. 66, p. 210-218, 2010.

GOLGE, O.; KABAK, B. Determination of 115 pesticide residues in oranges by high-performance liquid chromatography –triple-quadrupole mass spectrometry in combination with QuEChERS method. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 41, p. 86-97, 2015.

GONG, T.; XU, X.; DANG, Y.; KONG, A.; WU, Y.; LIANG, P.; WANG, S.; YU, H.; XU, P.; YANG, C. An engineered *Pseudomonas putida* can simultaneously degrade organosphosphates, pyrethroids and carbamates. **Science of the Total Environment**. v. 628-629, p. 1258-1265, 2018.

GOMM, A.; O'REILLY, E. Transaminases for chiral amine synthesis. **Current Opinion Chemical Biology**. v. 43, p. 106-112, 2018.

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

GUPTA, M.; MATHUR, S.; SHARMA, T. K.; RANA, M.; GAIROLA, A.; NAVANI, N. K.; PATHANIA, R. A study on metabolic prowess of *Pseudomonas* sp. RPT 52 to degrade imidacloprid, endosulfan and coragen. **Jornal of Hazardous Materials**. v. 301, p. 250-258, 2016.

HARMSSEN, J.; RIETRA, R. P. J. J. 25 years monitoring of PAHs and petroleum hydrocarbons biodegradation in soil. **Chemosphere**. Disponível em: https://ac.els-cdn.com/S0045653518308853/1-s2.0-S0045653518308853-main.pdf?_tid=a2e9fd0ca65f-4ff6-8b61eb27508b153b&acdnat=1527167920_464b5f7a06026ab9bb40f00b9b5f5899. Acesso em: 24 mai.

HARTLEY, E. L.; LAND, C.; WELLENDORF, R.; HANAFY, R. A.; BUDD, C.; DONALD FRENCH, P.; HOFF, W. D.; YOUSSEF, DRAFT, N.; AVRAMOV, A. P.; COUGER, M. B. genome sequence of *Microbacterium oleivorans* strain Wellendorf implicates heterotrophic versatility and bioremediation potential. **Genomics**. v. 10, p. 54-60, 2016.

HEITKAMP, M. A.; FREEMAN, J. P.; MILLER, D. W.; CERNIGLIA, C. E. Biodegradation of 1-nitropyrene. **Archives Microbiology**. v. 156, p. 223-30, 1991.

HILLOCKS, R. J. Farming with fewer pesticides: EU pesticide review and resulting challenges for UK agriculture. **Crop Protection**, v. 31, p. 85-93, 2012.

INVESTESP. A citricultura no estado de São Paulo. São Paulo, 2015. Disponível em: <http://www.investe.sp.gov.br/setores-de-negocios/agronegocios/laranja/>. Acesso em: 13 abr. 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Área plantada, área colhida e produção, por ano da safra e produto das lavouras**. São Paulo, 2018. Disponível em: < <https://sidra.ibge.gov.br/> >. Acesso em: 21 abril. 2018.

IRLA, M., NESHAT, A.; WINKLER, A.; ALBERSMEIER, A.; HEGGESET, T. M. B.; BRAUTASET, T.; KALINOWSKI, J.; WENDISCHA, V. F.; RÜCKERT, C. Complete genome sequence of *Bacillus methanolicus* MGA3, a thermotolerant amino acid producing methylotroph. **Journal of Biotechnology**. v. 188, p. 110-111, 2014.

IUPAC GOLD BOOK. Biodegradation, 2018. Disponível em: <<https://goldbook.iupac.org/html/B/B00656.html>>. Acesso em: 30 maio 2018.

JANCZAK, K.; HRYNKIEWICZ, K.; ZNAJEWSKA, Z.; DĄBROWSKI, G. Use of rhizosphere microorganisms in the biodegradation of PLA and PET polymers in compost soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 130, p. 65-75, 2018.

JANSSEN, D. B. Evolving haloalkane dehalogenases. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 8, p. 150-159, 2004.

JEANMART, S.; EDMUNDS, A. J. F.; LAMBERTH, C.; POULIOT, M. Synthetic approaches to the 2010-2014 new agrochemicals. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 317-341, 2016.

JÖNVALL, H. MDR-alcohol dehydrogenases. **Chemico-Biological Interactions**. v. 276, p. 75-76, 2017.

JÚNIOR, R. P. S.; RIGITANO, R. L. O. Sorção, degradação e lixiviação do inseticida tiametoxam em dois solos de Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v. 16, p. 564-572, 2012.

KADRI, T.; MAGDOULI, S.; ROUISSI, T.; BRAR, S. K. *Ex-situ* biodegradation of petroleum hydrocarbons using *Alcanivorax borkumensis* enzymes. **Biochemical Engineering Journal**. v. 132, p. 279-287, 2018

KE, S.; SUN, T.; ZHANG, Z.; ZHANG, Y-N.; LIANG, Y.; WANG, K.; YANG, Z. Spirodiclofen Analogues as Potential Lipid Biosynthesis Inhibitors: A Convenient

Synthesis, Biological Evaluation, and Structure-Activity Relationship. **Bulletin of the Koren Chemical Society**. v. 31, p. 2315-2321, 2010.

KIDD, H.; JAMES, D. R. **The Agrochemicals Handbook**. (third ed.), The Royal Society of Chemistry, Unwin Brothers Limited, Old Woking, Surrey, UK, 1991.

KIM, J.; LEE, I. N. Inactivation of bovine plasma amine oxidase by 1,1,1-trihalo-3-aminopropanes. **Bioorganic Chemistry**. v. 75, p. 265-273, 2017.

KIM, J. Biological Implications of Benzoquinones, Quinone: Occurrence, Medicinal Uses and Physiological Importance. **Nova Science Publisher Inc.**, 2013.

KOHL, H.; STEFFEN-MUNSBERG, F.; HOHNE, M. Recent achievements in developing the biocatalytic toolbox for chiral amine syntheses. **Current Opinion in Chemical Biology**. v. 19, p. 180-192, 2014.

KOPRNA, R.; DIEGO, N. D.; DUNDÁLKOVÁ, L.; SPÍCHAL, L. Use of cytokinins as agrochemicals. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 484-492, 2016.

KUHAD, R. Microbes and their role in sustainable development. **Indian Journal of Microbiology**. v. 52, p. 309-313, 2012.

KULIK, N.; GOI, A.; TRAPIDO, M.; TUHKANEN T. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by combined chemical pre-oxidation and bioremediation in creosote contaminated soil. **Journal of Environmental Management**.v. 78, p. 382-91, 2006.

KUMAR, S.; KAUSHIK, G.; DAR, M. A.; NIMESH, S.; LOPEZ-CHUKEN, U. J.; VILLARREAL-CHIU, J. F. Microbial degradation of organophosphate pesticides: A review. **Pedosphere**. v. 28, p. 190-208, 2018.

KUNJAPUR, A. M.; HYUN, J. C.; PRATHER, K. L. J. Deregulation of *S*-adenosylmethionine biosynthesis and regeneration improves methylation in the *E. coli* de novo vanillin biosynthesis pathway. **Microbial Cell Factories**. v. 15, p. 61-70, 2016.

KUSMIATUN, A.; RUSMANA, I.; BUDIARTI, S. Characterization of bacteriophage specific to *Bacillus pumilus* from Ciapus River in Bogor, West Java, Indonesia. **Journal of Biosciences**. v. 22, p. 27-33, 2015.

LAL, S.; TABACCHIONI, S. Ecology and biotechnological potential of *Paenibacillus polymyxa*: a mini review. **Indian Journal of Microbiology**. v. 49, p. 2-10, 2009.

LEBIN, T.; RAM, H.; SINGH, V. P. Fungal and bacterial physiology inducible cellulase production from an organic solvent tolerant *Bacillus* sp. SV1 and evolutionary divergence of endoglucanase in different species of the genus *Bacillus* Lebin. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 329, p. 1-14, 2017.

LENNARD, L.; WANG, L. 10.21 – Methyltransferases. **Comprehensive Toxicology (Third Edition)**. V. 20, p. 497-516, 2018.

LI, H.; L, Z-J.; Z, G-W, XU, J-H. Efficient of chiral indolines using na imine reductase from *Paenibacillus lactis*. **Advanced Syntesis and Catalysis**. v. 357, p. 1692-1695, 2015.

LI, J.; DENG, M.; WANG, Y.; CHEN, W. Production and characteristics of biosurfactant produced by *Bacillus pseudomycoides* BS6 utilizing soybean oil waste. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 112, p. 72-79, 2016.

LI, J.; ZHANG, S.; WU, C.; LI, C.; WANG, H.; WANG, W.; LI, Z.; YE, Q. Stereoselective degradation and transformation products of a novel chiral insecticide, paichongding, in flooded paddy soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 64, p. 7423-7430, 2016.

- LIU, J.; HUANG, W.; HAN, H.; SHE, C.; ZHONG, G. Characterization of cell-free extracts from fenpropathrin-degrading strain *Bacillus cereus* ZH-3 and its potential for bioremediation of pyrethroid-contaminated soils. **Science of the Total Environmental**. v. 523, p. 50-58, 2015.
- MA, Y.; CHEN, L.; LU, X.; CHU H.; XU, C.; LIU W. Enantioselectivity in aquatic toxicity of synthetic pyrethroid insecticide fenvalerate. **Ecotoxicol Environ Safaty**. v. 72, p. 1913-1918, 2009.
- MA, Y.; ZHAI, S.; MAO, S. Y.; SUN, S. L.; WANG, Y.; LIU, Z. H.; DAI, Y. J.; YUAN, S.; Co-metabolic transformation of the neonicotinoid insecticide imidacloprid by the new soil isolate *Pseudoxanthomonas indica* CGMCC 6648. **Jornal of Environmental Science and Healt, Part B**. v. 49, p. 661-670, 2014.
- MANSOURI, A.; ABBES, C.; LANDOULSI, Ahmed. Combined intervention of static magnetic field and growth rate of *Microbacterium maritypicum* CB7 for Benzo (a) Pyrene biodegradation. **Microbial Pathogenesis**. v. 113 p. 40-44, 2014.
- MARCHLER-BAUER, A. M.; DERBYSHIRE, N.; GONZALES, S.; LU, F.; CHITSAZ, L.; GEER, R.; GEER, J.; HE, M.; GWADZ, D.; HURWITZ, C.; LANCZYCKI, F.; LU, G.; MARCHLER, J.; SONG, N.; THANKI, Z.; WANG, R.; YAMASHITA, D.; ZHANG, C.; ZHENG, S.; Bryant, S. CDD: NCBI's conserved domain database. **Nucleic Acids Research**. v. 43, p. 222-226, 2015.
- MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. Citros-mapa 2015. **Diário Oficial da União**, São Paulo, 2015. Disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citros>. Acesso em: 16 mar. 2015.
- MATOS, A. K. V. Revolução Verde, Biotecnologia e Tecnologias Alternativas. **Fucamp**, v.10, p.1-17, 2010.

MOREMI, N.; CLAUS. H.; HINGI, M.; VOGEL, U.; MSHAMA, S.E. Multidrug-resistant *Achromobacter animadaclopridocus* causing wound infection in a street child in Mwanza, Tanzania. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 88, p. 58-61, 2017.

MOURA, M. C. S.; LOPES, A. N. C.; MOITA, G. C.; NETO, J. M. M. Estudo multivariado de solos urbanos da cidade de Teresina. **Química Nova**, v. 29, p. 429-435, 2006.

MUM, D.; KATALIN, F. M.; GREGORY, W. A.; PETRA, M.; WADE, M. H.; ALMA, L. B.; ALAN, J. S.; DANYING, C.; KLINMAN, J. P. Primary structures for a mammalian cellular and serum copper amine oxidase. **Jornal of Biological Chemistry**. v. 269, p. 9926, 1994

MULLLA, S. I.; HU, A.; SUN, Q.; LI, J.; SUANON, F.; ASHFAQ, M.; YU, C-P. Biodegradation of sulfamethoxazole in bacteria from three different origins. **Journal of Environmental Management**. v. 206, p. 93-102, 2018.

MULLIGAN, R. A.; TOMCO, P. L.; HOWARD, M. W.; SCHEMPP, T. S.; STEWART, D. J.; STACEY, P. M.; BALL, D. B.; TJEERDEMA, R. S. Aerobic *versus* anaerobic microbial degradation of clothianidin under simulated California rice field conditions. **Jornal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 64, p. 7059-7067, 2016.

NARDINI, M.; DIJKSTRA, B. W. Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing. **Current Opinion in Structural Biology**. v. 9, p. 732-737, 1999.

NAUEN, R.; EBBINGHAUS-KINTSCHER, SALGADO, V. L.; KAUSSMANN, M. Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. **Pesticide Biochemistry and Physiology**. v. 76, p. 55-59, 2003.

NEVES, P. D.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. São Paulo: Atheneu, 2004. 3 p.

NIELSEN P.; SORENSEN J. Multi-target and medium-independent fungal antagonism by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. **FEMS Microbiology Ecology**. v. 22, p. 183-92, 1997.

OUYANG, J.; PEI, Z.; LUTWICK, L.; DALAL, S.; YANG, L.; CASSAI, N. Case report: *Paenibacillus thiaminolyticus*: a new cause of human infection, inducing bacteremia in a patient on hemodialysis. **Annals of Clinical & Laboratory Science**. v. 38, p. 393-400, 2008.

PAILAN, S.; GUPTA, D.; APTE, S.; KRISHNAMURTHI, S.; SAHA, P. Degradation of organophosphate insecticide by a novel *Bacillus aryabhatai* strain SanPS1, isolated from soil of agricultural field in Burdwan, West Bengal, India. **International Biodeterioration & biodegradation**. v. 103, p. 191-195, 2015.

PARK, B-J.; CHELLIAH, R.; WEI, S.; PARK, J-H.; FORGHANI, F.; PARK, Y-S.; CHO, M-S.; PARK, D-S, OH, D-H. Unique biomarkers as a potential predictive tool for differentiation of *Bacillus cereus* group based on real-time PCR. **Microbial Pathogenesis**. v. 115, p. 131-137, 2018.

PAGE, M. J.; CERA, E. D. Serine peptidases: Classification, structure and function (Review). **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 65, p. 1220-1236, 2008.

PERELO, L. W. Review: In situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. **Journal of Hazardous Materials**. v. 177, p. 81-9, 2010.

PINHATI, A. F. R.; AGUILAB, E. M. D.; TÔRRESC, A. P. R.; SOUSAC, M. P.; SANTIAGOC, V. M. J.; SILVAB, J. T.; PASCHOALINB, V. M. F. Avaliação da eficiência de degradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias provenientes de estação de tratamento de efluente de refinaria de petróleo. **Química Nova**, v. 8, p. 1269-1274, 2014.

PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA CASA CIVIL SUBCHEFIA PARA ASSUNTOS JURÍDICOS. **Das disposições preliminares.** Disponível em: <<http://www.planalto.gov.br/>>. Acesso em 20 abril. 2018

PRIEST, F. G.; GOODFELLOW, M.; TODD, C. A numerical classification of the genus *Bacillus*. **Jornal of General Microbiology**. v. 134, p. 1847-82, 1988.

PHUGARE, S. S.; KALYANI, D. C.; GAIKWAD, Y. B.; JADHAV, J. P. Microbial degradation of imidacloprid and toxicological analysis of its biodegradation metabolites in silkworm (*Bombyx mori*). **Chemistry Engineering Journal**. v. 230, p. 27-35, 2013.

QUAX, W. J.; BROEKHUIZEN, C.P. Development of a new *Bacillus* carboxyl esterase for use in the resolution of chiral drugs. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 425- 431, 1994.

RABOUILLE, C.; ALBERTI, S. Cell adaptation upon stress: the emerging role of membrane-less compartments. **Current Opinion in Cell Biology**. v. 47, p. 34-42, 2017.

RAHMAN, MD. S.; CHOI, Y. H.; CHOI, Y. S.; ALAM, MD. B.; LEE, S. H. A novel antioxidant peptide, purified from *Bacillus amyloliquefaciens*, showed strong antioxidant potential via Nrf-2 mediated heme oxygenase-1 expression. **Food Chemistry**. v. 239, p. 502-510, 2018.

REBELO, R. M; CALDAS, E. D. Avaliação de risco ambiental de ambientes aquáticos afetados pelo uso de agroquímicos. **Química Nova**, v. 37, p. 1199-1208, 2014.

RAUCH, N.; NAUEN, R. Spirodiclofen resistance risk assessment in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): a biochemical approach. **Pesticide Biochemistry & Physiology**, v. 74, p. 91-101, 2003.

- SABOURMOGHADDAM, N.; ZAKARIA, M. P.; OMAR, D. Evidence for the microbial degradation of imidacloprid in soils of Cameron Highlands. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**. v. 14, p. 182-188, 2015.
- SARIKHANI, M.; KERMANSHAHI, R. K.; GHADAM, P. The Role of Probiotic *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 Bacteriocin on effect of HBSu on planktonic cells and biofilm formation of *Bacillus subtilis*. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 115, p. 762-766, 2018.
- SCHAMA, Renata; Mesquita, Rafael Dias. **Organização e Evolução da Família Gênica Carboxilesterase em Artrópodes**. 2013. Tese (Doutorado em Biologia) - Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.
- SCHANSTRA, J.; KINGMA, J.; JANSSEN, D. B. Specificity and kinetics of haloalkane dehalogenase. **Jornal of Biological Chemistry**. v. 25, p. 4747-53, 1996.
- SECRETARIA DE COMÉRCIO EXTERIOR (Secex). **Exportação de suco avançam**. São Paulo, 2018. Disponível em: < <http://portal.siscomex.gov.br>>. Acesso em: 21 abril. 2018.
- SHAWA, D. R.; DUSSANB, J. Transcriptional analysis and molecular dynamics simulations reveal the mechanism of toxic metals removal and efflux pumps in *Lysinibacillus sphaericus* OT4b.31. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 127, p. 46-61, 2018.
- SOUZA, M. M.; COLLA, T. S.; BÜCKER, F.; FERRAO, M. F.; HUANG, C. T.; ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. Biodegradation potential of *Serratiamarcescens* for diesel/biodiesel blends. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 110, p. 141-146, 2016.
- SPEIGHT, J. G.; EI-GENDY, N. S. **Introduction to petroleum biotechnology**. Cambridge: Gulf Professional Publishing, 2018. 493 p.

STEENKAMP, L; BRADY D. Optimidaclopridosation of stabilised carboxylesterase NP for enantioselective hydrolysis of naproxen methyl ester. **Process Biochemistry**. v. 43, 1419- 1426, 2008.

STOUGHTON, S. J.; LIBER, K.; CULP, J.; CESSNA, A. Acute and chronic toxicity of imidacloprid to the aquatic invertebrates *Chironomus tentans* and *Hyalella azteca* under constant- and pulse-exposure conditions. **Archives Environ Contam Toxicology**. v. 54, p. 662-673, 2008.

STUCKI, G.; THÜER, M. Increased removal capacity for 1,2-dichloroethane by biological modification of the granular activated carbon process. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v. 42, p. 167-172, 1994.

SUJA, F.; RAHIM, F.; TAHA, M. R.; HAMBALI, N.; RAZALI, M. R.; KHALID, A.; HAMZAH, A. Effects of local microbial bioaugmentation and biostimulation on the bioremediation of total petroleum hydrocarbons (TPH) in crude oil contaminated soil based on laboratory and field observations. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 90, p. 115-22, 2014.

SYDOW, M.; OWSIANIAK, M.; FRAMSKI, G.; WOZNIAK-KARCZEWSKA, M.; PIOTROWSKA-CYPLIK, A.; LAWNICZAK, L.; SZULC, A.; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, A.; HEIPIEPER, H. J.; CHRZANOWSKI, L. Biodiversity of soil bacteria exposed to sub-lethal concentrations of phosphonium-based ionic liquids: Effects of toxicity and biodegradation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v. 147, p. 157-164. 2018.

TAUSZ, J.; DONATH, P. Über die oxydation des wasserstoffs und der kohlenwasserstoffe Mittels Bakterien. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie**. v. 190 p. 141-68, 1930.

- TOKIEDA, M.; OZAWA, M.; KOBAYASHI, S.; GOMYO, T. Method for determination of total residues of the insecticide acetamiprid and its metabolites in crops by gas chromatography. **Jornal of Pesticide Science**. v. 22, p. 77-83, 1997.
- TOMEI, M. C.; DAUGULIS, A. J. *Ex situ* bioremediation of contaminated soils: An overview of conventional an innovative technologies. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**. v. 43, p. 2107-39, 2013.
- TORRES, S.; PANDEY, A.; CASTRO, G. R. Organic solvent adaptation of Gram positive bacteria: Applications and biotechnological potentials. **Biotechnology Advances**. v. 29, p. 442-452, 2011.
- TORRÓ, L. M. P.; MORALES, J-L. **Protozoan Parasitism: From Omics to Prevention and Control**. Granada, 2018. 170 p.
- TSUZUKIBASHI, O.; UCHIBORI, S.; KOBAYASHI, T.; SAITO, M.; UMEZAWA, K.; OHTA, M.; SHINOZAKI-KUWAHARA, N. A selective medium for the isolation of *Microbacterium* species in oral cavities. **Journal Microbiology Methods**. v. 116. p. 60-5, 2015.
- TUFVESSON, P.; LIMA-RAMOS, J.; JENSEN, J. S.; AL-HAQUE, N.; NETO, W.; WOODLEY, J. M. Process considerations for the asymmetric synthesis of chiral amines using transaminases, **Biotechnology and Bioengineering**. v. 108, p. 1479-1493, 2011.
- TURCHI, L.; SANTINI, T.; BECCARI, E.; DI, F. C. Localization of new peptidoglycan at poles in *Bacillus mycoides*, a member of the *Bacillus cereus* group. **Archives Microbiology**. v. 194, p. 887-892, 2012.
- VERSCHUEREN, K. H.; SELJÉE, F.; ROZEBOOM, H. J.; KALK, K. H.; DIJKSTRA, B. W. Crystallographic analysis of the catalytic mechanism of haloalkane dehalogenase. **Nature**. v. 363, p. 693-8, 1993.

XIAN-GUO, F.; LIANG-ZHONG, X.; FAN-RUI, K.; HONG-XIN, L.; RUI-FENG, Y. *Spirodiclofen* Derivatives as highly potential acaricides: Synthesis, structure and bioactivity. **Chemical Research in Chinese Universities**. v. 26, p. 968-972, 2011.

XIONGYI, H.; GROVES, J. T. Beyond ferryl-mediated hydroxylation: 40 years of the rebound mechanism and C–H activation. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**. v. 22, p. 185-207, 2017.

XU, Y.; LU, M. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. **Journal of Hazardous Materials**. v. 183, p. 395-401, 2010.

WANA, S.; MAKB, M–W.; KUNGA, S-Y. Gram-LocEN: Interpretable prediction of subcellular multi-localization of Gram-positive and Gram-negative bacterial proteins. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**. v. 162, p. 1-9, 2017.

WANG, G.; CHEN, X.; YUE, W.; ZHANG, H.; LI, F.; XIONG, M. Microbial degradation of acetamiprid by *Ochrobactrum* sp. D-12 isolated from contaminated soil. **PLoS One**. V. 8, p. 1-9, 2013.

WANG, Y.; LIU, H.; PENG, Y.; TONG, L.; FENG, L.; MA, K. New pathways for the biodegradation of diethyl phthalate by *Sphingobium yanoikuyae* SHJ. **Process Biochemistry**. v.16, In press, 2018. doi: org/10.1016/j.procbio.2018.05.010

WEI, I. Chapter Thirteen - A Step-Up LC-MS/MS for Proteomics. **Comprehensive Analytical Chemistry**. v. 79, p. 377-414, 2018.

WENZLER, E.; KAMBOJ, K.; LLASAT, J-M. B-S. Sepsis secondary to persistente *Lysinibacillus sphaericus*, *Lysinibacillus fusiformis* and *Paenibacillus amylolyticus* bacteremia. **International Journal of Infectious Diseases**. v. 35, p. 93-95, 2015.

WILSON, D. B. Microbial diversity of cellulose hydrolysis. **Current Opinion in Microbiology**. v. 14, p. 259-263, 2011.

YAN, Z.; XU, L.; ZHANG, J.; LU, Q.; LUO, S.; XU, L. Aldehyde dehydrogenase 1A1 stabilizes transcription factor Gli2 and enhances the activity of Hedgehog signaling in hepatocellular cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 471, p. 466-473, 2016.

YANG, L. Q.; LI, X. Y.; XU, L.; SU, Z. C.; ZHANG, C. G.; ZHANG, H. W. Improved stability and enhanced efficiency to degrade chlorimuron-ethyl by the entrapment of esterase Sule in cross-linked poly (γ -glutamic acid)/gelatin hydrogel. **Jornal of Hazardous Materials**. v. 287, p. 287-295, 2015.

YOU, L-X.; LIU, L-D.; XIAO, Y.; DAI, Y-F.; CHEN, B-L.; JIANG, Y-X.; ZHAO, F. Flavins mediate extracellular electron transfer in Gram-positive *Bacillus megaterium* strain LLD-1. **Bioelectrochemistry**. v. 119, p. 196-202, 2018.

YOUNESS, M.; SANCELME, M.; COMBOURIEU, B.; B-H, P. Identification of new metabolic pathways in the enantioselective fungicide tebuconazole biodegradation by *Bacillus* sp. 3B6. **Journal of Hazardous Materials**. In Press, accepted manuscript. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.02.048>.

YU, F. B.; SHAN, S. D.; LUO, L. P.; GUAN, L. B.; QIN, H. Isolation and characterization of a *Sphingomonas* sp. strain F-7 degrading fenvalerate and its use in bioremediation of contaminated soil. **Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes**. v. 48, p. 198-207, 2013.

VARRÓ, P.; KOVÁCSB, M.; VILÁGIA, I. The insecticide esfenvalerate modulates neuronal excitability in mammalian central nervous system in vitro. **Toxicology Letters**. v. 267, p. 39-44, 2017.

ZAKHIA, F.; JEDER, H.; WILLEMS, A.; GILLIS, M.; DREYFUS, B.; LAJUDIE, P. Diverse bacteria associated with root nodules of spontaneous legumes in Tunisia and first report for nifH-like gene within the genera *Microbacterium* and *Starkeya*. **Microbiology Ecology**. v. 51, p. 375-393, 2006.

ZHANGA, J.; LUA, L.; CHENA, F.; CHENA, L.; YINC, J.; Huang, X. Detoxification of diphenyl ether herbicide lactofen by *Bacillus* sp. Za and enantioselective characteristics of an esterase gene lacE. **Journal of Hazardous Materials**. v. 341, p. 336-345, 2018.

ZHANG, P.; REN, C.; SUN, H.; MIN, L. Sorption, desorption and degradation of neonicotinoids in four agricultural soils and their effects on soil microorganisms. **Science of the Total Environment**. v. 615, p. 59-69, 2018.

ZHOU, G. C.; WANG, Y.; ZHAI, S.; GE, F.; LIU, Z. H.; DAI, Y. J.; YUAN, S.; HOU, J. Y. Biodegradation of the neonicotinoid insecticide thiamethoxam by the nitrogen-fixing and plant-growth-promoting rhizo bacterium *Ensifer adhaerens* strain TMX-23. *Applied Microbiology na Biochemistry*. v. 97, p. 4065-4074, 2013.

ZHOU, L. Y.; ZHANG, L. J.; SUN, S. L.; GE, F.; MAO, S. Y.; MA, Y.; LIU, Z. H.; DAI, Y. J.; YUAN, S. Degradation of the neonicotinoid insecticide acetamiprid via the *N*-carbamoylimine derivate (IM-1-2) mediated by the nitrile hydratase of the nitrogen-fixing bacterium *Ensifer meliloti* CGMCC 7333. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 62, p. 9957-9964, 2014.

Apêndice

8. APÊNDICE

8.1. Apêndice- A

8.2. TERCEIRA ETAPA: F) Isolamento dos microrganismos da citricultura da laranja

8.2.1. MATERIAIS E MÉTODOS

8.2.1.1. F) Isolamento dos microrganismos da citricultura da laranja

8.2.1.2. Coleta de amostras para o isolamento dos microrganismos da citricultura

O isolamento dos microrganismos foi realizado no Laboratório de Química Orgânica e Bioanálise. A coleta das amostras para o isolamento dos microrganismos foi realizada em colaboração com a empresa Fundecitrus sendo supervisionada pelo Dr. Rodrigo Facchini Magnani. A identificação das bactérias foi realizada em parceria com o Prof. Dra. Maria Bernadete Amâncio Varesche e a parte técnica foi supervisionada pela Dra. Isabel Sakamoto.

Para a realização de coleta das amostras e o isolamento dos microrganismos da citricultura, todo o material utilizado foi autoclavado à temperatura de 120°C por 20 minutos. As coletas foram realizadas na cidade de Tabatinga- SP no dia 19 de novembro de 2014 às 14:50 h com o apoio do agricultor Antônio José Araujo. As plantas estavam saudáveis e, recentemente, havia sido aplicado o herbicida Randap (Figura 76). O solo estava seco, pouca umidade no ar e pouco vento. A coleta foi realizada no meio do pomar com o intuito de minimizar agentes externos. As amostras de folhas, frutos verdes, musgos do caule, flores e solo foram armazenadas em frascos Schott para posteriores procedimentos de isolamento.

Figura 76. Fotos mostrando algumas etapas da coleta realizada na cidade de Tabatinga- SP. **A-** Musgos presente no caule. **B-** Frutos verdes. **C-** Armazenamento das amostras.

Fonte: Autoria própria

8.2.1.3. Preparo das amostras em meio de cultura sólido para o cultivo e o isolamento dos microrganismos da citricultura

As amostras coletadas foram cortadas com o auxílio de uma tesoura de aço inox e foram colocadas em meio de cultura sólido para o cultivo crescimento microbiano [Agar 15 g L⁻¹ (Kasvi) e 8 g L⁻¹ de Caldo Nutriente (acumedia); pH 7,0] e fúngico [Agar 15 g L⁻¹ e Malte 15 g L⁻¹(acumedia); pH 6,0]. As placas contendo as amostras foram colocadas em uma estufa B.O.D (34°C, 2 dias) (Figura 77).

Após várias etapas de cultivo em meio de cultura sólido os microrganismos foram isolados na forma de cultura pura totalizando 55 estirpes de bactérias e 18 de fungos.

Figura 77. Adição das amostras em meio de cultura sólido bacteriano e fúngico. **A-** Frutos verdes. **B-** Florescência.

A

B

Fonte: Autoria própria

1-4: Fragmentos das amostras colocadas na superfície do meio de cultura para o desenvolvimento microbiano.

8.2.2. Teste de coloração de Gram para as bactérias isoladas da citricultura

Preparo das soluções utilizadas no processo de coloração de Gram

a- Cristal violeta

Para a obtenção da solução cristal violeta foram preparadas duas soluções, solução A e solução B. A solução A foi obtida adicionando 2 g de cristal violeta com pureza de 90-95% em 20 mL de etanol 95%. Para a obtenção da solução B foram adicionados 0,8 g de oxalato de amônio em 80 mL de água destilada. Posteriormente as soluções foram misturadas colocando-se a solução B sobre a A e deixadas em repouso por 24 h, filtrando em seguida. A solução foi estocada em um frasco âmbar por um período máximo de 30 dias.

b- Solução de lugol (iodo iodeto de potássio)

Para a obtenção da solução de lugol foram adicionados lentamente 1g de iodo sólido e 2 g de iodeto de potássio em 300 mL de água destilada. Em seguida a solução foi estocada em um frasco âmbar e mantida em temperatura de 4°C por um período máximo de 30 dias.

c- Descorante

A solução de decolorante foi preparada por meio de uma mistura com 10 mL de acetona e 10 mL de etanol 95%.

d- Safranina

A solução de safranina foi preparada com a adição de 2,5 g de safranina em 100 mL de água destilada. Posteriormente a solução obtida foi diluída 10 vezes em água destilada.

Para a realização do teste de Gram as bactérias foram cultivadas em meio de cultura sólido como demonstrado na Seção 4.2.2. na ausência de qualquer agroquímico, após as 24 h de incubação prévia para averiguar o crescimento bacteriano, bem como a ausência de qualquer tipo de contaminação. Em seguida uma pequena porção da amostra foi transferida para uma lâmina de vidro (5x10 cm) e uma gota de água destilada foi adicionada. Em seguida foi feita um esfregão com uma alça de inoculação e então este material foi seco em um bico de Bunsen passando a lâmina de 4 a 5 vezes pela chama a depender da quantidade de amostrada adicionada (Figura 78).

Figura 78. Etapas para a fixação do microrganismo nas lâminas para posteriores realização do teste de Gram.

Adaptado de Tortora et al. (2010).

Após a secagem das células uma sequência de corantes foi utilizada para o rompimento da parede celular de cada microrganismo. Esse procedimento foi desenvolvido em 1884 por Hans Christian Gram e é utilizado até os dias atuais com grande desempenho.

- A- Aplicou-se uma solução de cristal violeta que possui a coloração púrpura, e aguardou-se o um minuto e meio;
- B- Posteriormente a lâmina foi lavada com água corrente para retirar o excesso da solução de cristal violeta;

- C- Em seguida adicionou-se a tintura de iodo, deixando reagir por mais 1 minuto e meio;
- D- Após o tempo corrido a lâmina foi então novamente lavada em água corrente e então foi aplicado álcool 96% deixando em repouso por 20 segundos;
- E- A lâmina mais uma vez foi lavada com água corrente e então foi aplicada a safranina, deixando a lâmina em repouso por 20 segundos e foi realizada uma última lavagem com água corrente;
- F- A lâmina foi então seca suavemente com papel toalha e levada para o microscópio e para averiguar se estas eram Gram-positivas ou Gram-negativas (Figura 79).

Figura 79. Etapas de adição dos corantes para a coloração de Gram.

Adaptado de Tortora et al. (2010).

8.2.3. Reação de cadeia polimerase (*polymerase chain reaction- PCR*)

8.2.3.1. Primeira etapa para a reação de cadeia polimerase

O crescimento das bactérias isoladas da citricultura da laranja em meio de cultura sólido foram posteriormente realizado em placas de Petri contendo 25 mL de meio de cultura [15 g L^{-1} de Agar- Kasvi, 8 g L^{-1} de Caldo Nutriente- Acumedia, pH 7]. A ausência de contaminação foi confirmada previamente por incubação das placas em estufa B.O.D (Nova Ética) a 32°C durante 24 h.

Posteriormente os microrganismos foram cultivados em meio de cultura líquido, em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio de cultura (Caldo Nutriente 8 g L^{-1} Acumedia), pH 7 e agitação orbital (130 rpm, 32°C). Nesta foi então utilizado um inóculo contendo 1 mL de suspensão (10^8 UFC/mL). Após 24 h de crescimento em meio líquido, 2 mL das amostras foram retiradas e inseridas em tubos eppendorf e centrifugados a 10.000 rpm, por 30 segundos. A seguir o meio líquido foi descartado e então o *pellet* foi ressuspensionado em 300 μL da solução *MicroBead Solution*. Em seguida a ressuspensão foi transferida para um novo tubo *MicroBead Tube* (Figura 80).

Figura 80. Primeira etapa para a realização da reação de cadeia polimerase.

Fonte: Autoria própria.

8.2.3.2. Segunda etapa para reação de cadeia polimerase

Após a transferência do *pellet* ao tubo eppendorf foi adicionado 50 μ L da *Solução MD1* e então foi realizada a homogenização em vortex por 10 min. Subsequentemente foi realizada uma centrifugação (10.000 rpm, 30 s). O sobrenadante foi então removido para um outro tubo eppendorf e foi adicionado a este 100 μ L da *Solução MD2*, e então foi realizada uma homogenização em vortex (Gehaka) por 5 s. Uma nova centrifugação foi procedida (10.000 rpm, 1 min), consecutivamente foram retirados 400 μ L da solução para um outro tubo eppendorf a este foi acrescentado 900 μ L da *Solução MD3*, e então homogeneizado em vortex por 5 s. Deste 700 μ L foi transferido para um *Spin Filter* e centrifugado (10.000 rpm, 30 s) (Figura 81).

Figura 81. Segunda etapa para a realização da reação de cadeia polimerase.

Fonte: Autoria própria.

8.2.3.3. Terceira etapa para a realização da reação de cadeia polimerase

Ao *Spin Filter* foram adicionados 300 µL da *Solução MD4* e então foi efetuada uma centrifugação (10.000 rpm, 30 s). O sobrenadante foi descartado, uma nova centrifugação (10.000 rpm, 1 min) foi realizada para a retirada da solução contida no *pellet*. Transferiu-se então o *Spin Filter* para um tubo eppendorf, a este foi adicionado 500 µL da *Solução MD5*, centrifugou-se (10.000 rpm, 30 s), descartou-se o *Spin Filter* e então obteve-se o DNA dos microrganismos (Figura 82).

Figura 82. Terceira etapa para a reação de cadeia polimerase.

Fonte: Autoria própria.

Os DNAs obtidos das bactérias foram então enviados para o Laboratório de Biotecnologia Animal/ Departamento de Zootecnia Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” ESALQ/ Universidade de São Paulo sobre a responsabilidade da Bióloga Nirlei Aparecida da Silva, para identificação dos gêneros.

8.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

8.3.1. Isolamento dos microrganismos isolados da citricultura da laranja

Foram realizadas coletas de amostras do solo, folhas saudáveis, folhas doentes por fungos e ácaros, folhas secas caídas no solo, frutos verdes (2-3 cm), frutos caídos no solo (2-3 cm), musgos presentes no caule, pétalas e ramos verdes. As plantas selecionadas estavam no período de pós-colheita e apresentavam algumas flores e frutos esporádicos. Posteriormente, as amostras em laboratório foram colocadas em meio de cultura sólido (15 g L⁻¹ de Ágar- Kasvi), 8 g L⁻¹ de caldo nutriente (Acumedia em pH 7) para favorecer o crescimento bacteriano. As placas contendo as amostras foram colocadas em estufa (34°C, 2 dias) para propiciar o crescimento dos microrganismos.

Após a obtenção das colônias dos microrganismos nas placas uma série de repiques sucessivos foram realizados para obter o isolamento das colônias puras. A Figura 83 ilustra o processo de crescimento, isolamento e purificação dos microrganismos de diferentes partes da planta *Citrus sinensis* em meio de cultura sólido.

Figura 83. Etapas de isolamento de microrganismos em meio de cultura sólido presente em amostras coletadas em pomar de *Citrus sinensis*.

Fonte: Autoria própria

Dentre os microrganismos isolados houve a predominância de bactérias as quais estavam presentes em todas as amostras coletadas. Foram isoladas 55 estirpes de bactérias (Tabela 21) e 18 de fungos (Tabela 22). Ensaios de coloração de Gram foram realizados e os microrganismos isolados foram preservados a -80°C . Para posteriormente serem identificado utilizando a técnica 16S rRNA.

Tabela 21. Estirpes de bactérias isoladas do pomar de *Citrus sinensis* em meio de cultura sólido.

Código	SOLO	Código	FOLHAS DOENTES
2RS1C	2º repique do solo 1º colônia	RFd1C	Repique das folhas doentes 1º colônia
2RS2C	2º repique do solo 2º colônia	Código	PÉTALAS
3RS1C	3º repique do solo 1º colônia	RP1C	Repique das pétalas 1º colônia
Código	GALHOS	2RP1C	2º repique das pétalas 1º colônia
2RG1C	2º repique dos galhos 1º colônia	Código	MUSGOS DO CAULE
2RG2C	2º repique dos galhos 2º colônia	2RMC1C	2º repique dos musgos do caule 1º colônia
3RG1C	3º repique dos galhos 1º colônia	2RMC2C	2º repique dos musgos do caule 2º colônia
3RG2C	3º repique dos galhos 2º colônia	3RMC1C	3º repique dos musgos do caule 1º colônia
Código	FRUTOS DO SOLO	Código	FRUTOS VERDES
RFSR1C	Repique dos frutos do solo 1º colônia	RFv1C	Repique dos frutos verdes 1º colônia
2RFSR1C	2º repique dos frutos do solo 1º colônia	RFv2C	Repique dos frutos verdes 2º colônia
2RFSR2C	2º repique dos frutos do solo 2º colônia	2RFv2C	2º repique dos frutos verdes 2º colônia
2RFSR3C	2º repique dos frutos do solo 3º colônia	2RFv3C	2º repique dos frutos verdes 3º colônia
3RFSR1C	3º repique dos frutos do solo 1º colônia	2RFv4C	2º repique dos frutos verdes 4º colônia
3RFSR2C	3º repique dos frutos do solo 2º colônia	3RFv1C	3º repique dos frutos verdes 1º colônia
3RFSR3C	3º repique dos frutos do solo 3º colônia	3RFv2C	3º repique dos frutos verdes 2º colônia
3RFSR4C	3º repique dos frutos do solo 4º colônia	4RFv1C	4º repique dos frutos verdes 1º colônia
3RFSR5C	3º repique dos frutos do solo 5º colônia	Código	FLORESCÊNCIA
4RFSR1C	4º repique dos frutos do solo 1º colônia	2RF11C	2º repique da florescência 1º colônia
4RFSR2C	4º repique dos frutos do solo 2º colônia	2RF12C	2º repique da florescência 2º colônia
Código	FOLHAS SADIAS	3RF3C	2º repique das folhas 3º colônia
RF1C	Repique das folhas sadias 1º colônia	3RF4C	3º repique das folhas 4º colônia
2RF1C	2º repique das folhas sadias 1º colônia	4RF1C	4º repique das folhas 1º colônia
2RF2C	2º repique das folhas sadias 2º colônia	4RF2C	4º repique das folhas 2º colônia
2RF3C	2º repique das folhas sadias 3º colônia		

Código	FOLHAS DO SOLO
3RF1C	3º repique das folhas sadias 1º colônia
3RF2C	3º repique das folhas sadias 2º colônia
3RF3C	3º repique das folhas sadias 3º colônia
3RF4C	3º repique das folhas sadias 4º colônia
3RF5C	3º repique das folhas sadias 5º colônia
2RF3C	2º repique das folhas 3º colônia
3RF4C	3º repique das folhas 4º colônia
RFsR1C	Repique das folhas do solo 1º colônia
2RFsR1C	2º repique das folhas do solo 1º colônia
2RFsR2C	2º repique das folhas do solo 2º colônia
3RFsR6C	3º repique das folhas do solo 6º colônia
4RFsR1C	4º repique das folhas do solo 1º colônia
4RFs2C	4º repique das folhas do solo 2º colônia

O número de estirpes fúngicas isoladas foi menor que as estirpes bacterianas. Durante o processo de isolamento dos fungos foram realizadas cerca de 12 repiques para se obter uma colônia isolada. Destaca-se que se utilizou o meio de cultura Caldo Nutriente para isolar preferencialmente bactérias. Contudo, também cresceram alguns fungos os quais foram isolados.

Tabela 22. Estirpes de fungos isolados do pomar de *Citrus sinensis* em meio de cultura sólido.

Código	SOLO	Código	FRUTOS VERDES
FRS1C	Fungo repique do solo 1º colônia	FRFv1C	Fungo repique dos frutos verdes 1º colônia
Código	GALHOS	Código	FLORESCÊNCIA
F2RG1C	Fungo 2º repique dos galhos 1º colônia	F2RF11C	Fungo 2º repique da florescência 1º colônia
F2RG2C	Fungo 2º repique dos galhos 2º colônia	F2RF12C	Fungo 2º repique da florescência 2º colônia
F2RG3C	Fungo 2º repique dos galhos 3º colônia	F2RF13C	Fungo 2º repique da florescência 3º colônia
F2RG4C	Fungo 2º repique dos galhos 4º colônia	F2RF14C	Fungo 2º repique da florescência 4º colônia
Código	FRUTOS VERDES	Código	FOLHAS DO SOLO
FRFv1C	Fungo repique dos frutos verdes 1º colônia	F2RFSR1C	Fungo 2º repique das folhas do solo 1º colônia
Código	FRUTOS DO SOLO	Código	PÉTALAS
F2RFSR1C	Fungos 2º repique dos frutos do solo 1º colônia	FRP2C	Fungo repique das pétalas 1º colônia
F2RFSR2C	Fungos 2º repique dos frutos do solo 2º colônia	F2RP2C	Fungo 2º repique das pétalas 2º colônia
F2RFSR3C	Fungos 2º repique dos frutos do solo 3º colônia	F2RP3C	Fungo 2º repique das pétalas 3º colônia

No processo de isolamento foram obtidas estirpes de bactérias em todas as amostras coletadas (solo, folhas saudias, folhas doentes, folhas do solo, florescência, frutos verdes, frutos do solo, musgos do caule, pétalas e galhos). A predominância de bactérias isoladas dos frutos do solo, sendo obtidas 11 linhagens e a amostra que obteve o menor número de microrganismos isolados foi nas folhas “doentes” com uma única linhagem isolada. Estirpes de fungos não foram isoladas nas amostras de folhas saudias, folhas “doentes” e musgos do caule e o maior número de fungos isolados foram obtidos da florescência e dos galhos, ambos com 4 linhagens isoladas (Figura 84).

Figura 84. Gráfico da presença de estirpes de bactérias e fungos isolados de amostras coletadas da plantação de *Citrus sinensis*.

8.3.2. Identificação dos microrganismos isolados da citricultura da laranja

Dentre os microrganismos isolados foram usadas apenas as linhagens de bactérias para os estudos posteriores de identificação. As estirpes passaram pelo processo de identificação, por meio da amplificação do DNA, para serem identificados no Laboratório de Biotecnologia ESALQ. Novos códigos foram dados as linhagens, sendo nomeadas, CSA-1 a CSA- 42.

De acordo com as sequências de 16S rDNA obtidas através da sequenciação genética, foram possíveis obter árvores filogenéticas utilizando o Programa Mega 6.0 Mega (Molecular Evolutionary Genetics Analysis). As sequências parciais do 16S rDNA foram variando-se em comprimentos de 429 a 540 nucleotídeos.

Algumas das árvores filogenéticas foram divididas em grupos (*clusters*) para uma melhor organização das variáveis (neste caso as espécies de bactéria) obtidas. Sendo assim:

- a) 1º *cluster* foram as amostras coletadas dos frutos do solo;
- b) 2º *cluster* foram as amostras coletadas das folhas do solo, solo e musgo do caule;
- c) 3º *cluster* foram as amostras coletadas das folhas saudáveis e doentes;
- d) 4º *cluster* foram as coletadas dos frutos verdes, pétalas, fluorescência e galhos.

O microrganismo *Methanosaeta harundinacea* (filo: *Euryarchaeota*, domínio: *Archaea*) foi aplicado como grupo externo em todas as árvores filogenéticas, porque todas as estirpes isoladas e identificadas foram de bactérias.

Dentre as bactérias isoladas e identificadas no 1º *cluster* (frutos do solo) 55% pertenceram ao gênero *Bacillus*, 36%, ao gênero *Paenibacillus* e 9% ao gênero *Lysinibacillus* (Figura 85). É importante observar que as distâncias evolutivas estão representadas em percentagens nas árvores filogenéticas. Três linhagens das bactérias isoladas da 1ª *cluster* foram identificadas como *Paenibacillus* sp. CSA-3, *Paenibacillus* sp. CSA-4 e *P. taiwanensis* CSA-7.

Figura 85. Árvore filogenética dos microrganismos isolados e identificados na 1ª cluster (frutos do solo). *Methanosaeta harundinacea* foi utilizada como grupo externo. A barra de escala indica a distância filogenética.

Para os microrganismos isolados e identificados no 2º *cluster* (folhas do solo, solo e musgo do caule), 60% foram do gênero *Bacillus*, 20% do gênero *Paenibacillus* e 9% *Lysinibacillus* (Figura 86). Seis estirpes bacterianas do 2º *cluster* foram identificadas como *Bacillus* sp. CSA-26, *Paenibacillus* sp. CSA-6, *Paenibacillus* sp. CSA-9, *B. aryabhattai* CSA-17, *B. aryabhattai* CSA-18, *Lysinibacillus* sp. CSA-28 e *Lysinibacillus* CSA-37.

Figura 86. Árvore filogenética dos microrganismos isolados e identificados no 2º *cluster* (folhas do solo, solo e musgo do caule). *Methanosaeta harundinacea* foi utilizado como grupo externo. A barra de escala indica a distância filogenética.

Para as bactérias do 3º cluster (folhas saudáveis e doentes) o gênero *Bacillus* foi predominante (Figura 87). Tendo as espécies identificadas como *B. amyloliquefaciens* CSA-30, *B. pseudomycolides* CSA-12, *B. pseudomycolides* CSA-16, *B. pseudomycolides* CSA-42, *B. pseudomycolides* CSA-34 e a como *B. megaterium* CSA-15.

Figura 87. Árvore filogenética dos microrganismos isolados e identificados no 3º cluster (folhas saudáveis e doentes). *Methanosaeta harundinacea* foi utilizada como grupo externo. A barra de escala indica a distância filogenética.

As estirpes isoladas e identificadas no 4º cluster (frutos verdes, pétalas, fluorescência e galhos) 64% foram do gênero *Bacillus*, 27% do gênero *Achromobacterium* e 9%, do gênero *Microbacterium* (Figura 87). No 4º cluster foi possível a identificação das espécies *B. pseudomycoïdes* CSA- 23, *B. pseudomycoïdes* CSA-27, *B. pseudomycoïdes* CSA-33, *B. pseudomycoïdes* CSA-39 e *B. mycoïdes* CSA-35.

Figura 88. Árvore filogenética dos microrganismos isolados e identificados no 4º cluster (frutos verdes, pétalas, fluorescência e galhos). *Methanosaeta harundinacea* foi utilizada como grupo externo. A barra de escala indica a distância filogenética.

No processo de identificação das bactérias isoladas da citricultura da laranja neste trabalho foram possíveis averiguar a presença de cinco gêneros distintos, sendo estes *Bacillus*, *Paenibacillus*, *Lysinibacillus*, *Achromobacterium* e *Microbacterium*. O gênero *Bacillus* é constituído de microrganismos aeróbeos ou tolerantes a ausência de oxigênio quando ocorre a formação de endósporos pelos mesmos. Sendo assim, é um gênero o qual tem grande capacidade de adaptar-se em diversificados ambientes, tais como, solo, água, folha, frutos, bem como, no organismo humano. A facilidade pela qual este tipo de gênero possui para colonizar-se pode justificar o porquê este foi predominante nas bactérias isoladas e identificadas da citricultura da laranja (CADORET et al., 2017); (FRITZE, 2004); (PRIEST; GOODFELLOW; TOOD, 1988).

A diversidade do gênero também traz uma ampla variedade nas espécies, o que é de interesse biotecnológico entre a indústria e os cientistas, visto que o metabolismo de cada espécie pode promover diferentes resultados, como danos ao ser humano, tal como, *Bacillus thuringiensis* que são microrganismos patogênicos ou proporcionar soluções como no processo de fermentação industrial e biorremediação. Por exemplo, o gênero com uma determinada espécie pode ser empregado para a descontaminação de compostos orgânicos e solventes que são muito utilizados na produção de insumos na área farmacêutica, em tintas, vernizes, adesivos, pesticidas, dentre outros contaminantes (THOMAS; RAM; SINGH, 2017); (ARFFIN et al., 2006); (WILSON, 2011).

O gênero *Paenibaacillus* e *Lysinibacillus* são considerados anaeróbeos sendo anteriormente pertencentes ao gênero *Bacillus*. Estes gêneros já foram isolados de diversos ambientes tais como, solo, água, rizosfera, vegetais, larvas de matéria orgânica, insetos, bem como, de amostras clínicas. Espécies destes gêneros possuem diversificadas funções, podendo ser utilizados na agricultura como é o caso do *Paenibacillus polymyxa*, na produção industrial (*Paenibacillus amylolyticus*), em aplicações médicas (*Paenibacillus peoriae*) e no processo de biorremediação (*Paenibacillus* sp. AD, *Lysinibacillus sphaerius*) dentre outras aplicações (SHAW; DUSSAN, 2018); (PHAM et al., 2017); (LAL; TABACCHIONI, 2009); (OUYANG et al., 2008); (CHOI et al., 2004); (NIESEN; SORENSEN, 1997).

Microbacterium é um gênero que possui pigmentação amarelada, trata-se de um microrganismo com poucos estudos quando relacionados à patogenia (OSAMU et al., 2015). Dados na literatura relataram a presença desse tipo de bactéria em ambientes

terrestres, aquáticos englobando a rizosfera das plantas e em plantas leguminosas. As *Microbacterium* podem ser consideradas microrganismos endófitos, porém estudos mais direcionados precisam ser realizados para esta confirmação (ALVES et al., 2014); (ZAKHIA et al., 2006). Estudos realizados por Avramov et al. (2016) e Mansouri et al. (2017) relataram a utilização de *Microbacterium* em biorremediação de pesticidas tais como dieldrin, atrazina e mirex.

Dentre as formas de distinguir os microrganismos isolados da citricultura da laranja apenas a morfologia foi estudada. Segundo dados na literatura as bactérias podem ter tamanhos diferenciados variando-se entre 0,2-2,0 μm e 2-8 μm de diâmetro e as formas mais conhecidas são de bastonetes (bacilos), cocos, vibriões e espiral. Os cocos possuem a morfologia arredondadas, mas não necessariamente são sempre arredondados, estes podem ser ovais, alongados ou até mesmo achatados. No processo de divisão os cocos podem permanecer ligados e assim formar os diplococos, estreptococos, estafilococos, tétrades e sarcinas. O mesmo acontece quando a morfologia for bacilos estes podem ser, diplobacilos (com duas unidades de bacilo), estreptobacilos e os cocobacilos que é uma unidade de cocos juntamente com uma unidade de bacilo, além destes tem-se os vibriões e os espirilos (Figura 89) (TORTA, 2012); (BROCK, 2004).

Figura 89. Algumas formas morfológicas de células bacterianas.

Adaptado de Tortora et al., 2010

Nas linhagens isoladas da citricultura da laranja foram encontradas apenas bactérias com as morfologias de cocos e bacilos (Tabela 23, p. 250). É importante ressaltar que a morfologia bacteriana é estabelecida por meio da hereditariedade e que grande parte das bactérias são geneticamente monomórficas, porém também existem as pleomórficas (TORTA, 2012); (BROCK, 2004).

As análises de Gram foram realizadas para todas as bactérias isoladas, neste processo a parede celular do microrganismo é rompida. “A parede celular de uma bactéria é uma estrutura complexa, semirrígida e é responsável pela forma da célula” (TORTA, 2012).

Para definir se uma bactéria é Gram-positiva ou Gram-negativa é importante saber como é formada a sua parede celular. Em geral, as paredes celulares bacterianas são formadas por uma cadeia de peptideoglicana que consiste de um dissacarídeo e estes por sua vez são formados por N-acetilglicosina (NAG) e ácido acetilmurânico (NAM). Para manter ligados entre si as cadeias de peptideoglicanas são formadas por redes de aminoácidos, sendo estes de cadeias laterais e pontes cruzadas e a ligação de um aminoácido a outro é realizada por ligações peptídicas (Figura 90) (TORTA, 2012); (BROCK, 2004).

Figura 90. Estrutura esquemática de peptideoglicanas que constituem a parede celular das bactérias.

Adaptado de Tortora et al., 2010

Sabendo-se de que é formada as paredes celulares bacterianas é possível entender como funciona o processo de coloração de Gram, pois todo o comportamento celular do experimento difere-se na estrutura da parede celular dos microrganismos. Bactérias Gram-positivas possuem a estrutura da parede celular mais simples quando comparada com as bactérias Gram-negativas. Bactérias Gram-positivas dispõem de parede celular composta por peptidoglicanos, NAG e NAM na parte superior de uma membrana plasmática contendo as proteínas em seu interior. Além de ácidos teitoico e lipoteitoico que auxiliam a manter a parede celular. Apresentam-se revelando a coloração violeta quando ocorre a ruptura da mesma (Figura 90) (TORTA, 2012); (BROCK, 2004).

Dados na literatura descrevem diversas estirpes bacterianas de coloração Gram-positiva como é o caso de *B. subtilis*, *B. psychrosaccharolyticus* Hsp33, *Clostridium acetobutylicum* (TORRES et al., 2011), *Gordonia* sp. (MULLA et al., 2018), gênero *Geobacillus* (SYDOW et al., 2018) entre outras. Porém, Torres et al. (2011), ressaltaram que pouco se conhece sobre a tolerância que os microrganismos Gram-positivos possuem com relação aos solventes utilizados para o teste de Gram e então ainda não se é possível explicar o mecanismo que estes possuem na parede celular para que possam ter tal tolerância.

Algumas hipóteses foram levantadas, tais como, em momento de estresse (variação de pH e temperatura) o microrganismo produz maior número de proteínas no interior da membrana deixando essa por sua vez mais espessa o que dificulta a ação dos corantes (TORRES et al., 2011).

Os microrganismos Gram-negativos possuem a parede celular formada por uma camada peptidoglicana juntamente com a membrana externa. Esta por sua vez possui proteína no interior, bem como, para as Gram-positivas, porém a parede celular Gram-negativa é interligada com uma nova camada de membrana plasmática por meio de lipoproteínas (Figura 91). Outros agentes são atuantes na parede celular Gram-negativa como exemplo os lipopolissacarídeos, cerne polissacarídico, lipídeo A e polissacarídeo O, revelando-se de coloração rosa quando ocorre a ruptura da mesma (TORTA, 2012); (BROCK, 2004).

Dados na literatura relatam que microrganismos Gram-negativos, tais como, *Aeromonas hydrophila* K12, *Chryseobacterium indologenes* A22 e *Serratia marcescens*

P3 (BATCH et al., 2011), *Chryseobacterium indologenes* A22 e *Aeromonas hydrophila* K12. (BATCH et al., 2015)

Figura 91. Parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Dentre os microrganismos isolados da citricultura da laranja 45% mostraram-se Gram-negativos e 54% Gram-positivos. Muitos corroboram com dados na literatura como por exemplo *B. cereus* CSA-1 ou *Bacillus* sp. CSA-21, que são Gram-positivas (PARK et al., 2018); (YOUNNES et al., 2018) (Tabela 23). Existem microrganismos que apresentaram-se também Gram-negativos como *Achromobacter animicus* ou *Achromobacter* sp. CSA-40, o qual corrobora com a literatura (MOREMI et al., 2014).

Tabela 23. Identificação de estirpes bacterianas isoladas do 1, 2, 3 e 4º cluster por biologia molecular, teste de Gram e morfologia

Estirpe isolada (código)	Bactéria (semelhança)	Número de acesso (GenBank)	Gram-literatura/Gram-experimento	Morfologia
CSA-1	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus</i> sp.	MF495498.1 KY910062.1 KX618415.1	<i>B. cereus</i> , positiva (PARK et al., 2018) <i>Bacillus</i> sp., positiva (YOUNNES et al., 2018)/ positiva	bastonete
CSA-2	<i>Bacillus</i> sp.	MF511824.1	<i>Bacillus</i> sp., positiva (YOUNNES et al., 2018)/ positiva	bastonete
CSA-3	<i>Paenibacillus</i> sp.	LC133621.2	Positiva (WENZLER et al., 2015)/ positiva	bastonete

Continuação

CSA-4

Paenibacillus sp.

KU041667.1

Cocos

Positiva (WENZLER et al., 2015)/
negativa

CSA-5

Bacillus safensis
Bacillus pumilus

MF523637.1
MF540569.1

Cocos

B. safensis, positiva (FONSECA et al.,
2015)
B. pumilus, positiva (KUSMIATUN et
al., 2015)
/ positiva

CSA-6

Paenibacillus sp.

LC133621.1

bastonete

Positiva (WENZLER et al., 2015)/
positiva

Continuação

CSA-7

Paenibacillus taiwanensis

KP326367.1

bastonete

Positiva (BACH et al., 2016)/ positiva

CSA-8

Paenibacillus sp.
Bacillus sp.

KU041667.1
KF995492.1

bastonete

Paenibacillus sp., positiva (WENZLER et al., 2015) *Bacillus* sp., positiva (YOUNNES et al., 2018)/ positiva

CSA-9

Paenibacillus sp.

KU041667.1

bastonete

Positiva (WENZLER et al., 2015)/
positiva

Continuação

CSA-10	<i>Bacillus</i> sp. <i>Bacillus aryabhatai</i>	KX645723.1 MF537625.1		bastonete
			<p><i>Bacillus</i> sp., positiva (YOUNNES et al., 2018) <i>B. aryabhatai</i>, positiva (PAILAN et al., 2015)/ positiva</p>	
CSA-11	<i>Achromobacter</i> <i>denitrificans</i> <i>Achromobacter</i> sp.	MF144473.1 MF144503.1		cocos
			<p><i>A. denitrificans</i> (Não relatado na literatura) <i>Achromobacter</i> sp., negativa (BORLOI et al., 2014) /negativa</p>	
CSA-12	<i>Bacillus</i> <i>pseudomyoides</i> <i>Bacillus</i> <i>pseudomyoides</i>	KY621921.1 KU254640.1		bastonete
			<p>Positiva (LI et al., 2016)/ positiva</p>	

CSA-13	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus mycoides</i>	MF5544643 KT210119.1		Cocos
<i>B. cereus</i> , positiva (PARK et al., 2018) <i>B. mycoides</i> , positiva (TURCHI et al., 2012) /positiva				
CSA-14	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus</i> sp.	MF526969.1 KX645714.1		Cocos
<i>B. cereus</i> , positiva (PARK et al., 2018) <i>Bacillus</i> sp., positiva (YOUNNES et al., 2018)/ positiva				
CSA-15	<i>Bacillus megaterium</i> <i>Bacillus megaterium</i>	MF537621.1 KX580170.1		bastonete
Positiva (YOU et al., 2018)/ negativa				

Continuação

CSA-16	<i>Bacillus pseudomycoides</i> <i>Bacillus pseudomycoides</i>	KY621921.1 KU254640.1		bastonete
			Positiva (LI et al., 2016)/ positiva	
CSA-17	<i>Bacillus aryabhatai</i>	MF537625.1		bastonete
			Positiva (PAILAN et al., 2015)/ positiva	
CSA-18	<i>Bacillus aryabhatai</i>	MF537625.1		bastonete
			Positiva (PAILAN et al., 2015)/ positiva	

CSA-19	<i>Bacillus cereus</i> <i>Bacillus</i> sp.	MF526969.1 KX645714.1		bastonete
CSA-20	<i>Bacillus pseudomycoides</i> <i>Bacillus anthracis</i>	KX661360.1 KY312803.1		bastonete
CSA-21	<i>Bacillus mycoides</i> <i>Bacillus cereus</i>	KX268133.1 LT603028.1		
CSA-22	<i>Lysinibacillus</i> sp. <i>Lysinibacillus macrolides</i>	LMF465572.1 KY753330.1		
CSA-23	<i>Bacillus pseudomycoides</i>	KY312792.1		

B. cereus, positiva (PARK et al., 2018)
Bacillus sp., positiva (YOUNNES et al., 2018) / negativa
B. pseudomycoides, positiva (LI et al., 2016)
B. anthracis, positiva (BASSY et al., 2018)

B. mycoides, positiva (TURCHI et al., 2012)
B. cereus, positiva (GODIČ and BEDENIČ, 2018) / positiva

Lysinibacillus sp.,
positiva (WENZLER et al., 2015)
Lysinibacillus macrolides (Não
relatado na literatura)
/ positiva

Positiva (LI et al., 2016)

Continuação

CSA-24

Bacillus mycoides
Bacillus subtilis

KT210119.1
MF0012861

bastonete

B. mycoides, positiva (TURCHI et al., 2012)
B. subtilis, positiva (SARIKHANI et al., 2018)
/ positiva

CSA-25

Bacillus pseudomycooides
Bacillus pseudomycooides

KU254660.1
KY621921.1

bastonete

Positiva (LI et al., 2016)/ positiva

CSA-26

Bacillus sp.

KX583524.1

bastonete

Bacillus sp., positiva (YOUNNES et al., 2018)/ positiva

Continuação

CSA-27 *Bacillus
pseudomycoides* KY312792.1

bastonete

Positiva (LI et al., 2016)/ negativa

CSA-28 *Lysinibacillus* sp.
Lysinibacillus sp. MF465572.1
KX467233.1

bastonete

Positiva (WENZLER et al., 2015)/
positiva
Positiva (WENZLER et al., 2015)/
negativa

CSA-29 *Achromobacter spanius* KJ023254.1

Não relatado na literatura

CSA-30 *Bacillus
amyloliquefaciens*
*Bacillus
amyloliquefaciens* MF510169. 1
KX845683.1

bastonete

Positiva (RAHMAN et al., 2018)/
positiva

Continuação

CSA-31	<i>Bacillus</i> sp. <i>Bacillus</i> sp. <i>Bacillus mycoides</i>	KX583524.1 KR063185.1 KT210119.1		bastonete	<i>Bacillus</i> sp., positiva (YOUNNES et al., 2018) <i>B. mycoides</i> , positiva (TURCHI et al., 2012) /negativa
CSA-32	<i>Bacillus pumilus</i> <i>Bacillus safensis</i>	MF540569.1 MF523646.1			<i>B. pumilus</i> , positiva (KUSMIATUN et al., 2015) <i>B. safensis</i> , positiva (FONSECA et al., 2015)
CSA-33	<i>Bacillus pseudomycoides</i>	KY312792.1		bastonete	Positiva (LI et al., 2016)/ negativa
CSA-34	<i>Bacillus pseudomycoides</i> <i>Bacillus pseudomycoides</i>	KY621921.1 KU254640.1		bastonete	Positiva (LI et al., 2016)/ positiva
CSA-35	<i>Bacillus mycoides</i>	KX268123.1		bastonete	Positiva (TURCHI et al., 2012) / positiva

Continuação

CSA-36

Bacillus mycoides
Bacillus cereus

KX26133.1
LT603028.1

bastonete

B. mycoides, positiva (TURCHI et al., 2012)
B. cereus, positiva (PARK et al., 2018)
/ positiva

CSA-37

Lysinibacillus sp.
Lysinibacillus sp

MF465572.1
KX467233.1

bastonete

Positiva (WENZLER et al., 2015)/
positiva
Positiva (WENZLER et al., 2015)/
positiva

CSA-38

Bacillus sp.
Bacillus anthracis

MF405124.1
MF062970.1

bastonete

Bacillus sp., positiva (YOUNNES et al., 2018)
B. anthracis, positiva (BASSY et al., 2018)/
positiva

Continuação

CSA-39 *Bacillus pseudomycoides* KY312792.1

Bastonete

Positiva (LI et al., 2016)/ positiva

CSA-40 *Achromobacter animidaclopridocus*
Achromobacter sp. HG423440.1
AB772984.1

A. animidaclopridocus, negativa
(MOREMI et al., 2017)
Achromobacter sp., negativa (BORLOI
et al., 2014)

CSA-41 *Microbacterium* sp.
Microbacterium sp. KX185395.1
KY848820.1

Cocos

Positiva (OSAMU et al., 2015)/
positiva

CSA-42 *Bacillus pseudomycoides*
Bacillus pseudomycoides KY621921.1
KU254640.1

Bastonete

Positiva (LI et al., 2016)/ positiva

8.4. Apêndice- B

Figura 92. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 para a metodologia MCT-1. (A) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 1 em 3 dias. (B) Comparação dos cromatogramas da reação de biodegradação no período de 3, 6 e 9 dias.

Condições de análise: Coluna C-18: o material foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-40 min, 5-100% B; 40-50 min, 100% B. A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, com split 1/4 pós- coluna e volume de injeção de 30 µL. O tempo de retorno foi de 10 min.

Figura 93. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 para a metodologia MCT-2. (A) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 1 em 3 dias. (B) Comparação dos cromatogramas da reação de biodegradação no período de 3, 6 e 9 dias.

Condições de análise: Coluna C-18: o material foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-40 min, 5-100% B; 40-50 min, 100% B. A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, com split 1/4 pós- coluna e volume de injeção de 30 µL. O tempo de retorno foi de 10 min.

Figura 94. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida tiametoxam pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 para a metodologia MCT-3. (A) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 3 em 3 dias. (B) Comparação dos cromatogramas da reação de biodegradação no período de 3, 6 e 9 dias.

Condições de análise: Coluna C-18: o material foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-40 min, 5-100% B; 40-50 min, 100% B. A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, com split 1/4 pós- coluna e volume de injeção de 30 µL. O tempo de retorno foi de 10 min.

Tabela 24. Espectro de massas obtidos por LC-MS/MS para a obtenção dos possíveis metabólitos da biodegradação do tiametoxam por *Bacillus* sp. CSA-21.

Continuação

Figura 95. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 para a metodologia MCI-1. (A) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 3 em 3 dias. (B) Comparação dos cromatogramas da reação de biodegradação no período de 3, 6 e 9 dias.

Condições de análise: Coluna C-18: o material foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-40 min, 5-100% B; 40-50 min, 100% B. A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, com split 1/4 pós- coluna e volume de injeção de 30 µL. O tempo de retorno foi de 10 min.

Figura 96. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 para a metodologia MCI-2. (A) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 3 em 3 dias. (B) Comparação dos cromatogramas da reação de biodegradação no período de 3, 6 e 9 dias.

Condições de análise: Coluna C-18: o material foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-40 min, 5-100% B; 40-50 min, 100% B. A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, com split 1/4 pós- coluna e volume de injeção de 30 µL. O tempo de retorno foi de 10 min.

Figura 97. Cromatogramas obtidos por LC-MS/MS para a reação de biodegradação do pesticida imidacloprido pela bactéria *Bacillus* sp. CSA-21 para a metodologia MCI-3. (A) Cromatograma da reação de biodegradação da replicata 3 em 3 dias. (B) Comparação dos cromatogramas da reação de biodegradação no período de 3, 6 e 9 dias.

Condições de análise: Coluna C-18: o material foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-40 min, 5-100% B; 40-50 min, 100% B. A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, com split 1/4 pós- coluna e volume de injeção de 30 µL. O tempo de retorno foi de 10 min.

Tabela 25. Espectro de massas obtidos por LC-MS/MS para a obtenção dos possíveis metabólitos de biodegradação do imidacloprido por *Bacillus* sp. CSA-21.

Continuação