

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

Lohany Idargo de Souza

**Biodegradação e biorremediação *ex situ* do pesticida  
esfenvalerato mediado por microrganismos isolados do  
solo**

São Carlos

2021

**Lohany Idargo de Souza**

**Biodegradação e biorremediação *ex situ* do pesticida  
esfenvalerato mediado por microrganismos isolados do  
solo**

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Química.

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

**Exemplar revisado**

O exemplar original encontra-se em acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

**São Carlos**

**2021**



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

**Assinatura:**

**Data:**

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

Souza, Lohany Idargo de

Biodegradação e biorremediação ex situ do pesticida esfenvalerato mediado por microrganismos isolados do solo / Lohany Idargo de Souza. — São Carlos, 2021.

157 f.

Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2021.

Edição revisada

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Meleiro Porto

1. Biodegradação. 2. Biorremediação. 3. Esfenvalerato. 4. Solo. 5. Microrganismos. I. Título.



## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. André Luiz Meleiro Porto que durante o meu mestrado me orientou com os seus mais ricos conhecimentos e não mediu esforços para cumprir a função mais bonita do mundo que é a de ensinar. Agradeço pela paciência e pelos ensinamentos dos quais esses são levados durante a vida.

Ao Dr. William Garcia Birolli por ter compartilhado comigo parte do seu conhecimento e por ter me ajudado a cumprir uma importante etapa da minha vida.

A Universidade de São Paulo (USP) e ao Instituto de Química de São Carlos (IQSC) pela oportunidade de crescimento profissional e realização pessoal.

Ao meu esposo Joelson Antônio dos Santos pela paciência, compreensão e por sempre apoiar e viver junto comigo os meus sonhos.

A minha avó Nilsa Ferreira Idargo que me ensinou que para visualizar a chegada precisa ter persistência e que para isso nunca devemos desistir. A você deixo aqui o meu muito obrigado! Agradeço por embarcar comigo em todos os meus sonhos e por nunca ter medido esforços para me ajudar a realizá-los.

A minha tia Enedina Maria Fernandes por ter me ensinado desde pequena os valores da vida.

Aos meus amigos que ganhei durante o período do mestrado e que pretendo levá-los comigo para o resto da vida.

As agências de fomento CNPq, CAPES e FAPESP.

A todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho e que não mediram esforços para me ajudar a executá-lo. Especialmente a técnica Marília Cardoso Milanetto, os funcionários da Comissão de Pós-Graduação (CPG), da biblioteca, aos porteiros e zeladores dos prédios e especialmente a Dona Edivânia pelas conversas, apoio e o carinho dedicado a todos nós do laboratório de Química Orgânica e Biocatálise.

## RESUMO

DE SOUZA, L. I. **Biodegradação e biorremediação *ex situ* do pesticida esfenvalerato mediado por microrganismos isolados do solo.** 2021. 156p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

O uso indiscriminado de defensivos agrícolas pode levar a contaminação do solo, do ar, da água e colocar em risco o ecossistema. A classe dos piretróides compõe um grupo de pesticidas que vem sendo bastante utilizado no mundo, mesmo apresentando poucos estudos relacionados ao seu acúmulo no meio ambiente e nos seres vivos. Sendo assim, este estudo teve como objetivo avaliar a degradação do esfenvalerato em meio líquido e em solo pela ação de microrganismos. Para isso foram isoladas 16 bactérias e 6 fungos de uma amostra composta de solo coletada a 20 cm de profundidade, os quais foram capazes de crescer em uma concentração inicial de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  do pesticida em meio de batata-dextrose-agar. Em seguida foram selecionados os microrganismos mais promissores para realizar os estudos de biodegradação. Os resultados foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). Os melhores isolados quanto à biodegradação do pesticida esfenvalerato foram a bactéria *Cupriavidus* sp. (QOB-B09) a qual sozinha degradou em média 85% da concentração inicial do pesticida ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) em meio líquido de caldo nutriente (5 dias), o consórcio bacteriano composto pelos isolados QOB-B01, QOB-B02, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15 atingiu uma média de 99% degradação da concentração inicial do pesticida ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) em meio líquido caldo nutriente (5 dias) e 27% em solo (28 dias). O isolado fúngico QOB-F02 degradou em média 44% da concentração inicial do esfenvalerato ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) em meio líquido de malte 2% (7 dias) e em solo degradou em média 21% do pesticida (28 dias). Os principais metabólitos foram identificados e analisados em um cromatógrafo a gás acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG-EM). Foram encontrados os principais produtos de degradação do pesticida esfenvalerato o 3-fenoxibenzaldeído (PBald), o ácido 3-fenoxibenzoico (PBAc), o álcool 3-fenoxibenzílico (PBA) e o ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutírico (CLAc). Os microrganismos degradaram concentrações diferentes do pesticida esfenvalerato com isso a seleção de microrganismos resistentes aliada aos estudos de biorremediação *ex situ* ajudou a compreender quais isolados poderiam ser usados como uma ferramenta na biorremediação dos problemas causados pelos impactos ambientais envolvendo esse xenobiótico.

**Palavras-chave:** Biodegradação; Biorremediação; Esfenvalerato; Solo; Microrganismos.

## ABSTRACT

DE SOUZA, L. I. **Biodegradation and *ex situ* bioremediation of the esfenvalerate pesticide mediated by microorganisms isolated from the soil.**

2021. 156p. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2021.

The indiscriminate use of pesticides can lead to contamination of soil, air, water and put the ecosystem at risk. The class of pyrethroids is part of a group of pesticides that has been widely used in the world, even with few studies related to their accumulation in the environment and in living beings. Therefore, this study aimed to evaluate the degradation of esfenvalerate in liquid and soil by the action of microorganisms. For this, 16 bacteria and 6 fungi were isolated from a sample composed of soil collected at 20 cm depth, which were able to grow at an initial concentration of  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  of the pesticide in potato-dextrose-agar medium. Then, the most promising microorganisms were selected to carry out the biodegradation studies. The results were analyzed by High Performance Liquid Chromatography (HPLC). The best isolates for biodegradation of the esfenvalerate pesticide were the bacterium *Cupriavidus* sp. (QOB-B09) which alone degraded an average of 85% of the initial concentration of the pesticide ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) in liquid medium of nutrient broth (5 days), the bacterial consortium composed of the isolates QOB-B01, QOB-B02, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) and QOB-B15 reached an average of 99% degradation of the initial concentration of the pesticide ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) in liquid broth nutrient (5 days) and 27% in soil (28 days). The fungal isolate QOB-F02 degraded an average of 44% of the initial concentration of esfenvalerate ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) in 2% liquid malt medium (7 days) and in soil it degraded an average of 21% of the pesticide (28 days). The main metabolites were identified and analyzed in a gas chromatograph coupled to the Mass Spectrometer (CG-EM). The main degradation products of the esfenvalerate pesticide were found: 3-phenoxybenzaldehyde (PBald), 3-phenoxybenzoic acid (PBAc), 3-phenoxybenzyl alcohol (PBA) and 2- (4-chlorophenyl) -3-methylbutyric acid (CLAc). The microorganisms degraded different concentrations of the esfenvalerate pesticide, thus the selection of resistant microorganisms combined with *ex situ* bioremediation studies helped to understand which isolates could be used as a tool in the bioremediation of the problems caused by the environmental impacts involving this xenobiotic.

**Keywords:** Biodegradation; Bioremediation; Esfenvalerate; Ground; Microorganisms.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura molecular da piretrina, a molécula que originou os grupos de classes dos piretróides sintéticos. . . . .	24
Figura 2 – Fórmula estrutural de alguns piretróides comercializados no Brasil e liberados pela ANVISA. . . . .	26
Figura 3 – Relação estereoisomérica da cipermetrina e deltametrina. . . . .	28
Figura 4 – Associação entre os processos de degradação e síntese nas células. O sistema de energia dos dois mecanismos ocorre de forma acoplada. . . . .	31
Figura 5 – Classificação dos organismos vivos de acordo com a fonte primária de energia por processos químicos e físicos. . . . .	32
Figura 6 – Vias de degradação dos hidrocarbonetos aromáticos até os precursores do Ciclo de <i>Krebs</i> . . . . .	35
Figura 7 – Proposta da via parcial de degradação do pesticida esfenvalerato por ação de fungos e bactérias de origem marinha. . . . .	38
Figura 8 – Fotos do local e das etapas de coleta das amostras de solo para o isolamento de microrganismos. . . . .	41
Figura 9 – Ilustração das etapas da técnica de diluição seriada realizada para o isolamento dos microrganismos da amostra composta de solo. . . . .	43
Figura 10 – Ilustração das etapas do método por plaqueamento por superfície realizado para o espalhamento dos microrganismos da amostra composta de solo. . . . .	44
Figura 11 – Ilustração das etapas do repique dos microrganismos para o crescimento dos fungos em meio sólido. . . . .	46
Figura 12 – Ilustração das etapas das reações de biodegradação do pesticida esfenvalerato com os fungos isolados do solo. . . . .	47
Figura 13 – Ilustração das etapas das reações de biodegradação do pesticida esfenvalerato com o consórcio microbiano. . . . .	49
Figura 14 – Etapas do processo de extração dos metabólitos de biotransformação do esfenvalerato com os fungos isolados do solo. . . . .	52
Figura 15 – Ilustração das etapas do repique para o crescimento das bactérias em meio sólido. . . . .	54
Figura 16 – Ilustração das etapas das reações de biodegradação do pesticida esfenvalerato com as bactérias do solo. . . . .	56
Figura 17 – Ilustração das etapas das reações de biodegradação do pesticida esfenvalerato com o consórcio bacteriano. . . . .	58
Figura 18 – Etapas do processo de extração dos metabólitos de biotransformação do esfenvalerato com as bactérias do solo. . . . .	62

Figura 19 – Curva analítica obtida para a quantificação do pesticida esfenvalerato.	64
Figura 20 – Curva analítica obtida para a quantificação do álcool 3-fenoxibenzílico (PBA).	65
Figura 21 – Curva analítica obtida para a quantificação do ácido 3-fenoxibenzoico (PBAc).	66
Figura 22 – Curva analítica obtida para a quantificação do ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutírico (CLAc).	66
Figura 23 – Curva analítica obtida para a quantificação do 3-fenoxibenzaldeído (PBAlc).	67
Figura 24 – Etapas do processo de extração dos metabólitos de biotransformação do esfenvalerato para os estudos de biorremediação <i>ex situ</i> .	70
Figura 25 – Curva analítica obtida para o pesticida esfenvalerato com o padrão interno pireno.	72
Figura 26 – Curva analítica obtida para a quantificação do ácido 3-fenoxibenzoico (PBAc).	73
Figura 27 – Curva analítica obtida para a quantificação do ácido 2-(4-clorofenil)-3-metil butírico (CLAc).	73
Figura 28 – Colônias das bactérias puras isoladas do solo e cultivadas (24- 48 horas) em meio de cultura Agar Nutriente na ausência do pesticida esfenvalerato.	75
Figura 29 – Método de Gram realizado para a diferenciação das bactérias isoladas do solo.	76
Figura 30 – Cromatogramas (padrões) obtidos por HPLC dos principais metabólitos identificados como produtos resultantes da degradação do pesticida esfenvalerato.	82
Figura 31 – Análises da concentração residual das reações com os quatro melhores isolados bacterianos em $100\text{ mg.L}^{-1}$ de esfenvalerato e seus principais metabólitos de degradação.	84
Figura 32 – Análises da concentração residual das reações com os quatros melhores isolados bacterianos em $100\text{ mg.L}^{-1}$ de esfenvalerato e controles abiótico e de recuperação.	85
Figura 33 – Cromatogramas (reação/padrão/controle) obtidos por HPLC para a bactéria <i>Cupriavidus</i> sp. QOB-B09.	86
Figura 34 – Reação com o isolado bacteriano <i>Cupriavidus</i> sp. QOB-B09 em diferentes concentrações de esfenvalerato e seus principais metabólitos de degradação.	89
Figura 35 – Cromatogramas (reação/controle biótico) obtidos por HPLC para o isolado bacteriano <i>Cupriavidus</i> sp. (QOB-B09) nas concentrações de $100\text{-}500\text{ mg.L}^{-1}$ .	90
Figura 36 – Reação com o consórcio bacteriano em diferentes concentrações de esfenvalerato e seus principais metabólitos de degradação.	91

Figura 37 – Cromatogramas (reação/controle abiótico) obtidos por HPLC para o consórcio bacteriano nas concentrações de esfenvalerato 100-500 $mg.L^{-1}$ .	92
Figura 38 – Correlação entre degradação (%) utilizando o consórcio bacteriano e diferentes concentrações de esfenvalerato ( $mg.L^{-1}$ ).	94
Figura 39 – Correlação entre degradação (%) utilizando o isolado bacteriano <i>Cu-priavidus</i> sp. (QOB-B09) e diferentes concentrações de esfenvalerato ( $mg.L^{-1}$ ).	95
Figura 40 – Colônias dos fungos puras isoladas do solo e cultivadas (48- 72 horas) em meio de cultura Agar Malte na ausência do pesticida esfenvalerato.	96
Figura 41 – Análises da concentração residual das reações com os quatro melhores isolados fúngicos em 100 $mg.L^{-1}$ de esfenvalerato e seus principais metabólitos de degradação.	98
Figura 42 – Análises da concentração residual das reações com os quatros melhores isolados fúngicos em 100 $mg.L^{-1}$ de esfenvalerato e controle abiótico e de recuperação.	99
Figura 43 – Reação com o isolado fúngico QOB-F02 em diferentes concentrações de esfenvalerato e seus principais metabólitos de degradação.	102
Figura 44 – Cromatogramas (reação/controle abiótico) obtidos por HPLC para o isolado fúngico QOB-F02 nas concentrações de 100-500 $mg.L^{-1}$ .	103
Figura 45 – Reação com o consórcio fúngico em diferentes concentrações de esfenvalerato e seus principais metabólitos de degradação.	103
Figura 46 – Cromatograma (reação/controle) obtido por HPLC para o consórcio fúngico nas concentrações de 100-500 $mg.L^{-1}$ .	104
Figura 47 – Correlação entre degradação (%) utilizando o isolado fúngico QOB-F02 e diferentes concentrações de esfenvalerato ( $mg.L^{-1}$ ).	107
Figura 48 – Correlação entre degradação (%) utilizando o consórcio fúngico e diferentes concentrações de esfenvalerato ( $mg.L^{-1}$ ).	108
Figura 49 – Reações do estudo de biorremediação <i>ex situ</i> empregando o isolado fúngico QOB-F2, o consórcio bacteriano, o controle abiótico e o microbioma (32°C, 7, 14, 21 e 28 dias) sob condições estáticas, realizados com solo frente a degradação do esfenvalerato (100 $mg.L^{-1}$ ).	109
Figura 50 – Cromatogramas (reação/controle/método) obtidos por HPLC para o isolado fúngico QOB-F02, o consórcio bacteriano, microbioma, controle e método na concentração de 100 $mg.L^{-1}$ por 7 dias	112
Figura 51 – Cromatogramas (reação/controle/método) obtidos por HPLC para o isolado fúngico QOB-F02, consórcio bacteriano, microbioma, controle e método na concentração de 100 $mg.L^{-1}$ por 14 dias	113

Figura 52 – Cromatogramas (reação/controle/método) obtidos por HPLC para o isolado fúngico QOB-F02, consórcio bacteriano, microbioma, controle e método na concentração de 100 $mg.L^{-1}$ por 21 dias. . . . .	114
Figura 53 – Cromatogramas (reação/controle/método) obtidos por HPLC para o isolado fúngico QOB-F02, consórcio bacteriano, microbioma, controle e método na concentração de 100 $mg.L^{-1}$ por 28 dias. . . . .	115
Figura 54 – Espectro de massas CG-EM (IE, 70 eV) obtidos para alguns metabólitos identificados frente às reações de biodegradação do esfenvalerato com as bactérias e os seus respectivos controles. . . . .	120
Figura 55 – Espectro de massas CG-EM (IE, 70 eV) obtidos para alguns metabólitos identificados frente às reações de biodegradação do esfenvalerato com fungos e os seus respectivos controles. . . . .	123
Figura 56 – Espectro de massas CG-EM (IE, 70 eV) obtidos para o pireno (padrão interno) e para o esfenvalerato. . . . .	125
Figura 57 – Proposta de degradação do esfenvalerato. . . . .	127
Figura 58 – Cromatogramas (reação em triplicatas/controle biótico) obtidos por CG-EM para os quatro melhores fungos <i>Rhizopus</i> sp. (QOB-F01), (QOB-F02), (QOB-F03) e <i>Penicillium</i> sp. (QOB-F05). . . . .	142
Figura 59 – Cromatogramas (controle de células mortas/controle de recuperação/controle abiótico) obtidos por CG-EM para as reações envolvendo os isolados fúngicos em meio líquido de Malte 2% na concentração de 100 $mg.L^{-1}$ . . . . .	143
Figura 60 – Cromatogramas (reação em triplicatas/controle biótico) obtidos por CG-EM para as quatro melhores bactérias <i>Lysinibacillus</i> sp. (QOB-B03), <i>Cupriavidus</i> sp. (QOB-B09), <i>Bacillus</i> sp. (QOB-B14) e (QOB-B15). . . . .	144
Figura 61 – Cromatogramas (controle de células mortas/controle de recuperação/controle abiótico) obtidos por CG-EM para as reações envolvendo os isolados bacterianos em meio líquido de Caldo Nutriente na concentração de 100 $mg.L^{-1}$ . . . . .	145
Figura 62 – Cromatogramas (consórcio fúngico/consórcio bacteriano) obtidos por CG-EM para as reações realizadas em meio líquido de Malte 2% e Caldo Nutriente na concentração de 100 $mg.L^{-1}$ . . . . .	146
Figura 63 – Cromatogramas (microbioma;7-28 dias) obtidos por CG-EM para as reações realizadas no solo. . . . .	147
Figura 64 – Cromatogramas (reação com QOB-F02; 7-28 dias) obtidos por CG-EM para as reações realizadas no solo. . . . .	148
Figura 65 – Cromatogramas (consórcio fúngico) obtidos por HPLC para as reações realizadas em meio líquido de Malte 2% nas concentrações de 100-500 $mg.L^{-1}$ . . . . .	149



Figura 66 – Cromatogramas (reação QOB-F02) obtidos por HPLC para as reações realizadas em meio líquido de Malte 2% nas concentrações de 100-500 $mg.L^{-1}$ . . . . .	150
Figura 67 – Cromatogramas (reação <i>Rhizopus</i> sp. QOB-F01/ QOB-F03/ <i>Penicillium</i> sp. QOB-F05) obtidos por HPLC para as reações realizadas em meio líquido de Malte 2% na concentração de 100 $mg.L^{-1}$ . . . . .	151
Figura 68 – Cromatogramas (controle de células mortas/ controle de recuperação/ controle abiótico) obtidos por HPLC para as reações realizadas em meio líquido de Malte 2% na concentração de 100 $mg.L^{-1}$ . . . . .	152
Figura 69 – Cromatogramas (consórcio bacteriano) obtidos por HPLC para as reações realizadas em meio líquido de Caldo Nutriente nas concentrações de 100-500 $mg.L^{-1}$ . . . . .	153
Figura 70 – Cromatogramas (reação <i>Cupriavidus</i> sp. QOB-09) obtidos por HPLC para as reações realizadas em meio líquido de Caldo Nutriente nas concentrações de 100-500 $mg.L^{-1}$ . . . . .	154
Figura 71 – Cromatogramas (reação <i>Lysinibacillus</i> sp. QOB-B03, <i>Bacillus</i> sp. QOB-B14 e QOB-B15) obtidos por HPLC para as reações realizadas em meio líquido de Caldo Nutriente na concentração de 100 $mg.L^{-1}$ . . . . .	155
Figura 72 – Cromatogramas (Controle de células mortas/ controle de recuperação/ controle abiótico) obtidos por HPLC para as reações realizadas em meio líquido de Caldo Nutriente na concentração de 100 $mg.L^{-1}$ . . . . .	156

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Variação nas doses da formulação comercial do pesticida esfenvalerato.	24
Tabela 2 – Classificação dos inseticidas piretróides de acordo com a OMS. . . . .	28
Tabela 3 – Classificação dos inseticidas piretróides de acordo com a OMS. . . . .	29
Tabela 4 – Resultados do método de Gram, as formas e os números de células das bactérias isoladas do solo. . . . .	77
Tabela 5 – Resultados da biodegradação do pesticida esfenvalerato obtidos no processamento da etapa do <i>screening</i> com as bactérias isoladas do solo (32°C, 130 rpm, 5 dias) na presença de 100 mg.L <sup>-1</sup> de esfenvalerato. . . . .	80
Tabela 6 – Concentração residual de esfenvalerato (100 mg.L <sup>-1</sup> ) para as reações com os quatro melhores isolados bacterianos e os seus controles em agitação orbital (32°C, 130 rpm, 5 dias). . . . .	83
Tabela 7 – Resultado do teste de Tukey para análise da diferença na média da concentração residual dos pares de tratamentos frente a degradação do esfenvalerato por bactérias isoladas do solo. . . . .	87
Tabela 8 – Concentração residual do esfenvalerato (100-500 mg.L <sup>-1</sup> ) para as reações com a bactéria <i>Cupriavidus</i> sp. (QOB-B09) em agitação orbital (32°C, 130 rpm, 5 dias). . . . .	88
Tabela 9 – Concentração residual de esfenvalerato (100-500 mg.L <sup>-1</sup> ) para as reações com o consórcio bacteriano em agitação orbital (32°C, 130 rpm, 5 dias). . . . .	88
Tabela 10 – Análises da igualdade entre as médias de recuperação do pesticida esfenvalerato para o isolado QOB-B09 e o consórcio bacteriano. . . . .	93
Tabela 11 – Concentração residual do esfenvalerato (100 mg.L <sup>-1</sup> ) para as reações com os quatro isolados fúngicos e os seus controles em agitação orbital (32°C, 130 rpm, 7 dias). . . . .	98
Tabela 12 – Resultado do teste de Tukey para análise da diferença na média da concentração residual dos pares de tratamentos frente a degradação do pesticida esfenvalerato por fungos isolados do solo. . . . .	101
Tabela 13 – Concentração residual do esfenvalerato (100-500 mg.L <sup>-1</sup> ) para as reações com o melhor fungo (QOB-F02) em agitação orbital (32°C, 130 rpm, 7 dias). . . . .	105
Tabela 14 – Concentração residual de esfenvalerato (100-500 mg.L <sup>-1</sup> ) para as reações com o consórcio fúngico em agitação orbital (32°C, 130 rpm, 7 dias). . . . .	105
Tabela 15 – Análises da igualdade enscreeningre as médias de recuperação do pesticida esfenvalerato do isolado fúngico QOB-F02 e o consórcio fúngico. . . . .	106

Tabela 16 – Concentração residual de esfenvalerato ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) para as reações do controle abiótico ( $32^{\circ}\text{C}$ e 7, 14, 21 e 28 dias) sob condições estáticas, realizadas em solo. . . . .	109
Tabela 17 – Concentração residual do esfenvalerato ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) para as reações do consórcio bacteriano ( $32^{\circ}\text{C}$ e 7, 14, 21 e 28 dias) sob condições estáticas, realizadas em solo. . . . .	110
Tabela 18 – Concentração residual do esfenvalerato ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) para as reações do microbioma ( $32^{\circ}\text{C}$ e 7, 14, 21 e 28 dias) sob condições estáticas, realizadas em solo. . . . .	110
Tabela 19 – Concentração residual do esfenvalerato ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) para as reações do isolado fúngico QOB-F02 ( $32^{\circ}\text{C}$ e 7, 14, 21 e 28 dias) sob condições estáticas, realizadas em solo. . . . .	111
Tabela 20 – Resultado do teste de Tukey para análise da diferença na média da concentração residual dos pares de tratamentos frente a degradação do pesticida esfenvalerato. . . . .	116
Tabela 21 – Metabólitos identificados por CG-EM (IE, 70 eV) nas reações de biodegradação do esfenvalerato com as bactérias isoladas do solo. . . . .	119
Tabela 22 – Metabólitos identificados por CG-EM (IE, 70 eV) nas reações com o consórcio fúngico na presença do esfenvalerato. . . . .	122
Tabela 23 – Compostos identificados por CG-EM (IE, 70 eV) para as reações de biodegradação realizadas no solo. . . . .	124

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA	acetilcoenzima A
AcOEt	Acetato de etila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP	Adenosina trifosfato
BD	Batata Dextrose
BDA	Batata Dextrose Agar
c	concentração
Cd	cádmio
CG-EM	Cromatógrafo a Gás acoplado ao Espectrômetro de Massas
CLAc	Ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutírico
cm	centímetro
CN	Caldo nutriente
Cu	cobre
°C	grau Celsius
d	dias
$DL_{50}$	Dose letal 50
dms	diferença mínima significativa
DO	Densidade Óptica
EM	Extrato de Malte
Esf	Esfenvalerato
Esfetec	Esfenvalerato grau técnico
FL1	Fase líquida 1
FL2	Fase líquida 2
FLT	Fase líquida total

g	grama
g/L	grama por litro
h	hora
ha	hectare
HCl	Ácido clorídrico
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
$I_2$	Iodo metálico
Kg	kilograma
KI	Iodeto de potássio
kPa	quilopascal
L	litro
lat	latitude
long	longitude
m	metro
MALDI TOF	Matrix Associated Laser Desorption-Ionization–Time of Flight
MB	metabólitos bacterianos
MF	metabólitos fúngicos
mg/Kg	miligrama por kilo
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
mol	massa molecular de uma substância
NaOH	Hidróxido de sódio
$Na_2SO_4$	Sulfato de sódio anidro
nd	não identificado
nm	nanômetro

OMS	Organização Mundial da Saúde
PBA	Álcool 3-fenoxibenzílico
PBAc	Ácido 3-fenoxibenzoico
PBAld	3-Fenoxibenzaldeído
pH	potencial hidrogeniônico
PHB	Poli-3-hidroxibutirato
P.N.I	produto não identificado
PVDF	Polivinilideno
rpm	rotação por minuto
T calc	Teste T calculado
T tab	Teste T tabelado
v/v	volume por volume

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b>	<b>20</b>
2.1	Técnicas de biorremediação ex situ	20
2.2	Biodegradação	21
2.3	A importância dos microrganismos na biorremediação de poluentes	22
2.4	Solo	23
2.5	Piretróides	24
2.6	Metabolismo microbiano	30
2.6.1	Enzimas e sua importância nas reações químicas	33
2.6.2	Estudos relacionados com a degradação do esfenvalerato e suas principais rotas de biodegradação	36
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>39</b>
3.1	Geral	39
3.2	Objetivos específicos	39
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>40</b>
4.1	Reagentes, solventes e meios de cultivo utilizados nos experimentos	40
4.2	Coleta do solo	40
4.2.1	Preparo da amostra composta do solo	42
4.3	Isolamento dos microrganismos	42
4.4	Composição dos meios de culturas usados para o isolamento dos microrganismos	43
4.5	Experimentos com os fungos isolados do solo	44
4.5.1	Composição dos meios de culturas sólido e líquido para o cultivo dos fungos	44
4.5.2	Cultivo de fungos em meio sólido	45
4.6	<i>Screening</i> dos isolados fúngicos para uso nos experimentos de degradação do esfenvalerato	46
4.7	Biodegradação do pesticida esfenvalerato empregando os fungos do solo	46
4.7.1	Reação de degradação do pesticida esfenvalerato com os fungos individuais	46
4.7.2	Reação de degradação do pesticida esfenvalerato com o consórcio fúngico	48
4.7.3	Controles para as reações de biodegradação com os fungos do solo	50
4.8	Extração dos metabólitos das reações de biotransformação do esfenvalerato e dos controles fúngicos	51

<b>4.9</b>	<b>Experimentos com as bactérias isoladas do solo</b>	<b>53</b>
4.9.1	Composição dos meios de culturas sólido e líquido para o cultivo das bactérias	53
4.9.2	Cultivo de bactérias em meio sólido	53
4.9.3	Procedimentos para avaliar a purificação das bactérias isoladas do solo	54
4.9.3.1	Preparo das soluções	54
4.9.3.2	Coloração de Gram para as bactérias do solo	55
4.9.4	<i>Screening</i> das cepas bacterianas para uso nos experimentos de biodegradação do pesticida esfenvalerato	55
4.9.5	Biodegradação do pesticida esfenvalerato empregando as bactérias do solo	56
4.9.5.1	Reação de degradação do pesticida esfenvalerato com as bactérias individuais	56
4.9.6	Reação de degradação do pesticida esfenvalerato com o consórcio bacteriano	57
4.9.7	Controles para as reações de biodegradação com as bactérias do solo	58
4.9.8	Extração dos metabólitos da biodegradação do esfenvalerato da reação bacteriana	61
4.9.9	Preservação dos microrganismos isolados dos solos e identificação molecular	62
4.9.10	Técnicas cromatográficas empregadas nas análises	63
4.9.11	Curva para a quantificação do esfenvalerato e dos seus metabólitos	63
<b>4.10</b>	<b>Experimento de biorremediação <i>ex situ</i></b>	<b>68</b>
4.10.1	Coleta das amostras de solo para a realização dos experimentos de biorremediação <i>ex situ</i>	68
4.10.2	Montagem dos experimentos em solo	68
4.10.3	Extração dos metabólitos do pesticida esfenvalerato em solo	69
<b>4.11</b>	<b>Curva analítica obtida para a quantificação do pireno, do esfenvalerato e dos seus principais produtos de degradação em solo</b>	<b>71</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>74</b>
<b>5.1</b>	<b>Bactérias</b>	<b>74</b>
5.1.1	Linhagens bacterianas isoladas do solo e os seus códigos de identificação	74
5.1.2	Método de Gram para a confirmação dos isolados bacterianos	75
<b>5.2</b>	<b>Resultados preliminares da identificação dos isolados bacterianos por MALDI-TOF</b>	<b>78</b>
<b>5.3</b>	<b><i>Screening</i> dos isolados bacterianos para a aplicação nos experimentos de degradação</b>	<b>79</b>
<b>5.4</b>	<b>Biodegradação do pesticida esfenvalerato pelas bactérias em meio de caldo nutriente</b>	<b>81</b>
5.4.1	Biodegradação empregando os quatro melhores isolados bacterianos	83
<b>5.5</b>	<b>Biodegradação com o isolado bacteriano (QOB-B09) e o consórcio bacteriano em diferentes concentrações do pesticida esfenvalerato</b>	<b>88</b>
<b>5.6</b>	<b>Fungos</b>	<b>94</b>
5.6.1	Linhagens fúngicas isoladas do solo e os seus códigos de identificação	94



5.6.2	Resultados preliminares da identificação dos isolados fúngicos por MALDI-TOF	96
5.6.3	<i>Screening</i> dos isolados fúngicos para a aplicação nos experimentos de degradação . . . . .	97
5.6.4	Biodegradação do pesticida esfenvalerato pelos fungos em meio malte 2% .	97
5.6.5	Biodegradação empregando os quatro melhores isolados fúngicos . . . . .	97
5.6.6	Biodegradação com o isolado fúngico (QOB-F02) e o consórcio fúngico em diferentes concentrações do pesticida esfenvalerato . . . . .	101
<b>5.7</b>	<b>Biorremediação <i>ex situ</i> do pesticida esfenvalerato em solo . . . . .</b>	<b>108</b>
<b>5.8</b>	<b>Identificação por CG-EM de metabólitos encontrados nas reações dos experimentos de degradação do pesticida esfenvalerato em meio líquido com os microrganismos isolados do solo . . . . .</b>	<b>117</b>
5.8.1	Reações com as bactérias em meio líquido de caldo nutriente . . . . .	117
5.8.2	Reações com os fungos em meio líquido de malte 2% . . . . .	120
<b>5.9</b>	<b>Identificação por CG-EM do pireno e do esfenvalerato remanescente nas reações de degradação do pesticida esfenvalerato em solo . . .</b>	<b>124</b>
<b>5.10</b>	<b>Proposta de rota metabólica para o pesticida esfenvalerato . . . . .</b>	<b>125</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO . . . . .</b>	<b>128</b>
<b>7</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS . . . . .</b>	<b>130</b>
	<b>REFERÊNCIAS . . . . .</b>	<b>131</b>
	<b>APÊNDICES . . . . .</b>	<b>141</b>
	<b>APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS OBTIDOS DOS EXPERIMENTOS DE DEGRADAÇÃO DO ESFENVALERATO . . . . .</b>	<b>142</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos países que mais utilizam agroquímicos no mundo, uma vez que parte significativa do setor produtivo está fundamentado no agronegócio, bem como pelo elevado consumo interno de produtos agrícolas (BOMBARDI, 2017).

Os piretróides estão entre os grupos de pesticidas mais utilizados na atualidade, pois permitem o controle de diferentes tipos de pragas; sendo aplicados em lavouras de soja, cana-de-açúcar, citros, arroz, batata, tomate, melancia, café, etc. E, os mais comumente comercializados são a cipermetrina, a bifentrina, a permetrina e o fenvalerato (SANTOS; AREAS; REYES, 2008). Alguns piretróides também são empregados na saúde pública para o controle de vetores que causam doenças como o mosquito *Aedes aegypti* (ZARA A. L. D. S. A.; SANTOS, 2016), na medicina veterinária como carrapaticidas (REGINATO *et al.*, 2017), na indústria têxtil para o controle de percevejos e ácaros (LIMA; OLIVEIRA; CRUZ, 2011), além de serem aplicados para a preservação de madeiras contra cupins (GONÇALVES; LAHR, 2020).

Conseqüentemente, devido à intensa e frequente utilização dos piretróides, seus metabólitos permanecem e acumulam no meio ambiente, causando danos aos seres vivos e desequilíbrios ambientais (SALIU, 2021).

Estudos na literatura mostraram efeitos tóxicos dos piretróides em organismos aquáticos (MONTANHA; PIMPÃO, 2012) e em abelhas, as quais são importantes para a polinização (PACÍFICO-DA-SILVA I.; MELO M. M.; BLANCO, 2016); causaram também desequilíbrio de carboidratos em morcegos frugívoros - *Artibeus lituratus* (OLIVEIRA *et al.*, 2018), bem como estimularam a formação de tumores em ratos da variedade Wistar (COSTA, 2007) e em cadelas (BARIANI.; ROCHA, 2010). Ainda, há uma elevada taxa de intoxicação e morte de agricultores no Brasil e no mundo por piretróides (SINITOX, 2021).

Estudos também mostraram que o esfenvalerato e seus metabólitos foram encontrados no tecido hepático de uma espécie de golfinho (*Sotalia guianensis*) sugerindo que esses compostos atingem as espécies marinhas, posicionadas no topo da cadeia alimentar. Assim, torna-se preocupante, pois demonstra a persistência, a bioacumulação e o transporte destas substâncias para localidades distantes daquelas em que são utilizadas na agricultura (VIDAL *et al.*, 2020).

Em face do elevado uso de piretróides na agricultura e os possíveis danos ambientais se faz necessário o estudo e a aplicação de técnicas de biorremediação para a recuperação ou remediação das áreas contaminadas. Dessa forma, os estudos tanto de biodegradação como de biorremediação são fundamentais para o meio ambiente.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Técnicas de biorremediação *ex situ*

A biorremediação pode ser definida como sendo um processo que depende de mecanismos biológicos capazes de resultar na redução, na transformação ou mineralização de um agente contaminante (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016). Trata-se de um processo de reciclagem de resíduos (ou contaminantes) pelos organismos vivos e que ocorre sob condições controladas. Tem por finalidade atingir um estado inócuo do ambiente original ou então em valores estabelecidos por agências regulatórias específicas (ABATENH E; GIZAW, 2017).

Um exemplo de biorremediação ocorreu frente ao derramamento de petróleo da Exxon Valdez no Alasca em 1989 (BOOPATHY, 2000). Na área contaminada pelo óleo foram adicionadas algumas toneladas de fertilizantes para estimular o crescimento de bactérias. Estes microrganismos foram aos poucos eliminando os hidrocarbonetos através de várias reações oxidativas. O processo enzimático se mostrou eficiente, de custo acessível e viável, uma vez que o local era de difícil acesso, bem como a remoção do agente poluente não era cabível de ser realizada devido a localidade e a elevada quantidade de óleo derramado (WOLFE D.; MICHEL, 1994; TAVARES, 2013)

Existem algumas técnicas de biorremediação que podem ser empregadas de acordo com o local a ser tratado ou descontaminado. A biorremediação *ex situ* requer inicialmente a remoção total do solo/resíduo/agente poluente da área contaminada. Enquanto a biorremediação *in situ* o agente poluente é tratado no próprio local em que houve a contaminação (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016).

- Para a biorremediação *ex situ* algumas técnicas que podem ser empregadas para esse tipo de biorremediação as quais incluem as biopilhas, os biorreatores e *landfarming*.
- Para a biorremediação *in situ* pode ser aplicada a atenuação natural ou a atenuação melhorada. Na atenuação melhorada são aplicadas, por exemplo, as técnicas *biolurping*, *biosparging*, bioventilação, fitorremediação e barreira de membrana reativa.

A escolha tanto do processo quanto da técnica implica diretamente no resultado desejado da biorremediação. Dessa forma, os critérios de seleção devem levar em consideração a natureza química e a concentração do poluente, a localidade e a profundidade em que se encontra no ambiente, os custos envolvidos e as políticas ambientais. Além desses fatores existem também os critérios de desempenho dos organismos degradadores que fazem parte os fatores abióticos como a temperatura, o pH e as concentrações adequadas

de nutrientes e oxigênio (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016; ABATENH E; GIZAW, 2017).

Dentre essas técnicas as mais aplicadas são as de atenuação natural, de bioestimulação e de bioaumentação.

A atenuação natural ou biorremediação intrínseca é a técnica de biorremediação *in situ* que ocorre naturalmente sem a necessidade da intervenção humana seguindo os processos físico-químicos e biológicos de origem natural (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016).

A bioestimulação ou atenuação natural acelerada é uma técnica também de biorremediação *in situ* que se baseia em estimular a atividade dos microrganismos no próprio ambiente, seja através da adição de nutrientes como exemplo, fósforo, potássio e nitrogênio ou de outros substratos, como açúcares (ADAMS *et al.*, 2015; KALANTARY *et al.*, 2014).

Enquanto que a bioaumentação tem por finalidade introduzir microrganismos (alóctones) no local contaminado que sejam capazes de estimular o aumento da microbiota nativa a fim de degradar o contaminante de interesse. As principais vantagens dessa técnica é que ela resulta em uma rápida degradação e em uma redução do período de adaptação do microrganismo com o agente poluente. E uma das principais desvantagens estão relacionadas com a limitação de nutrientes que pode interferir no desempenho dos microrganismos. Os fatores ambientais que podem ser desfavoráveis incluem as interações ecológicas desarmônicas como o caso da competição por condições e recursos, fatores físico-químicos (umidade, temperatura), entre outras (DELATORRE *et al.*, 2010).

## 2.2 Biodegradação

A biodegradação envolve a transformação de compostos químicos pela ação metabólica de organismos vivos, principalmente de microrganismos, que na natureza são os mais importantes agentes decompositores ou degradadores de matéria orgânica (MORAIS, 2005). É um processo complexo que envolve a ação de muitas reações enzimáticas na presença de células vivas na degradação de compostos naturais ou até mesmo de xenobióticos (FENNER *et al.*, 2013).

O processo de biodegradação envolve várias reações enzimáticas pelas quais o composto é totalmente eliminado do meio ambiente, cujo processo final de descontaminação é a biorremediação (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016; ALBUQUERQUE *et al.*, 2001).

### 2.3 A importância dos microrganismos na biorremediação de poluentes

Os microrganismos possuem importantes funções na atenuação dos impactos ambientais causados pelo uso de agrotóxicos, pois conseguem aclimatar-se ao ambiente e adaptar-se na presença de compostos xenobióticos, degradando-os. Em muitos casos, utilizam para o seu próprio metabolismo como fontes de nutrientes essenciais ao seu crescimento e desenvolvimento (MELO, 2008; MADIGAN, 2016).

A exposição dos microrganismos às moléculas tóxicas favorece a evolução de fenótipos resistentes. Dessa maneira, quando uma comunidade microbiana é exposta ao agente tóxico este pode promover a inibição ou mesmo a morte dos microrganismos sensíveis e a seleção dos mais resistentes (ATASHGAHI *et al.*, 2018).

Quando expostos às substâncias tóxicas os microrganismos são capazes de desenvolver mecanismos que permitem a tolerância e a sobrevivência, por exemplo, alterações na membrana para manter a fluidez/rigidez, a liberação de vesículas da membrana plasmática para aumentar a hidrofobicidade da superfície, a alteração da morfologia podendo aumentar de tamanho e diminuir a relação da superfície/volume, entre outros mecanismos de defesa e adaptação. Estudos demonstram que microrganismos isolados de habitat contaminado conseguem degradar melhor os compostos xenobióticos em relação àqueles oriundos de áreas não contaminadas (ATASHGAHI *et al.*, 2018).

Os pesticidas que são aplicados no meio ambiente em diferentes culturas agrícolas pelas ações antrópicas e seus metabólitos podem se tornar recalcitrantes, causando danos aos organismos vivos (GAYLARD; BELLINASSO; MANFIO, 2005). Portanto, os processos microbiológicos são fundamentais para promoverem a degradação de poluentes na natureza.

Uma maior diversidade microbiana e densidade populacional pode ser encontrada na rizosfera do solo, pois colonizam as raízes das plantas, cuja atividade metabólica é intensa. Nessa região encontram-se as bactérias produtoras de metabólitos secundários, como as auxinas, enzimas extracelulares, peptídeos e outros produtos de excreção. Por essa razão, é considerado um local em que ocorrem as maiores taxas de biotransformação dos pesticidas (MELO, 2008).

Possivelmente que a evolução e o tempo biológico, tenha favorecido e selecionado mecanismos genéticos importantes na via metabólica dos microrganismos para a degradação de compostos naturais de elevada complexidade, como a lignina, a celulose e os terpenos. Igualmente, a degradação de compostos sintéticos pelos microrganismos requer um período de adaptação biológica, para a evolução das vias metabólicas indutivas na degradação.

Os microrganismos requerem a ação de enzimas específicas para a biodegradação de um composto xenobiótico, as quais podem encontrar-se latentes em seu metabolismo ou mesmo quando presentes, as atividades encontram-se reduzidas ou inativas (MELO, 2008). Nestes casos, por exemplo, os consórcios microbianos são efetivos em biodegradação, pois uma única cepa bacteriana seria incapaz de produzir todas as enzimas necessárias à biodegradação de um poluente. Não obstante, na natureza as associações ou consórcios microbianos podem apresentar melhores potenciais de biodegradação (PINHATI *et al.*, 2014).

## 2.4 Solo

O solo é a porção da superfície da terra essencial para a produção de alimentos. Este pode sofrer alterações em suas características de acordo com as mudanças nos fatores abióticos como o clima, a acidez, a temperatura e a umidade. Inclusive os diferentes tipos de solos se diferenciam pela profundidade atingível, por suas propriedades físicas e suas composições químicas e biológicas. Dentro das suas peculiaridades, podem ser agrupados de acordo com as principais categorias: tipos de partículas minerais, presença de resíduos orgânicos, teor de umidade, disposição de gases solúveis e por composição biológica (ARAÚJO; MONTEIRO; CARVALHO, 2007; WEIL; BRADY; LEPSCH, 2012).

Dentre a composição biológica, os microrganismos diferenciam-se em diversidade de espécies e variabilidade populacional. Os microrganismos são essenciais para a composição do solo, pois promovem a mineralização de elementos que são essenciais para a manutenção da vida através do processo de reciclagem de nutrientes (MOREIRA *et al.*, 2012).

Na agricultura os piretróides são aplicados em concentrações variáveis a depender da espécie da cultura usada no plantio, como pode ser observado para o Sumidan 150 g/L nome comercial do esfenvalerato (Tabela 1).

Tabela 1 – Variação nas doses da formulação comercial do pesticida esfenvalerato.

Cultura	Espécie	Dose (Formulação comercial)
Algodão	<i>Anthonomus grandis</i>	165 - 200 mL/ha
Batata	<i>Myzus persicae</i>	15 mL/ 100 L
Citrus	<i>Diaphorina citri</i>	10 a 12,5 mL/100 L
Soja	<i>Anticarsia gemmatalis</i>	50 - 65 mL/ha
Tomate	<i>Neoleucinodes elegantalis</i>	20 mL/100 L

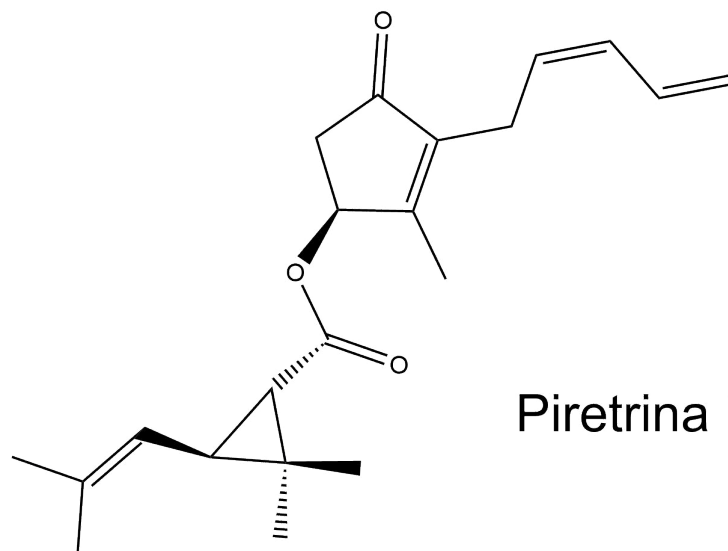
Fonte: Adaptado da bula do Sumidan 150 SC- IHARABRAS S.A.

A persistência dos pesticidas no solo é variável e depende de fatores químicos, físicos e biológicos. Um estudo na literatura mostrou que o tempo de meia-vida dos piretróides em solo variou a degradação em torno de 11 dias para ciflutrina, 96 dias para a bifentrina e 90 dias para o esfenvalerato (ROS *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2004). Os piretróides podem se ligar mais facilmente em solos ácidos húmicos e do tipo silte quando comparado ao solo do tipo arenoso (LEE, 1985).

## 2.5 Piretróides

Os piretróides (classe de inseticida) foram produzidos sinteticamente após décadas de estudos, a partir de derivados da piretrina, uma substância natural, extraída da flor de *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Na Figura 1 tem a estrutura molecular da piretrina (CAVERO, 1980).

Figura 1 – Estutura molecular da piretrina, a molécula que originou os grupos de classes dos piretróides sintéticos.



---

O uso crescente dos piretróides tem sido intensificado em todo o mundo devido a sua eficiência quanto ao potencial de inseticida e de ser considerado menos tóxico aos seres vivos que outros agentes. Contudo, seu uso tem sido debatido pela ciência, devido também aos efeitos nocivos para os organismos não-alvos.

Os piretróides surgiram devido a necessidade de desenvolver inseticidas estáveis no processo de fotodegradação (luz visível e ultravioleta), que degradam as piretrinas impedindo-as de serem utilizadas (CAVERO, 1980). A vantagem é que os piretróides são menos tóxicos que os organoclorados (banidos do uso agrícola) e os organofosforados. Contudo, novos estudos buscam o desenvolvimento de pesticidas menos prejudiciais ao meio ambiente, como os biopesticidas (FIGUEIREDO, 2014).

Os biopesticidas são usados no controle de pragas em lavouras e o seu uso está se expandindo. É uma alternativa mais sustentável ao meio ambiente, pois contém compostos naturais e preparos biológicos provenientes de organismos vivos e plantas como exemplo de agentes de controle biológico que incluem bactérias, fungos, nematóides e parasitóides (LIU *et al.*, 2019).

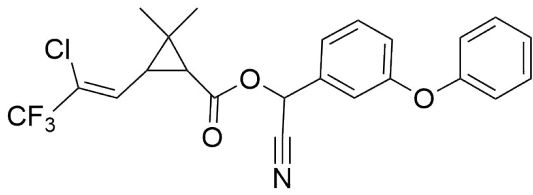
Em 2011 foi autorizado pelo Governo Federal a comercialização de 1352 pesticidas dentro de diversas categorias de atuação (herbicida, inseticida, fungicida, acaricida). Em contrapartida, nesse mesmo período foram comercializados 26 agentes de biocontrole (BETTIOL, 2011). Em 2019 foram liberados 325 defensivos agrícolas, sendo que destes 14 foram agentes de controle biológico ou orgânico e em 2020 foram cerca de 22 agentes biológicos para o combate de pragas (AGRICULTURA, 2020).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), permite o uso de um amplo grupo de piretróides, tais como: Aletrina, Esbiol, Imiprotrim, Praletrina, Bioresmetrina, Empretrina, Resmetrina, Tetrametrina, Transflutrina, Acrinatrina, Bifentrina, Cialotrina, Fempropratrina, Fenotrina, Sumitrina, Cipermetrina, Ciflutrina, Fenvalerato, Esfenvalerato, Fluvalenato (Figura 2).

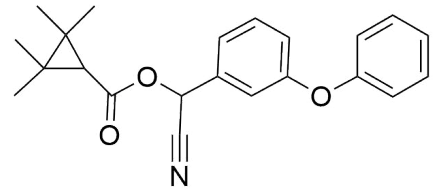
Continuação da Figura 2



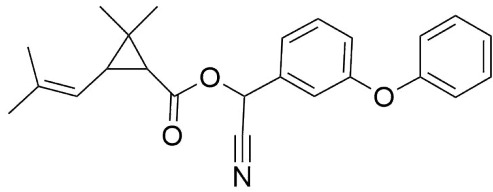




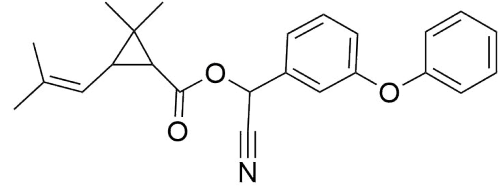
Cialotrina



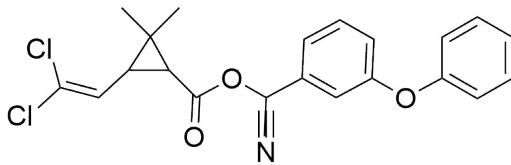
Fempropatrina



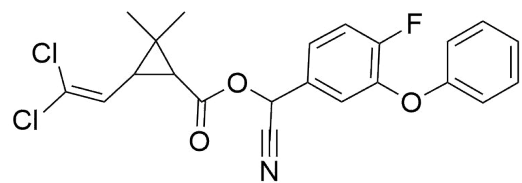
Fenotrina



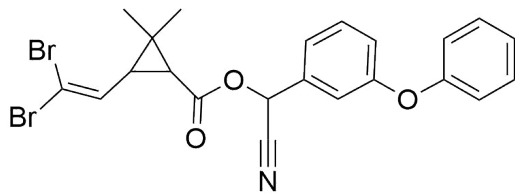
Sumitrina



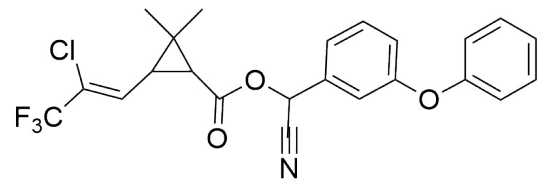
Cipermetrina



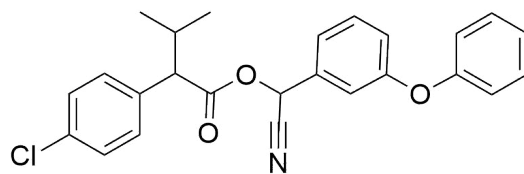
Ciflutrina



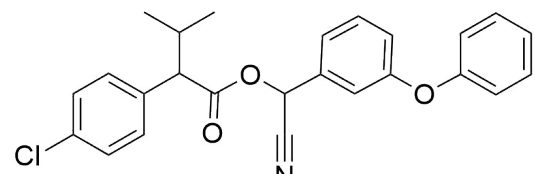
Deltametrina



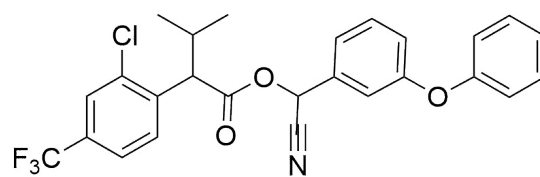
Cialotrina



Fenvalerato



Esfenvalerato

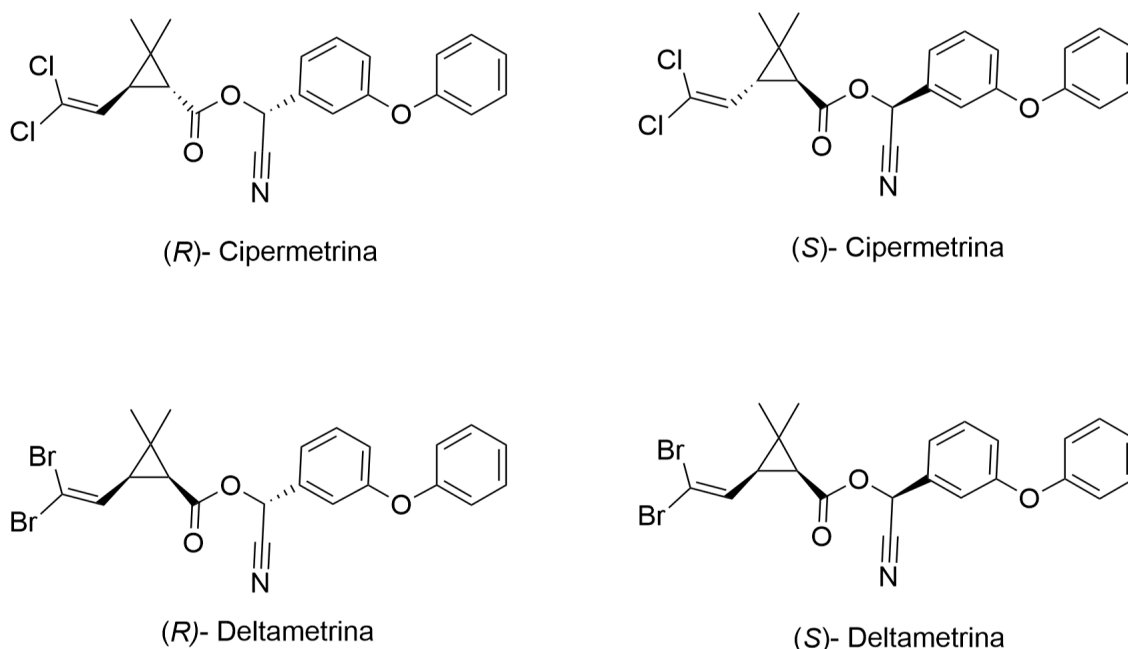


Fluvalinato

Os defensivos químicos derivados das piretrinas foram classificados através da geração em que foram desenvolvidos e agrupados como sendo de primeira, segunda, terceira ou quarta geração. Estes ainda são classificados de acordo com o grupo ciano em sua composição estrutural, sendo que a ausência do grupo ciano permite enquadrá-los como sendo do Tipo I e a presença do grupo ciano do Tipo II (WARE, 1994).

As estruturas químicas que estão relacionadas com as atividades biológicas podem ser devido também à estereoisomeria. Os piretróides podem conter estereoisômeros (como pode ser observado na Figura 3), a depender da estereoquímica relacionada ao número de centros estereogênicos presentes nas estruturas (BRADBERRY *et al.*, 2005).

Figura 3 – Relação estereoisomérica da cipermetrina e deltametrina.



Os inseticidas podem ser classificados através de um critério de periculosidade desenvolvido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (ORGANIZATION; SAFETY, 2010), de acordo com as suas classes, como pode-se observar na Tabela 2.

Tabela 2 – Classificação dos inseticidas piretróides de acordo com a OMS.

Classe	Nível de periculosidade
(I)	Extremamente perigoso
(II)	Muito perigoso
(III)	Moderadamente perigoso
(IV)	Ligeiramente perigoso

Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS) (ORGANIZATION; SAFETY, 2010).

O grau de toxicidade pode variar de acordo com as concentrações inaladas ou por aquelas absorvidas pelo contato cutâneo. Na Tabela 3 tem-se exemplos de piretróides comercializados no Brasil, são classificados dentro dessas classes de acordo com o seu grau de toxicidade específico (ORGANIZATION; SAFETY, 2010). A dose letal 50 ( $DL_{50}$ ) corresponde ao valor suficiente para matar metade da população (ratos) em que foi administrada a substância de acordo com a OMS.

Tabela 3 – Classificação dos inseticidas piretróides de acordo com a OMS.

Classe (I)	Classe (II)	Classe (III)	Classe (IV)
$DL_{50} < 5$ mg/kg	$DL_{50}$ 5-50 mg/kg	$DL_{50}$ 50-500 mg/kg	$DL_{50}$ 500-5000 mg/kg
	Acrinatrina	Aletrina	Transflutrina
	Bifentrina	Bioaletrina	
	Cialotrina	Bioresmetrina	
	Cipermetrina	Lambda-cifenotrina	
	Esbiol	Ciflutrina	
	Esfenvalerato	Deltametrina	
	Fenotrina	Empentrina	
	Fempropatrina	Esbiotrim	
	Fenvalerato	Imiprotrim	
	Fluvalinato	Permetrina	
		Praletrina	
		Resmetrina	

Fonte: Organização Mundial da Saúde (OMS).

Assim, a persistência dos piretróides no meio ambiente pode variar de acordo com a classe em que estão inseridos. Por exemplo, a bifentrina (Classe II) e a permetrina (Classe III) as quais são empregadas na cultura da soja demonstraram efeitos cumulativos nos organismos aquáticos, como por exemplo em peixes e uma elevada toxicidade (MOREIRA *et al.*, 2012).

Um estudo realizado para avaliar as alterações morfofisiológicas em morcegos frugívoros da espécie *Artibeus lituratus* concluiu que a exposição oral, mesmo que em baixas concentrações do inseticida deltametrina (Classe III), desencadeou um desbalanço metabólico de carboidratos, além de causar danos ao fígado e músculos desses animais (OLIVEIRA *et al.*, 2018).

Em outro estudo, que avaliou o efeito tóxico dos piretróides das Classes II e III (ciflutrina, fluvalinato, aletrina e permetrina) em abelhas, concluiu que os piretróides promoveram uma alteração na função motora desses insetos. Sendo observados mudanças

no comportamento, na locomoção, no aliciamento e no abanamento das asas das abelhas. Conseqüentemente, poderia reduzir o número de plantas polinizadas e a produtividade (OLIVER *et al.*, 2015).

As abelhas têm importantes funções na polinização cruzada das estruturas florais, especialmente para a fecundação, sendo essencial na produção de alimentos (BARBOSA *et al.*, 2017). Estudos realizados com diferentes tipos de flores, como as de café, maracujá, goiabeira, entre outras (MALERBO-SOUZA *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 1997; FREITAS; ALVES, 2008) demonstraram que o desaparecimento desses insetos foi prejudicial às culturas, pois a falta de polinização afetou o processo germinativo dos frutos nestas culturas.

A polinização é importante quando realizada pelas abelhas, insetos, aves e animais em geral (KWAK; JENNERSTEN, 1991). Ainda, outros fatores como o investimento de mão de obra para realizar a polinização manual, refletem nos custos da produção de alguns alimentos e tornam-se inviáveis em muitas culturas dependentes de polinização (NASCIMENTO *et al.*, 2012). Portanto, o uso de pesticidas pode afetar a produção de culturas em que a polinização pelos insetos é essencial.

A toxicidade dos piretróides na classe *mammalia* é considerada baixa. Estudos mostraram alterações não significativas tanto de teratogenicidade quanto de genotoxicidade (COSTA, 2007), apesar de apresentar efeitos positivos para carcinogênese (hepatocelulares) em ratos. Por exemplo, na variedade de ratos Wistar, quando foi administrado por via oral doses de 900-1800 ppm de metoflutrin (ação inseticida).

Há evidências que, alguns tipos de formação tumoral nas glândulas mamárias em fêmeas caninas, foram causadas pela exposição dos piretróides tetrametrina, deltametrina, aletrina, cialotrina e cipermetrina. Em células do tecido adiposo, coletados próximos das glândulas mamárias de 30 fêmeas caninas, havia a presença de uma quantidade significativa de resíduos de piretróides, onde foram observados um índice mais elevado na formação de carcinomas nesses animais (BARIANI.; ROCHA, 2010).

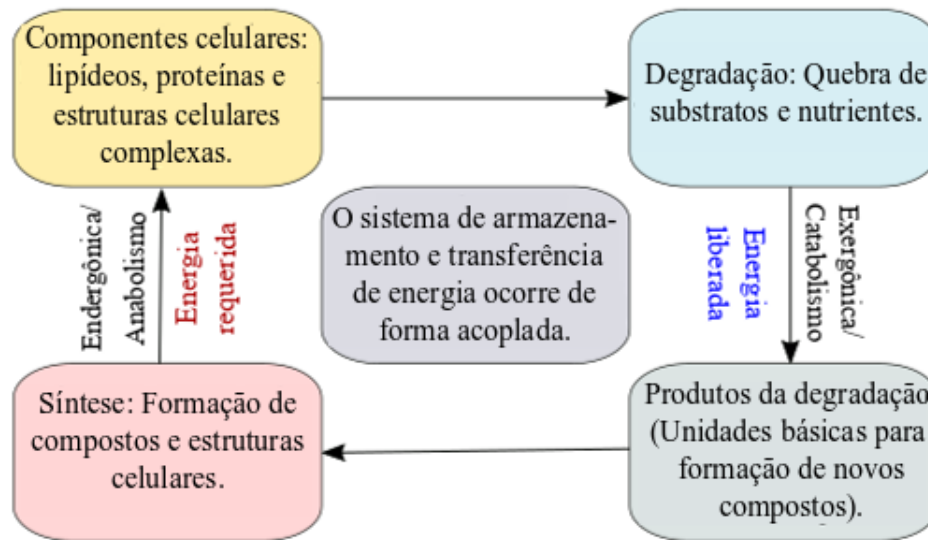
No banco de dados SINITOX, o qual realiza o monitoramento de casos de intoxicação aguda, mostraram que em 2017 foram relatados 76.115 casos de intoxicação humana por agrotóxicos no Brasil, sendo que 200 pessoas vieram a óbito por intoxicação e 846 animais foram intoxicados. Foram reportadas 2.548 pessoas intoxicadas pelo uso de agrotóxicos agrícolas e 831 de uso doméstico (SINITOX, 2021).

## 2.6 Metabolismo microbiano

O metabolismo pode ser definido como um conjunto de reações químicas que ocorrem no organismo (células) dos seres vivos. Essas reações podem ocorrer de maneira

exergônica envolvidas na liberação de energia ou endergônica envolvidas na utilização de energia. Dessa maneira o metabolismo pode ser dividido em catabolismo e anabolismo, respectivamente (Figura 4), (PELCZAR; REID; CHAN, 1996).

Figura 4 – Associação entre os processos de degradação e síntese nas células. O sistema de energia dos dois mecanismos ocorre de forma acoplada.



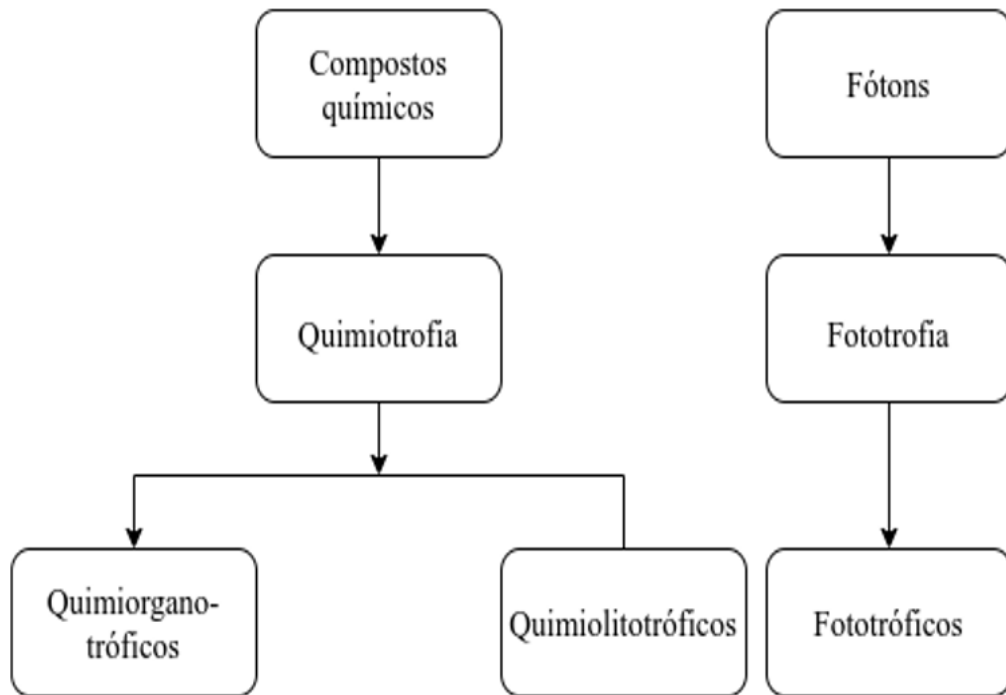
Fonte: Adaptado de (PELCZAR; REID; CHAN, 1996).

Nas células as reações químicas são reguladas por enzimas que liberam energia para serem armazenadas em forma de ATP ou também denominadas de reações exergônicas geralmente são as reações catabólicas ou biodegradativas, pois realizam a catálise de compostos orgânicos complexos em outros mais simples. Já as reações químicas reguladas por enzimas que requerem energia a partir da Adenosina Trifosfato (ATP) para a realização das suas reações químicas são as do tipo anabólicas, biossintéticas ou endergônicas, pois estas realizam o papel inverso onde atuam na formação de moléculas orgânicas complexas através de moléculas simples sendo que os dois mecanismos ocorrem de forma acoplada (JUNQUEIRA, 2012).

As células compõem a unidade que assegura a estrutura e a funcionalidade dos seres vivos e para manter a sua atividade e o bom funcionamento são dependentes de fontes energéticas. A energia é importante para a células realizar trabalho tais como o reparo de danos celulares, a produção de enzimas, a síntese de parede celular, entre outros. Assim, todos os organismos vivos precisam obter a energia de alguma fonte na natureza que pode ser através dos compostos orgânicos e inorgânicos ou dos fótons absorvidos da luz solar (Figura 5). Neste caso, tem-se o metabolismo primário de absorção de energia por processos químicos e físicos (ALBERTS; TRADUTORES, 2017).

Com o processo de oxidação desses compostos a energia liberada durante a reação pode ser armazenada nas células na forma de ATP. Existem microrganismos que realizam

Figura 5 – Classificação dos organismos vivos de acordo com a fonte primária de energia por processos químicos e físicos.



Fonte: Adaptado de (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014).

esse processo na ausência de oxigênio (anaeróbios), na presença do oxigênio (aeróbios) e ainda existem aqueles capazes de metabolizar os compostos orgânicos tanto na presença quanto na ausência do oxigênio (HUANG *et al.*, 2020).

Organismos quimiotróficos fazem a decomposição dos nutrientes em compostos passíveis de serem utilizados na produção de ATP. Para isso, eles realizam uma série de reações químicas catalisadas por enzimas denominadas de catabolismo. Como descrito, as reações catabólicas são fundamentais na liberação de energia para os microrganismos e no fornecimento de precursores para a síntese de outras moléculas como os lipídios, proteínas, polissacarídeos, entre outros (BONORA *et al.*, 2012).

Os microrganismos conseguem degradar uma vasta variedade de compostos, até mesmo moléculas complexas como lipídeos, proteínas ou polissacarídeos. Primeiramente, eles transformam essas moléculas em outras mais simples estruturalmente para então serem utilizadas como intermediárias das principais vias de degradação das células, como a glicólise (HEMSWORTH *et al.*, 2016).

### 2.6.1 Enzimas e sua importância nas reações químicas

Nas células as enzimas funcionam como catalisadores biológicos, as quais aceleraram a velocidade de uma reação química de modo a não a alterar o seu equilíbrio. As enzimas possuem uma elevada especificidade ao substrato e no sistema biológico catalisam apenas um tipo de reação devido ao reconhecimento seletivo pelo sítio ativo ao substrato. Desta forma, as enzimas orientam e posicionam o substrato no seu sítio ativo formando um complexo temporário enzima-substrato. Esse complexo é importante, pois garante que as colisões sejam eficientes, diminuindo a energia de ativação de uma reação química (LEHNINGER; NELSON; COX, 2014).

Algumas enzimas são compostas apenas de proteínas, enquanto que outras possuem uma porção proteica chamada de apoenzima e uma porção não protéica denominada de cofator, por exemplo os íons férricos e cúpricos. A apoenzima não tem atividade sem os cofatores, sendo assim, ambos se ligam formando uma holoenzima, um exemplo são as ribozimas (LEWIS T; STONE, 2021; VOET DONALD; VOET, 2014).

A atividade das enzimas é influenciada por diversos fatores como a temperatura, o pH, pela concentração do substrato e por seus inibidores e são classificadas em seis classes principais com base no tipo de reação química que catalisam, entre elas encontram-se as oxirredutases, liases, ligases, isomerases, hidrolases e as transferases (GRAHAME; BRYKSA; YADA, 2015; KIRSCHNING, 2021).

A transformação do substrato em produto pela enzima pode ocorrer pelo rearranjo dos átomos ou grupos, pela quebra ou formação de ligações ou mesmo pela combinação/formação com outras moléculas. Ao finalizar a catálise enzimática as moléculas formadas são liberadas para o meio, porque o sítio ativo passa a não reconhecer mais os produtos (TORTORA G.J.; FUNKE, 2017).

No processo de biotransformação em organismos vivos com compostos xenobióticos, inicialmente ocorre através da modificação química, pela atuação das enzimas, convertendo em compostos mais hidrofílicos e menos tóxicos, para serem mais facilmente transportados e eliminados. A biotransformação é composta por algumas fases. Na *fase I* envolve as reações de hidrólise, redução e oxidação, que geralmente modificam os grupos funcionais na molécula e incorporam outros grupos mais polares. Na *fase II* envolve as reações de conjugação, onde as enzimas catalisam o acoplamento de uma molécula endógena (ex. açúcar, aminoácido, lipídio, sais inorgânicos ( $SO_4^{2-}$ ,  $PO_4^{2-}$ ) a outra porção reativa no composto xenobiótico. Assim, é formado um novo composto conjugado, por exemplo, pela reação de glicosilação, que além de facilitar o transporte para fora das células, tende a reduzir sua toxicidade (SILVERMAN, 2004).

Os microrganismos podem usar os compostos xenobióticos como fontes de carbono e



energia, mas para que isso ocorra é necessário que diferentes enzimas atuem na transformação da molécula resultando em intermediários que sejam comuns ou reconhecidos nas vias catabólicas. Dessa forma, não são todos os microrganismos que conseguem mineralizar um composto xenobiótico, assim como alguns produtos resultantes da biodegradação também podem ser nocivos aos organismos vivos levando a morte e a danos como a intoxicação celular.

Vias metabólicas envolvendo a degradação de compostos xenobióticos já foram estudadas empregando diferentes microrganismos. Dessa forma, as principais vias de degradação dos piretróides envolvem a hidrólise dos grupamentos ésteres, pela ação das carboxilesterases, resultando na formação de um álcool e um ânion carboxilato que também devem ser posteriormente metabolizados (BIROLI *et al.*, 2016).

Também foi observada a total degradação da cipermetrina e com isso foi possível propor uma possível rota de biodegradação cujas principais etapas que levaram a sua mineralização, resultando na liberação de moléculas precursoras do metabolismo microbiano, assim como ATP,  $CO_2$  e água (TALLUR; MEGADI; NINNEKAR, 2008).

Comumente anéis aromáticos, após várias etapas de reações pelas vias metabólicas se degradam em fenol, catecol ou protocatecol. Esse processo é realizado por dois tipos principais de enzimas: as periféricas e as de fissão (MISHRA; LAL; SRINIVASAN, 2001).

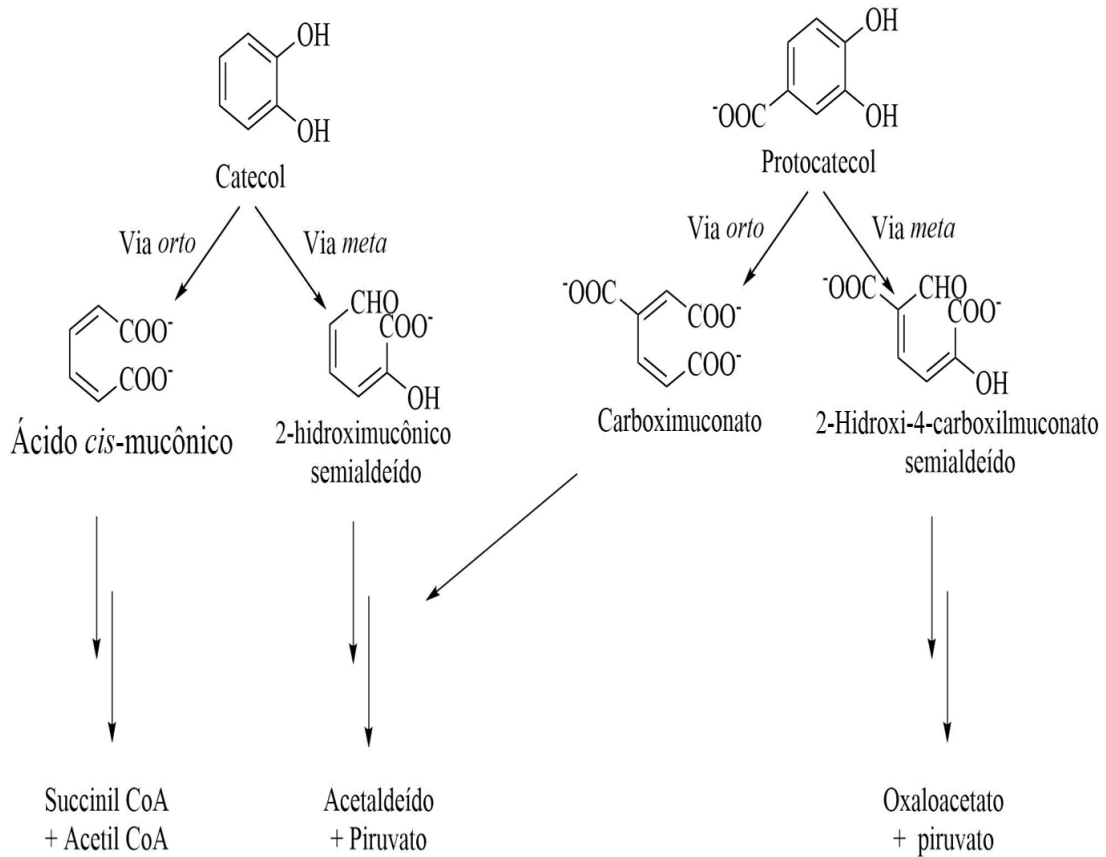
A degradação dos hidrocarbonetos aromáticos é possível devido a ação de enzimas periféricas que têm a função de fazer o reconhecimento dos compostos xenobióticos e convertê-los em compostos degradáveis como o catecol e o ácido protocatecuico. A maioria das enzimas periféricas são oxigenases que hidroxilam os compostos aromáticos facilitando a atuação das enzimas de fissão. Posteriormente, as enzimas de fissão realizam o processo da conversão dos intermediários centrais em compostos orgânicos como o ácido pirúvico, ácido acético, ácido succínico e Acetil- CoA que serão encaminhados para as vias catabólicas como o Ciclo de *Krebs*, para fornecer carbono e energia aos microrganismos (MISHRA; LAL; SRINIVASAN, 2001).

As enzimas dioxigenases ou também denominadas de fissão são divididas em dois grupos, enzimas intradiol ou extradiol, a depender do local da estrutura do composto aromático dihidroxilado que realizam a clivagem do intermediário central, por exemplo o catecol ou o protocatecol (BAMFORTH; SINGLETON, 2005).

Assim, a clivagem do anel aromático no catecol pode ocorrer entre os átomos de carbono hidroxilados em posição *orto*, originando o *cis*-muconato que será convertido em succinato e acetil-coenzima (Figura 6); ou adjacente aos átomos de carbono hidroxilados no protocatecol, em posição *meta*, resultando no 2-hidroxi-mucônico semialdeído que em seguida será transformado em ácido pirúvico e acetaldeído. Alguns exemplos dessas dioxigenases são as catecol 1,2-dioxigenases dependentes de  $Fe^{3+}$  e a catecol 2,3-dioxigenases dependentes

de  $Fe^{2+}$  (BAMFORTH; SINGLETON, 2005).

Figura 6 – Vias de degradação dos hidrocarbonetos aromáticos até os precursores do Ciclo de *Krebs*.



Não é uma obrigatoriedade que o metabolismo dos microrganismos ocorra para suprir as suas exigências nutricionais ou em prol do seu crescimento, às vezes ocorre apenas a degradação do xenobiótico como é o caso do co-metabolismo. Dessa maneira, os compostos orgânicos podem ser metabolizados pela respiração, fermentação ou pelo co-metabolismo (CETESB, 2004).

O co-metabolismo pode ser entendido como a metabolização de um composto orgânico na presença de um substrato que sirva de crescimento aos microrganismos que será usado pelas células como fonte primária de carbono e energia (VOET DONALD; VOET, 2014).

Nesse tipo de metabolismo, o composto não é totalmente degradado e os produtos resultantes não apresentam uma contribuição direta para a sobrevivência dos microrganismos. Porém, o produto do co-metabolismo pode servir como substrato para outras espécies de microrganismos resultando na sua mineralização (GAYLARD; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

## 2.6.2 Estudos relacionados com a degradação do esfenvalerato e suas principais rotas de biodegradação

Estudos na literatura frente à degradação do esfenvalerato empregando diferentes fungos e bactérias mostraram que existe uma variação na eficiência de degradação do pesticida a depender da espécie empregada, mas que em geral os metabólitos detectados foram sempre os mesmos.

Cepas bacterianas isoladas de diferentes biomas brasileiros, tais como *Curtobacterium* sp. 1E, *Bacillus* sp. 2B, *Lysinibacillus* sp. 2G e *Bacillus* sp. 4T; do ambiente marinho, tais como *Kocuria* sp. B135, *Kocuria* sp. B136, *Kocuria marina* B141 e *Kocuria* sp. B145 e da turfa tropical como *Bacillus* sp. P5CBNB, *Kosakonia* sp. P5MNB, *Bacillus* sp. P8CNB e *Kosakonia* sp. R5RaNB foram investigadas quanto à degradação do esfenvalerato. Essas bactérias foram cultivadas na presença de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  do pesticida e foram selecionadas para experimentos quantitativos (150 rpm,  $30^\circ \text{C}$ , 5 dias) realizados em meio líquido de Caldo Nutriente (CN). Os metabólitos foram analisados e identificados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e Cromatografia a Gás acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG-EM). A partir das análises realizadas, os principais metabólitos detectados foram o 3-fenoxibenzaldeído (PBald), o ácido 3-fenoxibenzoico (PBAC), o álcool 3-fenoxibenzílico (PBA) e o ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutírico (CLAc). Embora, os resultados da biodegradação variem em termos de conversão, para as diferentes cepas, em geral os produtos intermediários foram comuns entre as bactérias estudadas (BIROLI *et al.*, 2016).

Cepas de *Serratia marcescens* 6A, *Bacillus* sp. 6D, 6E, 6F, 6H, 6I e 6L e *Bacillus* sp., isoladas do cerrado reforestado (Área-2 USP) e da citricultura (laranja) também foram investigados quanto ao potencial de biodegradação do esfenvalerato (ANJOS, 2018). Essas cepas foram cultivadas também na presença de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de esfenvalerato (130 rpm,  $40^\circ \text{C}$ , 5 dias, pH=5) em meio líquido de caldo nutriente. Os metabólitos foram analisados por CG-EM. Os principais metabólitos identificados foram o ácido 3-fenoxibenzoico (PBAC) e o ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutírico (CLAc). Como esperado, os resultados da biodegradação foram distintos entre as bactérias do gênero *Bacillus* variando de 48 a 90% de conversão após 12 dias de reação. Neste estudo, experimentos com os consórcios bacterianos foram realizados e obtiveram 90% de biodegradação para o esfenvalerato no período de 12 dias (ANJOS, 2018).

Resultados semelhantes foram alcançados com as bactérias *Lysinibacillus xylanilyticus* CBMAI2085, *Bacillus cereus* CBMAI2067, *Lysinibacillus* sp. CBMAI2051 e *Bacillus* sp. CBMAI2052 frente a biodegradação do esfenvalerato. O co-cultivo destas bactérias resultou na biodegradação do pesticida em 52%. Análises dos produtos de biodegradação por CG-EM mostrou que o ácido 3-fenoxibenzoico (PBAC) e o 2-(4-clorofenil)-3-

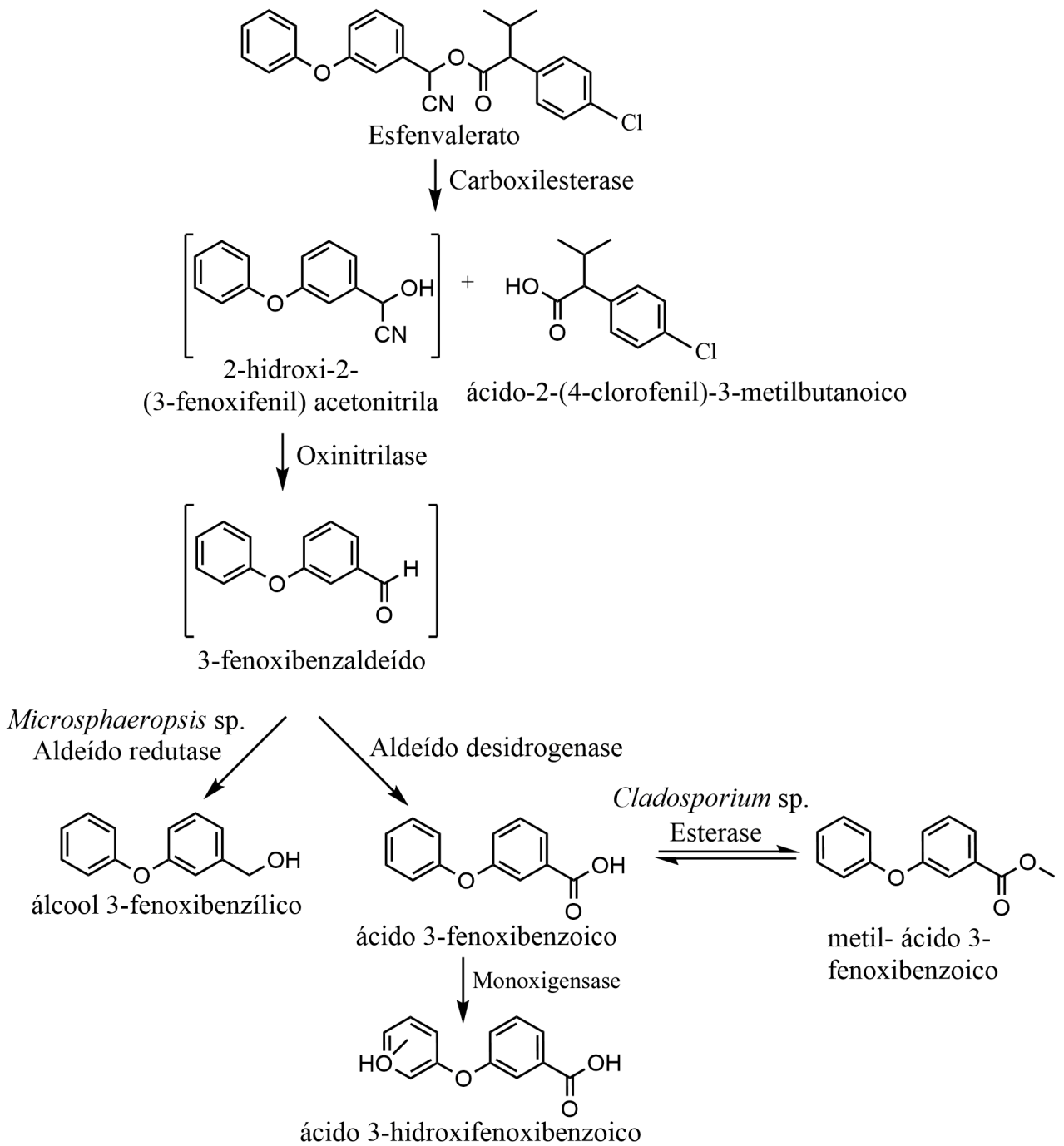
---

metilbutanoico foram os principais metabólitos (ANJOS; BIROLI; PORTO, 2020).

Cepas fúngicas de origem marinha como o *Penicillium raistrickii* CBMAI 931, *Aspergillus sydowii* CBMAI 935, *Cladosporium* sp. CBMAI 1237, *Microsphaeropsis* sp. Dr (A) 6, *Acremonium* sp. Dr (F) 1, *Westerdykella* sp. Dr (M2) 4 e *Cladosporium* sp. Dr (M2) 2 foram utilizadas na biodegradação do esfenvalerato ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ), (BIROLI *et al.*, 2016). Os principais metabólitos identificados foram o ácido 3-fenoxibenzoico (FBAC), o álcool 3-fenoxibenzílico, 3-fenoxibenzaldeído e o ácido-2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico. Os fungos *Acremonium* sp. Dr(F)1 degradou 71% e *Microsphaeropsis* sp. Dr(A)6 apresentou 54% de biodegradação após 28 dias para o esfenvalerato (BIROLI *et al.*, 2016).

Na Figura 7 é possível observar que a etapa inicial da biotransformação do esfenvalerato envolveu a ação das carboxilesterases da fase I. Adicionalmente, novas etapas da rota metabólica do esfenvalerato envolvendo os fungos *Microsphaeropsis* sp. e *Cladosporium* sp. foram investigadas e revelou que o PBAlD pode ser convertido em PBAC pela ação de uma aldeído-desidrogenase que oxida aldeídos aos ácidos carboxílicos. O PBAC pode sofrer hidroxilação por ação de mono-oxigenases para formar o ácido 3- (hidroxifenoxi)benzóico. Uma reação de conjugação também foi observada no qual o PBAC por ação de esterases de *Cladosporium* sp. que resultaram na formação do metil-PBAC (BIROLI *et al.*, 2016).

Figura 7 – Proposta da via parcial de degradação do pesticida esfenvalerato por ação de fungos e bactérias de origem marinha.



Fonte: (BIROLI *et al.*, 2016).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Realizar estudos de biodegradação e de biorremediação *ex situ* do pesticida esfenvalerato empregando microrganismos isolados do solo.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Isolar microrganismos do solo;
- Realizar um screening com os microrganismos (bactérias e fungos) frente à biodegradação do esfenvalerato em meio líquido;
- Analisar e quantificar por técnicas cromatográficas os produtos da reação de biodegradação do esfenvalerato com as bactérias, os fungos e os consórcios microbianos em meio líquido;
- Analisar e quantificar por técnicas cromatográficas os produtos da reação de biodegradação do esfenvalerato com as bactérias, os fungos e os consórcios microbianos em solo;
- Propor uma rota metabólica de biodegradação do esfenvalerato pelos microrganismos isolados do solo a partir dos principais metabólitos detectados.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Reagentes, solventes e meios de cultivo utilizados nos experimentos

O padrão analítico (Esfetec, 97%) e os padrões técnicos do pesticida esfenvalerato, (Esfenvalerato, 92%), 3-fenoxibenzaldeído (PBAld, 98%), ácido 3-fenoxibenzoico (PBAc, 98%), álcool 3-fenoxibenzílico (PBA, 98%), ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutírico (PBAc, 96%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

A composição comercial do esfenvalerato (Sumidan 150 SC) é formulado com o esfenvalerato ( $150 \text{ g.L}^{-1}$ ), xileno ( $160 \text{ g.L}^{-1}$ ) entre outros ingredientes foram doados pela empresa IHARABRAS S.A.

Os solventes e os reagentes utilizados para a extração e as análises das reações, tais como acetato de etila, o ácido fórmico (85%), o hexano, o sulfato de magnésio monohidratado e o sulfato de sódio anidro foram obtidos da *Synth*. A acetonitrila foi adquirida da Panreac e o metanol da *Cambridge Isotopes Laboratories*.

O Extrato de Malte (EM) e o Batata Dextrose (BD) foram obtidos da Acumedia.

O Caldo Nutriente (CN) e o Agar bacteriológico foram obtidos da Himedia.

### 4.2 Coleta do solo

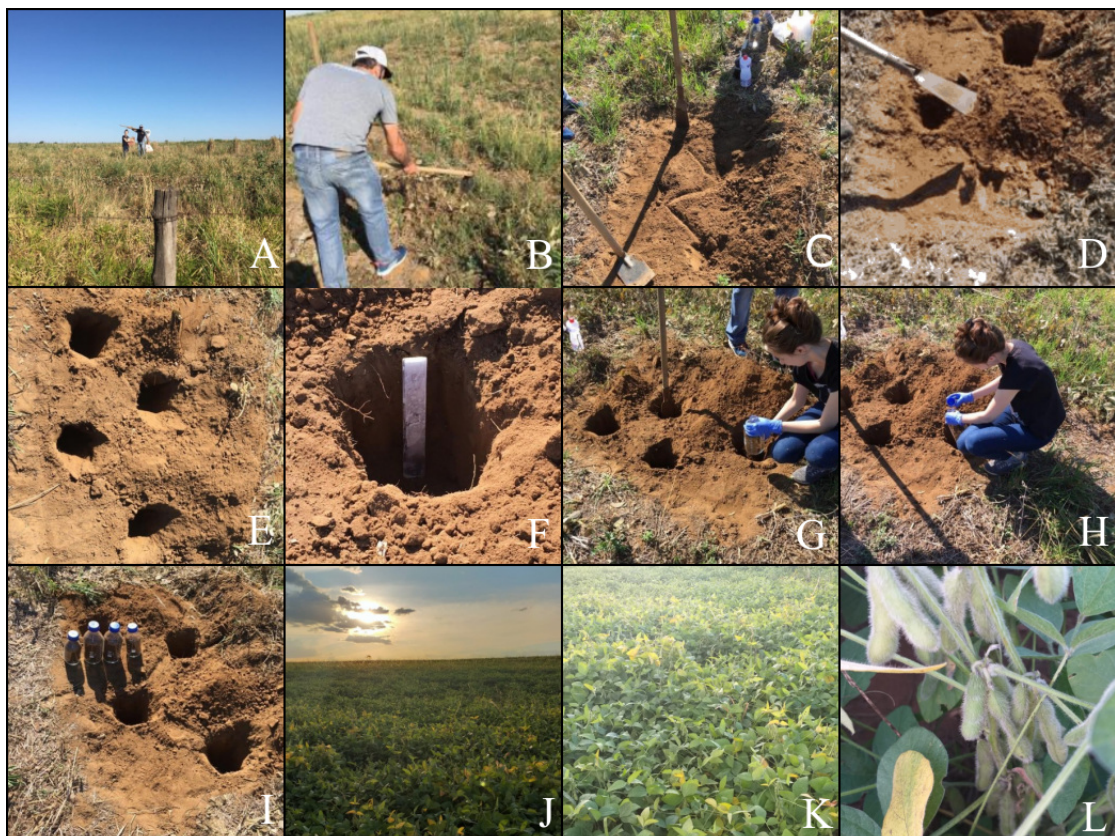
A coleta do solo foi realizada no dia 12 de agosto, 2019 p.m., em dois pontos afastados da cidade de São Carlos, e a 50 m do Campus de São Carlos- Área II da Universidade de São Paulo, cujas coordenadas geográficas indicaram (Ponto 1: - 21,994 35 lat; 47,933 long) e (Ponto 2: - 21,994 lat; - 47,933 long). Essa área foi escolhida porque eventualmente faz-se o plantio de soja no local e também por ser de fácil acessibilidade ao campus da Área II do campus da USP de São Carlos. O local também fica próximo de uma área que frequentemente recebe agroquímicos para o controle de gramíneas, portanto esse solo pode sofrer interferência direta na sua composição microbiana e na resistência desses microrganismos aos agentes contaminantes.

A coleta das amostras de solo foi realizada com o auxílio de uma cavadeira e enxada, as quais foram previamente desinfetadas com uma solução de hipoclorito de sódio (20%) e álcool (70%), com o auxílio de uma pisseta lavou-se as ferramentas com as soluções por aproximadamente 5 minutos.

Após selecionar o local de coleta, primeiro removeu a vegetação superficial com uma enxada e em seguida foram abertos com uma cavadeira 4 buracos equidistantes de 20 cm de distância entre eles por 20 cm de profundidade em cada um dos dois pontos, totalizando 8 buracos (ARRUDA M. R.; MOREIRA, 2014). Todas as amostras de solo coletadas foram acondicionadas em 4 frascos estéreis (tipo *Schott*) que posteriormente no laboratório foram misturadas formando uma amostra única de solo (amostra composta) da qual foi realizado o isolamento dos microrganismos.

Na Figura 8 é possível observar na ilustração a sequência de fotos do dia da saída de campo para a coleta das amostras de solo. Em (A) pode ser observado o local em que o solo foi coletado; em (B) a preparação para capinar o mato; em (C) o delineamento em zigue-zague; em (D, E) os buracos equidistantes de 20 cm de profundidade por 20 cm; em (E, F) a profundidade de 20 cm em que o solo foi coletado; em (G, H) a transferência do solo para os frascos de armazenamento, em (I) O solo já coletado e em (J, K, L) foto da cultura de soja tirada em março de 2021, na área onde fez a coleta do solo em 2019.

Figura 8 – Fotos do local e das etapas de coleta das amostras de solo para o isolamento de microrganismos.



Fonte: Autoria própria.



#### 4.2.1 Preparo da amostra composta do solo

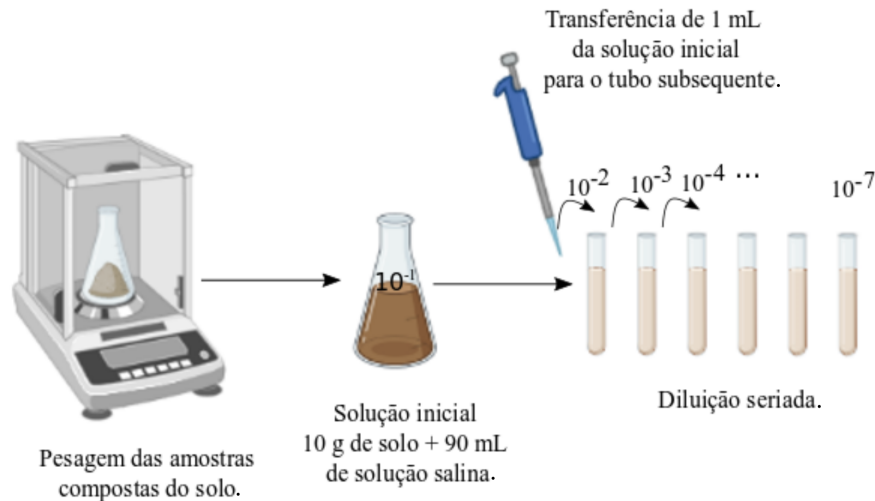
No laboratório fez-se uma homogeneização das amostras, em que os galhos, pedriscos e ramos foram removidos. Posteriormente, o solo foi peneirado dentro da Câmara de Segurança Biológica com fluxo laminar com o auxílio de uma peneira granulométrica de inox (8 x 2 mm) com abertura de malha de 2 mm. Em seguida, todas as amostras de solo coletadas (4 frascos) no laboratório foram unidas (misturadas) dentro da Câmara de Segurança Biológica com fluxo laminar formando uma única amostra do solo (amostra composta).

### 4.3 Isolamento dos microrganismos

Os microrganismos foram isolados da amostra composta do solo logo após a coleta através da técnica de diluição seriada.

Para isso foram pesados 10 g de solo dentro da Câmara de Segurança Biológica com fluxo laminar ao qual foi adicionado 90 mL de solução salina estéril (0,85%) de NaCl. A solução salina foi preparada adicionando 85 g de cloreto de sódio para cada 1L de água destilada a qual foi esterilizada autoclave vertical da marca (Phoenix) a 121°C em 1,5 kPa por 20 minutos. Para a homogeneização da amostra de solo a mistura foi mantida sob agitação magnética por 20 minutos. A partir dessa amostra inicial foram realizadas as diluições em série de  $10^{-2}$  até  $10^{-7}$  na qual, uma alíquota com 1 mL da amostra anterior foi transferida para um tubo subsequente e assim sucessivamente até a última diluição (MADIGAN, 2016). A Figura 9 ilustra as etapas do procedimento de isolamento microbiano do solo pela técnica de diluição seriada.

Figura 9 – Ilustração das etapas da técnica de diluição seriada realizada para o isolamento dos microrganismos da amostra composta de solo.



Fonte: Autoral, realizado no Biorender (BIORENDER, 2021).

Após esse processo foi transferido 1 mL de cada uma dessas diluições para as placas de Petri com o meio de cultivo de Batata-Dextrose-Agar (BDA) com a adição de  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  do pesticida esfenvalerato, cuja composição pode ser observada na Seção 4.4. O método utilizado para o espalhamento do inóculo na superfície da placa foi a plaqueamento por superfície (Figura 10), (HOFLING, 2008). Para cada diluição foram realizadas triplicatas de  $10^{-2}$  até  $10^{-7}$ , totalizando 18 placas.

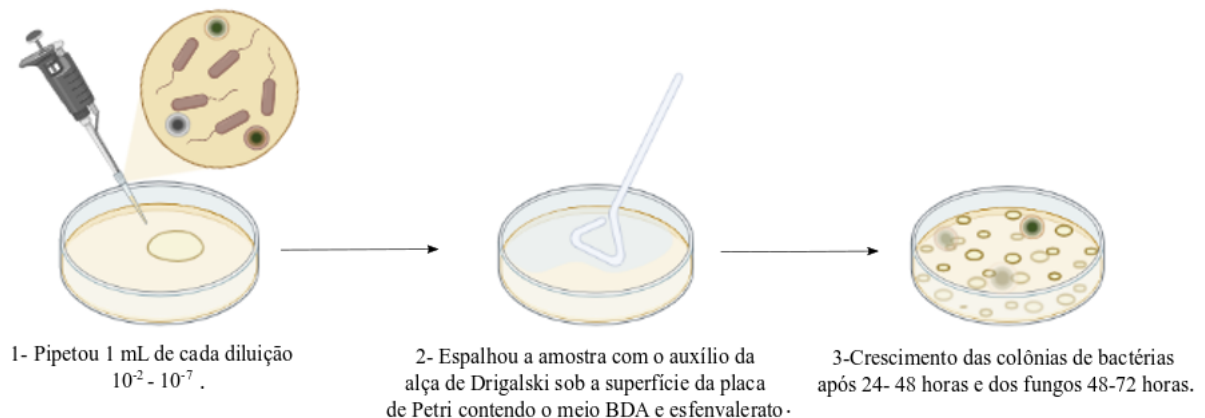
Após o espalhamento do inóculo sob a superfície das placas de Petri com o meio BDA e o esfenvalerato, essas foram incubadas em estufa a  $30^\circ\text{C}$  por até 96h para propiciarem o crescimento dos microrganismos que foram isolados do solo na solução salina.

Posteriormente ao crescimento das colônias bacterianas (24 - 48h) e fúngicas (48 - 72h) estas foram transferidas para os meios de cultivos contendo Agar Nutriente e Agar Malte (2%), respectivamente, cuja composição pode ser observada nas Subseções 4.5.1 e 4.9.1 (HOFLING, 2008).

#### 4.4 Composição dos meios de culturas usados para o isolamento dos microrganismos

Para o isolamento dos microrganismos presentes na amostra composta de solo foi empregado o meio de cultura Batata-Dextrose-Agar (27 g do meio pronto Batata e Dextrose, 20 g de Agar), 1 L de água destilada, pH final=  $5.1 \pm 0.2$  a  $25^\circ\text{C}$ , conforme as especificações do fabricante. O pH final foi aferido em um medidor de pH e foi ajustado com uma solução de HCl ( $1,0 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ou NaOH ( $0,7 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ).

Figura 10 – Ilustração das etapas do método por plaqueamento por superfície realizado para o espalhamento dos microrganismos da amostra composta de solo.



Fonte: Autoral, realizado no Biorender (BIORENDER, 2021).

Adicionou-se  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  do pesticida esfenvalerato (SUMIDAN SC 150) previamente esterilizado nas placas de Petri e foi homogeneizado antes da solidificação do meio. O meio BDA e o pesticida esfenvalerato foram esterilizados em autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  em  $1,5 \text{ kPa}$  por 20 minutos.

O pesticida esfenvalerato precisou ser esterilizado durante a fase de teste, pois quando empregado esse produto, sem o devido tratamento térmico, foi possível observar o crescimento de microrganismos indesejados nas amostras uma vez que o seu grau de pureza é de 92%.

Foi realizado um controle para verificar a recuperação do esfenvalerato após ter sido submetido a altas temperaturas (Subseção 4.7.3).

## 4.5 Experimentos com os fungos isolados do solo

### 4.5.1 Composição dos meios de culturas sólido e líquido para o cultivo dos fungos

Para o cultivo dos fungos em meio sólido foi empregado o meio de Agar e Extrato de Malte (2%) que foi preparado usando a composição de 20 g de Agar, 20 g do Extrato de Malte e 1 L de água destilada,  $\text{pH}=7,0$  a  $25^{\circ}\text{C}$ , conforme as especificações do fabricante.

Para as reações empregando o meio líquido de Malte 2% foi preparado utilizando a composição de 20 g do extrato de Malte, 1 L de água destilada,  $\text{pH} = 7,0$  a  $25^{\circ}\text{C}$ , conforme as especificações do fabricante.

O pH final foi aferido em um medidor de pH e foi ajustado com uma solução de HCl ( $1,0 \text{ mol/L}^{-1}$ ) ou NaOH ( $0,7 \text{ mol/L}^{-1}$ ).

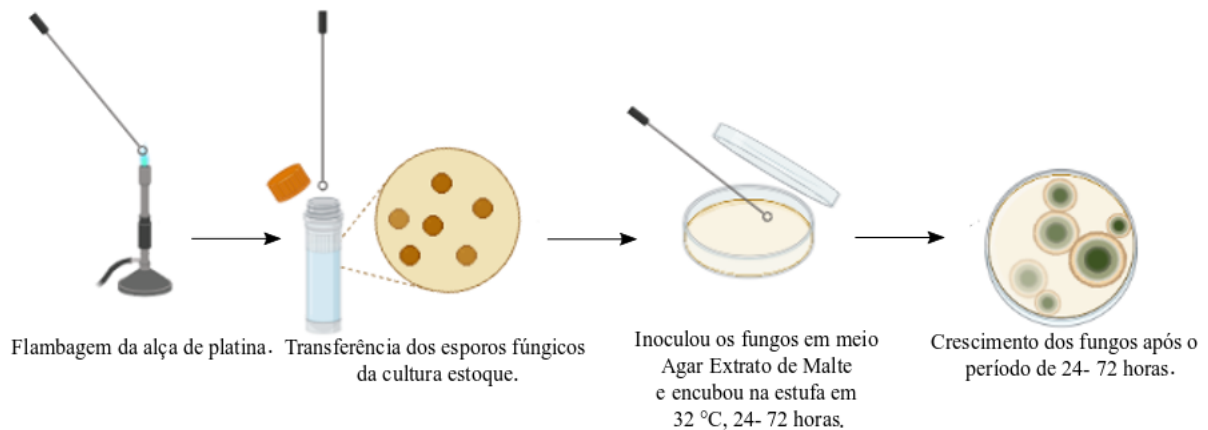
Todos os meios de cultura utilizados foram esterilizados em autoclave (Phoenix) em 121°C, 1,5 kPa por 20 min.

#### 4.5.2 Cultivo de fungos em meio sólido

Os meios de cultivos, cuja composição encontra-se detalhada na Subseção 4.5.1, foram vertidos nas placas de Petri descartáveis com as dimensões de (90mm de diâmetro × 15mm de altura) com capacidade de 20 mL, em câmara Câmara de Segurança Biológica com fluxo laminar (Veco) e em condições assépticas. As placas foram previamente incubadas na temperatura de 32°C (Incubadora-Nova Ética) por 24h para confirmar a não contaminação dos meios de cultivo. Todos os meios sólidos foram armazenados em placas de Petri no máximo por 30 dias em geladeira (4°C).

Os fungos foram transferidos com o auxílio de uma alça de platina pela transferência dos esporos da cultura estoque para as placas de Petri contendo o meio sólido de Agar e Extrato de Malte (2%) que foram mantidos em estufa (Nova-Ética) para o crescimento (32°C, 48-72 horas), (Figura 11).

Figura 11 – Ilustração das etapas do repique dos microrganismos para o crescimento dos fungos em meio sólido.



Fonte: Autoral, realizado no Biorender (BIORENDER, 2021).

#### 4.6 **Screening** dos isolados fúngicos para uso nos experimentos de degradação do esfenvalerato

Após os microrganismos terem sido isolados da amostra composta do solo, foi realizada uma seleção dos isolados fúngicos para serem usados nos experimentos de biodegradação.

Sendo assim, a seleção dos isolados fúngicos ocorreu através da triagem dos representantes mais diferentes (visualmente nas placas) visando abranger possíveis gêneros distintos e também levou-se em conta os isolados que apresentaram um bom crescimento durante o período de incubação.

#### 4.7 **Biodegradação do pesticida esfenvalerato empregando os fungos do solo**

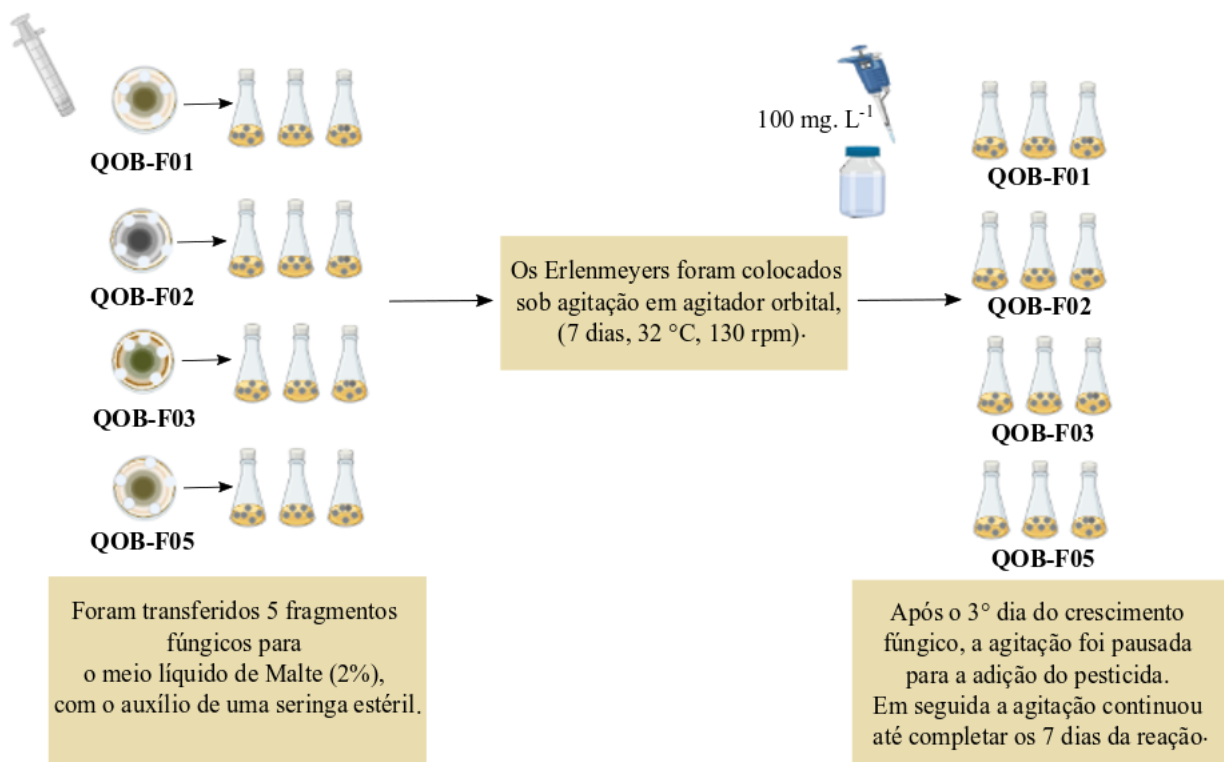
##### 4.7.1 Reação de degradação do pesticida esfenvalerato com os fungos individuais

As reações para avaliar a atividade individual de cada fungo, como a do *Rhizopus* sp. (QOB-F01), do QOB-F02, do QOB-F03 e do *Penicillium* sp. (QOB-F05) na degradação do pesticida esfenvalerato, ocorreram através da transferência de cinco fragmentos do

micélio fúngico (0,5 cm de diâmetro cada) cultivados previamente no meio sólido de Agar e Extrato de Malte (2%), com o auxílio de uma seringa previamente esterilizada em autoclave (121°C, 1,5 kPa, 20 min) a frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido de Malte (2%) para o seu devido crescimento. As reações ocorreram por um período de 7 dias a 32°C, mantida em agitação orbital (130 rpm).

As reações foram realizadas em triplicatas e o pesticida esfenvalerato foi adicionado (100 mg.L<sup>-1</sup>) no terceiro dia do cultivo do fungo no meio reacional (Figura 12).

Figura 12 – Ilustração das etapas das reações de biodegradação do pesticida esfenvalerato com os fungos isolados do solo.



Fonte: Autoral, realizado no Biorender (BIORENDER, 2021).

---

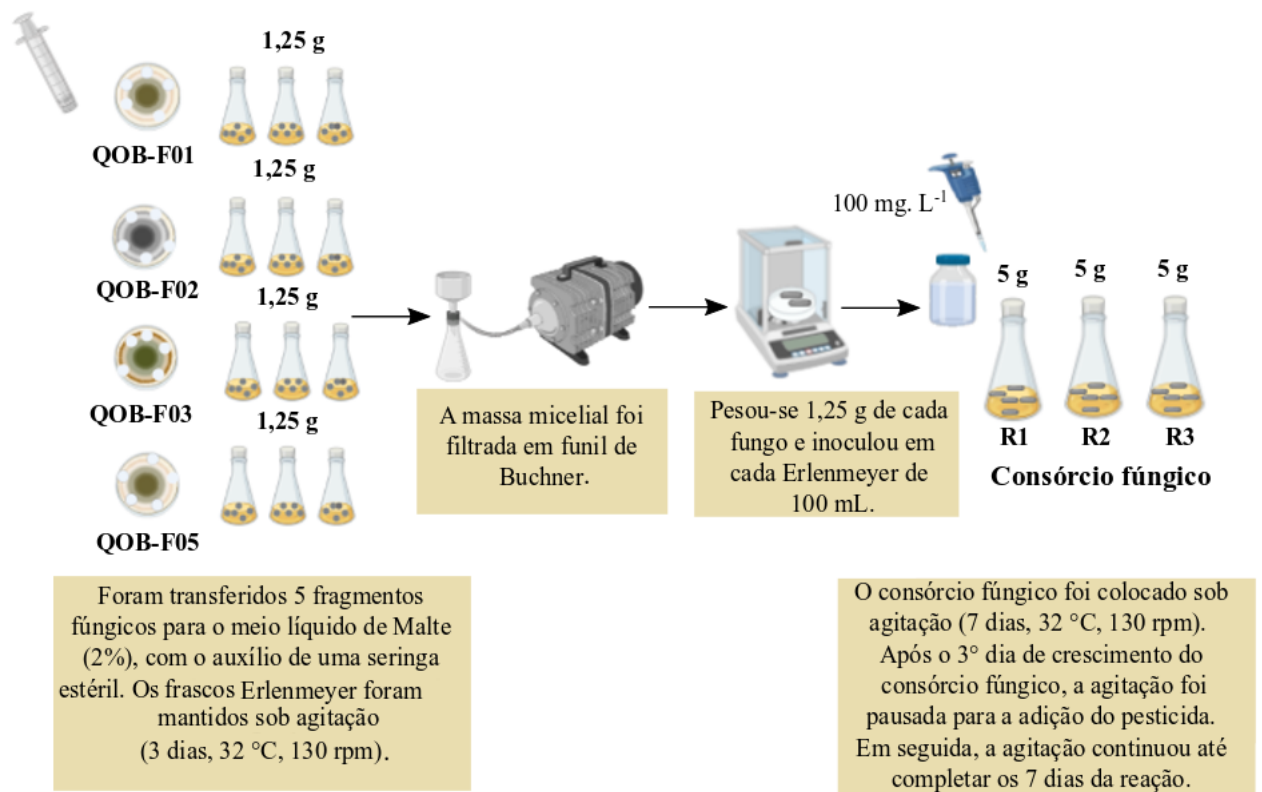
Após o período de incubação (7 dias) realizou-se a extração das reações de acordo com a metodologia adaptada de Birolli, Lima e Porto (2019), no qual o procedimento encontra-se detalhado na Seção 4.9.8.

O isolado fúngico QOB-F02 por apresentar um bom desempenho na biodegradação do esfenvalerato, também foi avaliado quanto a sua capacidade de crescer e de degradar diferentes concentrações do pesticida (100, 200, 300, 400 e 500  $mg.L^{-1}$ ). Essas reações também ocorreram em triplicatas. A realização desse experimento seguiu o mesmo procedimento da Figura 12, o que variou foi apenas a concentração do pesticida esfenvalerato aplicado. Após o período de incubação (7 dias) realizou-se a extração das reações de acordo com a metodologia adaptada de Birolli, Lima e Porto (2019), no qual o procedimento encontra-se detalhado na Seção 4.9.8.

#### 4.7.2 Reação de degradação do pesticida esfenvalerato com o consórcio fúngico

Para as reações com o consórcio fúngico empregou-se os isolados fúngicos *Rhizopus* sp. (QOB-F01), QOB-F02, QOB-F03 e o *Penicillium* sp. (QOB-F05) que foram primeiramente cultivados por 3 dias em frascos Erlenmeyer de 125 mL, separadamente, contendo 50 mL de meio líquido de Malte 2%. Em seguida a massa micelial foi filtrada em funil de Buchner e pesada. Para cada isolado fúngico pesou-se 1,25 g de micélios (totalizando 5 g). Posteriormente 5 g de micélios foram transferidos para um novo frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL de meio líquido de Malte 2%, os quais foram mantidos em agitação orbital (32°C, 130 rpm, 7 dias) para permitir o crescimento do consórcio fúngico. O pesticida foi adicionado com (100  $mg.L^{-1}$ ) no terceiro dia do cultivo do consórcio fúngico. As reações foram realizadas em triplicatas (Figura 13).

Figura 13 – Ilustração das etapas das reações de biodegradação do pesticida esfenvalerato com o consórcio microbiano.



Fonte: Autoral, realizado no Biorender (BIORENDER, 2021).

O consórcio fúngico por apresentar um bom desempenho na biodegradação do esfenvalerato, também foi avaliado quanto a sua capacidade de crescer e de degradar diferentes concentrações do pesticida (100, 200, 300, 400 e 500  $mg.L^{-1}$ ). Essas reações também ocorreram em triplicatas. A realização desse experimento seguiu o mesmo procedimento da Figura 13, o que variou foi apenas a concentração do pesticida esfenvalerato aplicado. Após o período de incubação (7 dias) realizou-se a extração das reações de acordo com a metodologia adaptada de Birolli, Lima e Porto (2019), no qual o procedimento encontra-se detalhado na Seção 4.8.



#### 4.7.3 Controles para as reações de biodegradação com os fungos do solo

Foi realizada uma reação de controle na ausência do pesticida esfenvalerato (controle biótico) e três reações de controles para avaliar a concentração final do pesticida (controle abiótico, controle de células mortas e controle de recuperação).

##### A - Controle na ausência de fungo em meio líquido

Para os experimentos foi realizado o controle abiótico sem a adição de fungos para verificar a estabilidade do pesticida em relação aos fatores externos como luz e a evaporação pela temperatura. Dessa maneira, adicionou-se  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  do pesticida esfenvalerato em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido de Malte (2%). As reações foram realizadas em triplicatas e ocorreram por 7 dias, mantidas em agitação orbital (130 rpm) na temperatura de  $32^\circ\text{C}$ . Após o período de incubação (7 dias) realizou-se a extração dos controles abióticos de acordo com a metodologia adaptada de Birolli, Lima e Porto (2019), no qual o procedimento encontra-se detalhado na Seção 4.8.

##### B - Controle na ausência de pesticida em meio líquido

Para os experimentos foi realizado o controle biótico somente com os fungos cultivados em meio líquido para verificar a presença de metabólitos produzidos pelos fungos na ausência do pesticida.

Dessa maneira, adicionou-se 5 fragmentos de cada fungo, separadamente, em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido de Malte (2%). As reações foram realizadas em uniplicatas e ocorreram por 7 dias, mantidas em agitação orbital (130 rpm) na temperatura de  $32^\circ\text{C}$ , na ausência do pesticida esfenvalerato.

Após o período de incubação (7 dias) realizou-se a extração dos controles bióticos de acordo com a metodologia adaptada de Birolli, Lima e Porto (2019), no qual o procedimento encontra-se detalhado na Seção 4.8.

##### C - Controle de recuperação do pesticida esfenvalerato

Para os experimentos foi realizado o controle de recuperação do pesticida esfenvalerato para verificar a concentração final do pesticida após a reação ser submetida a um tratamento térmico. Dessa maneira, adicionou-se 5 fragmentos do fungo QOB-F02 em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido de Malte (2%).

O fungo QOB-F02 foi colocado para crescer por 7 dias, mantidas em agitação orbital (130 rpm) na temperatura de  $32^\circ\text{C}$ . Após esse período (7 dias), as reações realizadas em triplicatas foram submetidas ao tratamento térmico em autoclave ( $121^\circ\text{C}$ , 1,5 kPa, 20 min) e em seguida foi acrescentado  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  do pesticida

esfenvalerato. Logo após, ao tratamento térmico realizou-se a extração dos controles de recuperação de acordo com a metodologia adaptada de Birolli, Lima e Porto (2019), no qual o procedimento encontra-se detalhado na Seção 4.8.

#### D - Controle de células mortas

Para os experimentos foi realizado o controle de células mortas do fungo QOB-F02 para verificar se haveria degradação do pesticida esfenvalerato durante os 7 dias de reação caso as células fúngicas de QOB-F02 morressem. Dessa maneira, adicionou-se 5 fragmentos do fungo QOB-F02 em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido de Malte (2%). O fungo QOB-F02 foi colocado para crescer por 3 dias, mantidas em agitação orbital (130 rpm) em 32°C. As reações realizadas em triplicatas foram submetidas ao tratamento térmico em autoclave (121°C, 1,5 kPa, 20 min) e em seguida foi acrescentado 100  $mg.L^{-1}$  do pesticida esfenvalerato. Os Erlenmeyer foram mantidos em agitação orbital até completar o 7º dia da reação. Após o período de incubação (7 dias) realizou-se a extração dos controles de células mortas de acordo com a metodologia adaptada de Birolli, Lima e Porto (2019), no qual o procedimento encontra-se detalhado na Seção 4.8.

### 4.8 Extração dos metabólitos das reações de biotransformação do esfenvalerato e dos controles fúngicos

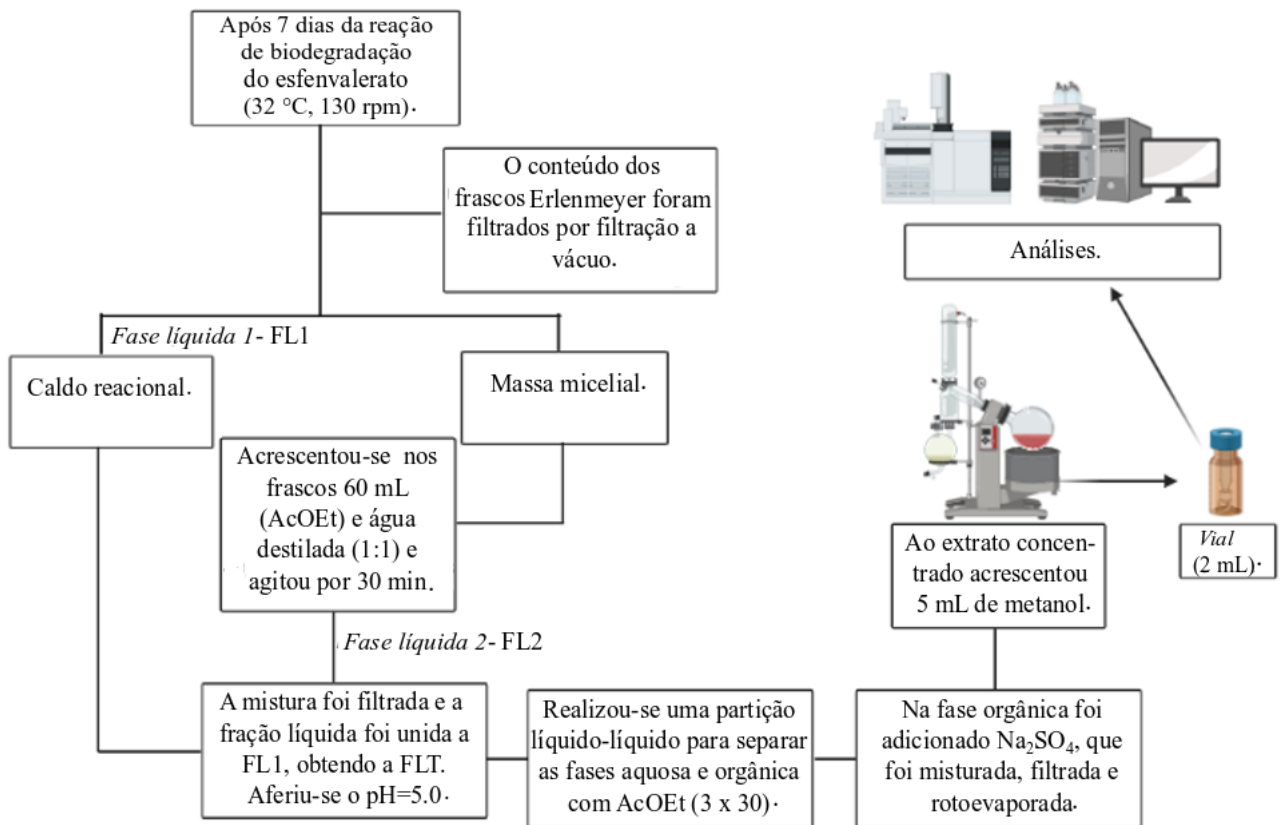
Após 7 dias de reação dos fungos em meio líquido de Malte 2% com o pesticida esfenvalerato (100  $mg.L^{-1}$ ) as amostras foram filtradas em um aparato de Buchner com o auxílio de uma bomba de vácuo, para separar o caldo reacional (Fase líquida 1-FL1) da massa micelial fúngica.

Posteriormente foi adicionado junto à massa micelial 60 mL de AcOEt e água destilada (1:1) e foi mantido em agitação magnética por 30 minutos. Após esse processo, a mistura de AcOEt, água e massa micelial fúngica foi filtrada (Fase líquida 2-FL2) e unida à Fase líquida 1 obtendo a Fase líquida total - FLT. A Fase líquida total foi transferida para um frasco béquer e ajustou-se para pH=5,0. O pH final foi aferido em um medidor de pH (ION, pHB-500) e foi ajustado com uma solução de HCl (1,0  $mol/L^{-1}$ ) ou NaOH (0,7  $mol/L^{-1}$ ). Essa solução foi transferida para um funil de separação de 500 mL e realizou-se uma partição líquido-líquido separando a fase aquosa da orgânica com AcOEt (3 × 30 mL).

Na fase orgânica que continha os metabólitos de interesse da biotransformação do esfenvalerato foi acrescentado sulfato de sódio anidro ( $Na_2SO_4$ ), esta foi misturada, filtrada e levada ao rotaevaporador para a remoção do solvente.

O extrato concentrado foi suspenso em 5 mL de metanol e foi transferido do balão para um tubo vial de 2 mL para em seguida ser analisado por cromatografia líquida utilizando um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu) com detector de Ultravioleta acoplado (CLAE-UV). A Figura 14 ilustra o fluxograma do processo de extração dos metabólitos de biotransformação do esfenvalerato com os fungos isolados do solo.

Figura 14 – Etapas do processo de extração dos metabólitos de biotransformação do esfenvalerato com os fungos isolados do solo.



Fonte: Autoral, realizado no Biorender (BIORENDER, 2021).

## 4.9 Experimentos com as bactérias isoladas do solo

### 4.9.1 Composição dos meios de culturas sólido e líquido para o cultivo das bactérias

Para o cultivo das bactérias em meio sólido foi empregado o meio Agar Nutriente que foi preparado utilizando a composição de 8 g de Caldo Nutriente, 20 g de Agar e 1 L de água destilada, pH final = 7,0 a 25°C, conforme as especificações do fabricante.

Para as reações empregando o meio líquido Caldo Nutriente foi preparado utilizando uma composição de 8 g de Caldo Nutriente e 1 L de água destilada, pH final= 7,0 a 25°C conforme as especificações do fabricante.

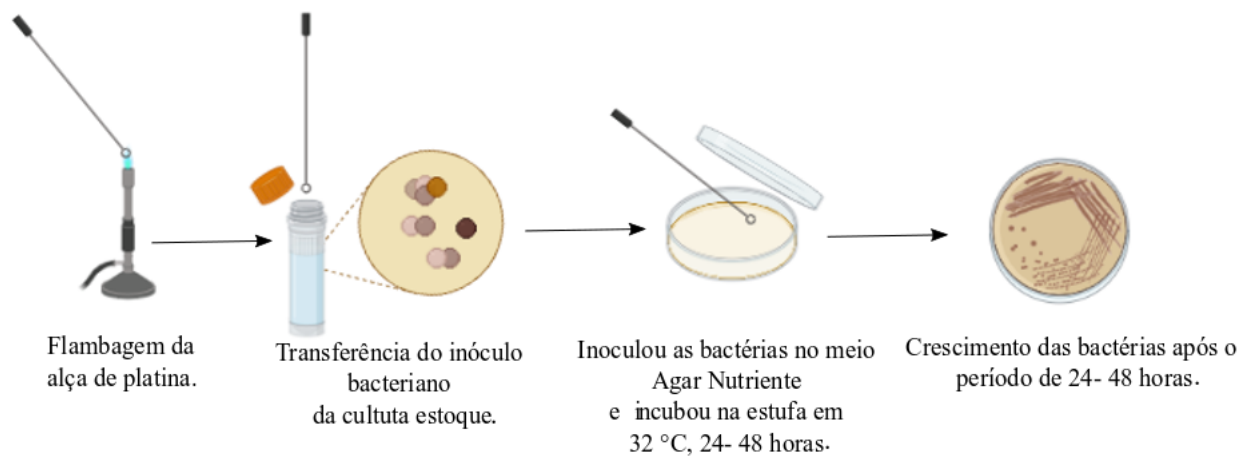
O pH final do meio de cultura foi aferido em um medidor de pH e foi ajustado com uma solução de HCl ( $1,0 \text{ mol/L}^{-1}$ ) ou NaOH ( $0,7 \text{ mol/L}^{-1}$ ).

Todos os meios de cultura utilizados foram esterilizados em autoclave (Phoenix) em 121°C, 1,5 kPa por 20 min.

### 4.9.2 Cultivo de bactérias em meio sólido

Os meios de cultivo, cuja composição encontra-se detalhada na Subseção 4.9.1, foram vertidos nas placas de Petri com as dimensões de 90mm de diâmetro  $\times$  15mm de altura, com capacidade de 20 mL de meio, em Câmara de Segurança Biológica com fluxo laminar (Veco) e em condições assépticas. As placas foram incubadas a 32°C (Incubadora-Nova Ética) por 24 h para confirmar que não houve a contaminação dos meios de cultivo antes de serem utilizados. Todos os meios sólidos foram armazenados em placas de Petri no máximo por 30 dias em geladeira (4°C). As bactérias foram transferidas para as placas de Petri em forma de estrias pela técnica de esgotamento. Utilizou-se uma alça de platina para realizar transferência do inóculo bacteriano da cultura estoque para as placas de Petri contendo o meio Agar Nutriente (Acumedia). Posteriormente foram incubadas em estufa (Nova-Ética) para o crescimento e o desenvolvimento das colônias (32°C, 48 horas), (Figura 15).

Figura 15 – Ilustração das etapas do repique para o crescimento das bactérias em meio sólido.



Fonte: Autoral, realizado no Biorender (BIORENDER, 2021).

#### 4.9.3 Procedimentos para avaliar a purificação das bactérias isoladas do solo

##### 4.9.3.1 Preparo das soluções

As soluções utilizadas no método de Gram foram preparadas de acordo com as 4 etapas seguintes:

Primeira etapa: O preparo da Solução A do cristal violeta foi realizado através da diluição de 2g do composto cristal violeta (90-95% de pureza) em 20 mL de etanol (95%). Posteriormente, para o preparo da Solução B diluiu-se 0,8 g de oxalato de amônio em 80 mL de água destilada. As soluções foram misturadas adicionando a Solução B sobre a solução A que foram deixadas em repouso por 24 h, filtrando em seguida. A solução final foi estocada em um frasco âmbar.

Segunda etapa: Nesta etapa foi preparado uma solução de lugol através da diluição de 1 g do iodo metálico ( $I_2$ ) e 2 g do iodeto de potássio (KI) em 300 mL de água destilada. O iodo e o iodeto foram misturados e a água foi sendo adicionada aos poucos, em seguida a solução foi filtrada. A solução foi estocada em frasco âmbar em geladeira (4°C).

Terceira etapa: Preparou-se o descorante no qual misturou-se 10 mL de acetona e 10 mL de etanol (95%).

Quarta etapa: Nesta etapa preparou-se o contra-corante para isso diluiu-se 2,5 g de safranina em 100 mL de etanol (95%).

#### 4.9.3.2 Coloração de Gram para as bactérias do solo

O processo para confirmar a purificação dos isolados bacterianos foi realizado pela técnica de repicagem por esgotamento, onde as estrias foram realizadas de modo a obter-se a separação e a total purificação das linhagens. Em seguida, as colônias bacterianas puras foram confirmadas pela técnica de coloração de Gram (HOFLING, 2008; MOREIRA *et al.*, 2012).

O procedimento de coloração de Gram das bactérias isoladas do solo e a observação das colônias foram realizados em colaboração com a técnica Marília Cardoso Milanetto no laboratório de Biotecnologia Microbiana do Instituto de Química, coordenado pela Profa. Dra. Márcia Nitschke.

A partir das colônias cultivadas previamente por 24 h em estufa a 32°C, com o auxílio de uma alça de inoculação retirou-se uma amostra e realizou cuidadosamente os esfregaços homogêneos em uma lâmina de vidro (26 cm x 76 mm). Em seguida, as amostras foram fixadas na presença de calor (Bico de Bunsen) e corou-se com a solução de cristal violeta (1 min). Realizou uma sequência de tratamentos com uma solução de lugol (1 min), descorou com álcool-acetona 95% (15 segundos) e contra-corou com uma solução de safranina (30 segundos).

Para todas as etapas houve a remoção do excesso de reagentes adicionados nas colônias fixadas nas lâminas de vidro com água destilada. Após o processamento das amostras essas foram visualizadas em microscópio óptico de luz (ZEISS) na objetiva de 100X de aumento com óleo de imersão (HOFLING, 2008).

#### 4.9.4 *Screening* das cepas bacterianas para uso nos experimentos de biodegradação do pesticida esfenvalerato

Após os microrganismos terem sido isolados do solo e purificados, foi realizada uma seleção das bactérias para serem usadas nos experimentos de biodegradação.

Sendo assim, todas as 16 bactérias isoladas do solo foram inicialmente avaliadas quanto ao potencial de biodegradação do pesticida esfenvalerato. Foram realizados experimentos em uniplicatas no meio líquido de Caldo Nutriente nas condições de 130 rpm, 32°C, por 5 dias, o qual encontra-se detalhado na Subseção 4.9.5.

#### 4.9.5 Biodegradação do pesticida esfenvalerato empregando as bactérias do solo

##### 4.9.5.1 Reação de degradação do pesticida esfenvalerato com as bactérias individuais

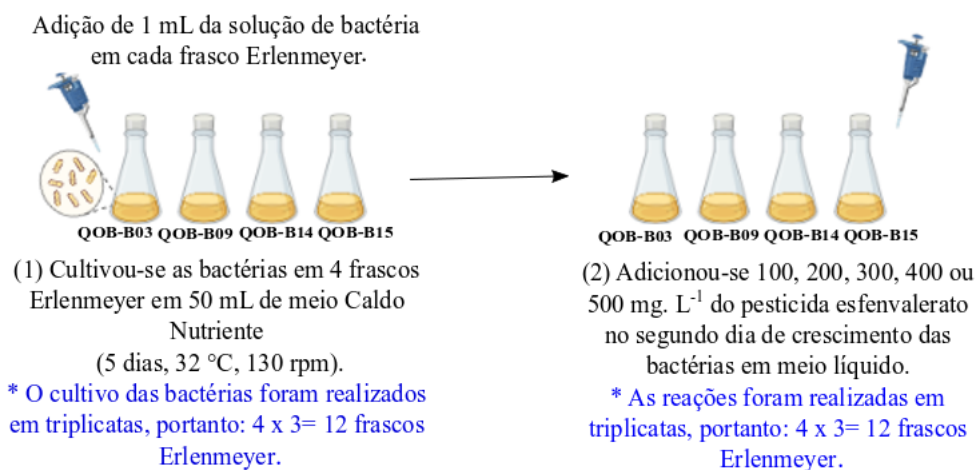
As reações para avaliar a atividade individual de cada bactéria, como a de *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15 na degradação do pesticida esfenvalerato, ocorreram através da inoculação de 1 mL da suspensão bacteriana a frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido de Caldo Nutriente, para o seu devido crescimento.

A densidade óptica do inóculo das bactérias foi estimada no espectrofotômetro UV-*vis* (DO=0.9) cujo comprimento de onda foi de 610 nm. As reações foram realizadas em triplicatas e ocorreram por um período de 5 dias a 32°C, mantidas em agitação orbital (130 rpm).

O pesticida esfenvalerato foi adicionado ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) no segundo dia do crescimento da bactéria no meio reacional (Figura 16).

Após o período de incubação (5 dias) realizou-se a extração das reações de acordo com a metodologia adaptada de Birolli, Lima e Porto (2019), no qual o procedimento encontra-se detalhado na Subseção 4.9.8.

Figura 16 – Ilustração das etapas das reações de biodegradação do pesticida esfenvalerato com as bactérias do solo.



Fonte: Autoral, realizado no Biorender (BIORENDER, 2021).

O isolado bacteriano *Cupriavidus* sp. (QOB-B09) por apresentar um bom desempenho na biodegradação do esfenvalerato, também foi avaliado quanto a sua capacidade de crescer e de degradar diferentes concentrações do pesticida (100, 200, 300, 400 e 500  $\text{mg.L}^{-1}$ ). Essas reações também foram realizadas em triplicatas. A realização desse experi-

---

mento seguiu o mesmo procedimento da Figura 16, o que variou foi apenas a concentração do pesticida esfenvalerato aplicado.

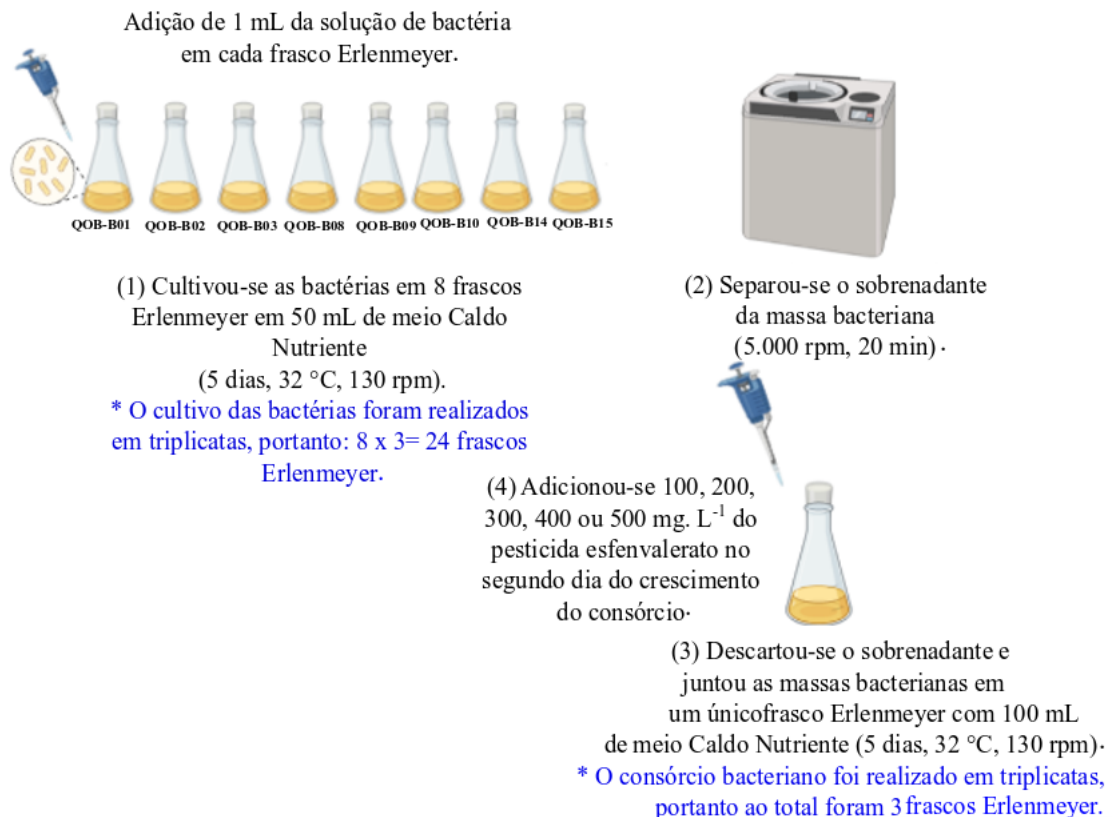
Após o período de incubação (5 dias) realizou-se a extração das reações de acordo com a metodologia adaptada de Birolli, Lima e Porto (2019), no qual o procedimento encontra-se detalhado na Subseção 4.9.8.

#### 4.9.6 Reação de degradação do pesticida esfenvalerato com o consórcio bacteriano

Para as reações com o consórcio bacteriano empregou-se os isolados QOB-B01, QOB-B02, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15. As bactérias foram primeiramente cultivadas por 2 dias em frascos Erlenmeyer de 125 mL, separadamente, contendo 50 mL de meio líquido de Caldo Nutriente. Em seguida, a massa bacteriana foi separada por centrifugação na centrífuga (Hitachi), a 5.000 rpm por 20 minutos. Os *pellets* foram transferidos de forma asséptica para um novo frasco Erlenmeyer de 250 mL contendo 100 mL do meio Caldo Nutriente, os quais foram mantidos em agitação orbital (32°C, 130 rpm, 5 dias) para permitir o crescimento do co-cultivo. O pesticida foi adicionado (100 mg.L<sup>-1</sup>) no segundo dia do consórcio bacteriano. As reações foram realizadas em triplicatas (Figura 17).



Figura 17 – Ilustração das etapas das reações de biodegradação do pesticida esfenvalerato com o consórcio bacteriano.



Fonte: Autoral, realizado no Biorender (BIORENDER, 2021).

O consórcio bacteriano por apresentar um bom resultado na biodegradação do esfenvalerato, também foi avaliado quanto a sua capacidade de crescer e degradar diferentes concentrações do pesticida (100, 200, 300, 400 e 500  $mg.L^{-1}$ ). Essas reações também ocorreram em triplicatas. A realização desse experimento seguiu o mesmo procedimento da Figura 17, o que variou foi apenas a concentração do pesticida esfenvalerato aplicado.

#### 4.9.7 Controles para as reações de biodegradação com as bactérias do solo

Foi realizada uma reação de controle na ausência do pesticida esfenvalerato (controle biótico) e três reações de controles para avaliar a concentração final do pesticida (controle abiótico, controle de células mortas e controle de recuperação).

##### A - Controle na ausência de bactéria em meio líquido

Para os experimentos foi realizado o controle abiótico sem a adição de bactérias para verificar a estabilidade do pesticida em relação aos fatores externos como luz e a evaporação pela temperatura. Dessa maneira, adicionou-se 100  $mg.L^{-1}$  do pesticida

esfenvalerato em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido de Caldo Nutriente.

As reações foram realizadas em triplicatas e ocorreram por 5 dias, mantidas em agitação orbital (130 rpm) na temperatura de 32°C.

Após o período de incubação (5 dias) realizou-se a extração dos controles abióticos de acordo com a metodologia adaptada de Birolli, Lima e Porto (2019), no qual o procedimento encontra-se detalhado na Subseção 4.9.8.

#### B - Controle na ausência de pesticida em meio líquido

Para os experimentos foi realizado o controle biótico somente com as bactérias cultivadas em meio líquido para verificar a presença de metabólitos produzidos pelas bactérias na ausência do pesticida. Dessa maneira, adicionou-se 1 mL de cada bactéria, separadamente, em frascos Erlenmeyer de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido Caldo Nutriente. A densidade óptica do inóculo das bactérias foi estimada no espectrofotômetro UV-*vis* (DO=0.9) cujo comprimento de onda foi de 610 nm. As reações foram realizadas em uniplicatas e ocorreram por 5 dias, mantidas em agitação orbital (130 rpm) na temperatura de 32°C, na ausência do pesticida esfenvalerato. As reações foram realizadas em uniplicatas.

Após o período de incubação (5 dias) realizou-se a extração dos controles bióticos de acordo com a metodologia adaptada de Birolli, Lima e Porto (2019), no qual o procedimento encontra-se detalhado na Subseção 4.9.8.

### C - Controle de recuperação do pesticida esfenvalerato

Para os experimentos foi realizado um controle de recuperação do pesticida esfenvalerato para verificar a concentração final do pesticida após a reação ser submetida a um tratamento térmico. Dessa maneira, adicionou-se 1 mL da bactéria *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), em frascos *Erlenmeyer* de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido Caldo Nutriente. A densidade óptica do inóculo da bactéria foi estimada no espectrofotômetro UV-*vis* (DO=0.9) cujo comprimento de onda foi de 610 nm.

A bactéria *Cupriavidus* sp. (QOB-B09) foi cultivada por 5 dias, mantida em agitação orbital (130 rpm) na temperatura de 32°C. Após esse período (5 dias), as reações realizadas em triplicatas foram submetidas ao tratamento térmico em autoclave (121°C, 1,5 kPa, 20 min) e em seguida foi acrescentado 100  $mg.L^{-1}$  do pesticida esfenvalerato. Logo após, foi realizada a extração das reações de acordo com a metodologia adaptada de Birolli, Lima e Porto (2019), no qual o procedimento encontra-se detalhado na Subseção 4.9.8.

### D - Controle de células mortas

Para os experimentos foi realizado um controle de células mortas da bactéria *Cupriavidus* sp. (QOB-B09) para verificar uma possível degradação do pesticida esfenvalerato durante os 5 dias de reação caso as células bacterianas morressem.

Dessa maneira, adicionou-se 1 mL da bactéria *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), em frascos *Erlenmeyer* de 125 mL contendo 50 mL de meio líquido Caldo Nutriente. A densidade óptica do inóculo da bactéria foi estimada no espectrofotômetro UV-*vis* (DO=0.9) cujo comprimento de onda foi de 610 nm.

A bactéria foi cultivada por 2 dias, mantida em agitação orbital (130 rpm) na temperatura de 32°C, após esse período. As reações realizadas em triplicatas foram submetidas ao tratamento térmico em autoclave (121°C, 1,5 kPa, 20 min) e em seguida foi acrescentado 100  $mg.L^{-1}$  do pesticida esfenvalerato.

Os *Erlenmeyer* foram mantidos em agitação orbital até completar o 5° dia da reação. Após o período de incubação (5 dias) seguido do tratamento térmico realizou-se a extração das reações de acordo com a metodologia adaptada de Birolli, Lima e Porto (2019), no qual o procedimento encontra-se detalhado na Subseção 4.9.8.

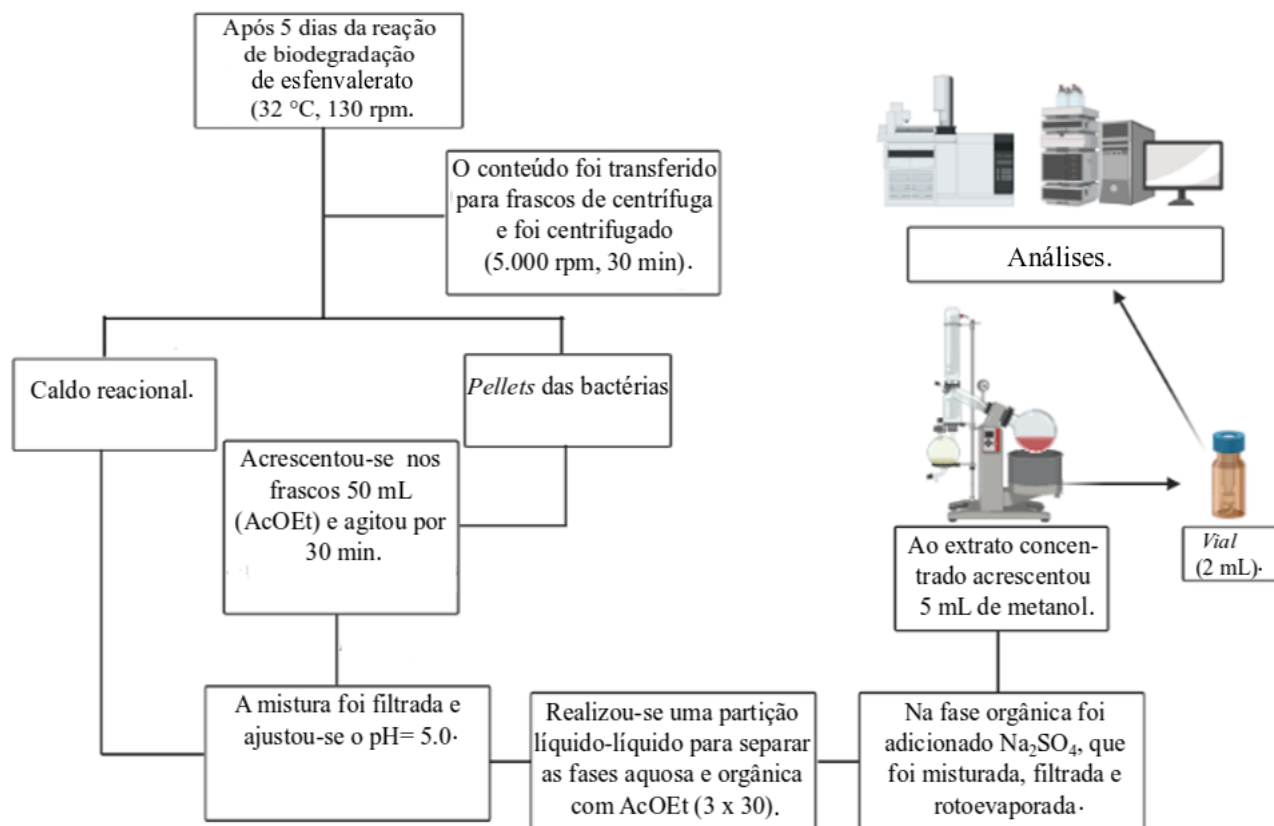
#### 4.9.8 Extração dos metabólitos da biodegradação do esfenvalerato da reação bacteriana

Após 5 dias de crescimento das bactérias (32°C, 130 rpm) em meio de Caldo Nutriente na presença do esfenvalerato (100 mg.L<sup>-1</sup>), todo o conteúdo de 50 mL do frasco Erlenmeyer de 125 mL para as reações com os isolados cultivados individualmente e 100 mL para as reações do consórcio bacteriano foi transferido para um frasco de centrifuga de 250 mL que foram centrifugados a 5.000 rpm por 20 minutos, para promover a separação do caldo reacional líquido do *pellets* das bactérias.

Posteriormente a centrifugação o caldo reacional foi separado e no *pellets* foi acrescentado 50 mL de acetato de etila e manteve-se em agitação magnética por 30 minutos em um frasco Erlenmeyer de 250 mL. O conteúdo do *pellets*, o AcOEt e o caldo reacional foram transferidos para um frasco béquer e ajustou-se o pH=5,0 com uma solução de HCl 0,5 M. Em seguida transferiu-se o volume total para um funil de separação de 500 mL, para que fosse realizada a partição líquido-líquido separando a fase aquosa da fase orgânica com AcOEt (3 × 30 mL).

A fase aquosa foi descartada e a fase orgânica que continha os metabólitos de interesse da biotransformação do esfenvalerato foi acrescentado sulfato de sódio anidro. Esta foi misturada, filtrada e levada ao rota-evaporador para a remoção do solvente de extração. Ao extrato concentrado foi adicionado 5 mL de metanol e foi transferido do balão para um frasco vial de 2 mL para em seguida ser e analisado por cromatografia líquida utilizando um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (Shimadzu) com detector de Ultravioleta acoplado (CLAE-UV). A Figura 18 ilustra o fluxograma do processo de extração dos metabólitos de biotransformação do esfenvalerato com as bactérias isoladas do solo.

Figura 18 – Etapas do processo de extração dos metabólitos de biotransformação do esfenvalerato com as bactérias do solo.



Fonte: Autoral, realizado no Biorender (BIORENDER, 2021).

#### 4.9.9 Preservação dos microrganismos isolados dos solos e identificação molecular

Os microrganismos até o momento foram preservados na coleção do Laboratório de Química Orgânica e Biocatálise do Instituto de Química de São Carlos (IQSC/USP).

Os microrganismos foram preservados e estocados em geladeira a 4°C e em freezer a -20°C sendo empregado o glicerol como agente crio-protetor. Dessa maneira, foi realizada uma solução de meio de Malte 2% para os fungos e de Caldo Nutriente para as bactérias com adição de glicerol, 20% v/v.

Os microrganismos foram previamente identificados pela professora Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos, do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Laboratório Multidisciplinar em Saúde e Meio Ambiente da Unifesp de São Paulo- SP.

Uma primeira análise foi realizada pela técnica de Matrix Associated Laser Desorption-Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF), mas ainda será realizado o sequenciamento para confirmação da identificação dos microrganismos isolados do solo.

#### 4.9.10 Técnicas cromatográficas empregadas nas análises

As análises por cromatografia líquida foram realizadas em um Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE-UV) da marca Shimadzu, Sistema Prominence que possui os seguintes módulos: Controlador de sistema (CBM-20A); Propulsão de solvente (LC-20AT); Degaseificador DGU-20A5; Forno de coluna CTO-20A, Detector UV-*Vis* SPD-M20A.

Para as análises de biodegradação do pesticida esfenvalerato e demais amostras (controles) foi utilizada uma coluna Phenomenex C18 ( $0,46 \times 25$  cm;  $5 \mu\text{m}$ ). A amostra foi eluída com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico e água Mili Q (Solvente A) e 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila (Solvente B), a fase móvel foi composta de 50% - 90% B (gradiente linear). A temperatura do forno utilizado foi de  $40^\circ\text{C}$ , fluxo de  $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  e o volume de injeção de  $10 \mu\text{L}$ .

As amostras e as reações também foram analisadas em um Cromatógrafo a Gás acoplado ao Espectrômetro de Massas (CG-EM) da marca Shimadzu, modelo GC-2010 plus acoplado a um injetor automático AOC-5000 e a um detector de massas MS2010 plus com impacto de elétrons (IE,  $70 \text{ eV}$ ).

O gás de arraste utilizado para realizar as análises foi o hélio com vazão de  $0,76 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  e pressão  $38,4 \text{ kPa}$ , temperatura do injetor de  $250^\circ\text{C}$ , temperatura inicial da coluna de  $60^\circ\text{C}$  e final de  $250^\circ\text{C}$ .

O tempo total de análise foi de 45 min, injetando-se  $1 \mu\text{L}$  com razão de divisão de fluxo 5,0. A temperatura da fonte de íon foi de  $200^\circ\text{C}$  e a da interface de  $270^\circ\text{C}$ . O monitoramento dos íons ocorreu entre 4 a 45 min na faixa de 40 a 500 m/z.

#### 4.9.11 Curva para a quantificação do esfenvalerato e dos seus metabólitos

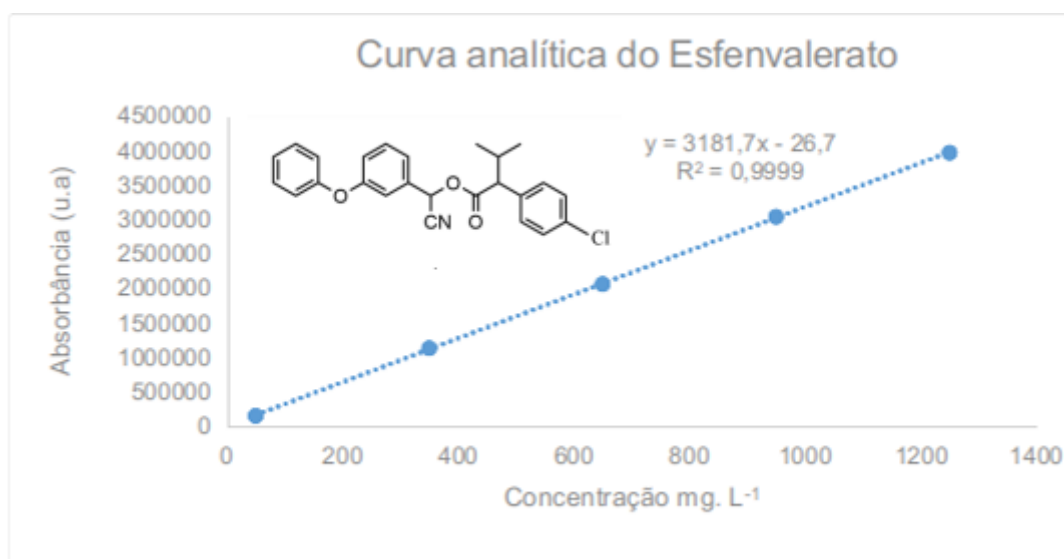
A curva de calibração realizada para validação do método para análise da concentração residual do pesticida esfenvalerato para as reações realizadas em meio líquido, foi uma curva de padrão externo em que foi adicionada quantidades conhecidas e crescentes do pesticida esfenvalerato ( $50$ -  $1250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

A partir dessas concentrações (eixo x) foi possível encontrar a absorbância (eixo y) e assim traçar uma reta interligando os pontos das concentrações que através de uma análise de regressão linear foi possível obter a equação da reta. É possível observar a linearidade do gráfico na Figura 19 indicando assim que todos os valores das concentrações encontram-se dentro da curva.

No caso da curva de calibração empregando o padrão externo, tanto o padrão quanto as amostras foram injetados separadamente, sendo possível a identificação do analito nas amostras pela comparação do tempo de retenção do pesticida esfenvalerato da amostra com o do padrão.

O pesticida esfenvalerato (92% de pureza) foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água Milli-Q (Solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (Solvente B). Foi utilizada a detecção ultravioleta em 277 nm. As soluções padrões foram preparadas em concentrações de 50, 350, 650, 950 e 1250  $mg.L^{-1}$  de esfenvalerato dissolvido em acetonitrila de grau CLAE. Através da curva obteve-se a equação linear da reta  $c = 3181,7x - 26,7$ , como pode ser observado na Figura 19.

Figura 19 – Curva analítica obtida para a quantificação do pesticida esfenvalerato.

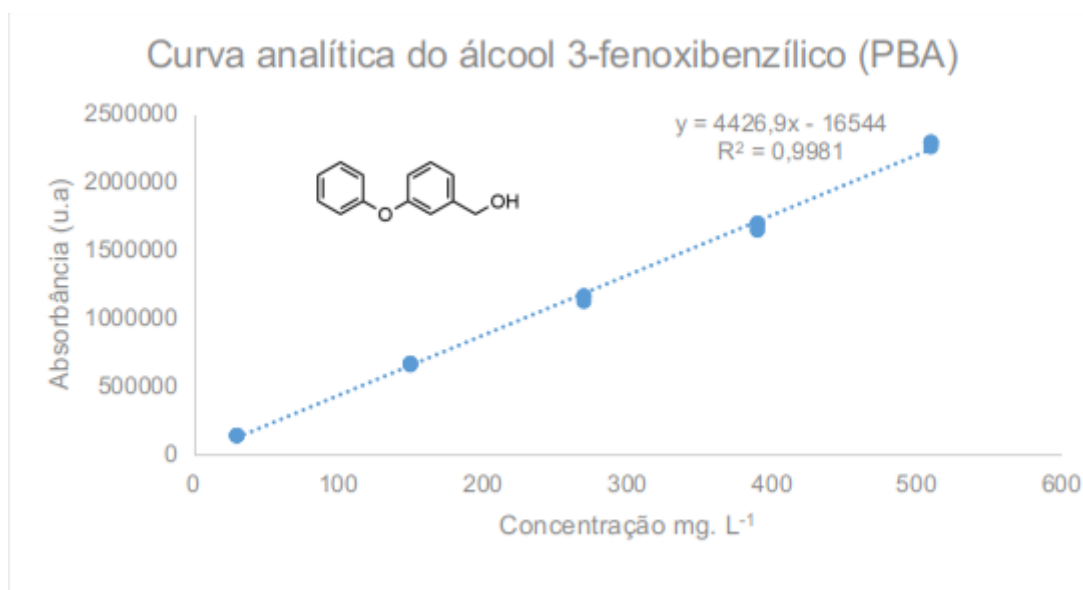


As curvas de calibração realizadas para a validação do método e para a análise da concentração residual dos principais produtos de degradação do pesticida esfenvalerato, o álcool 3-fenoxibenzílico (PBA), o ácido 3-fenoxibenzoico (PBAc), o ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutírico (CLAc) e o 3-fenoxibenzaldeído (PBAld) também foram realizadas pela curva de padrão externo em que foram adicionadas quantidades conhecidas e crescentes de concentração ( $30\text{-}510\text{ mg.L}^{-1}$ ) de cada produto analisado.

A partir dessas concentrações (eixo  $x$ ) foi possível encontrar a absorvância (eixo  $y$ ) e assim traçar uma reta interligando os pontos das concentrações e através de uma análise de regressão linear foi possível obter a equação da reta.

O álcool 3-fenoxibenzílico (PBA), (98% de pureza) foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água Milli-Q (Solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (Solvente B). Foi utilizada a detecção ultravioleta em 277 nm. As soluções padrões foram preparadas em diferentes concentrações 30, 150, 270, 390 e 510  $\text{mg.L}^{-1}$  de (PBA) dissolvido em metanol de grau CLAE. Através da curva obteve-se a equação linear da reta  $c = 4426,9x - 16544$ , como pode ser observado na Figura 20.

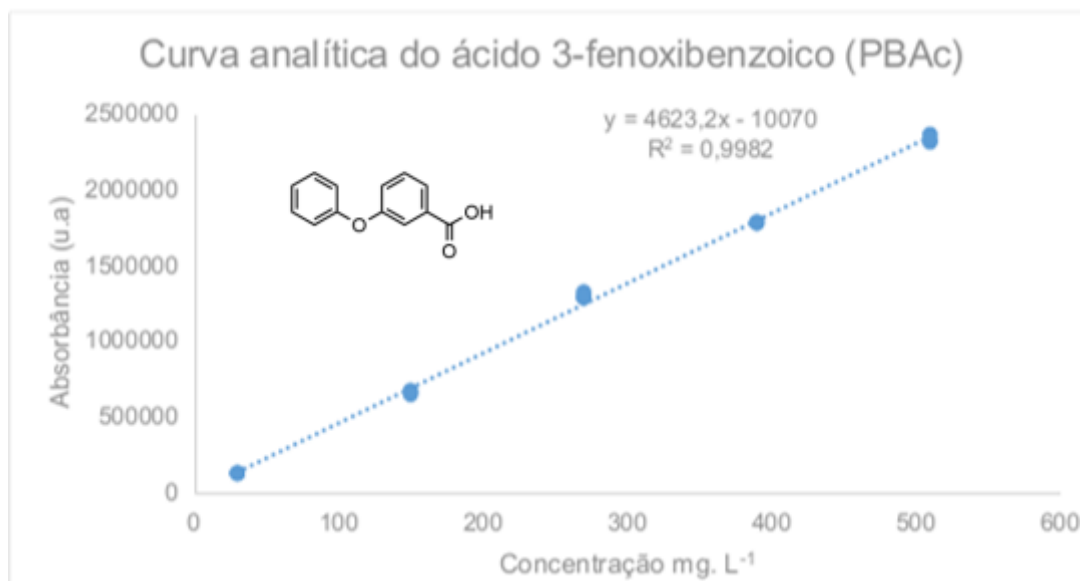
Figura 20 – Curva analítica obtida para a quantificação do álcool 3-fenoxibenzílico (PBA).



O ácido 3-fenoxibenzoico (PBAc), (98% de pureza) foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água Milli-Q (Solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (Solvente B). Foi utilizada a detecção ultravioleta em 277 nm. As soluções padrões foram preparadas em diferentes concentrações 30, 150, 270, 390 e 510  $\text{mg.L}^{-1}$  de (PBAc) dissolvido em metanol de grau CLAE. Através da curva obteve-se a equação linear da reta  $c = 4623,2x - 10070$ , como pode ser observado na Figura 21.

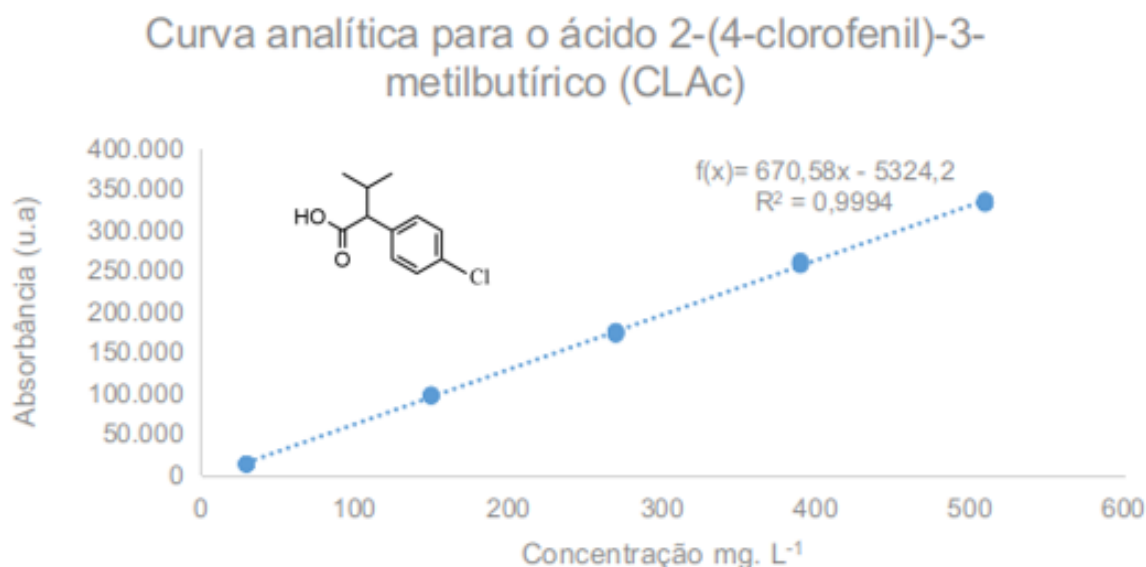


Figura 21 – Curva analítica obtida para a quantificação do ácido 3-fenoxibenzoico (PBAc).



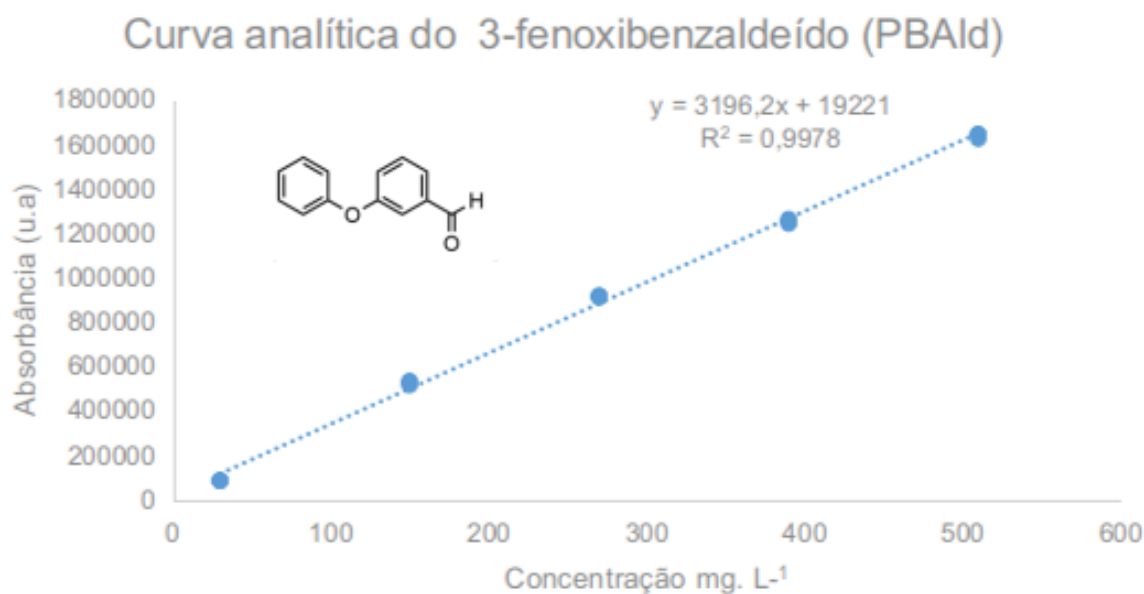
O ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutírico (CLAc), (96% de pureza) foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água Milli-Q (Solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (Solvente B). Foi utilizada a detecção ultravioleta em 266 nm. As soluções padrões foram preparadas em diferentes concentrações 30, 150, 270, 390 e 510  $mg.L^{-1}$  de (CLAc) dissolvido em metanol de grau CLAE. Através da curva obteve-se a equação linear da reta  $c = 670,58x - 5324,2$ , como pode ser observado na Figura 22.

Figura 22 – Curva analítica obtida para a quantificação do ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutírico (CLAc).



O 3-fenoxibenzaldeído (PBAlD), (98% de pureza) foi eluído com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água Milli-Q (Solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (Solvente B). Foi utilizada a detecção ultravioleta em 277 nm. As soluções padrões foram preparadas em diferentes concentrações 30, 150, 270, 390 e 510  $mg.L^{-1}$  de (PBAlD), dissolvido em metanol de grau CLAE. Através da curva obteve-se a equação linear da reta  $c = 3196,2x + 19221$ , como pode ser observado na Figura 23.

Figura 23 – Curva analítica obtida para a quantificação do 3-fenoxibenzaldeído (PBAlD).



## 4.10 Experimento de biorremediação *ex situ*

### 4.10.1 Coleta das amostras de solo para a realização dos experimentos de biorremediação *ex situ*

Uma segunda coleta do solo foi realizada no dia 10 de novembro, 2020 p.m., nas mesmas coordenadas geográficas e seguiram a mesma metodologia empregada na primeira coleta realizada previamente na etapa de isolamento dos microrganismos do solo (Seção 4.2).

As novas amostras de solo foram coletadas com o objetivo de empregar a microbiota nativa como um dos controles dos experimentos de biorremediação *ex situ* do pesticida esfenvalerato em solo.

### 4.10.2 Montagem dos experimentos em solo

Os microrganismos que apresentaram os melhores desempenhos nos experimentos de biodegradação do pesticida esfenvalerato em meio líquido foram o consórcio bacteriano (QOB-B01, QOB-B02, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15) e o fungo QOB-F02. Por esse motivo, esses foram os selecionados para serem investigados nos estudos de biorremediação *ex situ* em solo.

Para os experimentos no solo foram realizados três tipos de tratamentos e um controle abiótico, dentre eles: O consórcio bacteriano, o fungo QOB-F02 e o microbioma.

Os experimentos para investigar a biorremediação *ex situ* do pesticida esfenvalerato em solo foram realizados para avaliar a biodegradação de 100 mg.  $L^{-1}$  do pesticida esfenvalerato. Para todos os tratamentos as reações ocorreram durante um período de reação de 7, 14, 21 e 28 dias a 32°C sob modo estático em estufa em 32°C.

A água evaporada foi repostada semanalmente, através da diferença do peso inicial menos o final de cada frasco Erlenmeyer com o solo. Dessa maneira os Erlenmeyer com as reações foram pesados um a um em uma balança analítica dentro da Câmara de Segurança Biológica com fluxo laminar e foi acrescentado a água destilada estéril ( $\pm 2$  mL) para a manutenção da umidade do solo de modo a propiciar o crescimento dos microrganismos e tornar possível as reações.

- Experimento em solo (*ex situ*) com o fungo QOB-F02

Para a realização das reações com o fungo (QOB-F02), esse primeiramente foi cultivado em meio Agar e Extrato de Malte (2%). Posteriormente, pesou-se 30 g da amostra

do solo que foi submetida ao tratamento térmico em autoclave (121°C, 1,5 kPa, 20 min). Em seguida, adicionou-se 8 mL de água destilada estéril, homogeneizou-se a amostra e inoculou-se o fungo através da transferência de cinco fragmentos do micélio fúngico (0,5 cm de diâmetro cada). Por fim, adicionou-se em 0,402  $\mu\text{L}$  do pesticida esfenvalerato. As reações foram realizadas em triplicatas.

- Experimento em solo (*ex situ*) com consórcio bacteriano

Para a realização das reações com consórcio bacteriano, (QOB-B01, QOB-B02, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15) as bactérias foram primeiramente cultivadas separadamente em meio Agar Nutriente. Posteriormente, pesou-se 30 g da amostra do solo que foi submetida ao tratamento térmico em autoclave (121°C, 1,5 kPa, 20 min). Em seguida, adicionou-se 1 mL da suspensão bacteriana de cada isolado bacteriano para compor o consórcio bacteriano, resultando em um volume total de 7 mL de água.

Dessa maneira, foi adicionado apenas 1 mL da água destilada estéril, resultando nos 8 mL de água utilizada nas reações. A densidade óptica foi estimada no espectrofotômetro UV-*vis* (DO=0.9) cujo comprimento de onda foi de 610 nm. Por fim, adicionou-se em 0,402  $\mu\text{L}$  do pesticida esfenvalerato. As reações foram realizadas em triplicatas.

- Experimento em solo (*ex situ*) com o microbioma

O microbioma foi realizado para investigar a degradação do pesticida esfenvalerato empregando os próprios microrganismos (desconhecidos) da amostra do solo. Para isso, pesou-se 30 g do solo, adicionou-se 8 mL de água destilada estéril, homogeneizou-se e adicionou-se em seguida 0,402  $\mu\text{L}$  do pesticida esfenvalerato. As reações foram realizadas em triplicatas.

- Experimento em solo (*ex situ*) com o controle abiótico

Para a realização do controle abiótico pesou-se 30 g da amostra do solo que foi submetida ao tratamento térmico em autoclave (121°C, 1,5 kPa, 20 min). Posteriormente, adicionou-se 8 mL de água destilada estéril, homogeneizou-se e adicionou-se em seguida 0,402  $\mu\text{L}$  do pesticida esfenvalerato. As reações foram realizadas em triplicatas.

#### 4.10.3 Extração dos metabólitos do pesticida esfenvalerato em solo

Posteriormente aos respectivos dias de incubação dos experimentos (7, 14, 21 e 28 dias) foi realizada a extração dos metabólitos das reações.

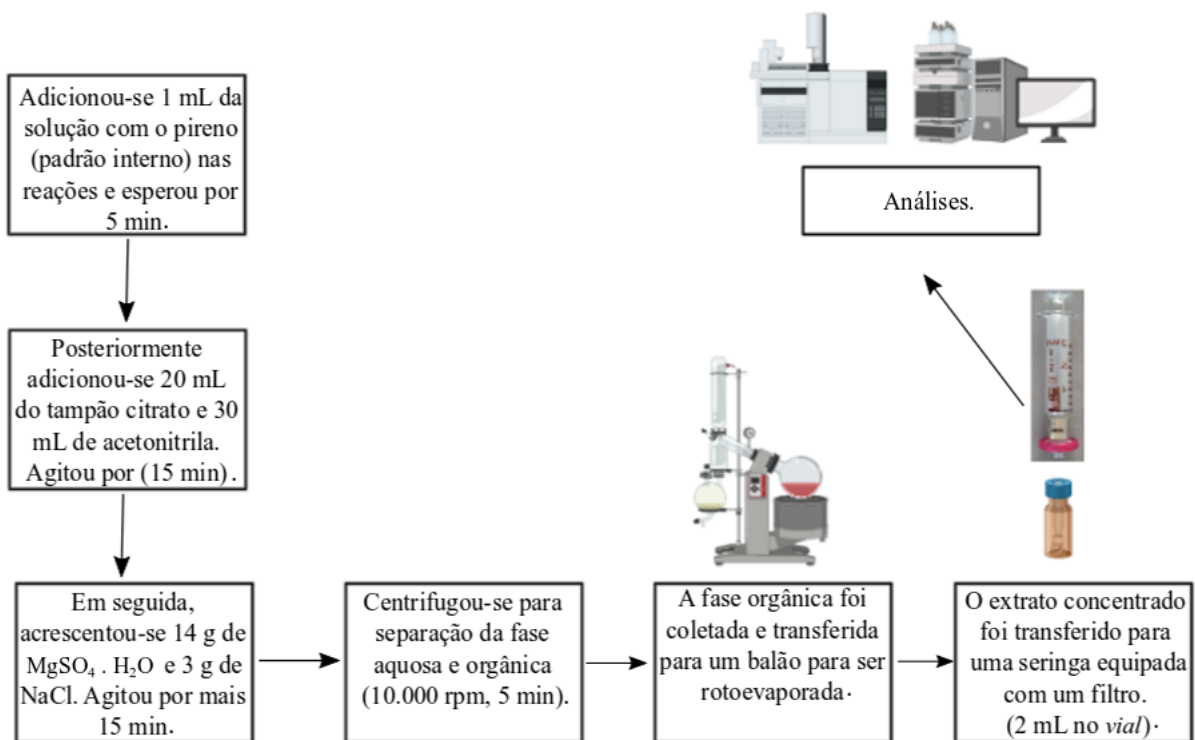
Para isso foi dissolvido 30 mg de pireno (padrão interno) em um balão volumétrico de 25 mL em acetonitrila. No qual foi adicionado 1 mL em cada amostra de solo, esperou-se 5 minutos.

Posteriormente foi adicionado 20 mL da solução com o tampão citrato (0,1 M), pH=5.0 e 30 mL de acetonitrila. Agitou a reação por 15 minutos (sob agitação magnética).

Foi acrescentado 14 g de sulfato de magnésio mono-hidratado e 3 g de NaCl e agitou-se por mais 15 minutos.

Em seguida, foi levado a centrifuga por 5 minutos por 10.000 rpm para a separação das fases aquosa e orgânica. Na fase orgânica (fase superior) foi coletada os *pellets* a qual foi transferida para um balão de fundo redondo e levado para roto-evaporação até restar aproximadamente 5 mL da fase orgânica no balão. Ao final a amostra foi transferida para uma seringa de vidro (*Arti Glass*) de 3 mL equipada com um filtro de seringa de polivinilideno- PVDF, hidrofóbico, com um filtro de 13mm de diâmetro, e um poro de  $0,45\mu\text{m}$  diâmetro (LAC). Foi coletado 2 mL no vial dessa amostra filtrada e levou-se para análise (Figura 24).

Figura 24 – Etapas do processo de extração dos metabólitos de biotransformação do esfenvalerato para os estudos de biorremediação *ex situ*.



#### 4.11 Curva analítica obtida para a quantificação do pireno, do esfenvalerato e dos seus principais produtos de degradação em solo

A curva de calibração realizada para a validação do método e para a análise da concentração residual do pesticida esfenvalerato das reações realizadas em solo, foi uma curva de padrão interno em que foi adicionada quantidades conhecidas e crescentes do pesticida esfenvalerato e do pireno tanto nas amostras quanto nos padrões (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

O pireno foi utilizado como um padrão interno a fim de minimizar possíveis erros analíticos reduzindo as variações no sinal do analito.

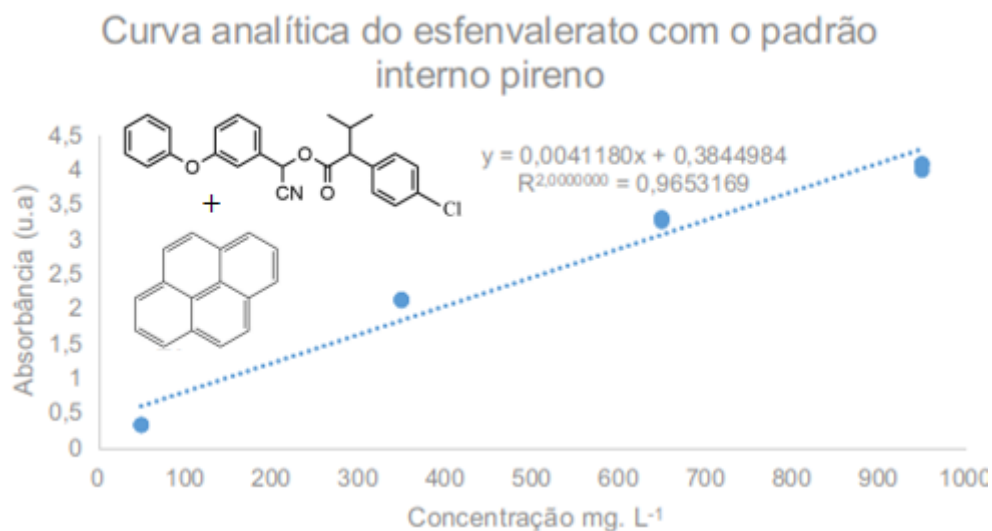
Dessa maneira, a curva padrão foi realizada através da razão entre a área do sinal (pico) do analito (esfenvalerato) e do padrão interno (pireno) de acordo com as diferentes concentrações analisadas (50, 350, 650, 950 e 1200  $mg.L^{-1}$ ).

O pireno foi escolhido como padrão interno por ser uma molécula estável, apolar, de difícil degradação e que não influenciou na transformação do pesticida esfenvalerato, uma vez que foi adicionado na etapa final da extração e o seu tempo de retenção era próximo do tempo de retenção do analito (RIBANI *et al.*, 2004).

O pesticida esfenvalerato (92% de pureza) e o pireno foram eluídos com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água Milli-Q (Solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (Solvente B).

Foi utilizada a detecção ultravioleta em 215 nm. As soluções padrões foram preparadas em concentrações de 50, 350, 650, 950 e 1200  $mg.L^{-1}$  de esfenvalerato dissolvido em acetonitrila de grau CLAE. Através da curva obteve-se a equação linear da reta  $c = 0,0041180x + 0,384$ , como pode ser observado na Figura 25.

Figura 25 – Curva analítica obtida para o pesticida esfenvalerato com o padrão interno pireno.



As curvas de calibração realizadas para a validação do método para a análise da concentração residual dos principais produtos de degradação do pesticida esfenvalerato o álcool 3-fenoxibenzílico (PBA) e o ácido 3-fenoxibenzoico (PBAc) foi uma curva de padrão interno em que foi adicionada quantidades conhecidas e crescentes do pesticida esfenvalerato e do pireno tanto nas amostras quanto nos padrões.

O ácido 3-fenoxibenzoico (PBAc), (98% de pureza) e o pireno foram eluídos com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água Milli-Q (Solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (Solvente B). Foi utilizada a detecção ultravioleta em 215 nm. As soluções padrões foram preparadas em concentrações de 30, 150, 270, 390 e 510  $mg.L^{-1}$  de (PBA) dissolvido em acetonitrila de grau CLAE. Através da curva obteve-se a equação linear da reta  $c = 0,0092479x + 0,2734202$ , como pode ser observado na Figura 26.

Figura 26 – Curva analítica obtida para a quantificação do ácido 3-fenoxibenzoico (PBAC).

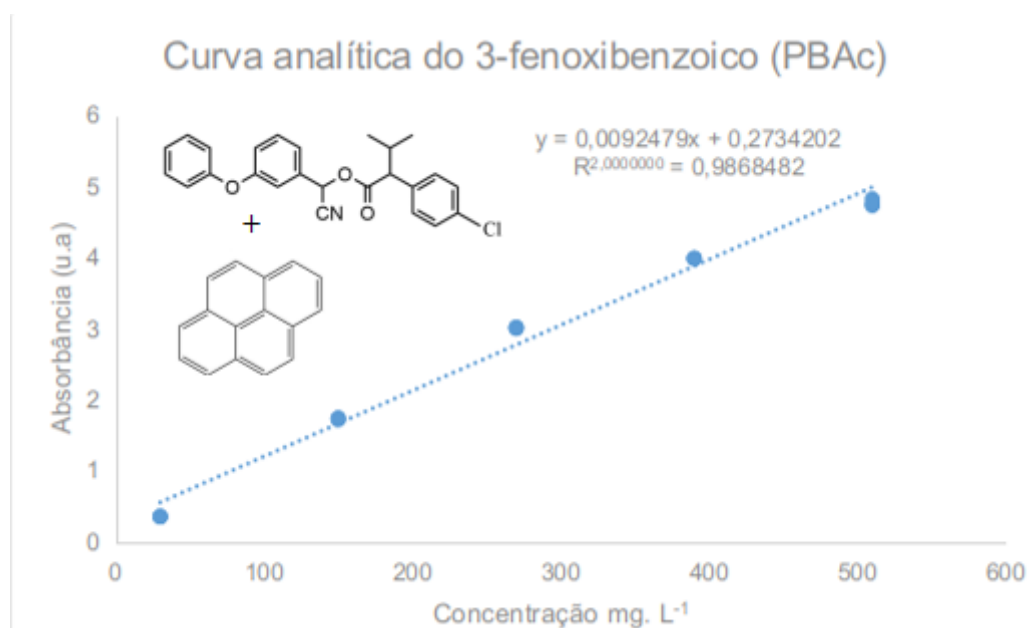
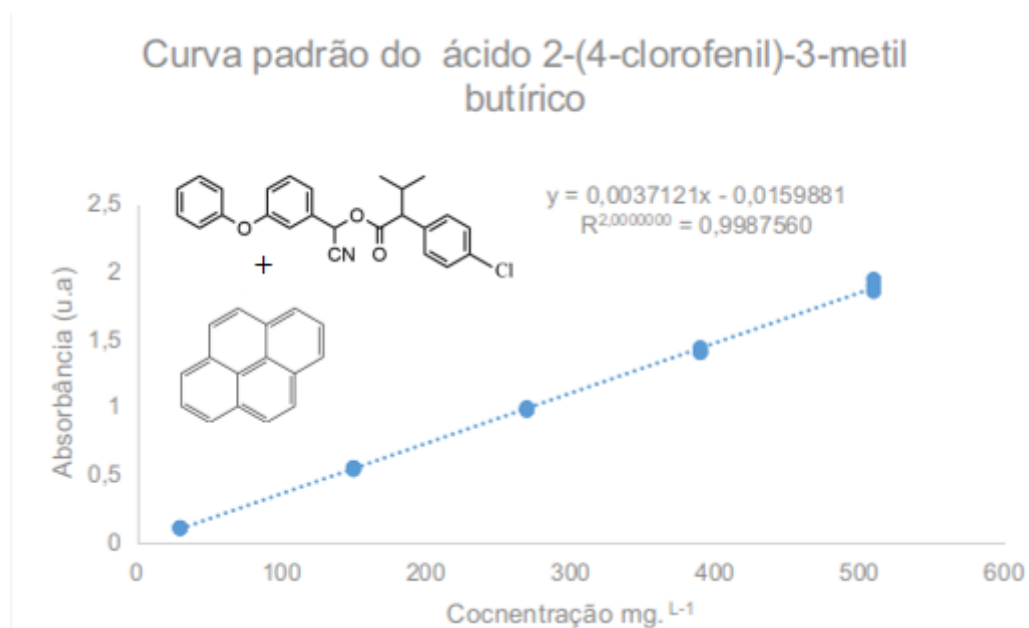


Figura 27 – Curva analítica obtida para a quantificação do ácido 2-(4-clorofenil)-3-metil butílico (CLAc).



O ácido 2-(4-clorofenil)-3-metil butílico (CLAc), (96% de pureza) e o pireno foram eluídos com uma mistura de 0,1% de ácido fórmico em água Milli-Q (Solvente A) e 0,1% de ácido fórmico em acetonitrila (Solvente B). Foi utilizada a detecção ultravioleta em 215 nm. As soluções padrões foram preparadas em concentrações de 30, 150, 270, 390 e 510  $mg.L^{-1}$  de (PBAC) dissolvido em acetonitrila de grau CLAE. Através da curva obteve-se a equação linear da reta  $c = 0,0037121x - 0,0159881$  como pode ser observado na Figura 27.



## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os fungos e as bactérias após serem isolados do solo em meio Agar Batata Dextrose (BDA) na presença de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de esfenvalerato foram transferidos para um novo meio de cultivo o Malte 2% ou o Caldo Nutriente, respectivamente. Dessa maneira, os microrganismos foram purificados, identificados e investigados quanto ao seu potencial de biodegradação.

Após os microrganismos serem isolados e purificados, estes foram identificados (dados prévios ainda não confirmados) pela técnica Matrix Associated Laser Desorption-Ionization– Time of Flight MALDI-TOF/MS pela professora Dra. Suzan Pantaroto de Vasconcellos, do Departamento de Ciências Farmacêuticas do Laboratório Multidisciplinar em Saúde e Meio Ambiente da Unifesp- Campus de Diadema em São Paulo- SP.

### 5.1 Bactérias

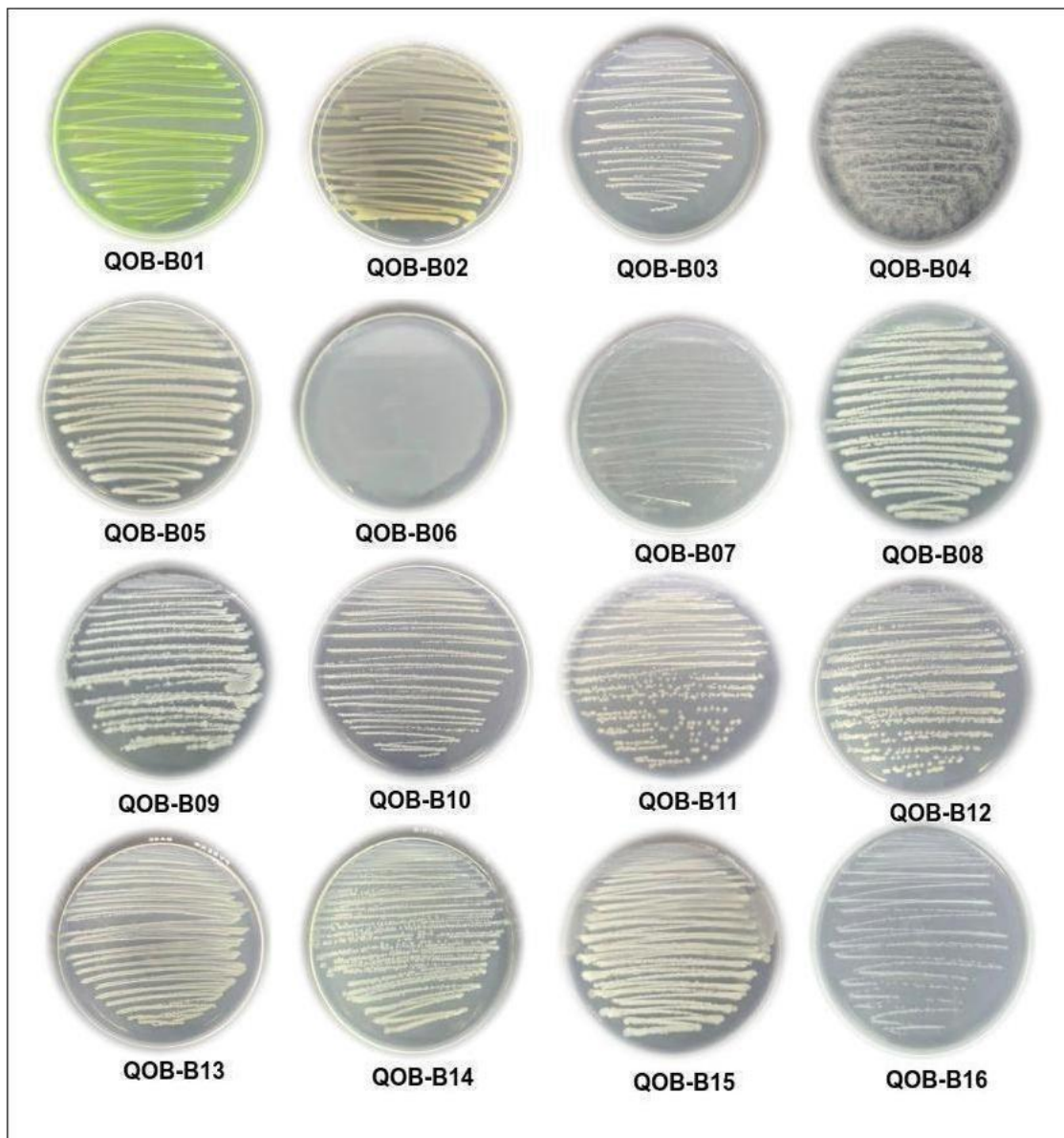
#### 5.1.1 Linhagens bacterianas isoladas do solo e os seus códigos de identificação

Foram isoladas do solo 16 linhagens bacterianas que cresceram inicialmente na presença de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  do pesticida esfenvalerato (Figura 28).

Os códigos dos isolados foram dados a partir das iniciais do laboratório onde QOB refere-se à Química Orgânica e Biocatálise, seguido de uma numeração para a identificação das bactérias.

Como pode ser observado todas as colônias nas placas apresentaram um aspecto uniforme demonstrando que foram isoladas nas formas puras, podendo ser confirmado também pela coloração de Gram (Figura 29).

Figura 28 – Colônias das bactérias puras isoladas do solo e cultivadas (24- 48 horas) em meio de cultura Agar Nutriente na ausência do pesticida esfenvalerato.

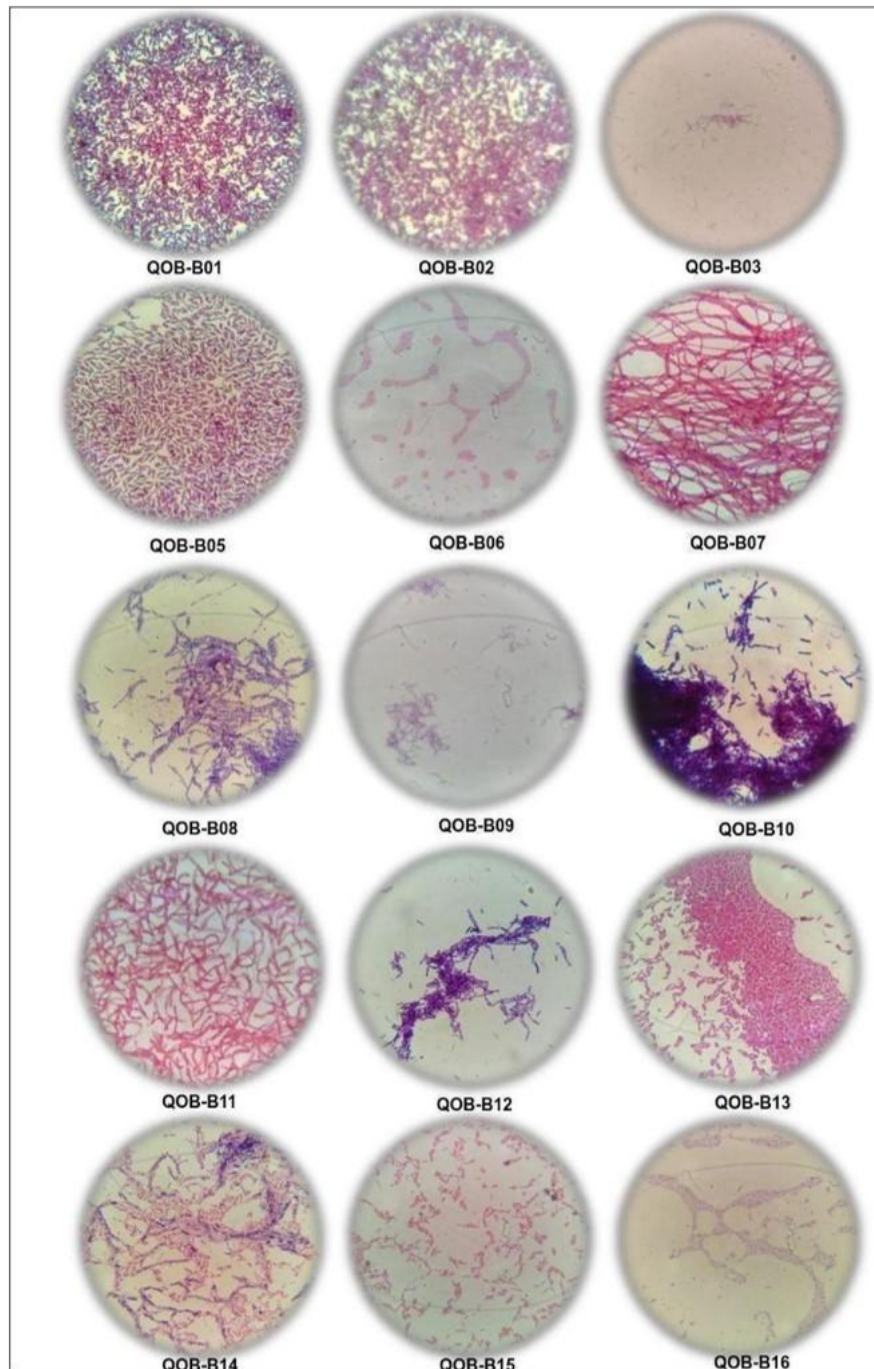


Fonte: Autoria própria.

### 5.1.2 Método de Gram para a confirmação dos isolados bacterianos

Dentre as 16 bactérias isoladas, exceto a bactéria filamentosa QOB-B04, foram coradas pelo método da coloração de Gram para confirmar a purificação, como pode ser observado na Figura 29. Para os ensaios de Gram as bactérias foram cultivadas na ausência do pesticida esfenvalerato.

Figura 29 – Método de Gram realizado para a diferenciação das bactérias isoladas do solo.



Fonte: Autoria própria.

Na Tabela 4 é possível observar que a maioria das bactérias isoladas do solo foram do tipo bacilos contendo 1-2 células agrupadas denominadas de diplobacilos. Também foi observado as formas tanto dos cocos quanto dos bacilos em cadeia, sendo, denominados estreptococos ou estreptobacilos, respectivamente (MADIGAN, 2016). Cerca de 38% foram do tipo Gram negativas, enquanto 63% foram Gram positivas.

A ocorrência das bactérias do tipo gram negativas ainda são pouco estudadas e compreendem cerca de 7% da população bacteriana do solo. Isso pode justificar o motivo pelo qual a maioria dos isolados bacterianos foram do tipo gram positivo (SILVA, 2005).

A diversidade microbiana do solo pode sofrer influência das características dos próprios microrganismos que o compõem, como o tempo de duplicação, a capacidade de mutação, os mecanismos enzimáticos, mas também sofrem influência dos fatores externos como a temperatura, o teor de umidade, disponibilidade de energia e de inibidores naturais, por isso a sua composição pode estar sempre mudando (MICHEREFF SAMI J.; ANDRADE, 2005).

Sabe-se ainda que as bactérias esporulantes como alguns representantes dos bastonetes gram positivos e dos cocos são capazes de resistir melhores às condições adversas e estressantes do meio como a dessecação, mudança de pH, mudança na umidade, entre outros fatores, e que os representantes do gênero *Bacillus* conseguem absorver melhor os nutrientes em soluções menos concentradas devido a sua maior área superficial, por isso ambos são comumente encontrados no solo (MADIGAN, 2016; MICHEREFF SAMI J.; ANDRADE, 2005).

Tabela 4 – Resultados do método de Gram, as formas e os números de células das bactérias isoladas do solo.

Código dos isolados	Tipo da coloração	Forma das células/ número
QOB-B01	Gram positivo	Bacilos (1-2)
QOB-B02	Gram positivo	Bacilos (1-2)
QOB-B03	Gram positivo	Bacilos (1-2)
QOB-B05	Gram negativo	Bacilos (1-2)
QOB-B06	Gram negativo	Cocos (cadeia)
QOB-B07	Gram negativo	Bacilos (cadeia)
QOB-B08	Gram positivo	Bacilos (cadeia)
QOB-B09	Gram positivo	Bacilos (1-2)
QOB-B10	Gram positivo	Bacilos (cadeia)
QOB-B11	Gram negativo	Bacilos (cadeia)
QOB-B12	Gram positivo	Bacilos (cadeia)
QOB-B13	Gram negativo	Bacilos (1-2)
QOB-B14	Gram positivo	Bacilos (cadeia)
QOB-B15	Gram negativo	Bacilos (1-2)
QOB-B16	Gram positivo	Cocos (cadeia)

\* A bactéria (QOB-B04) não foi corada pelo método utilizado.

## 5.2 Resultados preliminares da identificação dos isolados bacterianos por MALDI-TOF

Os resultados preliminares da identificação das bactérias isoladas do solo sugerem que houve uma maior ocorrência de *Bacillus* sp., seguido de *Lysinibacillus* sp. e *Cupriavidus* sp. Dentre os 16 isolados bacterianos foi possível identificar 10 isolados bacterianos por MALDI-TOF/MS.

Os resultados obtidos por MALDI-TOF/MS permitiu fazer as caracterizações em nível de gênero, de acordo com o Bruker Daltonik MALDI Biotyper Software.

As análises foram realizadas de acordo com protocolo descrito por (SEYFARTH *et al.*, 2008). Partindo-se de uma placa de Petri inoculada pela cultura em agar, procedeu-se a transferência de parte de uma colônia (aproximadamente 50  $\mu$ g) de cada um dos isolados, em triplicata, para *spots* da placa de 48 poços, específica do equipamento, juntamente com 2  $\mu$ L de solução matriz (75 mg / mL, 2,5 ácido diidroxibenzoico em etanol / água / acetonitrila [1:1:1] com 0,03% de ácido trifluoroacético). Esta matriz foi sobreposta ao esfregão da célula e após a secagem do material em temperatura ambiente, a análise foi iniciada através da emissão de feixes de laser sobre cada um dos *spots*. As proteínas ribossomais de linhagens de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  foram utilizadas para a calibração interna, uma vez que as mesmas já possuem seus valores de massas conhecidos. A faixa de  $m/z$  2.000 a 20.000 Daltons foi determinada utilizando um modo linear. O espectrômetro de massas foi operado em modo linear com atraso de 104 ns a uma voltagem de 20 kV. Os espectros finais foram gerados somando-se 20 disparos de laser por perfil e 50 perfis produzidos por amostras, levando a um total de até 10.800 disparos de laser por espectro. As listas de picos resultantes foram exportadas para o software Maldi Biotyper 1.1<sup>TM</sup> (Bruker Daltonics, Alemanha) (FARON *et al.*, 2015). Através do programa Biotyper<sup>TM</sup>, as listas com os picos das amostras foram comparadas com seu banco de dados.

Dessa maneira, as bactérias QOB-B04, QOB-B13 e QOB-B14 foram identificadas como sendo *Bacillus* sp., enquanto os isolados QOB-B05, QOB-B07 e QOB-B11 como *Bacillus thuringiensis*, QOB-B16 como *Bacillus cereus*, QOB-B03 e QOB-B08 como *Lysinibacillus* sp. e o isolado QOB-B09 foi identificado como o *Cupriavidus* sp. O motivo pelo qual o *Bacillus* sp. foi o gênero mais comumente encontrado é devido ao fato de que esse grupo é amplamente distribuído nos diferentes tipos de ambientes, sendo o solo um deles (CARO-ASTORGA *et al.*, 2020).

Algumas bactérias do gênero *Bacillus* são benéficas e atuam como promotoras de crescimento em plantas, como agente de biocontrole e como probiótico. Em contrapartida, outras podem apresentar malefícios e serem responsáveis por intoxicação alimentar em humanos devido a sua enterotoxina capaz de causar graves infecções, também podem ocasionar a corrosão de materiais, a formação de biofilmes devido a adesão microbiana

(CARO-ASTORGA *et al.*, 2020). Essas bactérias também são produtoras de biossurfactantes, assim como o *Lysinibacillus* sp. (ALMEIDA *et al.*, 2020).

Outras bactérias que também apareceram colonizando as amostras do solo foram *Bacillus thuringiensis* e *Lysinibacillus* sp. que são comumente empregadas na biotecnologia devido a sua importância na agricultura como agentes de biocontrole sendo importante para a produção dos biopesticidas (POHARE; WAGH; UDAYASURIYAN, 2020; YANG *et al.*, 2012).

A bactéria *Cupriavidus* sp. tem se destacado biotecnologicamente por sua importância na capacidade de produzir naturalmente um biopolímero o poli-3-hidroxi-butilato (PHB), (PANICH; FONG; SINGER, 2021; NYGAARD *et al.*, 2021). As bactérias desse gênero também estão relacionadas com a capacidade de fixação de nitrogênio atmosférico e são denominadas como diazotróficas, importantes para a promoção do crescimento de plantas. Além disso, também são capazes de tolerar altas concentrações de metais pesados como por exemplo o cádmio (Cd) e o cobre (Cu), (VICENTIN, 2016).

### 5.3 **Screening dos isolados bacterianos para a aplicação nos experimentos de degradação**

Após o isolamento dos microrganismos foi realizado um *screening* com os 16 isolados para selecionar quais bactérias seriam utilizadas nos experimentos de biodegradação do esfenvalerato. Esse resultado pode ser observado na Tabela 5 onde foram empregados 100  $mg.L^{-1}$  do pesticida esfenvalerato.

Dessa maneira, algumas bactérias já foram previamente identificadas por MALDI-TOF/MS como sendo *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Bacillus* sp. (QOB-B04), *Bacillus thuringiensis* (QOB-B05), *Bacillus thuringiensis* (QOB-B07), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp., QOB-B09, *Bacillus thuringiensis* (QOB-B11), *Bacillus* sp. (QOB-B13), *Bacillus* sp. (QOB-B14) e *Bacillus cereus* (QOB-B16), (Tabela 5).

Tabela 5 – Resultados da biodegradação do pesticida esfenvalerato obtidos no processamento da etapa do *screening* com as bactérias isoladas do solo (32°C, 130 rpm, 5 dias) na presença de 100 mg.L<sup>-1</sup> de esfenvalerato.

Identificação das bactérias	Código dos isolados	*Concentração residual (%)
Não identificado	<b>QOB-B01</b>	99
Não identificado	<b>QOB-B02</b>	93
<i>Lysinibacillus</i> sp.	<b>QOB-B03</b>	17
<i>Bacillus</i> sp.	QOB-B04	76
<i>Bacillus thuringiensis</i>	QOB-B05	60
Não identificado	QOB-B06	90
<i>Bacillus thuringiensis</i>	QOB-B07	80
<i>Lysinibacillus</i> sp.	<b>QOB-B08</b>	54
<i>Cupriavidus</i> sp.	<b>QOB-B09</b>	9
Não identificado	<b>QOB-B10</b>	94
<i>Bacillus thuringiensis</i>	QOB-B11	80
Não identificado	QOB-B12	40
<i>Bacillus</i> sp.	QOB-B13	90
<i>Bacillus</i> sp.	<b>QOB-B14</b>	22
Não identificado	<b>QOB-B15</b>	26
<i>Bacillus cereus</i>	QOB-B16	44

\*A concentração residual do pesticida esfenvalerato foi determinada em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE-UV).

Sendo assim foram selecionados os isolados bacterianos o QOB-B01, o QOB-B02, o *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), o *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), o *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), o QOB-B10, o *Bacillus* sp. (QOB-B14) e o QOB-B15 para serem utilizadas nos experimentos de biodegradação. Dentro dessa seleção as quatro cepas que apresentaram o melhor potencial de biodegradação foram o *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), o *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), o *Bacillus* sp. (QOB-B14) e o QOB-B15 e os quatro isolados que não apresentaram um bom desempenho foram o QOB-B01, o QOB-B02, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08) e o QOB-B10.

As quatro bactérias selecionadas que não apresentaram um bom desempenho na degradação do pesticida esfenvalerato também foram empregadas junto com aquelas que melhor degradaram o pesticida no consórcio bacteriano.

De acordo com Pinhati *et al.* (2014) as variações dos resultados nos estudos de biodegradação podem estar ligadas a três principais fatores como o *background* genético das diferentes linhagens, o tempo de aclimação e as condições de incubação. Como as condições de incubação foram iguais para todas as cepas bacterianas nos experimentos

é possível que a variabilidade genotípica dessas bactérias e o período de aclimação de cada uma dessas linhagens sejam os principais fatores que estejam relacionados com as diferentes respostas de biodegradação do pesticida esfenvalerato observado no *screening* (Tabela 5).

As diferentes porcentagens de concentração residual observadas na Tabela 5, mostram que nem sempre uma concentração considerada tóxica para um microrganismo será tóxica para o outro e esse efeito também pode variar de acordo com o composto estudado (MORETTO, 2016). De acordo com PELCZAR, REID e CHAN (1996) alguns microrganismos podem desenvolver uma seletividade aos agrotóxicos que os conferem tolerância a esses compostos. Sendo assim, não são todos os microrganismos que conseguem sobreviver a toxicidade do meio seja por não ter uma rota metabólica específica para a degradação de fontes complexas ou mesmo por serem incapazes de contornar a sua via metabólica usual.

Além disso, os microrganismos podem apresentar outros mecanismos de tolerância ao pesticida através da modificação estrutural de nucleoproteínas ribossômicas, da alteração na membrana citoplasmática impedindo o agrotóxico de adentrar por sua célula, da inibição competitiva que pode ocorrer entre um metabólito essencial e um semelhante (pesticida), dentre outros (PELCZAR; REID; CHAN, 1996; COOK, 1985).

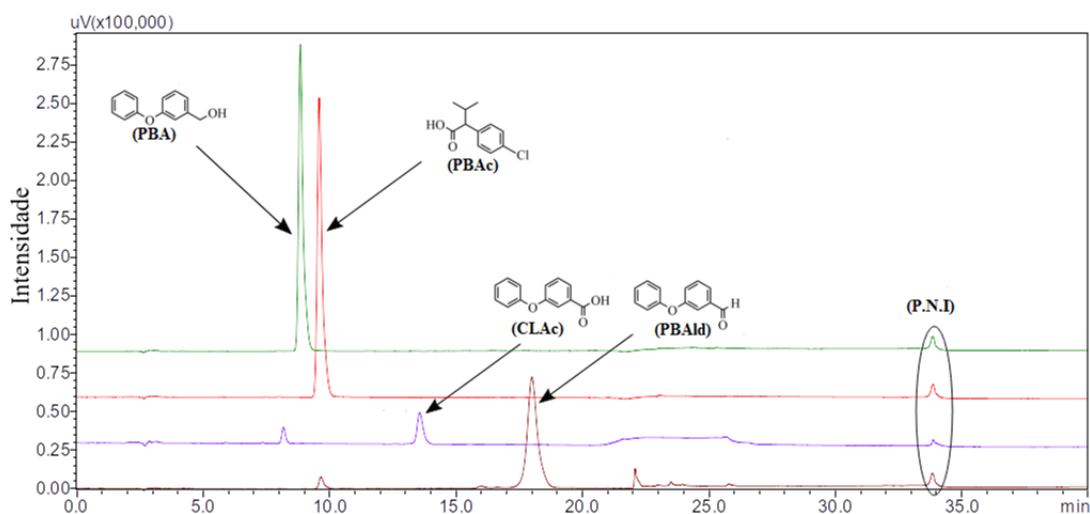
Conseqüentemente, são inúmeros os mecanismos pelos quais um microrganismo pode adotar como resposta a uma eventual presença de um agente antimicrobiano o que pode resultar em diferentes taxas de degradação do respectivo composto.

#### **5.4 Biodegradação do pesticida esfenvalerato pelas bactérias em meio de caldo nutriente**

A quebra da molécula do pesticida esfenvalerato em decorrência das reações de biodegradação realizadas em meio líquido Caldo Nutriente com as bactérias isoladas do solo, resultou em 4 principais produtos de degradação o PBA, o PBAC, o CLAC e o PBAld. O tempo de retenção dos metabólitos do esfenvalerato (PBA, PBAC, CLAC e PBAld) foi de aproximadamente 8,66 min, 9,48 min, 13 min e 17,70 min, respectivamente. Já o esfenvalerato apresentou um tempo de retenção de 25 min (Figura 30).



Figura 30 – Cromatogramas (padrões) obtidos por HPLC dos principais metabólitos identificados como produtos resultantes da degradação do pesticida esfenvalerato.



álcool 3-fenoxibenzílico (PBA); ácido 3-fenoxibenzoico (PBAC); ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutírico (CLAc) e 3-fenoxibenzaldeído (PBALd). P.N.I= Produto não identificado.

Foi observado um produto que não foi identificado em  $t_R = 34$  min, essa molécula apareceu em todas as reações com o pesticida esfenvalerato e nas reações que foram injetadas os padrões dos seus produtos de degradação (PBA, PBAC, CLAc e PBALd), indicando assim ser algum contaminante presente nos compostos, uma vez que eles não possuem 100% de pureza (Figura 30).

#### 5.4.1 Biodegradação empregando os quatro melhores isolados bacterianos

Quatro isolados bacterianos previamente selecionados foram avaliados quanto ao potencial de degradação de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  do pesticida esfenvalerato ( $32^\circ\text{C}$ , 130 rpm, 5 dias), dentre eles o *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), o *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), o *Bacillus* sp. (QOB-B14) e o QOB-B15 que degradaram em média 59%, 86%, 60% e 72%, respectivamente da concentração inicial do pesticida.

A média da concentração residual do pesticida esfenvalerato e o desvio padrão para cada um dos isolados bacterianos o *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), o *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), o *Bacillus* sp. (QOB-B14) e o QOB-B15, foram de  $(41,47 \pm 11,83)$ ,  $(14,73 \pm 4,05)$ ,  $(40,47 \pm 8,97)$  e  $(27,80 \pm 10,82)$ , respectivamente (Tabela 6).

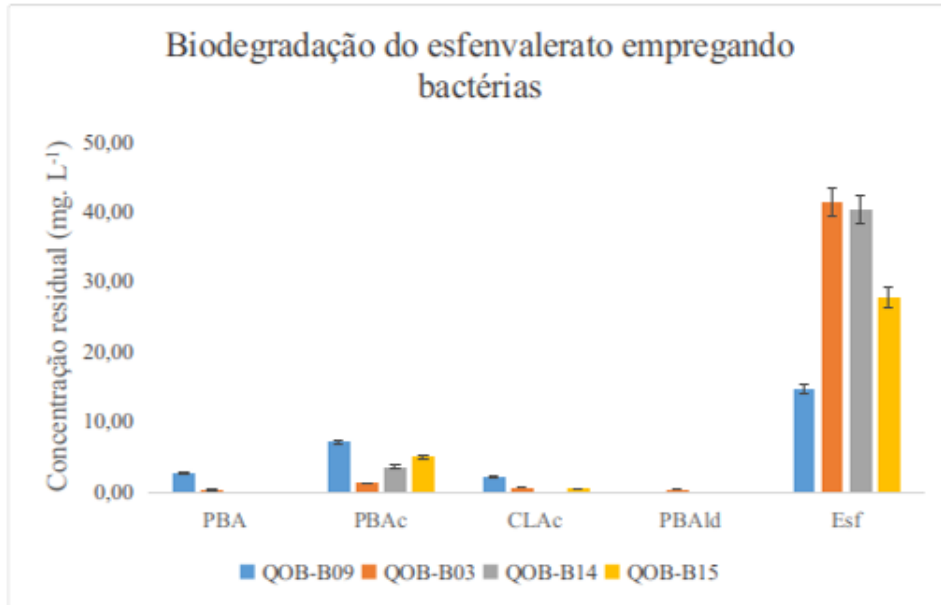
Tabela 6 – Concentração residual de esfenvalerato ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) para as reações com os quatro melhores isolados bacterianos e os seus controles em agitação orbital ( $32^\circ\text{C}$ , 130 rpm, 5 dias).

Composto	QOB-B03	QOB-B09	QOB-B14	QOB-B15	c. abiótico	c. recuperação
PBA	$0,26 \pm 0,07$	$2,75 \pm 2,38$	Nd	Nd	$0,06 \pm 0,48$	$0,36 \pm 0,03$
PBAc	$1,21 \pm 0,40$	$7,13 \pm 1,26$	$3,61 \pm 3,92$	$5,05 \pm 4,17$	$0,28 \pm 0,20$	Nd
CLAc	$0,59 \pm 0,34$	$2,07 \pm 3,59$	Nd	$0,48 \pm 0,27$	Nd	Nd
PBAld	$0,07 \pm 0,04$	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Esfenvalerato	$41,47 \pm 11,83$	$14,73 \pm 4,05$	$40,47 \pm 8,97$	$27,80 \pm 10,82$	$84,27 \pm 2,73$	$94,48 \pm 5,68$

Nd=não detectado. c. =controle.

Foi possível observar que todos os isolados degradou o pesticida até os seus principais produtos de degradação o álcool 3-fenoxibenzílico (PBA), o ácido 3-fenoxibenzoico (PBAc), o ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutírico (CLAc) e que o isolado *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), conseguiu degradar até o 3-fenoxibenzaldeído (PBAld) o que pode ser interessante uma vez que os primeiros metabólitos de degradação podem ser tóxicos (Figuras 31 e 33).

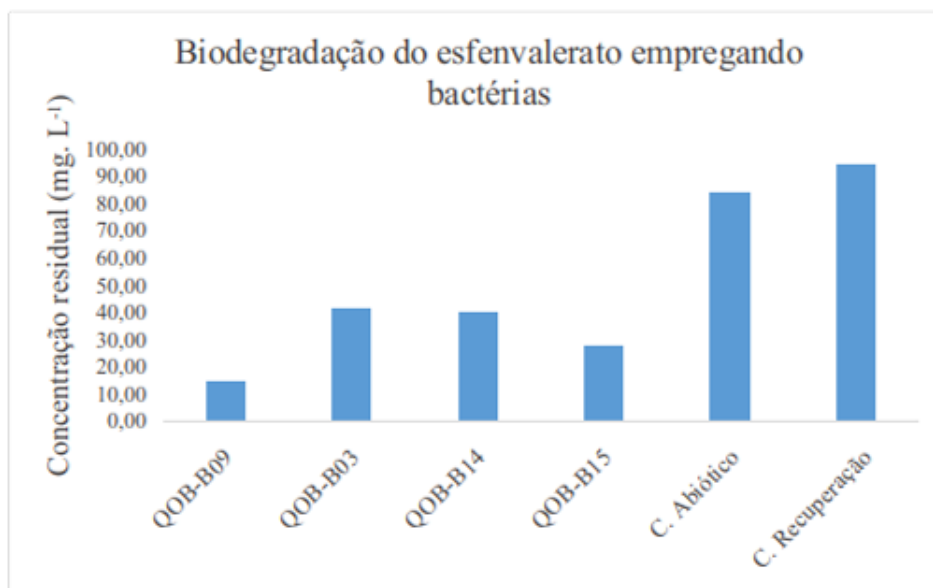
Figura 31 – Análises da concentração residual das reações com os quatro melhores isolados bacterianos em  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de esfenvalerato e seus principais metabólitos de degradação.



Bactérias: *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), o *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15. Condições da reação: As reações foram realizadas em meio líquido de Caldo Nutriente ( $32^{\circ}\text{C}$ , 130 rpm, 5 dias) na presença de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de esfenvalerato.

Foi observado que as reações realizadas na presença das células bacterianas vivas foram eficientes na degradação do pesticida esfenvalerato quando se comparado aos controles sem bactérias (abiótico) e com as células bacterianas não-vivas (recuperação). A concentração residual dos controles abiótico e de recuperação foram em média de 84% e 94% do pesticida esfenvalerato, respectivamente (Figura 32). Adicionalmente, também foi realizado um controle de células mortas cuja a concentração residual foi de 74%. Dessa maneira as reações empregando as bactérias acelerou a biodegradação do pesticida esfenvalerato em meio líquido Caldo Nutriente.

Figura 32 – Análises da concentração residual das reações com os quatro melhores isolados bacterianos em  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de esfenvalerato e controles abiótico e de recuperação.



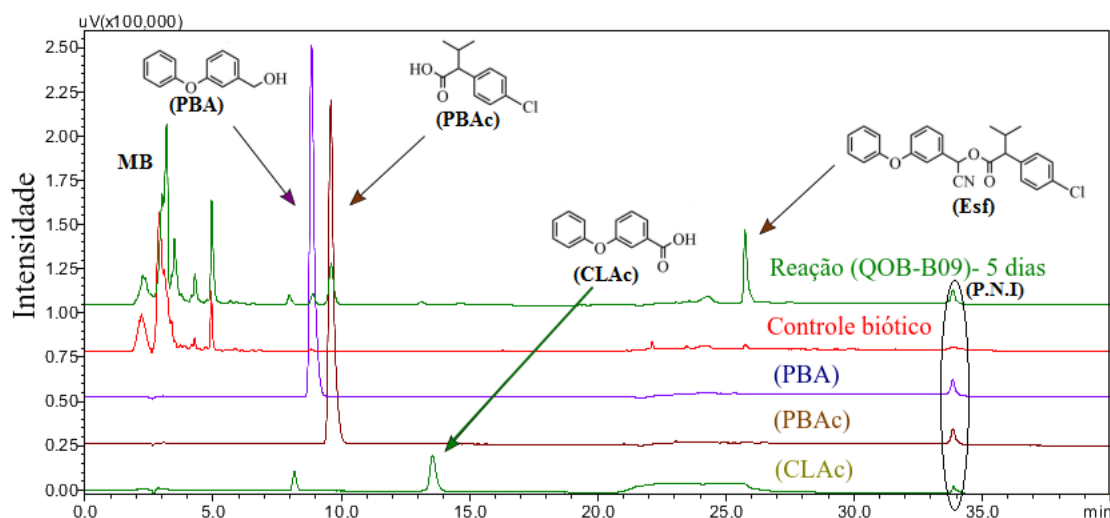
*Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), o *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15. C.= controle. As reações foram realizadas em meio líquido de Caldo Nutriente (32°C, 130 rpm) na presença de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de esfenvalerato.

Na Figura 33 é possível observar a reação obtida para o melhor isolado bacteriano *Cupriavidus* sp. (QOB-B09) que degradou em média 85% do pesticida esfenvalerato ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) nas condições de 32°C, 130 rpm, 5 dias. Seguido do seu controle biótico representado pela linha de base em coloração vermelha e dos três produtos de degradação do pesticida esfenvalerato que foram observados nessa reação PBA ( $t_R = 8,66 \text{ min}$ ), PBAc ( $t_R = 9,48 \text{ min}$ ) e CLAc ( $t_R = 13 \text{ min}$ ).

Também é possível observar os metabólitos bacterianos (MB) que apareceram tanto nas reações quanto no controle biótico (sem adição do esfenvalerato) nos intervalos entre 1 e 5 minutos da reação (Figura 33).

Na reação com a bactéria *Cupriavidus* sp. (QOB-B09) em  $t_R = 25 \text{ min}$  é possível observar o esfenvalerato. Em  $t_R = 34 \text{ minutos}$  foi possível observar um produto que não foi identificado (Figura 33).

Figura 33 – Cromatogramas (reação/padrão/controle) obtidos por HPLC para a bactéria *Cupriavidus* sp. QOB-B09.



Condições da reação: As reações foram realizadas em meio líquido de Caldo Nutriente (32°C, 130 rpm, 5 dias) na presença de 100  $mg.L^{-1}$  de esfenvalerato.

Foi realizada uma análise de variância para saber se houve diferenças estatisticamente significativas entre as médias da concentração residual do pesticida esfenvalerato para os quatro isolados bacterianos: o *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), o *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), o *Bacillus* sp. (QOB-B14) e o QOB-B15. Essa análise estatística foi importante para poder estimar em um intervalo de 95% de confiança qual o tratamento está degradando mais ou menos o pesticida esfenvalerato.

Adicionalmente, na análise de variância (ANOVA)(BUSSAB W. O.; MORETTIN, 2002) aplicada, na hipótese nula ( $H_0$ ) tomou-se como pressuposto que todas as médias das concentrações residuais das reações envolvendo as bactérias eram iguais entre si, e na hipótese alternativa ( $H_1$ ), assumiu-se que pelo menos um par de médias dentre esses dados eram diferentes entre si. Com base nessas premissas e nos dados do experimento, a hipótese  $H_0$  foi rejeitada com o  $p$ -valor (BUSSAB W. O.; MORETTIN, 2002) igual a 0,0260, em um nível de significância estatística de 5%. Implicando assim que, ao menos um par de médias no experimento difere-se entre si.

Em termos técnicos, o fato de  $H_0$  ter sido rejeitado reforça a hipótese de que existem bactérias entre os diferentes grupos que degradam mais ou menos do que outras o pesticida esfenvalerato.

Adicionalmente, como a hipótese  $H_0$  foi rejeitada, foi possível realizar um teste de comparações múltiplas (Teste de Tukey (BUSSAB W. O.; MORETTIN, 2002)) para saber quais pares de médias que estavam diferindo entre si. O teste se baseia em comparar a

diferença entre as médias com o cálculo da diferença mínima significativa (dms).

Como resultado, as médias da concentração residual dos isolados bacterianos *Cupriavidus* sp. QOB-B09 ( $14,73 \pm 4,05$ ), *Lysinibacillus* sp. QOB-B03 ( $41,47 \pm 11,83$ ) e *Bacillus* sp. QOB-B14 ( $40,47 \pm 8,97$ ) diferiram entre si pelo teste de Tukey com um nível de significância de 5% enquanto que para os demais pares não foram encontradas diferenças significativas. Concluiu-se que o isolado *Cupriavidus* sp. QOB-B09 teve um desempenho médio de degradação superior aos isolados *Lysinibacillus* sp. QOB-B03, *Bacillus* sp. QOB-B14 e que não houve diferença significativa na concentração residual entre os pares QOB-B09 ( $14,73 \pm 4,05$ ) vs QOB-B15 ( $27,80 \pm 10,82$ ), QOB-B03 ( $41,47 \pm 11,83$ ) vs QOB-B14 ( $40,47 \pm 8,97$ ), QOB-B03 ( $41,47 \pm 11,83$ ) vs QOB-B15 ( $27,80 \pm 10,82$ ) e QOB-B14 ( $40,47 \pm 8,97$ ) vs QOB-B15 ( $27,80 \pm 10,82$ ), (Tabela 7).

Dessa maneira, foi possível sugerir com base na análise estatística que o isolado bacteriano *Cupriavidus* sp. QOB-B09 teve o melhor desempenho atingindo em média 85% de degradação de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  do pesticida esfenvalerato em comparação ao isolado *Lysinibacillus* sp. QOB-B03 e o *Bacillus* sp. QOB-B14 que degradam em média 59% e 60%, respectivamente. Porém, quando comparado com a média de degradação do isolado QOB-B15 (72%) não houve diferença significativa, dessa forma não se pôde afirmar que *Cupriavidus* sp. QOB-B09 degradou mais do que o QOB-B15.

Os isolados *Lysinibacillus* sp. QOB-B03, *Bacillus* sp. QOB-B14 e QOB-B15 atingiram uma média de (59%), (60%) e (72%) de degradação, respectivamente. E degradaram de forma semelhante o pesticida esfenvalerato, pois não ocorreram diferenças significativas suficientes entre as suas médias de degradação para afirmar que um isolado degradou mais do que o outro.

Tabela 7 – Resultado do teste de Tukey para análise da diferença na média da concentração residual dos pares de tratamentos frente a degradação do esfenvalerato por bactérias isoladas do solo.

Tratamentos dos pares isolados	Q (HSD)	p-valor	Inferência
QOB-B09 vs QOB-B03	4,9086	0,0343460	* p<0,05
QOB-B09 vs QOB-B14	4,7250	0,0411701	* p<0,05
QOB-B09 vs QOB-B15	2,3992	0,3855372	Não significativo
QOB-B03 vs QOB-B14	0,1836	0,8999947	Não significativo
QOB-B03 vs QOB-B15	2,5094	0,3508453	Não significativo
QOB-B14 vs QOB-B15	2,3258	0,4097999	Não significativo

Q (HSD)= Diferença Honestamente Significante do teste de Tukey (Q); p-valor= probabilidade de significância.

## 5.5 Biodegradação com o isolado bacteriano (QOB-B09) e o consórcio bacteriano em diferentes concentrações do pesticida esfenvalerato

Tanto o isolado bacteriano *Cupriavidus* sp. (QOB-B09) quanto o consórcio composto pelos isolados bacterianos QOB-B01, QOB-B02, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15 foram capazes de crescer em diferentes concentrações do pesticida esfenvalerato (100, 200, 300, 400 e 500  $mg.L^{-1}$ ) em meio Caldo Nutriente e também conseguiram degradar o pesticida em todas as concentrações avaliadas (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8 – Concentração residual do esfenvalerato (100-500  $mg.L^{-1}$ ) para as reações com a bactéria *Cupriavidus* sp. (QOB-B09) em agitação orbital (32°C, 130 rpm, 5 dias).

Composto	100 $mg.L^{-1}$	200 $mg.L^{-1}$	300 $mg.L^{-1}$	400 $mg.L^{-1}$	500 $mg.L^{-1}$
PBA	2,75±2,38	0,26±0,31	Nd	0,43±0,75	Nd
PBAc	7,13±1,26	14,09±2,21	12,54±2,45	13,72±4,00	16,80±3,96
CLAc	2,08±3,59	10,42±1,61	8,94± 2,32	8,29±3,18	8,88±2,19
PBAld	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Esfenvalerato	14,73±4,05	125,60±6,33	182,0±34,37	311,93±54,70	446,80±5,06

Nd= não detectado.

Tabela 9 – Concentração residual de esfenvalerato (100-500  $mg.L^{-1}$ ) para as reações com o consórcio bacteriano em agitação orbital (32°C, 130 rpm, 5 dias).

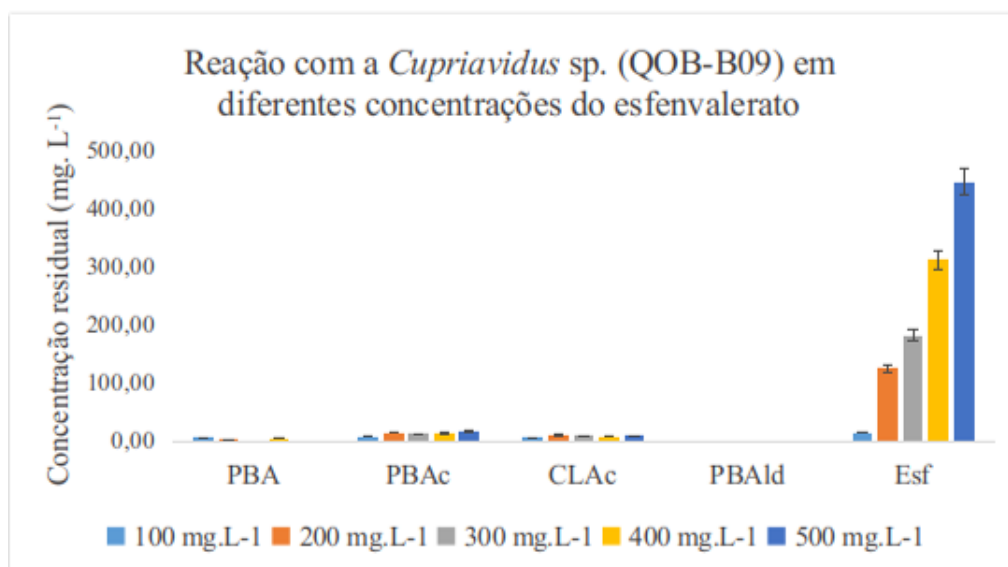
Composto	100 $mg.L^{-1}$	200 $mg.L^{-1}$	300 $mg.L^{-1}$	400 $mg.L^{-1}$	500 $mg.L^{-1}$
PBA	Nd	0,31±0,07	0,38±0,18	0,51±0,24	0,26±0,10
PBAc	27,88±4,60	13,75±0,93	9,56±4,12	12,14±1,20	7,69±1,04
CLAc	24,47±2,74	12,29±0,83	5,47±3,77	7,61±1,22	3,20±0,62
PBAld	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Esfenvalerato	0,70±0,5	46,20±6,69	72,60±24,96	103,63±14,47	147,67±4,25

Nd= não detectado. Consórcio bacteriano= QOB-B01, QOB-B02, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15.

A degradação do pesticida esfenvalerato pode ser observada através dos metabólitos de degradação PBA, PBAc, CLAc observados durante cada reação (Figuras 34 e 36).

Não foi possível confirmar a presença do metabólito 3-fenoxibenzaldeído (PBAlD) para nenhuma das reações.

Figura 34 – Reação com o isolado bacteriano *Cupriavidus* sp. QOB-B09 em diferentes concentrações de esfenvalerato e seus principais metabólitos de degradação.



Condições da reação: As reações foram realizadas em meio líquido de Caldo Nutriente (32°C, 130 rpm, 5 dias) na presença de 100-500  $mg.L^{-1}$  de esfenvalerato.

Na Figura 35 é possível observar as reações de 100, 200, 300, 400 e 500  $mg.L^{-1}$  obtidas para o melhor isolado bacteriano *Cupriavidus* sp. (QOB-B09) seguido do seu controle biótico, que degradou em média 85%, 37%, 39%, 22% e 11% das diferentes concentrações do pesticida, respectivamente.

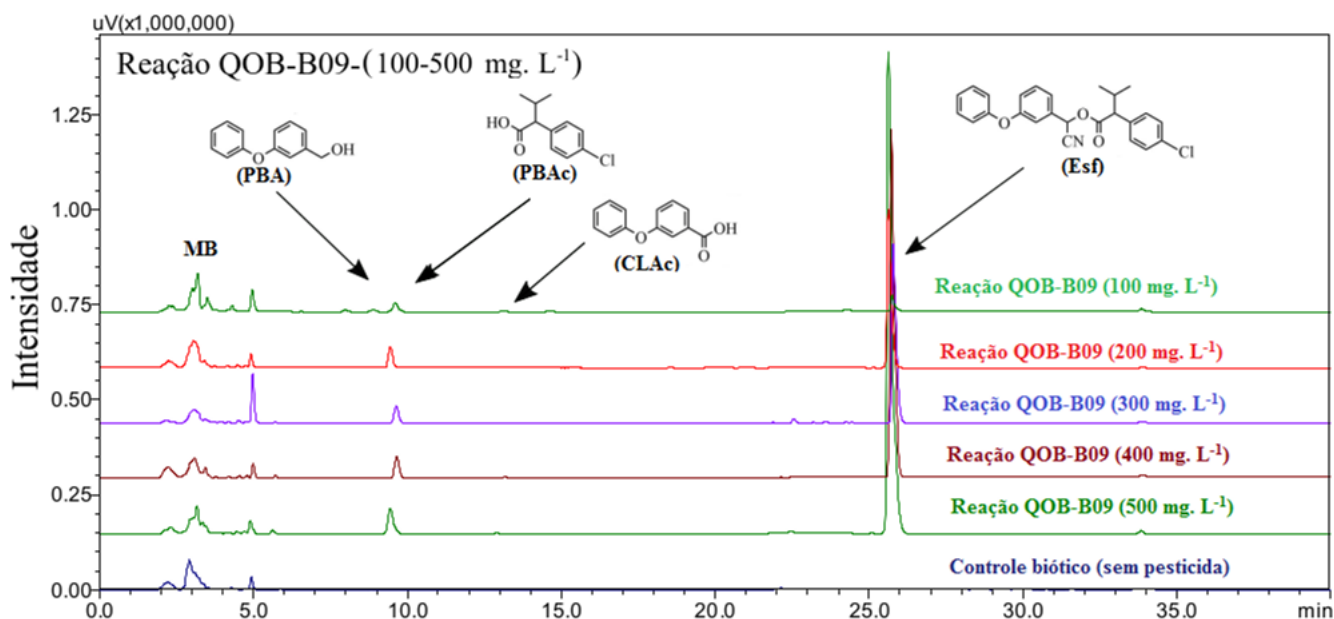
Também foi possível observar os dois principais metabólitos identificados nessa reação (PBA), (PBAC) e resquícios do (CLAc) também podem ser observados em  $t_R = 13$  min.

Os metabólitos bacterianos (MB) apareceram tanto nas reações quanto no controle biótico (sem adição do esfenvalerato) nos intervalos entre 1 e 5 minutos da reação (Figura 35).

Na reação com a bactéria *Cupriavidus* sp. (QOB-B09) em  $t_R = 25$  min é possível observar o esfenvalerato. Já em  $t_R = 34$  minutos foi possível observar um produto que não foi identificado (Figura 35).



Figura 35 – Cromatogramas (reação/controlado biótico) obtidos por HPLC para o isolado bacteriano *Cupriavidus* sp. (QOB-B09) nas concentrações de 100-500  $mg.L^{-1}$

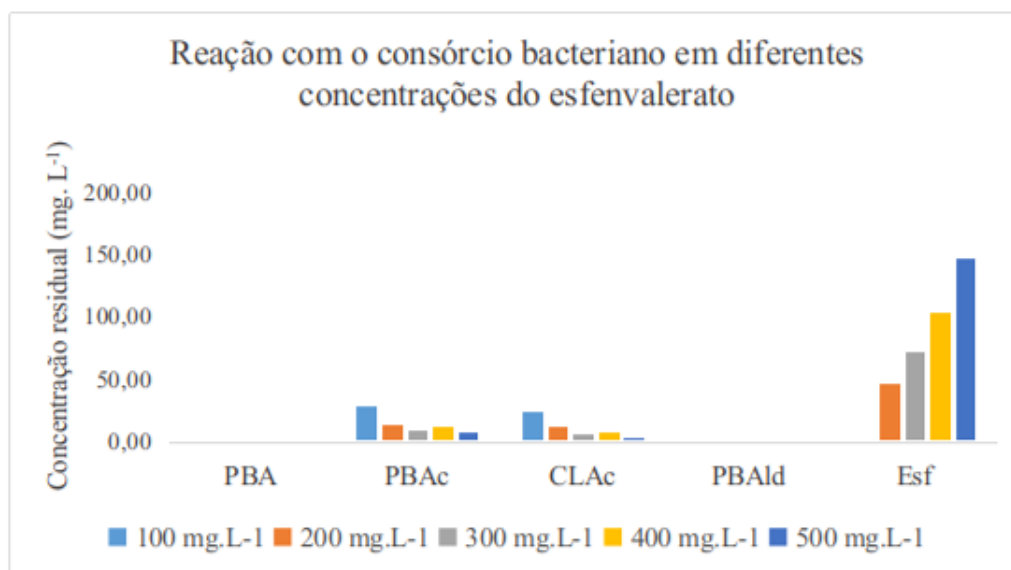


Condições da reação: As reações foram realizadas em meio líquido de Caldo Nutriente ( $32^{\circ}C$ , 130 rpm, 5 dias) na presença de 100-500  $mg.L^{-1}$  de esfenvalerato.

É possível observar na Figura 36 que o consórcio bacteriano foi capaz de crescer e de degradar o pesticida esfenvalerato em diferentes concentrações (100, 200, 300, 400 e 500  $mg.L^{-1}$ ). O produto PBAld não foi detectado nas reações com o consórcio bacteriano (QOB-B01, QOB-B02, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15). Uma vez que o consórcio bacteriano foi capaz de degradar quase todo o pesticida (100  $mg.L^{-1}$ ), em média 99%, há fortes indícios de que o PBAld foi degradado rapidamente antes mesmo de ter sido detectado pelas análises cromatográficas.

Na Figura 38 é possível observar as reações de 100, 200, 300, 400 e 500  $mg.L^{-1}$  obtidas para o consórcio bacteriano seguido do seu controle biótico (sem pesticida), que degradou em média 99%, 77%, 76%, 74% e 70% das diferentes concentrações do pesticida, respectivamente.

Figura 36 – Reação com o consórcio bacteriano em diferentes concentrações de esfenvalerato e seus principais metabólitos de degradação.

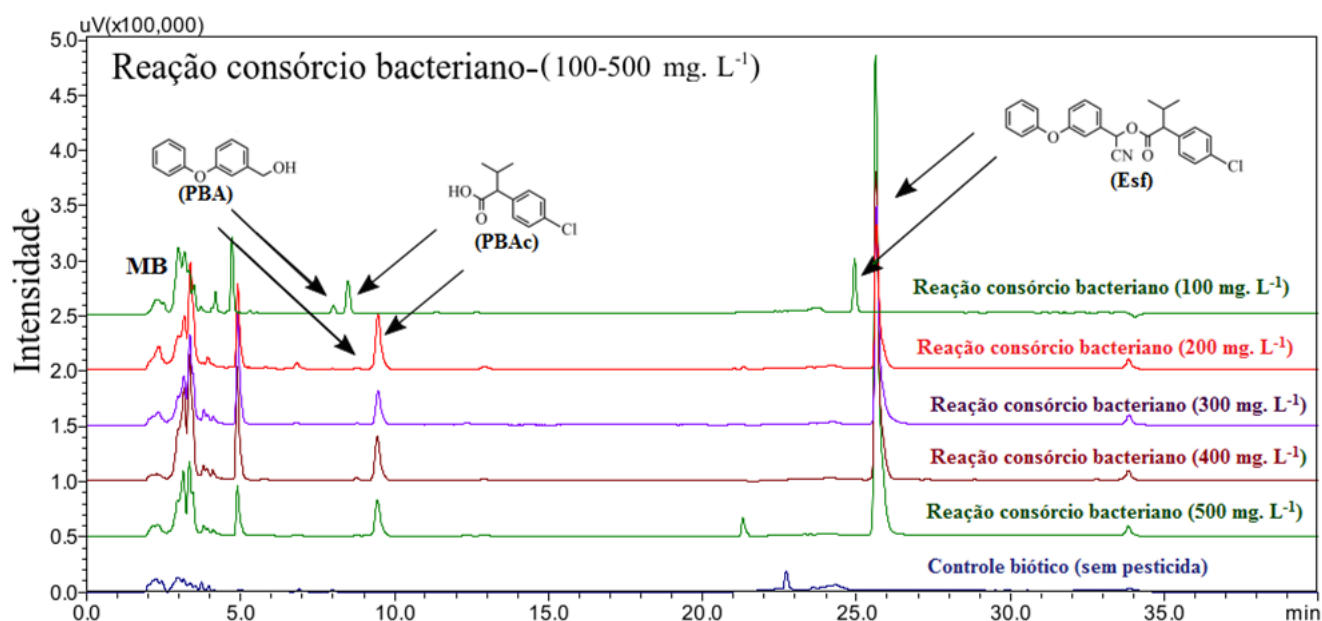


Consórcio bacteriano: QOB-B01, QOB-B02, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15.  
 Condições da reação: As reações foram realizadas em meio líquido de Caldo Nutriente (32 °C, 130 rpm, 5 dias) na presença de 100-500 mg.L<sup>-1</sup> de esfenvalerato.

Também é possível observar que o tempo de retenção variou  $\pm 1$  min desde o início das análises das reações até o final do experimento devido ao desgaste da coluna. Dessa maneira foi analisado o espectro de absorção do pesticida esfenvalerato e dos seus produtos de degradação PBA, PBAC, CLAc e PBAlD, para entender qual a faixa do comprimento de onda cada composto absorvia e também injetou-se uma amostra da reação junto com o padrão ao mesmo tempo para confirmação da molécula (Figura 37).

As concentrações residuais do pesticida esfenvalerato das reações empregando a bactéria *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), variando de 100 mg.L<sup>-1</sup> a 500 mg.L<sup>-1</sup>, foram comparadas com as do consórcio bacteriano (QOB-B01, QOB-B02, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15), também variando de 100 mg.L<sup>-1</sup> a 500 mg.L<sup>-1</sup>, para saber quais tratamentos foram mais eficientes na degradação do pesticida esfenvalerato. Adicionalmente, a devida comparação foi mapeada entre pares de acordo com cada quantidade de concentração. (Exemplo: comparação entre o par QOB-B09 (100 mg.L<sup>-1</sup>) e consórcio bacteriano (100 mg.L<sup>-1</sup>).

Figura 37 – Cromatogramas (reação/controle abiótico) obtidos por HPLC para o consórcio bacteriano nas concentrações de esfenvalerato 100-500  $mg.L^{-1}$ .



Consórcio bacteriano: QOB-B01, QOB-B02, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15.  
 Condições da reação: As reações foram realizadas em meio líquido de Caldo Nutriente (32°C, 130 rpm, 5 dias) na presença de 100-500  $mg.L^{-1}$  de esfenvalerato.

Para validar estatisticamente os resultados, o teste *t-student* (BUSSAB W. O.; MORETTIN, 2002) foi realizado para avaliar a igualdade entre as médias de cada par de concentração residual entre a bactéria QOB-B09 e o consórcio bacteriano. Nessa validação, foi considerado como hipótese nula (H0) a premissa de que não existem diferenças significativas entre a média da concentração residual do isolado bacteriano *Cupriavidus* sp. QOB-B09 e o consórcio bacteriano. Já para a hipótese alternativa (H1) determina que existem diferenças significativas entre a média da concentração residual do isolado bacteriano e o consórcio bacteriano.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 10, concluiu-se que houveram diferenças significativas entre os tratamentos. E que o consórcio bacteriano foi mais eficiente na degradação do esfenvalerato para todos os pares de concentrações avaliadas (100-500  $mg.L^{-1}$ ) do que o isolado bacteriano *Cupriavidus* sp. QOB-B09, mostrando eficiência na degradação. Como pode ser observado na Tabela 10, T calc (calculado) (BUSSAB W. O.; MORETTIN, 2002) foi maior do que T tab (tabelado) para todas as concentrações, rejeitando assim a hipótese H0.

Tabela 10 – Análises da igualdade entre as médias de recuperação do pesticida esfenvalerato para o isolado QOB-B09 e o consórcio bacteriano.

Valores	100 mg.L <sup>-1</sup>	200 mg.L <sup>-1</sup>	300 mg.L <sup>-1</sup>	400 mg.L <sup>-1</sup>	500 mg.L <sup>-1</sup>
T calc:	5,952	14,929	4,459	6,375	78,274
T tab:	2,776	2,776	2,776	2,776	2,776
gl:	6-2=4	6-2=4	6-2=4	6-2=4	6-2=4
X1:	14,733	125,59	182	311,93	446,8
X2:	0,699	46,200	72,6	103,63	147,66
n1:	3	3	3	3	3
n2:	3	3	3	3	3
$\sigma$ :	8,336	42,42	902,52	1601,19	21,906

$X_1$ = média de recuperação empregando *Cupriavidus* sp. QOB-B09;  $X_2$ = média de recuperação empregando o consórcio bacteriano; gl= grau de liberdade ( $n_1 + n_2 - 2$ ); Nível de significância adotado: 0,05%; T calc: T calculado; T tab: T tabelado. consórcio bacteriano: QOB-B01, QOB-B02, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15.

Adicionalmente, foi realizada uma análise de dispersão para esses dados através da análise de correlação de Pearson para saber se a degradação ( $x$ ) está relacionada ao aumento da concentração ( $y$ ) do pesticida esfenvalerato.

No gráfico de dispersão da Figura 38 é possível observar que à medida que a concentração do pesticida esfenvalerato aumentou, a degradação diminuiu, evidenciando uma correlação, onde  $r = -0,79$ . O valor ( $r$ ) representa a correlação de Pearson.

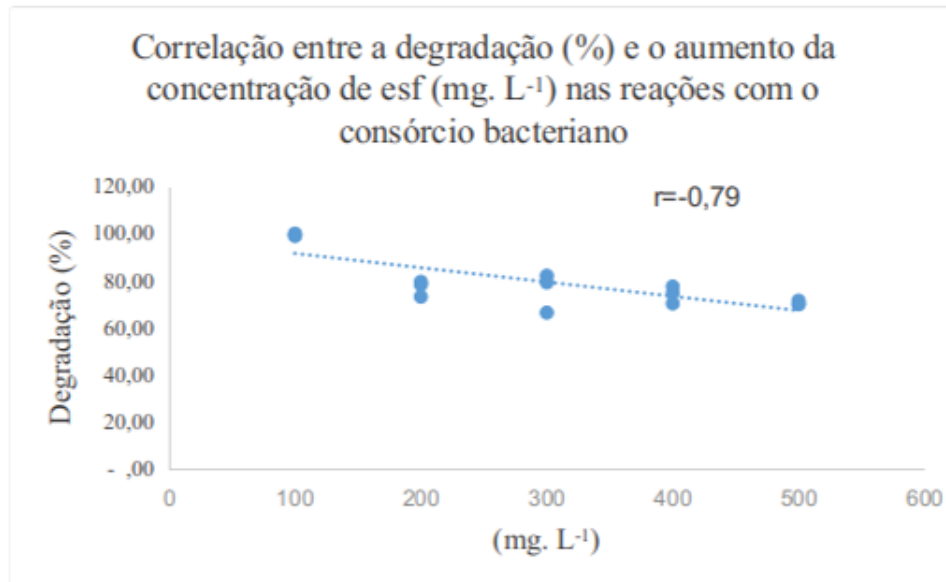
Quando os coeficientes se aproximam de -1 as variáveis também são consideradas correlacionadas. Nesse caso, se  $x$  e  $y$  variam em sentidos contrários têm-se uma correlação do tipo negativa (BUSSAB W. O.; MORETTIN, 2002).

A correlação negativa neste caso sugere que com o aumento da concentração do pesticida esfenvalerato a degradação diminui. Sendo que quanto mais próximos de 1 ou -1 o resultado estiver mais correlacionado serão essas variáveis.

O consórcio bacteriano (QOB-B01, QOB-B02, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15), foi capaz de crescer e degradar em média 99%, 77%, 76%, 74% e 70% de diferentes concentrações do pesticida esfenvalerato 100 mg.L<sup>-1</sup>, 200 mg.L<sup>-1</sup>, 300 mg.L<sup>-1</sup>, 400 mg.L<sup>-1</sup> e 500 mg.L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Dessa maneira foi possível observar que o consórcio diminuiu o potencial de degradação do pesticida esfenvalerato conforme aumentou a concentração do pesticida.

Figura 38 – Correlação entre degradação (%) utilizando o consórcio bacteriano e diferentes concentrações de esfevalerato ( $mg.L^{-1}$ ).



No gráfico de dispersão da Figura 39 é possível observar que à medida que a concentração do pesticida esfenvalerato aumentou, a degradação diminuiu, evidenciando uma correlação negativa, onde  $r = -0,88$ . O valor ( $r$ ) representa a correlação de Pearson. O isolado bacteriano *Cupriavidus* sp. (QOB-B09) foi capaz de crescer e degradar em média 85%, 37%, 39%, 22% e 11% de diferentes concentrações do pesticida esfenvalerato 100, 200, 300, 400 e 500  $mg.L^{-1}$ , respectivamente.

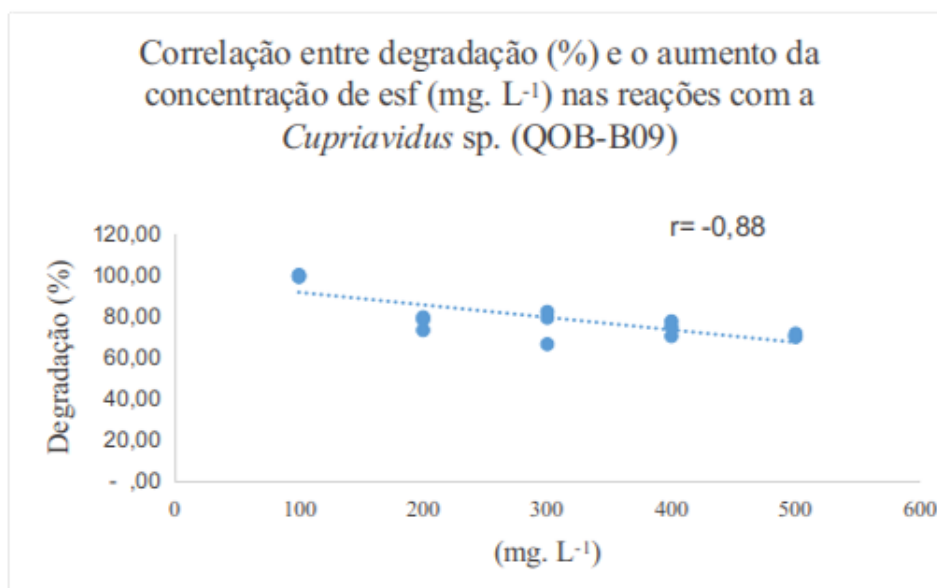
Dessa maneira, foi possível observar que o isolado bacteriano *Cupriavidus* sp. (QOB-B09) diminuiu o potencial de degradação do pesticida esfenvalerato conforme aumentou a concentração do pesticida.

## 5.6 Fungos

### 5.6.1 Linhagens fúngicas isoladas do solo e os seus códigos de identificação

Seis fungos foram isolados do solo, o baixo número na representatividade dos isolados em comparação com as bactérias pode estar relacionado ao fato de que no meio de crescimento BDA usado para o isolamento dos microrganismos foi aplicado uma concentração de 100  $mg.L^{-1}$  do pesticida esfenvalerato que já serviu para selecionar os microrganismos mais resistentes.

Figura 39 – Correlação entre degradação (%) utilizando o isolado bacteriano *Cupriavidus* sp. (QOB-B09) e diferentes concentrações de esfenvalerato ( $mg.L^{-1}$ ).



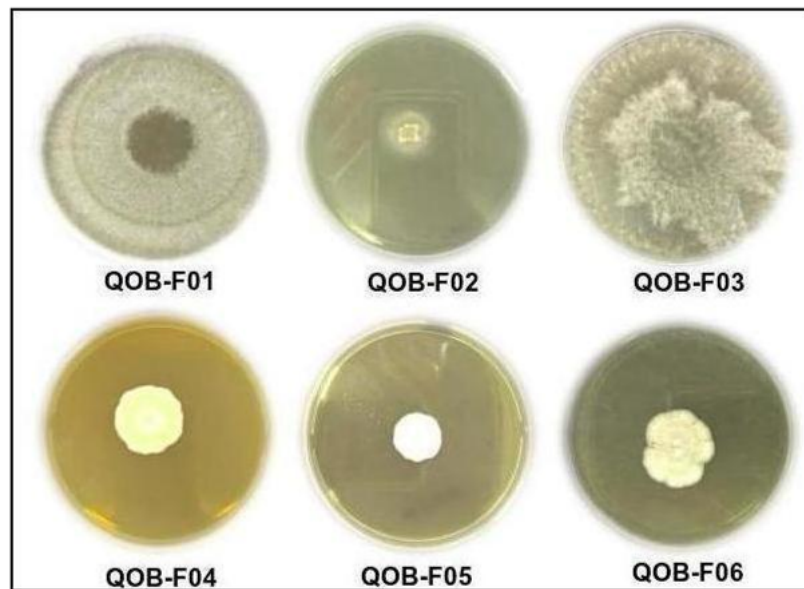
Neste caso, os 6 isolados fúngicos se desenvolveram e se adaptaram às condições impostas, o que demonstra que foram resistentes ao pesticida esfenvalerato. Destaca-se que no local onde foi realizada a coleta do solo eventualmente há cultivos de soja e algumas vezes também são aplicados o pesticida glifosato para combater gramíneas.

Outro fator que pode ter contribuído para um menor número de isolados fúngicos foi que toda a superfície do solo foi removida retirando a cobertura vegetal. Em geral, a população predominante de microrganismos vivem sobre a superfície do solo, onde contém matéria orgânica em decomposição, bem como uma maior disponibilidade de nutrientes, efeito rizosférico, luz, calor e umidade. Neste estudo foi utilizado o solo de uma profundidade de 20 cm, o que também diminui o número de microrganismos que colonizam esta região (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Sendo assim, cada isolado fúngico recebeu um respectivo código a partir das iniciais do laboratório onde QOB refere-se à Química Orgânica e Biocatálise, seguido de uma numeração para a identificação desses microrganismos. A Figura 40 ilustra as colônias de fungos que foram isolados do solo e cultivados em meio de extrato de Malte 2%, 32°C, 5 dias, na ausência do pesticida. Destaca-se que todas as colônias apresentaram aspectos uniformes, o que confirma que os isolados se encontravam puros.

Os isolados fúngicos QOB-F01 e QOB-F03 são considerados filamentosos pelos aspectos que apresentam a forma de crescimento das suas colônias. Bactérias e fungos filamentosos são comuns nos solos porque esse tipo de crescimento proporciona vantagens adaptativas para esses organismos. Essa morfologia é importante para a conexão dos fungos que adentram entre as partículas do solo em busca de fontes nutricionais. Auxilia também no aumento da relação superfície-volume que confere maiores chances na conquista de

Figura 40 – Colônias dos fungos puras isoladas do solo e cultivadas (48- 72 horas) em meio de cultura Agar Malte na ausência do pesticida esfenvalerato.



Fonte: Autoria própria.

recursos em ambientes tão competitivos (TORTORA G.J.; FUNKE, 2017).

#### 5.6.2 Resultados preliminares da identificação dos isolados fúngicos por MALDI-TOF

Dentre os seis isolados fúngicos foi possível identificar quatro desses isolados por MALDI-TOF/MS. Dessa maneira, o fungo QOB-F01 foi identificado como *Rhizopus* sp., o QOB-F04 como *Trichophyton* sp., o QOB-F05 como *Penicillium* sp. e o QOB-F06 como *Aspergillus* sp.

Os gêneros *Penicillium*, *Rhizopus* e o *Aspergillus* são comumente encontrados no solo e são os principais grupos produtores de lipases, sendo considerados importantes fungos do ponto de vista biotecnológico. Esses fungos são degradadores de hidrocarbonetos sendo comumente empregados na biorremediação de substratos contaminados por petróleo (LIMA; OLIVEIRA; CRUZ, 2011).

O gênero *Trichophyton* engloba várias espécies de fungos consideradas dermatófitas que podem causar micoses nas unhas, nos cabelos, na pele e são considerados cosmopolitas podendo ser geofílicas, zoofílicas ou antropofílicas sendo encontrados em diferentes habitats como solo, animais ou em humanos, respectivamente (PERES *et al.*, 2010). Esse gênero já foi empregado na biorremediação de clorpirifós degradando em média 17% da concentração inicial do inseticida (500 mg/L, 24 horas, 37°C, 150 rpm), (SASIKALA *et al.*, 2011).

### 5.6.3 *Screening* dos isolados fúngicos para a aplicação nos experimentos de degradação

Após o isolamento foram selecionados quatro fungos distintos morfológicamente e com o melhor crescimento para serem testados quanto ao potencial de degradação do pesticida esfenvalerato. Sendo os seguintes fungos selecionados *Rhizopus* sp. (QOB-BF01), QOB-F02, QOB-F03 e *Penicillium* sp. (QOB-F05).

### 5.6.4 Biodegradação do pesticida esfenvalerato pelos fungos em meio malte 2%

A quebra da molécula do pesticida esfenvalerato em decorrência das reações de biodegradação realizadas em meio líquido de Malte 2% com os fungos isolados do solo, resultou em 4 principais produtos de degradação o PBA, o PBAC, o CLAC e o PBALD. O tempo de retenção dos metabólitos do esfenvalerato (PBA, PBAC, CLAC e PBALD) foi de aproximadamente 8,66 min, 9,48 min, 13 min e 17,70 min, respectivamente. Já o esfenvalerato apresentou um tempo de retenção de 25 min. O PBALD quando presente nas reações com os fungos foi detectado apenas resquícios em baixas concentrações.

### 5.6.5 Biodegradação empregando os quatro melhores isolados fúngicos

Os quatro melhores isolados fúngicos foram avaliados quanto ao potencial de biodegradação de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  do esfenvalerato ( $32^\circ\text{C}$ , 130 rpm, 7 dias). Dentre eles, o *Rhizopus* sp. (QOB-BF01), o QOB-F02, o QOB-F03 e o *Penicillium* sp. (QOB-F05) que degradaram em média 31%, 44%, 49% e 79%, respectivamente.

A média da concentração residual do pesticida esfenvalerato e o desvio padrão para cada um dos isolados fúngicos *Rhizopus* sp. QOB-BF01, QOB-F02, QOB-F03 e *Penicillium* sp. (QOB-F05), foram de  $(69,40 \pm 1,38)$ ,  $(55,97 \pm 21,14)$ ,  $(51,10 \pm 20,75)$  e  $(21,13 \pm 11,58)$ , respectivamente (Tabela 11).



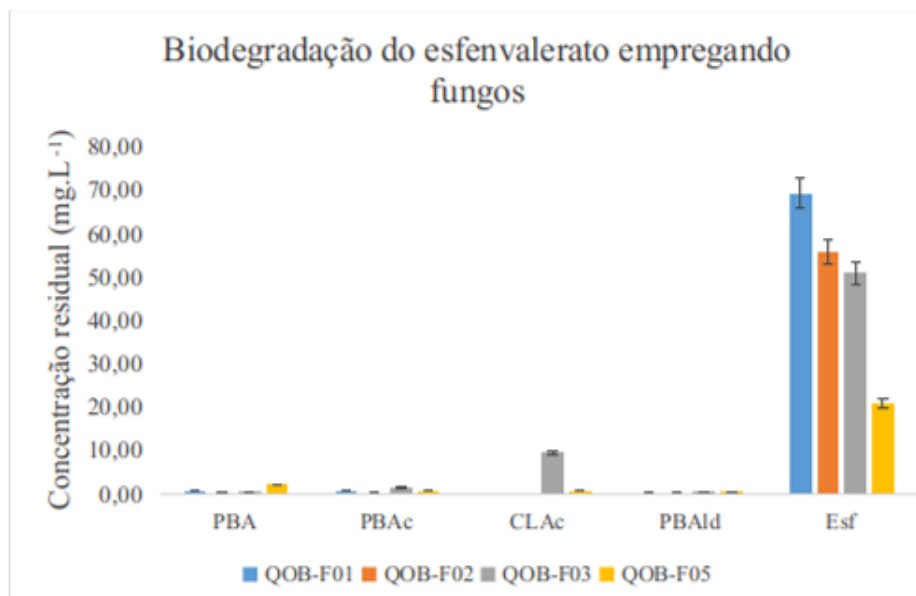
Tabela 11 – Concentração residual do esfenvalerato ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) para as reações com os quatro isolados fúngicos e os seus controles em agitação orbital ( $32^\circ\text{C}$ , 130 rpm, 7 dias).

Composto	QOB-F01	QOB-F02	QOB-F03	QOB-F05	c. abiótico	c. recuperação
PBA	$0,43 \pm 0,192$	$0,01 \pm 0,004$	$0,09 \pm 0,146$	$2,28 \pm 2,304$	$0,08 \pm 0,023$	$0,09 \pm 0,065$
PBAc	$0,33 \pm 0,168$	$0,01 \pm 0,0004$	$1,62 \pm 0,250$	$0,42 \pm 0,054$	$0,39 \pm 0,04$	$0,33 \pm 0,203$
CLAc	Nd	Nd	$9,70 \pm 8,03$	$0,94 \pm 0,173$	Nd	Nd
PBAld	$0,44 \pm 0,274$	Nd	$0,47 \pm 0,58$	$0,09 \pm 0,046$	Nd	Nd
Esf	$69,40 \pm 1,38$	$55,97 \pm 21,14$	$51,10 \pm 20,75$	$21,13 \pm 11,58$	$79,36 \pm 16,89$	$72,12 \pm 11,79$

Nd= não detectado. c. =concentração

Foi possível observar que os isolados fúngicos conseguiram degradar o pesticida até os seus principais produtos de degradação (PBA, PBAc, CLAc e PBAld), (Figuras 41).

Figura 41 – Análises da concentração residual das reações com os quatro melhores isolados fúngicos em  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de esfenvalerato e seus principais metabólitos de degradação.

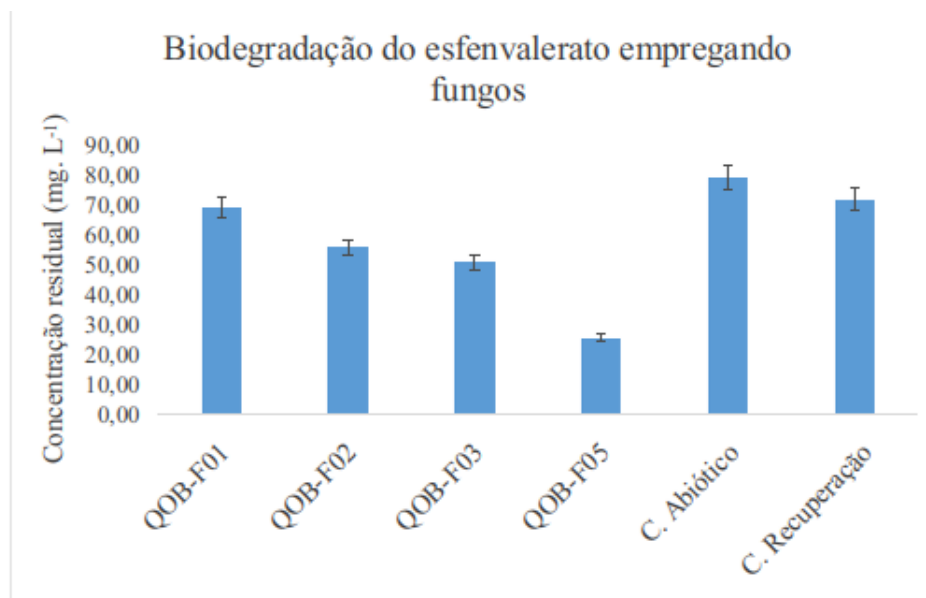


*Rhizopus* sp. (QOB-BF01), QOB-F02, QOB-F03 e *Penicillium* sp. (QOB-F05). Condições da reação: As reações foram realizadas em meio líquido de Malte 2%, ( $32^\circ\text{C}$ , 130 rpm, 7 dias) na presença de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de esfenvalerato.

Foi observado que as reações empregando as células fúngicas vivas foram eficientes na degradação do pesticida esfenvalerato quando comparadas aos controles sem fungo (controle abiótico) e com as células fúngicas não-vivas (controle de recuperação), (Figura 42).

A concentração residual dos controles abiótico e de recuperação foram em média 79% e 76% do pesticida esfenvalerato, respectivamente. Adicionalmente, também foi realizado um controle de células mortas cuja a concentração residual foi de 76%. Dessa maneira, as reações empregando os fungos acelerou a degradação do pesticida esfenvalerato em meio líquido de Malte 2%.

Figura 42 – Análises da concentração residual das reações com os quatros melhores isolados fúngicos em  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de esfenvalerato e controle abiótico e de recuperação.



Condições da reação: As reações foram realizadas em meio líquido de Malte 2%, (32°C, 130 rpm, 7 dias) na presença de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de esfenvalerato.

Com o intuito de comparar, de maneira analítica, as diferentes amostras de dados de concentrações residuais do pesticida esfenvalerato das reações realizadas em triplicatas para os isolados fúngicos: *Rhizopus* sp. (QOB-BF01), QOB-F02, QOB-F03 e *Penicillium* sp. (QOB-F05), o teste estatístico, conhecido como ANOVA foi utilizado para saber se houveram ou não, diferenças estatisticamente significativas entre as médias dessas amostras (BUSSAB W. O.; MORETTIN, 2002).

Adicionalmente, no teste ANOVA (BUSSAB W. O.; MORETTIN, 2002) aplicado, na hipótese nula (H0) tomou-se como pressuposto que todas médias das concentrações residuais das reações envolvendo os fungos eram iguais entre si, e na hipótese alternativa (H1), assumiu-se que pelo menos um par de médias dentre esses dados eram diferentes entre

si. Com base nessas premissas e nos dados do experimento, a hipótese H0 foi rejeitada com o  $p$ -valor (BUSSAB W. O.; MORETTIN, 2002) igual a 0,0320, em um nível de significância estatística de 5%. Como a hipótese H0 foi rejeitada, realizou-se um teste de comparações múltiplas (Teste de Tukey (BUSSAB W. O.; MORETTIN, 2002)) para saber quais pares de médias que estavam diferindo entre si. O teste se baseia em comparar a diferença entre as médias com o cálculo da diferença mínima significativa (dms) (BUSSAB W. O.; MORETTIN, 2002).

As médias da concentração residual do pesticida esfenvalerato com os isolados fúngicos *Rhizopus* sp. (QOB-BF01) ( $69,40 \pm 1,38$ ) e *Penicillium* sp. (QOB-F05) ( $21,13 \pm 11,58$ ) diferiram entre si pelo teste de Tukey com um nível de significância de 5% enquanto os demais pares foram insignificantes. Concluiu-se que o isolado *Penicillium* sp. (QOB-F05) teve um desempenho médio superior ao isolado *Rhizopus* sp. (QOB-BF01) na degradação do pesticida esfenvalerato e que não houve diferença significativa na concentração residual do pesticida esfenvalerato entre os pares QOB-F01 ( $69,40 \pm 1,38$ ) vs QOB-F02 ( $55,97 \pm 21,14$ ), QOB-F01 ( $69,40 \pm 1,38$ ) vs QOB-F03 ( $51,10 \pm 20,75$ ), QOB-F02 ( $55,97 \pm 21,14$ ) vs QOB-F03 ( $51,10 \pm 20,75$ ) e QOB-F03 ( $51,10 \pm 20,75$ ) vs QOB-F05 ( $21,13 \pm 11,58$ ), (Tabela 12).

Dessa maneira, foi possível sugerir com base na análise estatística que o isolado fúngico *Penicillium* sp. (QOB-F05) teve o melhor desempenho atingindo em média 79% de degradação de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  do pesticida esfenvalerato em comparação ao isolado *Rhizopus* sp. (QOB-BF01) que degradou em média 31%.

Os isolados *Rhizopus* sp. (QOB-BF01), QOB-F02 e QOB-F03 atingiram uma média de degradação de 31%, 44% e 49%, respectivamente, e degradaram de forma semelhante o pesticida esfenvalerato, pois não ocorreram diferenças significativas suficientes entre as suas médias de degradação para afirmar que um isolado degradou mais do que o outro. Tanto o fungo QOB-F02 quanto o QOB-F03 apresentaram um alto desvio padrão em relação à média obtida da concentração residual, sendo maior ou igual a 20,0. Isso pode ser explicado pela presença de *outliers* (BUSSAB W. O.; MORETTIN, 2002) nas amostras ou mesmo pelo baixo número de repetições. Assim, não se pode afirmar que o isolado *Rhizopus* sp. (QOB-BF01) mesmo degradando 31% da concentração inicial do pesticida ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) foi estatisticamente melhor do que os demais fungos.

Tabela 12 – Resultado do teste de Tukey para análise da diferença na média da concentração residual dos pares de tratamentos frente a degradação do pesticida esfenvalerato por fungos isolados do solo.

Tratamento	Q (HSD)	p-valor	Inferência
QOB-F01 <i>vs</i> QOB-F02	1,4614	0,7191085	não significativo
QOB-F01 <i>vs</i> QOB-F03	1,9908	0,5275963	não significativo
QOB-F01 <i>vs</i> QOB-F05	5,2508	0,0245952	* p<0.05
QOB-F02 <i>vs</i> QOB-F03	0,5294	0,8999947	não significativo
QOB-F02 <i>vs</i> QOB-F05	3,7894	0,1046189	não significativo
QOB-F03 <i>vs</i> QOB-F05	3,2600	0,1758678	não significativo

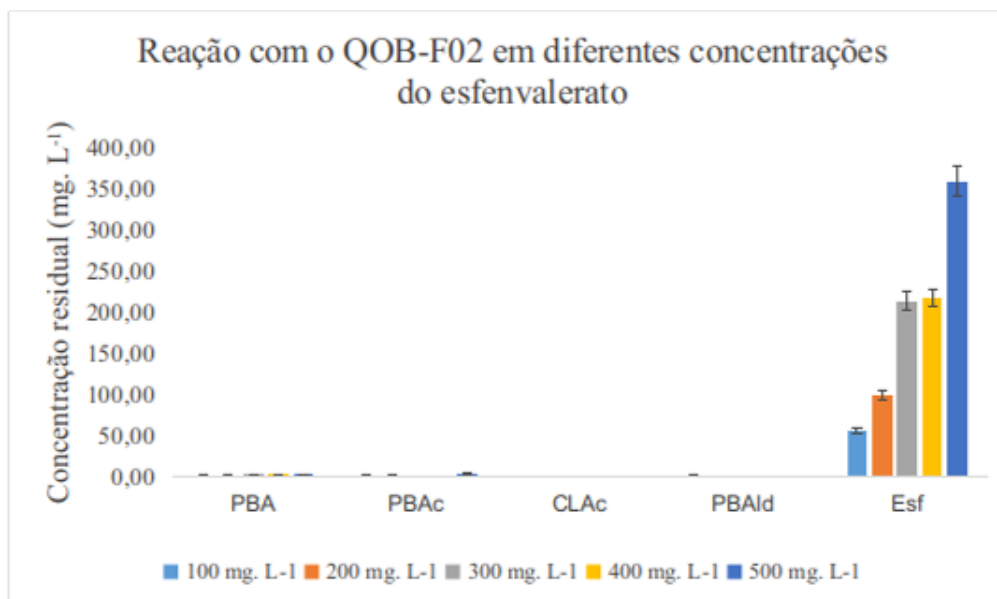
Q (HSD)= Diferença Honestamente Significante do teste de Tukey; p-valor= probabilidade de significância.

#### 5.6.6 Biodegradação com o isolado fúngico (QOB-F02) e o consórcio fúngico em diferentes concentrações do pesticida esfenvalerato

Tanto o isolado QOB-F02 quanto o consórcio fúngico (*Rhizopus* sp. (QOB-BF01), QOB-F02, QOB-F03 e *Penicillium* sp. (QOB-F05) foram capazes de crescer em diferentes concentrações do pesticida esfenvalerato (100, 200, 300, 400 e 500  $mg.L^{-1}$ ) em meio de Malte 2% e também conseguiram degradar o pesticida em todas as concentrações avaliadas (Tabelas 12 e 13). A degradação do pesticida esfenvalerato pode ser observada através dos metabólitos de degradação PBA, PBAc, CLAc e PBAlD observados durante cada reação por análises de HPLC (Figuras 43 e 45).

Na Figura 44 é possível observar as reações de 100, 200, 300, 400 e 500  $mg.L^{-1}$  obtidas para o melhor isolado fúngico (QOB-F02) seguido do seu controle biótico (sem pesticida), que degradou em média 44%, 50%, 29%, 45% e 28% das diferentes concentrações utilizadas do pesticida, respectivamente.

Figura 43 – Reação com o isolado fúngico QOB-F02 em diferentes concentrações de esfenvalerato e seus principais metabólitos de degradação.



Condições da reação: As reações foram realizadas em meio líquido de Malte 2%, (32°C, 130 rpm, 7 dias) na presença de 100-500  $mg.L^{-1}$  de esfenvalerato.

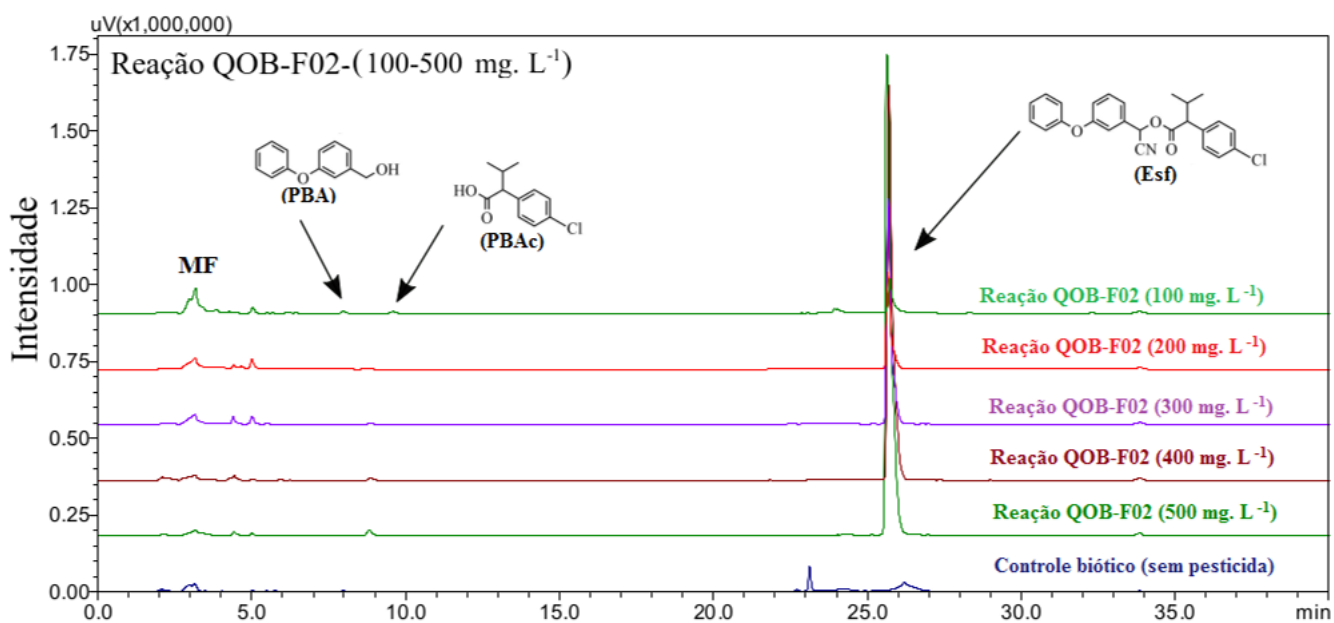
Também é possível observar os metabólitos fúngicos (MF) que apareceram tanto nas reações quanto no controle biótico (sem adição do esfenvalerato) nos intervalos entre 1 e 5 minutos da reação e os dois produtos de degradação do pesticida esfenvalerato que foram observados nessa reação o PBA ( $t_R = 8,66$  min) e o PBAC ( $t_R = 9,48$  min), (Figura 44).

Na reação com o fungo (QOB-F02) em  $t_R = 25$  min é possível observar o esfenvalerato. Em  $t_R = 34$  minutos foi possível observar um produto que não foi identificado (Figura 44).

É possível observar na Figura 45 que o consórcio fúngico composto pelos fungos *Rhizopus* sp. (QOB-BF01), QOB-F02, QOB-F03 e *Penicillium* sp. (QOB-F05) foi capaz de crescer e de degradar o pesticida esfenvalerato em diferentes concentrações do pesticida (100, 200, 300, 400 e 500  $mg.L^{-1}$ ). O produto PBAld não foi detectado nas reações.

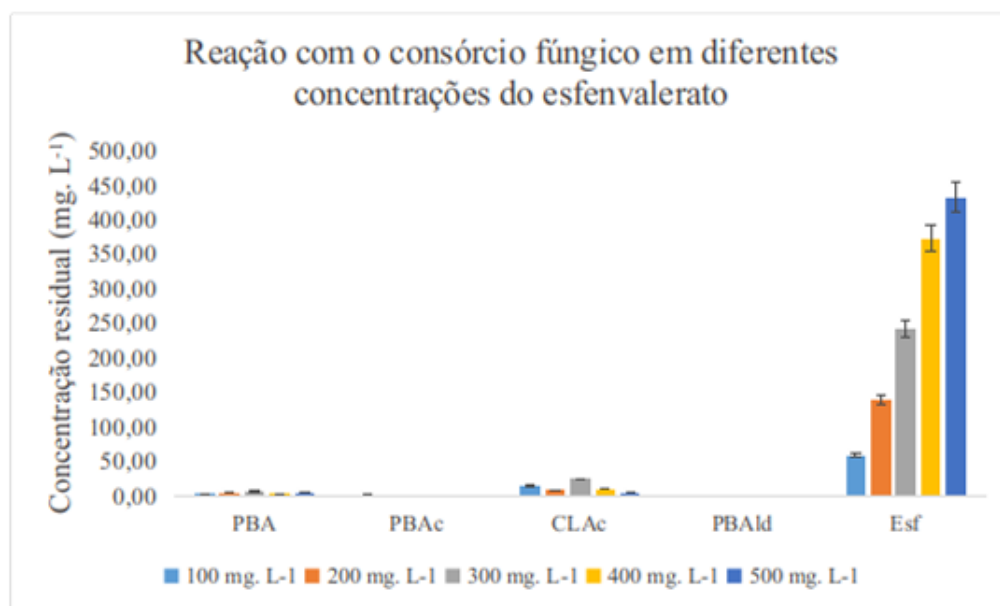
Na Figura 46 é possível observar as reações de 100, 200, 300, 400 e 500  $mg.L^{-1}$  obtidas para o consórcio fúngico *Rhizopus* sp. (QOB-BF01), QOB-F02, QOB-F03 e *Penicillium* sp. (QOB-F05), seguido do seu controle biótico (sem pesticida), degradou em média (41%, 31%, 19%, 6% e 13%) das diferentes concentrações do pesticida, respectivamente.

Figura 44 – Cromatogramas (reação/controle abiótico) obtidos por HPLC para o isolado fúngico QOB-F02 nas concentrações de 100-500  $mg.L^{-1}$ .



Condições da reação: As reações foram realizadas em meio líquido de Malte 2%, (32 °C, 130 rpm, 7 dias) na presença de 100-500  $mg.L^{-1}$  de esfenvalerato.

Figura 45 – Reação com o consórcio fúngico em diferentes concentrações de esfenvalerato e seus principais metabólitos de degradação.



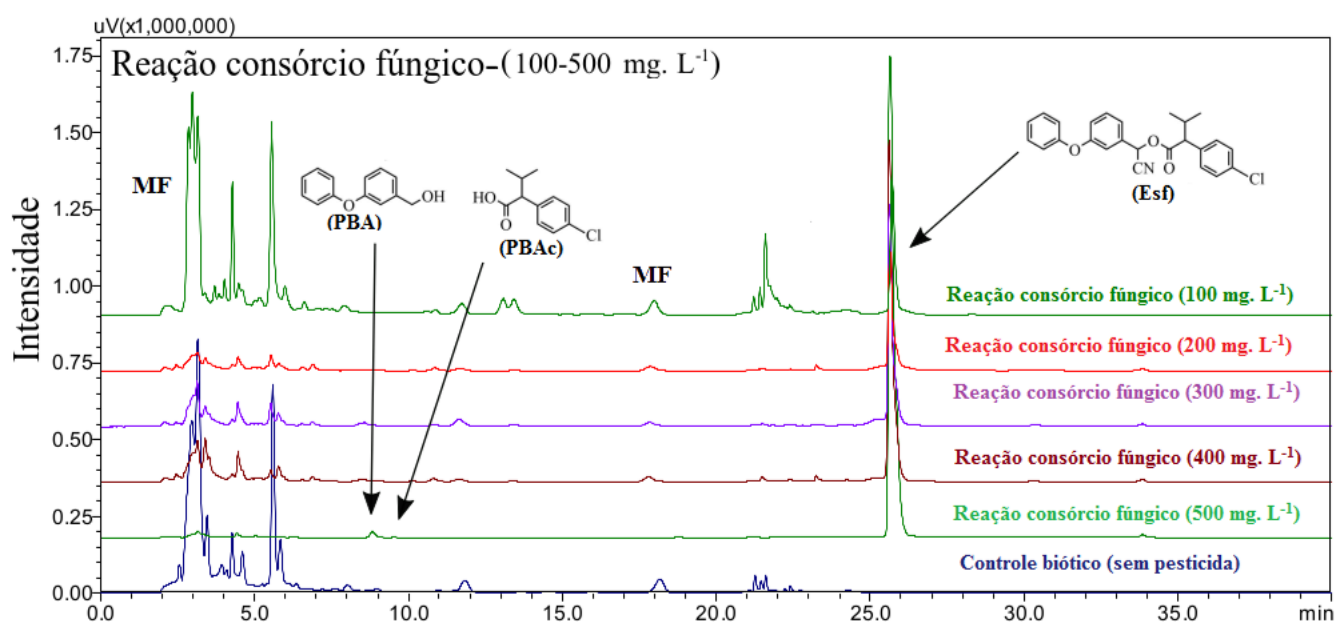
Consórcio fúngico: *Rhizopus* sp. (QOB-BF01), QOB-F02, QOB-F03 e *Penicillium* sp. (QOB-F05). Condições da reação: As reações foram realizadas em meio líquido de Malte 2%, (32 °C, 130 rpm, 7 dias) na presença de 100-500  $mg.L^{-1}$  de esfenvalerato.

Nas reações com o consórcio fúngico *Rhizopus* sp. (QOB-BF01), QOB-F02, QOB-F03 e *Penicillium* sp. (QOB-F05) em  $t_R = 25$  min é possível observar o esfenvalerato. Em  $t_R = 34$  minutos foi possível observar um produto que não foi identificado (Figura 47).

Resquícios dos produtos de degradação do pesticida esfenvalerato também foram observados nas reações o PBA ( $t_R = 8,66$  min), o PBAC ( $t_R = 9,48$  min) e o CLAc ( $t_R = 13$  min).

Também foi possível observar um produto que não foi identificado em  $t_R = 18$  min sugerindo ser um metabólito fúngico uma vez que também estava presente nas reações com o controle biótico (sem pesticida). A princípio foi considerada a hipótese de que poderia ser o PBald produto que degradação do pesticida esfenvalerato que geralmente aparece nas reações em  $t_R = 17,70$  min mas, não foi confirmado pelo espectro de absorção.

Figura 46 – Cromatograma (reação/controle) obtido por HPLC para o consórcio fúngico nas concentrações de 100-500  $mg.L^{-1}$ .



Consórcio fúngico: *Rhizopus* sp. (QOB-BF01), QOB-F02, QOB-F03 e *Penicillium* sp. (QOB-F05). Condições da reação: As reações foram realizadas em meio líquido de Malte 2%, (32 °C, 130 rpm, 7 dias) na presença de 100-500  $mg.L^{-1}$  de esfenvalerato.

A média de recuperação do pesticida esfenvalerato empregando o fungo QOB-F02 foi comparada com a do consórcio fúngico *Rhizopus* sp. (QOB-BF01), QOB-F02, QOB-F03 e *Penicillium* sp. (QOB-F05) para saber quais dos tratamentos foram mais eficientes na degradação do pesticida esfenvalerato (Tabelas 13 e 14).

Tabela 13 – Concentração residual do esfenvalerato ( $100\text{-}500\text{ mg.L}^{-1}$ ) para as reações com o melhor fungo (QOB-F02) em agitação orbital ( $32^{\circ}\text{C}$ , 130 rpm, 7 dias).

Composto	$100\text{ mg.L}^{-1}$	$200\text{ mg.L}^{-1}$	$300\text{ mg.L}^{-1}$	$400\text{ mg.L}^{-1}$	$500\text{ mg.L}^{-1}$
PBA	$0,01\pm 0,00$	$0,53\pm 0,21$	$0,75\pm 0,00$	$1,40\pm 0,30$	$3,63\pm 2,24$
PBAc	$0,01\pm 0,00$	$0,35\pm 0,30$	Nd	Nd	$1,65\pm 2,84$
CLAc	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
PBAld	$0,08\pm 0,134$	Nd	Nd	Nd	Nd
Esf	$55,97\pm 21,14$	$99,27\pm 2,40$	$214,43\pm 37,05$	$218,17\pm 50,96$	$360,48\pm 54,19$

Nd= não detectado.

Tabela 14 – Concentração residual de esfenvalerato ( $100\text{-}500\text{ mg.L}^{-1}$ ) para as reações com o consórcio fúngico em agitação orbital ( $32^{\circ}\text{C}$ , 130 rpm, 7 dias).

Composto	$100\text{ mg.L}^{-1}$	$200\text{ mg.L}^{-1}$	$300\text{ mg.L}^{-1}$	$400\text{ mg.L}^{-1}$	$500\text{ mg.L}^{-1}$
PBA	$0,56\pm 0,75$	$1,84\pm 3,18$	$7,23\pm 1,12$	$3,73\pm 4,75$	$2,31\pm 4,00$
PBAc	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
CLAc	$15,76\pm 20,79$	$8,50\pm 0,98$	$24,56\pm 5,67$	$10,28\pm 3,69$	$5,32\pm 3,96$
PBAld	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
Esf	$59,10\pm 4,85$	$138,97\pm 22,11$	$241,73\pm 33,32$	$374,40\pm 3,01$	$433,37\pm 63,45$

As concentrações residuais do pesticida esfenvalerato das reações empregando o isolado fúngico QOB-F02, variando de  $100\text{ mg.L}^{-1}$  a  $500\text{ mg.L}^{-1}$ , foram comparadas com as do consórcio fúngico *Rhizopus* sp. (QOB-BF01), QOB-F02, QOB-F03 e *Penicillium* sp. (QOB-F05), também variando de  $100\text{ mg.L}^{-1}$  a  $500\text{ mg.L}^{-1}$ , para saber quais tratamentos foram mais eficientes na degradação do pesticida esfenvalerato. Adicionalmente, a devida comparação foi mapeada entre pares de acordo com cada quantidade de concentração. (Exemplo: comparação entre o par QOB-F02 ( $100\text{ mg.L}^{-1}$ ) e consórcio fúngico ( $100\text{ mg.L}^{-1}$ )).

Para validar estatisticamente os resultados, o teste *t-student* (BUSSAB W. O.; MORETTIN, 2002) foi realizado para avaliar a igualdade entre as médias de cada par de concentração residual entre o fungo QOB-F02 e o consórcio fúngico. Nessa validação, foi considerado como hipótese nula ( $H_0$ ) a premissa de que não existem diferenças significativas entre a média da concentração residual do isolado fúngico QOB-F02 e o consórcio fúngico. Já para a hipótese alternativa ( $H_1$ ) determina que existem diferenças significativas entre a média da concentração residual do isolado fúngico QOB-F02 e o consórcio fúngico.



Com base nos resultados apresentados na Tabela 14, concluiu-se que houveram diferenças significativas para alguns dos tratamentos. Especificamente, existem diferenças significativas entre o isolado QOB-F02 e o consórcio fúngico quando aplicados uma quantidade de  $200 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $400 \text{ mg.L}^{-1}$ , uma vez que  $H_0$  foi rejeitada, devido aos valores de T calc terem sido maiores do que seus respectivos T tab, como pode ser visto na Tabela 15. Já para as demais concentrações aplicadas,  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $300 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $500 \text{ mg.L}^{-1}$ , não foi possível afirmar qual tratamento degradou mais do pesticida.

Tabela 15 – Análises da igualdade em screening as médias de recuperação do pesticida esfenvalerato do isolado fúngico QOB-F02 e o consórcio fúngico.

Valores	$100 \text{ mg.L}^{-1}$	$200 \text{ mg.L}^{-1}$	$300 \text{ mg.L}^{-1}$	$400 \text{ mg.L}^{-1}$	$500 \text{ mg.L}^{-1}$
T cal:	-0,138	-3,091	-0,948	-5,299	-1,512
T tab:	2,776	2,776	2,776	2,776	2,776
gl:	6-2=4	6-2=4	6-2=4	6-2=4	6-2=4
X1:	57,30	99,26	214,43	218,16	360,48
X2:	59,1	138,96	241,73	324,40	433,36
n1:	3	3	3	3	3
n2:	3	3	3	3	3
$\sigma$ :	252,093	247,36	1241,75	1303,42	3481,99

$X_1$ = média de recuperação empregando QOB-F02;  $X_2$ = média de recuperação empregando o consórcio fúngico (Nd= não detectado. Consórcio fúngico: QOB-F01, QOB-F02, QOB-F03 e QOB-F05); gl= grau de liberdade ( $n_1 + n_2 - 2$ ); Nível de significância adotado: 0,05%; T calc: T calculado; T tab: T tabelado, n= número de replicatas.

Uma análise de dispersão também foi realizada para os isolados fúngicos através da análise de correlação de Pearson para saber se a degradação ( $x$ ) está relacionada com o aumento da concentração ( $y$ ) do pesticida esfenvalerato.

No gráfico de dispersão da Figura 47 é possível observar que à medida que a concentração do pesticida esfenvalerato aumentou, a degradação diminuiu, evidenciando uma correlação negativa fraca, onde  $r = -0,37$ . Quanto mais próximo de -1 mais as variáveis estão relacionadas (BUSSAB W. O.; MORETTIN, 2002).

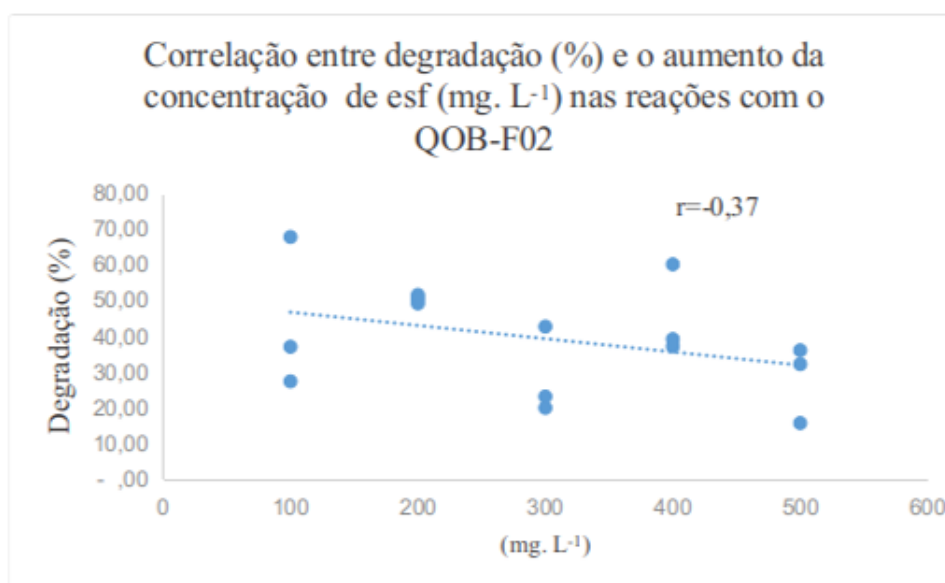
O fato da correlação ter sido negativa e fraca ( $r = -0,37$ ), pode ser observado pelas porcentagens de biodegradação do fungo QOB-F02 diante do aumento da concentração do pesticida, pois não houve uma redução gradual na degradação do pesticida.

O isolado fúngico QOB-F02 foi capaz de crescer e degradar em média 44%, 50%, 29%, 45% e 28% de diferentes concentrações do pesticida esfenvalerato  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ,  $200$

$mg.L^{-1}$ ,  $300 mg.L^{-1}$ ,  $400 mg.L^{-1}$  e  $500 mg.L^{-1}$ , respectivamente.

Dessa maneira, foi possível observar que o fungo QOB-F02 degradou menos quando expostos a concentrações de  $300 mg.L^{-1}$  e  $500 mg.L^{-1}$  do esfenvalerato. O desvio padrão também deve ser levado em consideração pois, podem estar influenciando a média amostral devido a presença de *outliers*, que em contrapartida poderiam ter sido reduzidos com o aumento das repetições.

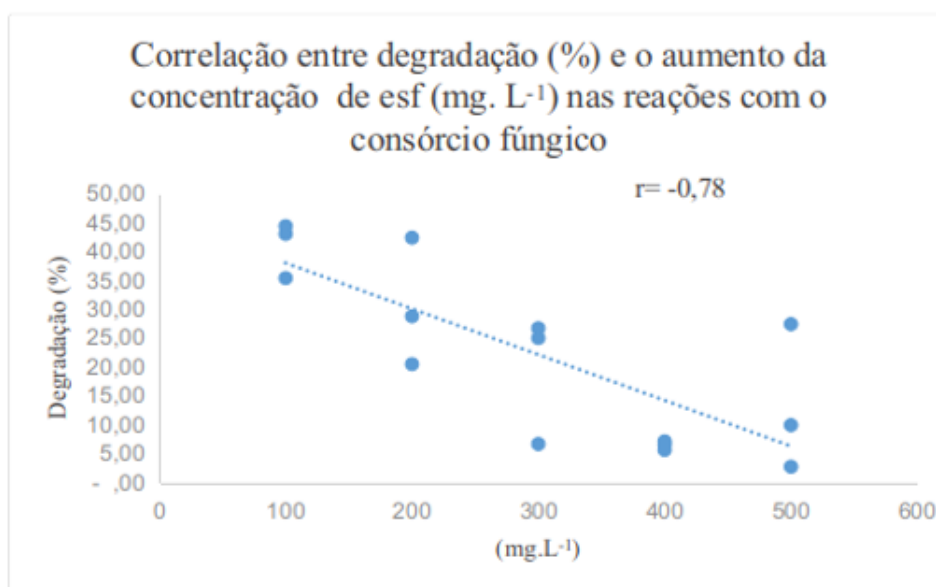
Figura 47 – Correlação entre degradação (%) utilizando o isolado fúngico QOB-F02 e diferentes concentrações de esfenvalerato ( $mg.L^{-1}$ ).



No gráfico de dispersão da Figura 48 foi possível observar que à medida que a concentração do pesticida esfenvalerato aumentou a degradação diminuiu, evidenciando uma correlação negativa forte, onde  $r = -0,78$ . Quanto mais próximo de -1 mais as variáveis estão relacionadas (BUSSAB W. O.; MORETTIN, 2002).

O consórcio fúngico *Rhizopus* sp. (QOB-BF01), QOB-F02, QOB-F03 e *Penicillium* sp. (QOB-F05), foi capaz de crescer e degradar em média 41%, 31%, 19%, 6% e 13% de diferentes concentrações do pesticida esfenvalerato  $100 mg.L^{-1}$ ,  $200 mg.L^{-1}$ ,  $300 mg.L^{-1}$ ,  $400 mg.L^{-1}$  e  $500 mg.L^{-1}$ , respectivamente. Dessa maneira, foi possível observar que o consórcio tendeu a diminuir o potencial de degradação do pesticida esfenvalerato conforme a concentração do pesticida aumentou.

Figura 48 – Correlação entre degradação (%) utilizando o consórcio fúngico e diferentes concentrações de esfenvalerato ( $mg.L^{-1}$ ).



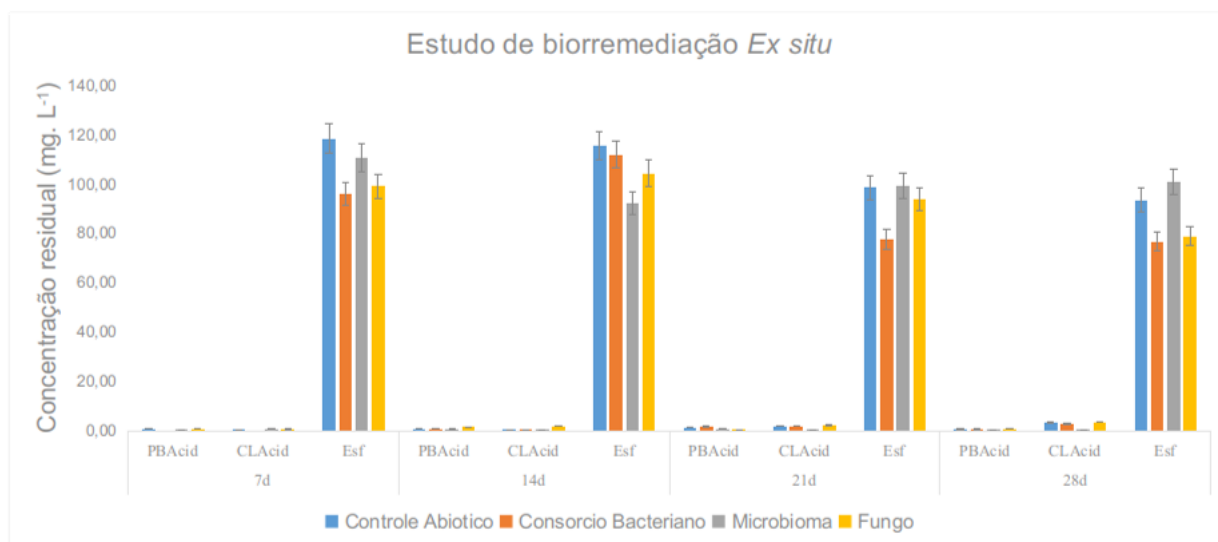
Consórcio fúngico: *Rhizopus* sp. (QOB-BF01), QOB-F02, QOB-F03 e *Penicillium* sp. (QOB-F05).

### 5.7 Biorremediação *ex situ* do pesticida esfenvalerato em solo

Para investigar a degradação do pesticida esfenvalerato em solo ( $100 mg.L^{-1}$ ), foram realizados dois tipos de tratamentos, a reação empregando o consórcio bacteriano composto pelos isolados QOB-B01, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15 e o isolado QOB-F02 que foram comparados com os controles abiótico e o microbioma (conjunto de microrganismos nativos presentes em uma amostra de solo o qual não foi esterilizado). As reações foram avaliadas por um período de 7, 14, 21 e 28 dias, ocorreram sob condições estáticas para se assemelhar dentro do possível ao ambiente natural (Figura 50).

Microrganismos empregados nos tratamentos, o isolado fúngico QOB-F02, o consórcio bacteriano composto pelos isolados QOB-B01, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15 e no microbioma foram capazes de crescer na presença do pesticida esfenvalerato  $100 mg.L^{-1}$  em meio de Caldo Nutriente e também conseguiram degradar o pesticida na concentração avaliada. A degradação do pesticida esfenvalerato pôde ser observada através dos metabólitos de degradação (PBAc e do CLAc) observados durante cada reação (Figura 49).

Figura 49 – Reações do estudo de biorremediação *ex situ* empregando o isolado fúngico QOB-F2, o consórcio bacteriano, o controle abiótico e o microbioma (32°C, 7, 14, 21 e 28 dias) sob condições estáticas, realizados com solo frente a degradação do esfenvalerato ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ).



Consórcio bacteriano: QOB-B01, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15. Condições da reação: As reações foram realizadas no solo (32°C, sob modo estático, 7,14,21 e 28 dias) na presença de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de esfenvalerato.

Já a média da concentração residual do controle abiótico sem o emprego de microrganismos foi de  $118,4 \pm 8,0$ ,  $103,83 \pm 18,97$ ,  $97,15 \pm 6,0$  e  $93,15 \pm 2,0$  no decorrer de 7, 14, 21 e 28 dias, respectivamente (Figura 49), (Tabela 16).

Tabela 16 – Concentração residual de esfenvalerato ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) para as reações do controle abiótico (32°C e 7, 14, 21 e 28 dias) sob condições estáticas, realizadas em solo.

Composto	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
PBAc	$0,66 \pm 0,5$	$0,33 \pm 0,23$	$0,45 \pm 0,21$	$0,65 \pm 0,07$
CLAc	$0,43 \pm 0,49$	$0,2 \pm 0,1$	$0,15 \pm 0,07$	$0,05 \pm 0,07$
Esfenvalerato	$118,4 \pm 8,0$	$103,83 \pm 18,97$	$97,15 \pm 6,0$	$93,15 \pm 2,0$

A média da concentração residual empregando o consórcio bacteriano QOB-B01, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15 foi de  $96,16 \pm 18,78$ ,  $112,1 \pm 10,24$ ,

77,63±17,16 e 73,93±2,56 no decorrer de 7, 14, 21 e 28 dias, respectivamente (Figura 50), (Tabela 17).

Tabela 17 – Concentração residual do esfenvalerato ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) para as reações do consórcio bacteriano ( $32^\circ\text{C}$  e 7, 14, 21 e 28 dias) sob condições estáticas, realizadas em solo.

Composto	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
PBAc	1,06±0,32	1,66±0,25	0,63±0,20	0,43±0,05
CLAc	0,8±0,1	2,06±0,41	2,46±0,35	3,76±0,41
Esfenvalerato	96,16±18,78	112,1±10,24	77,63±17,16	73,93±2,56

Enquanto que a média da concentração residual empregando o microbioma foi de 110,7±10,58, 92,16±5,45, 99,36±10,14 e 101,0±4,24 no decorrer de 7, 14, 21 e 28 dias, respectivamente (Figura 49), (Tabela 18).

Tabela 18 – Concentração residual do esfenvalerato ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) para as reações do microbioma ( $32^\circ\text{C}$  e 7, 14, 21 e 28 dias) sob condições estáticas, realizadas em solo.

Composto	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
PBAc	1,0±0,51	1,63±0,15	0,83±0,30	0,5±0,1
CLAc	0,76±0,49	2,03±0,11	3,63±0,23	4,2±0,65
Esfenvalerato	110,7±10,58	92,16±5,45	99,36±10,14	101,0±4,24

Dessa maneira, a média da concentração residual empregando o fungo QOB-F02 foi de 99,2±8,21, 104,14±9,82, 93,9±4,02 e 78,96±4,81 no decorrer de 7, 14, 21 e 28 dias, respectivamente (Figura 49), (Tabela 19).

Tabela 19 – Concentração residual do esfenvalerato ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) para as reações do isolado fúngico QOB-F02 ( $32^\circ\text{C}$  e 7, 14, 21 e 28 dias) sob condições estáticas, realizadas em solo.

Composto	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
PBAc	$1,03 \pm 0,11$	$1,9 \pm 0,1$	$0,8 \pm 0,5$	$0,36 \pm 0,05$
CLAc	$0,66 \pm 0,15$	$2,06 \pm 0,11$	$3,03 \pm 0,05$	$3,26 \pm 0,11$
Esfenvalerato	$99,2 \pm 8,21$	$104,14 \pm 9,82$	$93,9 \pm 4,02$	$78,96 \pm 4,81$

Foi realizada uma análise de variância (ANOVA) para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre as médias da concentração residual do pesticida esfenvalerato para as reações envolvendo o consórcio bacteriano, o fungo (QOB-F02), o microbioma e o controle abiótico. A referida análise ANOVA foi aplicada de acordo com a variação de dias e de maneira separada, resultando em quatro diferentes testes: ANOVA para 7, 14, 21 e 28 dias.

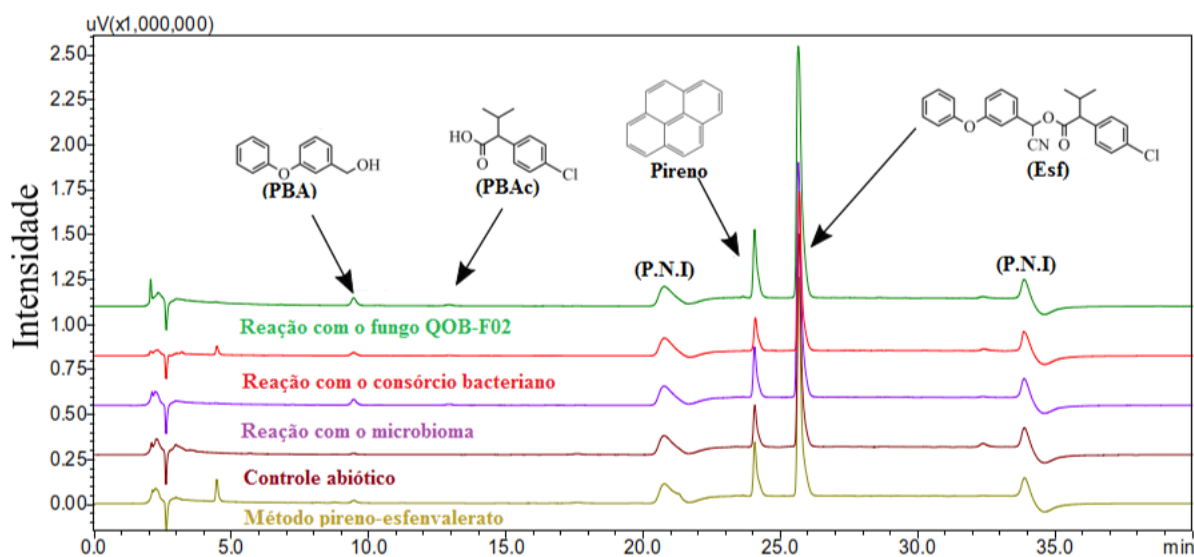
Adicionalmente, no teste ANOVA (BUSSAB W. O.; MORETTIN, 2002) aplicado, na hipótese nula ( $H_0$ ) tomou-se como pressuposto que as médias de todos os tratamentos são iguais entre si, e na hipótese alternativa ( $H_1$ ), assumiu-se que pelo menos um par de médias dentre esses dados eram diferentes entre si.

O teste F calculado, parte que compõe a análise de variâncias ANOVA, foi de 2,1362 e apresentou um  $p$ -valor de 0,1738. Dessa forma, os tratamentos não foram significativamente diferentes para  $p$ -valor igual a 0,05. Portanto, aceita-se a hipótese nula  $H_0$  e concluiu-se que as médias da concentração residual para todas as reações que ocorreram em um período de 7 dias não diferiram entre si. Dessa maneira não foi possível considerar que um tratamento degradou melhor que o outro sistema.

Na figura 50 é possível observar as reações de degradação do pesticida esfenvalerato em solo (7 dias) empregando o isolado fúngico QOB-F02, o consórcio bacteriano, o microbioma e o controle abiótico. É possível observar a presença do pesticida esfenvalerato no tempo de retenção de 25 minutos para todas as reações e o pireno (padrão interno) em 24 minutos. Resquícios dos metabólitos também foram observados (PBAc) e do (CLAc) nos tempos de 9,44 e 13,0 minutos, respectivamente.

O teste F calculado foi de 1,3731 e apresentou um  $p$ -valor de 0,3191. Dessa forma, os tratamentos não foram significativamente diferentes para  $p$ -valor igual a 0,05. Portanto, aceita-se a hipótese nula  $H_0$  e concluiu-se que as médias da concentração residual para todas as reações que ocorreram em um período de 14 dias não diferiram entre si. Dessa maneira não foi possível considerar que um tratamento degradou melhor que outro sistema.

Figura 50 – Cromatogramas (reação/controle/método) obtidos por HPLC para o isolado fúngico QOB-F02, o consórcio bacteriano, microbioma, controle e método na concentração de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  por 7 dias

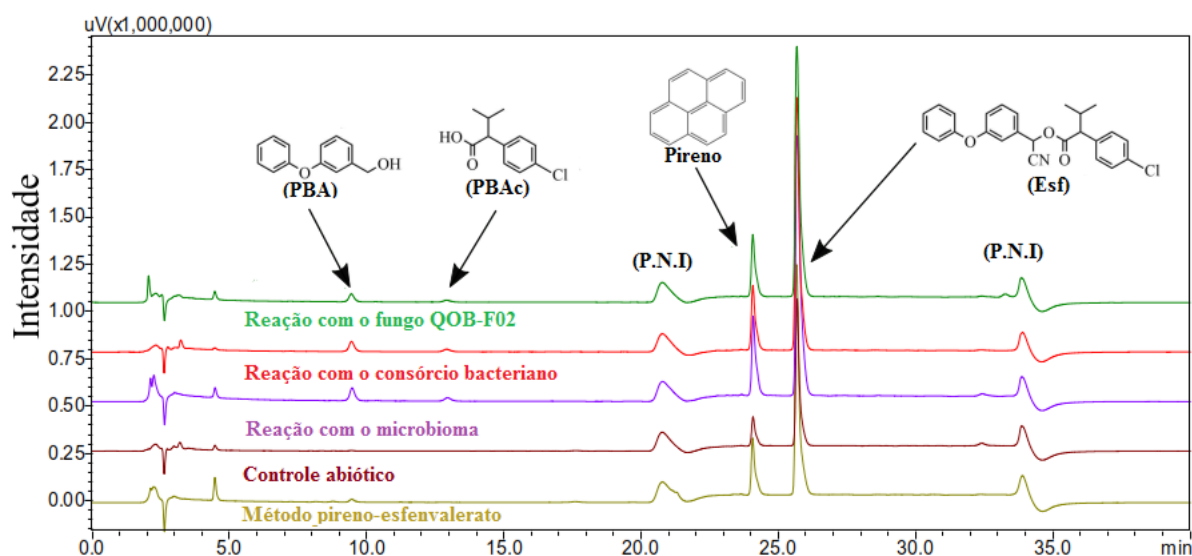


Consórcio bacteriano: QOB-B01, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15.

Na Figura 51 é possível observar as reações de degradação do pesticida esfenvalerato em solo (14 dias) empregando o isolado fúngico QOB-F02, o consórcio bacteriano composto pelos isolados QOB-B01, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15, o microbioma e o controle abiótico.

Foi possível observar a presença do pesticida esfenvalerato no tempo de retenção de 25 minutos para todas as reações e o pireno em 24 minutos. Resquícios dos metabólitos também foram observados (PBAC) e do (CLAc) nos tempos de 9,44 e 13,0 minutos, respectivamente.

Figura 51 – Cromatogramas (reação/controlado/método) obtidos por HPLC para o isolado fúngico QOB-F02, consórcio bacteriano, microbioma, controle e método na concentração de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  por 14 dias



Consórcio bacteriano: QOB-B01, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15.

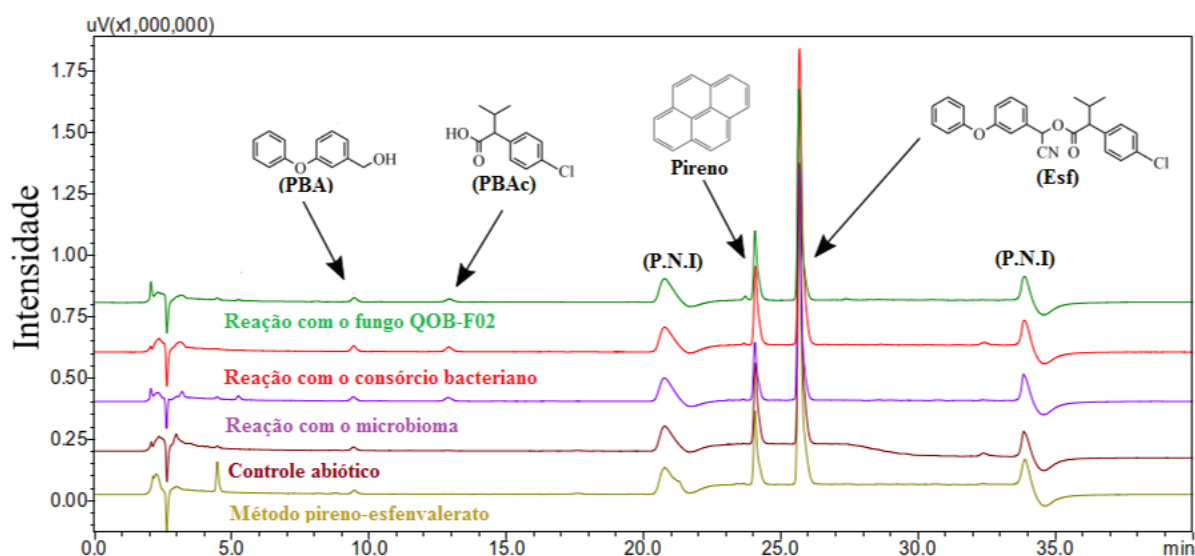
O teste F calculado foi de 2,2795 e apresentou um  $p$ -valor de 0,1695. Dessa forma, os tratamentos não foram significativamente diferentes para  $p$  igual a 0,05. Portanto, aceita-se a hipótese nula  $H_0$  e concluiu-se que as médias da concentração residual para todas as reações que ocorreram em um período de 21 dias não diferiram entre si. Dessa maneira não foi possível considerar que um tratamento degradou melhor que outro.

Na Figura 52 é possível observar as reações de degradação do pesticida esfenvalerato em solo (21 dias) empregando o isolado fúngico QOB-F02, o consórcio bacteriano, o microbioma e o controle abiótico.

É possível observar a presença do pesticida esfenvalerato no tempo de retenção de 25 minutos para todas as reações e o pireno (padrão interno) em 24 minutos. Resquícios dos metabólitos também foram observados (PBAc) e do (CLAc) nos tempos de 9,44 e 13,0 minutos, respectivamente.



Figura 52 – Cromatogramas (reação/controle/método) obtidos por HPLC para o isolado fúngico QOB-F02, consórcio bacteriano, microbioma, controle e método na concentração de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  por 21 dias.



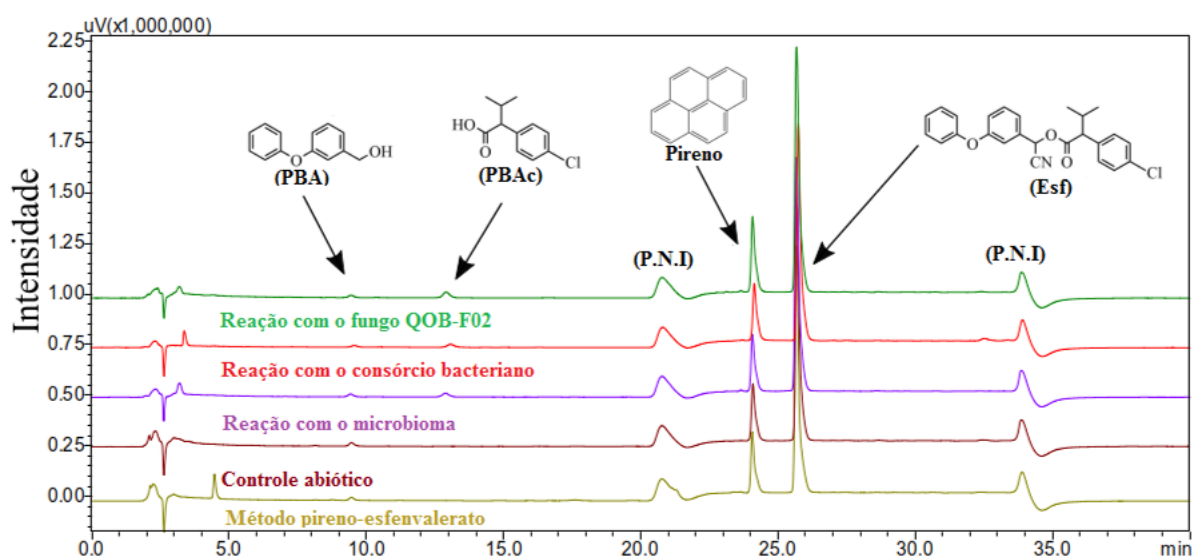
Consórcio bacteriano: QOB-B01, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15.

O teste F calculado foi de 27,1291 e apresentou um  $p$ -valor de 0.0003. Dessa forma, os tratamentos foram significativamente diferentes para  $p$  igual a 0,05. Portanto, rejeita-se a hipótese nula  $H_0$  e concluiu-se que as médias da concentração residual para todas as reações que ocorreram em um período de 28 dias diferiram entre si.

Na Figura 54 é possível observar as reações de degradação do pesticida esfenvalerato em solo (28 dias) empregando o isolado fúngico QOB-F02, o consórcio bacteriano composto pelos isolados QOB-B01, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15, o microbioma e o controle abiótico.

Foi possível observar a presença do pesticida esfenvalerato no tempo de retenção de 25 minutos para todas as reações e o pireno (padrão interno) em 24 minutos. Resquícios dos metabólitos também foram observados (PBAC) e do (CLAc) nos tempos de 9,44 e 13,0 minutos, respectivamente.

Figura 53 – Cromatogramas (reação/control/método) obtidos por HPLC para o isolado fúngico QOB-F02, consórcio bacteriano, microbioma, controle e método na concentração de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  por 28 dias.



Como a hipótese  $H_0$  foi rejeitada sugerindo que pelo menos um par de médias foram diferentes entre as reações que ocorreram em um período de 28 dias, realizou-se um teste de comparações múltiplas (Teste de Tukey (BUSSAB W. O.; MORETTIN, 2002)) para saber quais eram os pares de concentrações residuais que diferiram entre si.

As concentrações residuais após 28 dias dos tratamentos com o controle abiótico *vs* consórcio bacteriano e do controle abiótico *vs* QOB-F02 diferiram entre si pelo teste de Tukey com um nível de significância de 5%. Dessa maneira, tanto o consórcio bacteriano quanto o isolado fúngico QOB-F02 (44%) degradaram o pesticida após os 28 dias de reação mostrando eficiência quando se comparado ao controle abiótico (79%).

Já os tratamentos com o consórcio bacteriano ( $73,93 \pm 2,56$ ) *vs* microbioma ( $101,0 \pm 4,240$ ) e o microbioma ( $101,0 \pm 4,240$ ) *vs* QOB-F02 ( $78,96 \pm 4,81$ ) diferiram entre si com um nível de significância de 1%, enquanto os demais pares foram insignificantes. Dessa maneira, tanto o consórcio bacteriano quanto o isolado fúngico QOB-F02 degradaram o pesticida após os 28 dias de reação mostrando eficiência quando se comparado ao microbioma.

Portanto, ao final dos 28 dias não houve diferença significativa entre a degradação do consórcio bacteriano com o isolado fúngico QOB-F02 que degradaram em média 26% e 21%, respectivamente. Assim, foi possível constatar que os dois tratamentos degradaram de forma semelhantes o pesticida esfenvalerato e que seus resultados de biodegradação foram melhores do que quando se comparados aos do controle abiótico (7%) e ao microbioma (0%), (Tabela 20).

Tabela 20 – Resultado do teste de Tukey para análise da diferença na média da concentração residual dos pares de tratamentos frente a degradação do pesticida esfenvalerato.

Tratamentos	Q (HSD)	<i>p</i> -valor	Inferência
C.A <i>vs</i> C.B	6,6509	0,0091636	* $p < 0.05$
C.A <i>vs</i> MB	3,2195	0,1928681	Não significativo
C.A <i>vs</i> QOB-F02	5,8170	0,0182814	* $p < 0.05$
C.B <i>vs</i> MB	11,0354	0,0010053	* $p < 0.01$
C.B <i>vs</i> QOB-F02	0,9324	0,8999947	Não significativo
MB <i>vs</i> QOB-F02	10,1031	0,0010053	* $p < 0.01$

Q (HSD)= Diferença Honestamente Significante do teste de Tukey (Q); *p*-valor= probabilidade de significância. Controle abiótico (C.A); Microbioma (MB); Isolado fúngico (QOB-F02) e Consórcio bacteriano (C.B).

A degradação do pesticida esfenvalerato em meio líquido ocorreu de forma mais rápida e eficiente do que em solo, isso pode estar relacionado ao fato de que no solo as reações foram realizadas modo estático e também porque o pesticida pode ter sido adsorvido pelas partículas do solo diminuindo a sua disponibilidade tornando-a mais lenta (TAKESHITA *et al.*, 2019).

Assim como em meio líquido, alguns microrganismos podem ter liberado maiores quantidades de biosurfactantes, de proteínas que podem ter contribuído para a degradação diminuindo a tensão superficial entre a fase aquosa e a fase orgânica aumentando assim a interação das moléculas complexas. Além do pesticida esfenvalerato estar mais disponível para ser absorvido (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

Um fato importante deste experimento em solo é que foi possível constatar que após 28 dias de reação obteve-se em média 26% (consórcio bacteriano) e 21% (isolado fúngico QOB-F02) de degradação da concentração inicial ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) do pesticida esfenvalerato.

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram os dados encontrados na literatura que estimam que o tempo de meia vida do pesticida esfenvalerato em solo é de 90 dias (ROS *et al.*, 2005; SOUZA *et al.*, 2004). Uma vez que a degradação do composto foi significativa após 28 dias de reação e apresentou uma média de degradação de 21-26% da concentração inicial do pesticida ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

Os resultados demonstraram que no solo a biodegradação ocorreu mais lentamente, podendo ser observado um resultado significativo somente após 28 dias de reação. Dessa maneira, na ausência do emprego dos microrganismos previamente selecionados em labora-

tório não houve sequer a degradação do pesticida esfenvalerato ressaltando a importância da seleção prévia de microrganismos com potencial biodegradador para serem usados como ferramentas como a que foi empregada neste estudo a de bioaugmentação a fim de minimizar os impactos ambientais causados pela ação antrópica.

## 5.8 Identificação por CG-EM de metabólitos encontrados nas reações dos experimentos de degradação do pesticida esfenvalerato em meio líquido com os microrganismos isolados do solo

Os compostos foram identificados qualitativamente por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM). Foram descritos os compostos com similaridades igual ou superior a 80% de acordo com as bibliotecas NIST05, NIST11, NIST107 e WILLEY8.

As análises foram realizadas no CG-EM da marca Shimadzu, modelo GC-2010 plus acoplado a um injetor automático AOC-5000 e a um detector de massas MS2010 plus com impacto de elétrons (IE, 70 eV). O gás utilizado para realizar as análises foi o hélio com vazão de  $(0,76 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1})$  e pressão 38,4 kPa, temperatura do injetor de 250°C, temperatura inicial da coluna de 60°C e final de 250°C. O tempo total de análise foi de 45 min, injetando-se 1  $\mu\text{L}$  com razão de divisão de fluxo 5,0. A temperatura da fonte de íon foi de 200°C e a da interface de 270°C. O monitoramento dos íons ocorreu entre 4 a 45 min na faixa de  $m/z$  40 a 500.

### 5.8.1 Reações com as bactérias em meio líquido de caldo nutriente

Alguns compostos foram observados nas reações empregando as bactérias isoladas do solo na presença e/ou na ausência do pesticida esfenvalerato.

O composto bioativo pirrol[1,2-a] pirazina-1,4-diona, hexa-hidro-3-(2-metilpropil) (Figura 54), foi observado nas reações com as bactérias *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15, no consórcio bacteriano e no controle de recuperação (Tabela 20). Essa mesma substância já foi isolada de espécies de bactérias marinhas *Bacillus tequilensis* e possui ação antibiótica no controle de bactérias multirresistentes como a *Staphylococcus aureus* (KIRAN *et al.*, 2018).

A anel pirazina (Figura 54), é um composto orgânico heterocíclico, aromático, nitrogenado, volátil comumente encontrado em plantas, fungos, bactérias e insetos. Essa substância age através da liberação de odores para repelir os predadores. Algumas bactérias em que foram observadas a produção das pirazinas foram *Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp., *Chondromyces* sp. e *Streptomyces* sp. (MORTZFELD *et al.*, 2020).

O  $\beta$ -sitosterol ou estigmasterol foi encontrado nas reações com as bactérias *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09) e no controle de recuperação (Figura 54). O composto é um fitoesteróide encontrado comumente em plantas e em microrganismos. Possui propriedades medicinais sendo empregado no tratamento de incontinência urinária e da hiperplasia benigna de próstata. Adicionalmente também possui ação como regulador de glicose devido a sua atividade anti-diabética (SUJATHA *et al.*, 2010; SANTOS, 2010).

Microrganismos endofíticos que vivem em associação com algumas plantas adquiriram por recombinação gênica durante o seu processo de evolução a capacidade de sintetizar metabólitos semelhantes ou iguais à planta hospedeira. Dessa maneira, podem ter biosintetizado o  $\beta$ -sitosterol como estratégia de sobrevivência no consórcio microbiano para inibir outros microrganismos (ZHANG; SONG; TAN, 2006). O esfenvalerato, composto alvo neste estudo de biodegradação pode ser observado em todas as reações, exceto nos controles abióticos, confirmando assim a sua adição intencional nos experimentos.

Nas reações de biodegradação foram encontrados diferentes tipos de ácidos carboxílicos, como por exemplo o ácido octadecanóico encontrado nas reações com a bactéria QOB-B15 e no controle abiótico (Figura 54). O ácido heptadecanóico encontrado nas reações com as bactérias *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15 (Figura 54), dentre outros, que podem ser metabólitos produzidos e liberados pelas próprias bactérias no meio reacional.

Tabela 21 – Metabólitos identificados por CG-EM (IE, 70 eV) nas reações de biodegradação do esfenvalerato com as bactérias isoladas do solo.

Composto	Biblioteca	Similaridade (%)	Tempo de retenção (min)	Isolado bacteriano
Estigmasterol	WILLEY8	80	38,8	<i>QOB – B09<sup>a</sup></i>
Esfenvalerato	NIST05	93	41,4	
Pirrol	NIST05	81	27,5	<i>QOB – B03<sup>a</sup></i>
Estigmasterol	WILLEY8	80	38,8	
Esfenvalerato	NIST05	93	41,4	
Pirrol	NIST07	81	27,5	<i>QOB – B14<sup>a</sup></i>
Esfenvalerato	NIST05	93	41,4	
Pirrol	NIST07	86	27,5	<i>QOB – B15<sup>a</sup></i>
Ácido octadecanóico, metil éster	WILLEY8	95	30,32	
Esfenvalerato	NIST05	93	41,4	
Ácido hexadecanóico, metil éster	WILLEY8	90	27,2	CR
Estigmasterol	WILLEY8	80	38,8	
Esfenvalerato	NIST05	93	41,4	
Ácido heptadecanóico	NIST08	83	30,3	<i>QOB – B14<sup>b</sup></i>
9-Ácido oxadecanóico, metil éster	WILLEY8	90	27,2	<i>QOB – B09<sup>b</sup></i>
Pirrol	NIST107	83	27,5	<i>QOB – B03<sup>b</sup></i>
9-Ácido oxadecanóico, metil éster	WILLEY8	90	27,2	<i>CB<sup>a</sup></i>
Pirrol	NIST105	81	30,0	
Esfenvalerato	NIST05	93	41,4	
9-Ácido oxadecanóico, metil éster	WILLEY8	90	27,2	<i>CB<sup>b</sup></i>
Pirrol	NIST105	81	30,0	
Ácido hexadecanóico, metil éster	WILLEY8	83	27,1	CA
Ácido octadecanóico, metil éster	WILLEY8	95	30,32	
Esfenvalerato	NIST05	93	41,4	
Ácido hexadecanóico, metil éster	WILLEY8	83	27,1	CM
Esfenvalerato	NIST05	93	41,4	
Pirrol	NIST05	81	27,5	<i>QOB – B15<sup>b</sup></i>
Estigmasterol	WILLEY8	80	38,8	
Ácido hexadecanóico, metil éster	WILLEY8	90	27,2	

CA: Controle abiótico;

CB: Consórcio bacteriano;

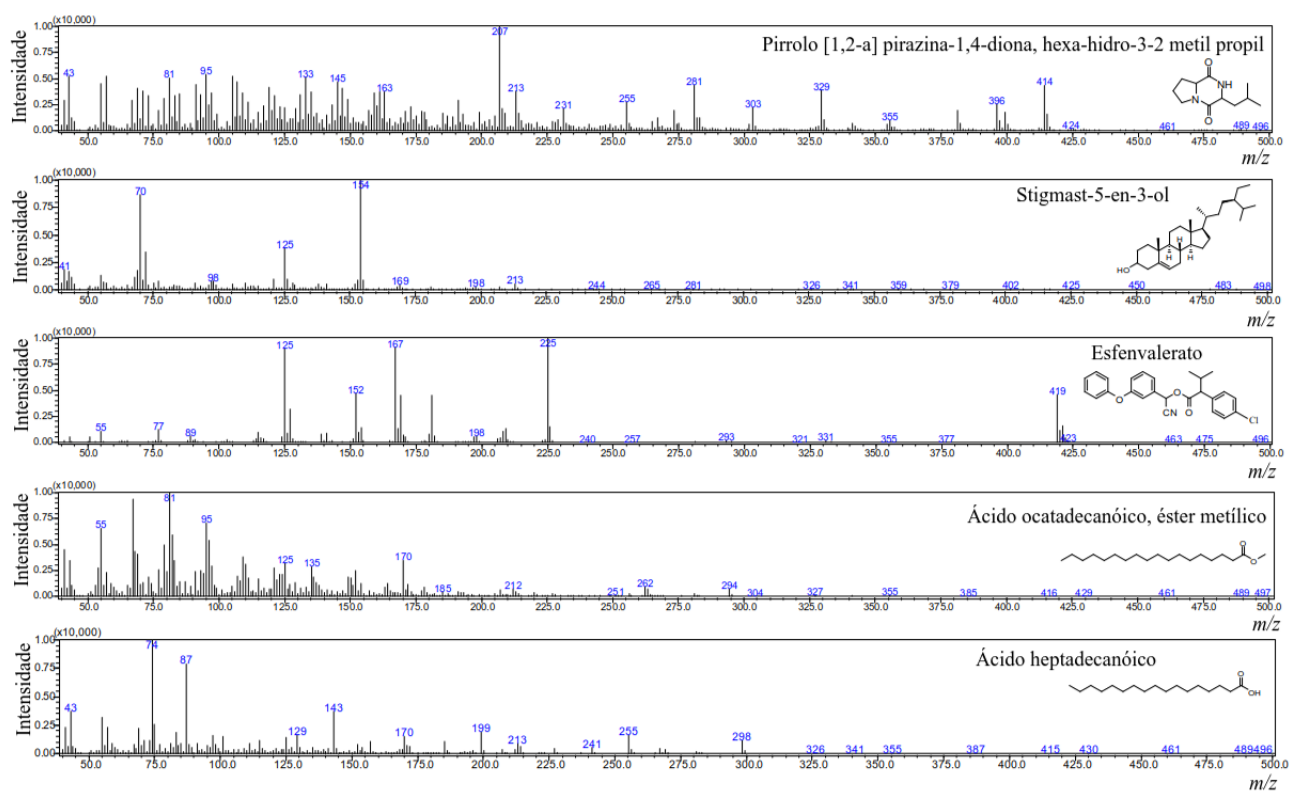
CM: Controle de células mortas;

CR: Controle de recuperação;

a: Reação na presença do esfenvalerato;

b: Reação na ausência do esfenvalerato;

Figura 54 – Espectro de massas CG-EM (IE, 70 eV) obtidos para alguns metabólitos identificados frente às reações de biodegradação do esfenvalerato com as bactérias e os seus respectivos controles.



### 5.8.2 Reações com os fungos em meio líquido de malte 2%

Alguns metabólitos observados nas reações fúngicas foram os mesmos encontrados e descritos para as bactérias como o estigmasterol, o esfenvalerato e o ácido heptadecanóico. Nas reações empregando os isolados fúngicos surgiram novos metabólitos como por exemplo o 3-fenoxibenzaldeído (Figura 55) que é um possível produto da degradação do pesticida esfenvalerato. A detecção do 3-fenoxibenzaldeído ocorreu para as três reações realizadas, ou seja, com o consórcio fúngico, o isolado QOB-F02 e o controle de recuperação (Tabela 22).

O ácido 3-furanacético ou 4-hexil-2,5-di-hidro-2,5-dioxo (Figura 55) foi encontrado nas reações do controle do consórcio fúngico na ausência do pesticida esfenvalerato (Tabela 22). Estudos na literatura descreveram que esse metabólito pode ser produzido por fungos do gênero *Aspergillus* e que possui propriedades antifúngicas capazes de inibir o crescimento de demais fungos como já foi observado em *Neurospora crassa* além de modificar as suas hifas (KOCH *et al.*, 2014). Isso evidencia uma possível competição entre os microrganismos no consórcio fúngico, uma vez que o metabólito excretado no meio pode inibir o crescimento dos demais fungos e funcionaria como um mecanismo de defesa antifúngico.

Dentre os compostos identificados destacam-se os ácidos hexadecanóico (Figura 55) e o octadecanóico (Figura 55). O ácido hexadecanóico foi detectado nas reações com o consórcio fúngico com pesticida e nas reações empregando os fungos QOB-F02 e *Penicillium* sp. QOB-F05 (Tabela 22).

O ácido octadecanóico foi encontrado no controle do consórcio fúngico na ausência do pesticida esfenvalerato (Tabela 22). Estudos na literatura demonstraram que ambos os compostos podem ser encontrados em extratos de *Beauveria bassiana* e que possuem atividade antibacteriana (FELISBINO, 2019).



Tabela 22 – Metabólitos identificados por CG-EM (IE, 70 eV) nas reações com o consórcio fúngico na presença do esfenvalerato.

Composto	Biblioteca	Similaridade (%)	Tempo de retenção (min)	Isolado bacteriano
3-Fenoxibenzaldeído	WILLEY8	80	23,8	
Ácido hexadecanóico, metil éster	WILLEY8	88	27,12	CF <sup>a</sup>
Esfenvalerato	NIST107	92	41,4	
Ácido 3-furanacético, 4-hexil-2,5-di-hidro-2,5-dioxo	NIST05	87	18,9	
Ácido octadecanóico, metil éster	NIST05	92	30,2	CF <sup>b</sup>
Estigmasterol	WILLEY8	80	38,8	
Ácido eicosanóico, metil éster	NIST21	84	27,1	
Estigmasterol	WILLEY8	80	38,8	QOB – F01 <sup>c,a</sup>
Esfenvalerato	NIST107	92	41,4	
Estigmasterol	WILLEY8	80	38,8	QOB – F04 <sup>a</sup>
Esfenvalerato	NIST107	92	41,4	
Esfenvalerato	NIST05	93	41,4	QOB – F05 <sup>a</sup>
3- Fenoxibenzaldeído	WILLEY8	80	23,8	
Ácido hexadecanóico, metil éster	WILLEY8	88	27,12	QOB – F02 <sup>a</sup>
Esfenvalerato	NIST107	92	41,4	
Ácido hexadecanóico, metil éster	WILLEY8	88	27,12	QOB – F05 <sup>b</sup>
Estigmasterol	WILLEY8	80	38,8	
Ácido heptadecanóico10-metil, metil éster	NIST105	85	30,32	QOB – F04 <sup>b</sup>
Esfenvalerato	NIST107	92	42,0	CA
3-Fenoxibenzaldeído	WILLEY8	80	23,8	
Estigmasterol	WILLEY8	80	39,8	CR
Esfenvalerato	NIST107	92	42,0	
Ácido hexadecanóico, metil éster	WILLEY8	83	27,1	CM
Esfenvalerato	NIST05	93	41,4	
Pirrol	NIST05	81	27,5	
Estigmasterol	WILLEY8	80	38,8	QOB-B02

CA: Controle abiótico;

CF: Consórcio fúngico;

CM: Controle de células mortas;

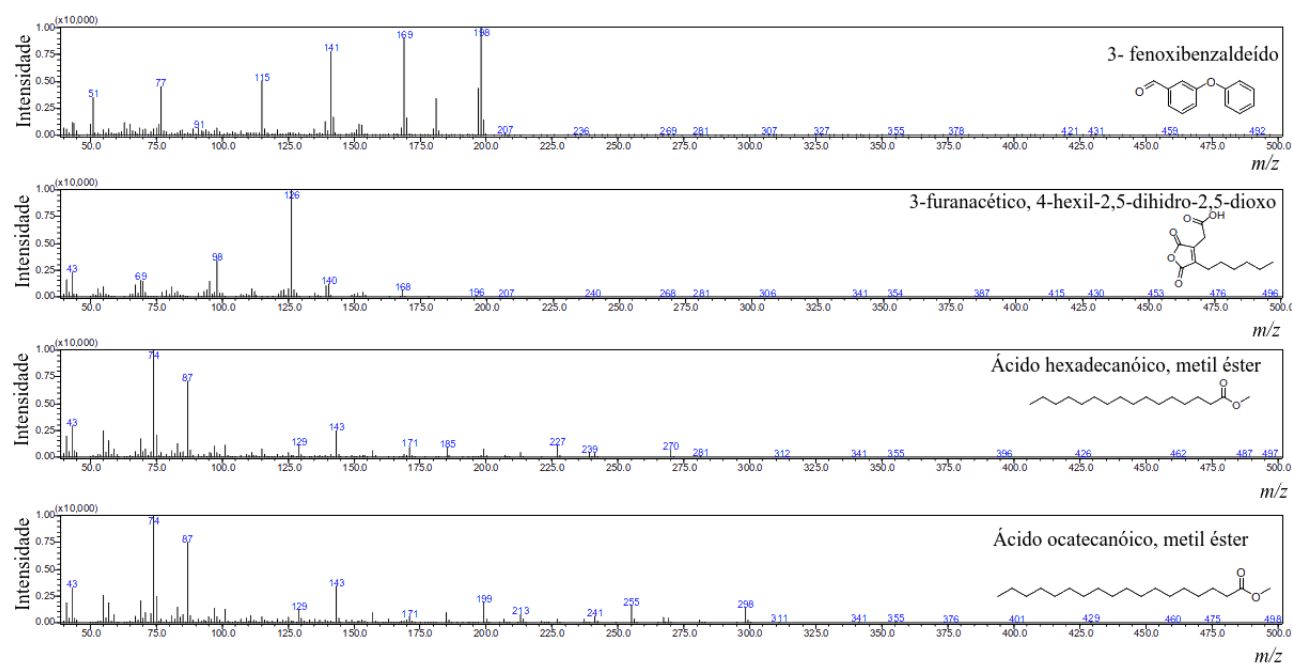
CR: Controle de recuperação;

a: Reação na presença do esfenvalerato;

b: Reação na ausência do esfenvalerato;

<sup>c</sup>Não foi detectado nenhum metabólito nas reações com o fungo QOB-F01 na ausência do esfenvalerato;

Figura 55 – Espectro de massas CG-EM (IE, 70 eV) obtidos para alguns metabólitos identificados frente às reações de biodegradação do esfenvalerato com fungos e os seus respectivos controles.



## 5.9 Identificação por CG-EM do pireno e do esfenvalerato remanescente nas reações de degradação do pesticida esfenvalerato em solo

Assim, foram identificados nas reações de biodegradação do esfenvalerato em solo, o pireno (padrão interno), e o esfenvalerato remanescente (Figura 56).

O pireno foi detectado nas análises das reações empregando o consórcio bacteriano, o fungo QOB-F02, o microbioma e o controle abiótico (Tabela 23). Este foi adicionado durante a etapa da extração para a quantificação dos analitos de interesse.

Tabela 23 – Compostos identificados por CG-EM (IE, 70 eV) para as reações de biodegradação realizadas no solo.

Composto	Biblioteca	Similaridade (%)	Tempo de retenção (min)	Isolado bacteriano
Pireno	NIST05	96	30,5	<i>QOB – F02<sup>a</sup></i>
Esfenvalerato	NIST05	93	41,4	
Pireno	NIST05	96	30,5	<i>CB<sup>a</sup></i>
Esfenvalerato	NIST05	93	41,4	
Pireno	NIST05	96	305	<i>MB<sup>a</sup></i>
Esfenvalerato	NIST05	93	41,4	
Pireno	NIST05	96	30,5	<i>CA<sup>a</sup></i>
Esfenvalerato	NIST05	93	41,4	

QOB-F02: Fungo 02;

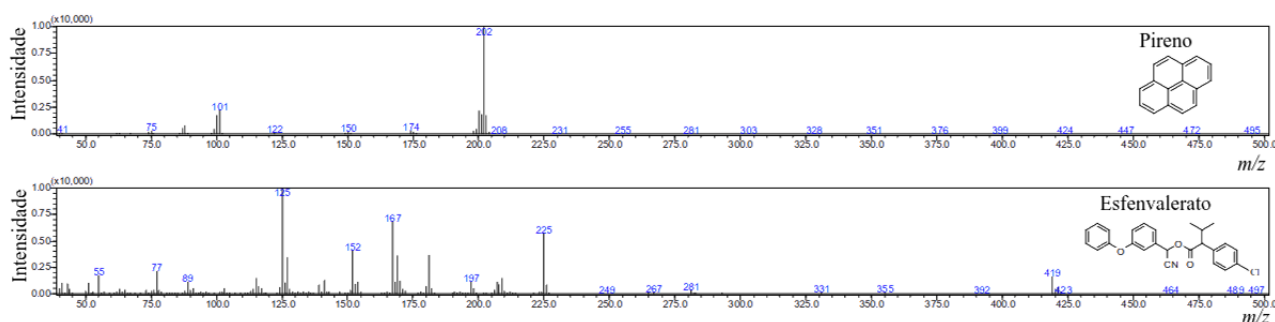
CA: controle abiótico;

CB: Consórcio Bacteriano;

MB: Microbioma;

<sup>a</sup>presença de esfenvalerato.

Figura 56 – Espectro de massas CG-EM (IE, 70 eV) obtidos para o pireno (padrão interno) e para o esfenvalerato.



### 5.10 Proposta de rota metabólica para o pesticida esfenvalerato

O pesticida esfenvalerato é uma molécula estável, apolar, insolúvel em água sendo considerada tóxica para os seres vivos. Dessa maneira, os microrganismos não conseguem degradar a molécula diretamente dentro do seu organismo. Como uma estratégia de contornar essa toxicidade, as enzimas extracelulares como exemplo as carboxilesterases são liberadas no meio e participam das reações que fazem a quebra da molécula inicial em outras menos tóxicas às células.

O caminho metabólico que o esfenvalerato pode percorrer envolve inicialmente a hidrólise da ligação éster dos ésteres carboxílicos por ação das enzimas carboxilesterases o qual pode originar um ácido carboxílico e um álcool correspondente, formando primeiramente o ácido 2-(4-clorofenil)-3-metilbutanoico e o 2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil) acetonitrila (não detectado).

Posteriormente, o composto 2-hidroxi-2-(3-fenoxifenil) acetonitrila (não detectado) que ainda possui em sua estrutura o grupo alfa-ciano (CN) que é tóxico às células, pode ser convertido por ação das oxinitrilases em seu aldeído correspondente o 3-fenoxibenzaldeído (PBAlD) havendo a liberação do íon cianeto.

O 3-fenoxibenzaldeído pode ser oxidado a um ácido carboxílico o ácido 3-fenoxibenzoico, por uma reação de oxidação pela ação de uma aldeído desidrogenase.

O ácido 3-fenoxibenzaldeído pode ser convertido por uma reação de redução pela ação de uma aldeído redutase a um álcool 3-fenoxibenzílico.

O ácido 3-fenoxibenzoico pode ser convertido em fenol e/ou em ácido protocatecólico que são capazes de serem transformados nos intermediários do Ciclo de Krebs e resultar na formação de  $CO_2$  e  $H_2O$ , ocasionando assim a mineralização da molécula do pesticida esfenvalerato.

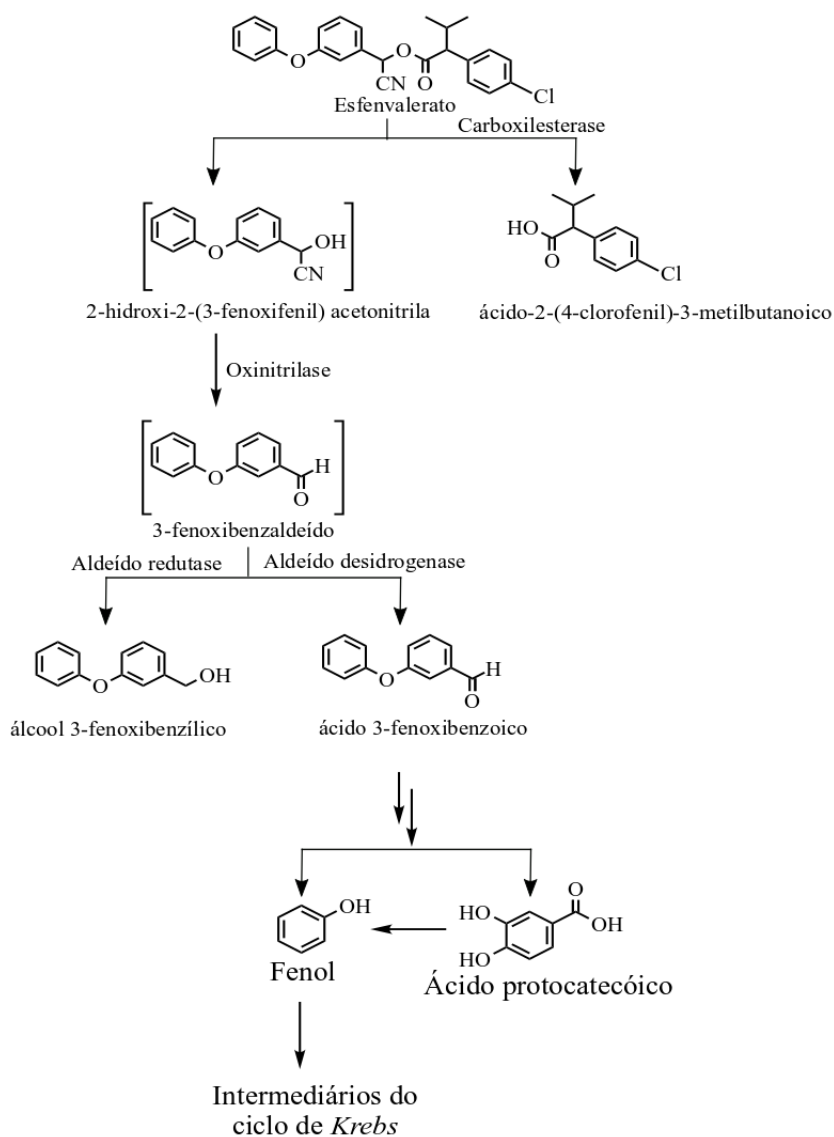
O ácido 3,4-di-hidroxibenzoico também conhecido como ácido protocatecólico pode

---

ser convertido no intermediário (*Z*)-but-3-eno-1,2,4-tricarboxílico, enquanto o fenol pode ser transformado no ácido (2 (*Z*),4 (*Z*))-hexa-2,4-dienodioico (TALLUR; MEGADI; NINNEKAR, 2008).

Como no presente estudo foi encontrado o ácido 3-fenoxibenzoico é provável que esteja ocorrendo a mineralização da molécula do esfenvalerato, principalmente nas reações que ocorreram em meio líquido Caldo Nutriente em que o consórcio composto pelos isolados (QOB-B01, QOB-B02, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15) foi capaz de degradar >99% da concentração inicial do pesticida ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ) em 5 dias e a bactéria *Cupriavidus* sp. (QOB-B09) que sozinha degradou em média 85% da mesma concentração do pesticida. Dessa maneira, novos estudos podem ajudar a confirmar se está havendo a mineralização da molécula do pesticida esfenvalerato. Desta forma, através dos metabólitos identificados nas análises por HPLC foi possível propor a mesma rota de biodegradação do esfenvalerato com os microrganismos isolados do solo, de acordo com Birolli *et al.* (2016), (Figura 57).

Figura 57 – Proposta de degradação do esfenvalerato.



## 6 CONCLUSÃO

O isolamento e a seleção de microrganismos com potencial de biodegradação são importantes pois, nem todos os microrganismos conseguem crescer e degradar os xenobióticos.

Neste trabalho a etapa do *Screening* teve uma importante função na seleção dos melhores microrganismos. Ao todo foram 22 microrganismos isolados do solo, incluindo 16 bactérias e 6 fungos que foram capazes de crescerem na presença de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  do pesticida em meio de cultivo de batata-dextrose-agar). Dentre esses microrganismos, apenas alguns isolados conseguiram apresentar um bom desempenho na degradação do pesticida.

Dessa forma foram escolhidos os 4 melhores isolados bacterianos que foram avaliados quanto a degradação do pesticida esfenvalerato o *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), o *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), o *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15 e os 4 melhores fungos o *Rhizopus* sp. (QOB-B01), o (QOB-B02), o (QOB-B03) e o *Penicillium* sp. (QOB-B05) que degradaram em média (59%), (85%) (60%), (72%), (31%), (44%), (49%) e (79%), respectivamente. As reações foram realizadas em meio líquido de Caldo Nutriente para as bactérias (32 °C, 130 rpm, 5 dias) ou em meio líquido de Malte 2 % para os fungos (32°C, 130 rpm, 7 dias).

Posteriormente, foi realizada uma nova seleção em que foram empregados os dois melhores isolados o melhor fungo QOB-F02 e a bactéria *Cupriavidus* sp. (QOB-B09) para serem avaliados quanto ao seu potencial de biodegradação em 100, 200, 300, 400 e 500  $\text{mg.L}^{-1}$  do pesticida esfenvalerato. Dos quais degradaram em média 44%, 50%, 29%, 45%, 28%, 85%, 37%, 39%, 22% e 11% da concentração inicial do pesticida, respectivamente. As reações foram realizadas em meio líquido de Caldo Nutriente (32°C, 130 rpm, 5 dias) ou em meio líquido de Malte 2% (32°C, 130 rpm, 7 dias). Um consórcio fúngico também foi realizado com os fungos *Rhizopus* sp. (QOB-B01), (QOB-F02), (QOB-F03) e *Penicillium* sp. (QOB-F05) e foram avaliados quanto ao seu potencial de biodegradação em 100, 200, 300, 400 e 500  $\text{mg.L}^{-1}$  do pesticida esfenvalerato. Dos quais degradaram 41%, 31%, 19%, 6% e 13% da concentração inicial do pesticida, respectivamente. As reações foram realizadas em meio líquido de Malte 2% (32°C, 130 rpm, 7 dias).

Um consórcio bacteriano foi realizado com as bactérias e também foram avaliados quanto ao seu potencial de biodegradação em 100, 200, 300, 400 e 500  $\text{mg.L}^{-1}$  do pesticida esfenvalerato. Dos quais degradaram 99%, 77%, 76%, 74% e 70%, respectivamente. As reações foram realizadas em meio líquido de Caldo Nutriente (32°C, 130 rpm, 5 dias). Consórcios microbianos podem ser mais efetivos do que um único microrganismo na degradação do pesticida esfenvalerato. O isolado bacteriano conseguiu crescer e degradar

---

em meio líquido de Caldo Nutriente uma média 99% da concentração inicial do pesticida ( $100 \text{ mg.L}^{-1}$ ), enquanto que a melhor bactéria *Cupriavidus* sp. QOB-09 degradou em média 87%.

A aplicação de diferentes concentrações do pesticida esfenvalerato pode influenciar na sua degradabilidade. O aumento da concentração do pesticida esfenvalerato apresentou uma correlação negativa com a capacidade de degradação da molécula. Isso significou que conforme aumentou-se a concentração do pesticida esfenvalerato a tendência foi de uma redução na degradação.

Após investigarem os microrganismos quanto ao seu potencial de biodegradação em meio líquido. O consórcio bacteriano e o consórcio fúngico foram selecionados para serem investigados quanto ao potencial de biodegradação do pesticida esfenvalerato em solo que foi contrastado com o potencial de biodegradação do microbioma (que inclui os microrganismos não selecionados que fazem parte da própria amostra de solo) e com o controle abiótico (ausência de microrganismos). As análises em solo foram realizadas por um período de 7, 14, 21 e 28 dias e foi possível concluir através de análises estatísticas que a degradação do pesticida esfenvalerato ocorreu após o período de 28 dias da reação. E que o consórcio bacteriano também foi considerado o melhor tratamento para as reações realizadas no solo (26%), contra as reações empregando o fungo QOB-F02 (21%), podendo ser uma alternativa eficiente para a biorremediação de solos contaminados com o piretróide.

A partir dos resultados obtidos foi possível obter os produtos de degradação da molécula do pesticida esfenvalerato, o PBA, o PBAC, CLAc e o PBald e assim propor uma rota metabólica.



## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo forneceu indícios de que é possível acelerar a degradação do pesticida esfenvalerato em solo através da bioaumentação empregando o isolado fúngico (QOB-F02) e o consórcio bacteriano. Esta alternativa pode ser viável na descontaminação e na desintoxicação de solos contaminados com o piretróide.

As chances de alcançar um bom desempenho na degradação de moléculas complexas aumentam quando existe uma seleção prévia dos potenciais microrganismos degradadores. Uma vez que, a degradação do pesticida foi afetada significativamente pela linhagem microbiana e pelo tratamento empregado.

Portanto, novas pesquisas podem ajudar a elucidar quais são as enzimas que estão atuando na degradação do esfenvalerato e confirmar se esses microrganismos estão mineralizando a molécula em  $CO_2$  e  $H_2O$  ou se apenas está utilizando no cometabolismo.

Estudos de biorremediação *in situ* também são importantes ferramentas para entender se esses microrganismos são capazes de degradar o agente contaminante no próprio local em que houve a contaminação. Se confirmada a eficácia desses microrganismos em metabolizar o pesticida em condições naturais, esses podem ser úteis tanto para a recuperação de áreas degradadas quanto para a redução do período de carência, problema enfrentado pelos agricultores para o plantio de um novo cultivar no solo.

## REFERÊNCIAS

- ABATENH E; GIZAW, B. T. Z. W. M. The role of microorganisms in bioremediation - a review. **Open Journal of Environmental Biology**, Peertechz Publications Private Limited, v. 2, n. 1, p. 038–046, nov. 2017. Acesso em: 10 set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.17352/ojeb.000007>.
- ADAMS, G.; TAWARI-FUFUYIN, P.; OKORO, S.; EHINOMEN, I. Bioremediation, biostimulation and bioaugmentation: A review. **International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation**, v. 3, p. 28–39, 03 2015.
- AGRICULTURA, M. **Mapa registra 22 defensivos agrícolas genéricos, incluindo produtos biológicos**. 2020. Acessado em 20 de maio de 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/noticias/mapa-registra-22-defensivos-agricolas-genericos-com-produtos-biologicos>.
- ALBERTS, B.; TRADUTORES, V. **Biologia Molecular Da Célula**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017. ISBN 9788582714225.
- ALBUQUERQUE, M. A.; SCHAEFER, C. E. G. R.; FOLONI, J. M.; KER, J. C.; FONTES, L. E. F. Mineralização e sorção de atrazina em latossolo roxo sob cultivo convencional e plantio direto. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, scielo, v. 25, p. 179 – 188, 03 2001. ISSN 0100-0683. Acesso em: 15 jul. 2020. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-06832001000100019&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-06832001000100019&nrm=iso).
- ALMEIDA, G. A. M. de; NETA, M. dos R. A. A. V.; SILVA, G. F. da; PRADO, P. F. do; ALMEIDA, M. A. A. de; DUARTE, I. C. S. Produção de biosurfactante por *Lysinibacillus* sp. e *Bacillus* sp. a partir de diferentes óleos como fonte de carbono. **Matéria (Rio de Janeiro)**, scielo, v. 25, 00 2020. ISSN 1517-7076. Acesso em: 17 mar. 2020. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1517-70762020000400309&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-70762020000400309&nrm=iso).
- ANJOS, C. S. D. **Biodegradação dos pesticidas esfenvalerato, espiroclifeno, tiametoxam e imidacloprido por linhagens bacterianas isoladas do cerradoreflorestado e citricultura da laranja**. 2018. Tese (dissertation) — Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018., 2018.
- ANJOS, C. S. d.; BIROLI, W. G.; PORTO, A. L. M. Biodegradation of the Pyrethroid Pesticide Esfenvalerate by a Bacterial Consortium Isolated from Brazilian Savannah. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, scielo, v. 31, p. 1654 – 1660, 08 2020. ISSN 0103-5053. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-50532020000801654&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532020000801654&nrm=iso).
- ARAÚJO, A.; MONTEIRO, R.; CARVALHO, E. Effect of composted textile sludge on growth, nodulation and nitrogen fixation of soybean and cowpea. **Bioresource Technology**, Elsevier BV, v. 98, n. 5, p. 1028–1032, mar. 2007. Acesso em: 15 jun. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.04.028>.
- ARRUDA M. R.; MOREIRA, A. P. J. D. **Amostragem e cuidados na coleta de solo para fins de fertilidade**. Embrapa Amazônia Ocidental-Documentos.

(INFOTECA-E), 2014. Acessado em 04 de fevereiro 2021. Disponível em: <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/117075/1/Doc115.pdf>.

ATASHGAHI, S.; SÁNCHEZ-ANDREA, I.; HEIPIEPER, H. J.; MEER, J. R. van der; STAMS, A. J. M.; SMIDT, H. Prospects for harnessing biocide resistance for bioremediation and detoxification. **Science**, American Association for the Advancement of Science (AAAS), v. 360, n. 6390, p. 743–746, maio 2018. Acesso em: 23 dez. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.aar3778>.

AZUBUIKE, C. C.; CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 32, n. 11, set. 2016. Acesso em: 20 jul. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>.

BAMFORTH, S. M.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 80, n. 7, p. 723–736, 2005. Acesso em: 28 jun. 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jctb.1276>.

BARBOSA, D.; CRUPINSKI, E.; SILVEIRA, R.; LIMBERGER, D. As abelhas e seu serviço ecossistêmico de polinização. **Revista Eletrônica Científica da UERGS**, v. 3, p. 694, 12 2017.

BARIANI, M. H.; ROCHA, N. S. Residues of pyrethroids in the adipose tissue adjacent to spontaneous mammary carcinoma in female dogs. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, v. 8, p. 3–17, 2010.

BETTIOL, W. Biopesticide use and research in brazil. *Outlooks on Pest Management*, v. 22, n. 6, p. 280–283, 2011.

BIORENDER, S. **Software Biorender**. 2021. Acessado em 1 de março de 2021. Disponível em: <https://biorender.com/>.

BIROLI, W. G.; ALVARENGA, N.; SELEGHIM, M. H. R.; PORTO, A. L. M. Biodegradation of the pyrethroid pesticide esfenvalerate by marine-derived fungi. **Marine Biotechnology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 18, n. 4, p. 511–520, jul. 2016. Acesso em: 15 abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10126-016-9710-z>.

BIROLI, W. G.; LIMA, R. N.; PORTO, A. L. M. Applications of marine-derived microorganisms and their enzymes in biocatalysis and biotransformation, the underexplored potentials. **Frontiers in Microbiology**, Frontiers Media SA, v. 10, ago. 2019. Acesso em 10 mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01453>.

BOMBARDI, L. M. **Geografia do uso de agrotóxicos no Brasil e conexões com a União Europeia**. São Paulo: FFLCH–USP, 2017.

BONORA, M.; PATERGNANI, S.; RIMESSI, A.; MARCHI, E. D.; SUSKI, J. M.; BONONI, A.; GIORGI, C.; MARCHI, S.; MISSIROLI, S.; POLETTI, F.; WIECKOWSKI, M. R.; PINTON, P. ATP synthesis and storage. **Purinergic Signalling**, Springer Science and Business Media LLC, v. 8, n. 3, p. 343–357, abr. 2012. Acesso em 10 abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11302-012-9305-8>.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 63–67, 08 2000.

BRADBERRY, S. M.; CAGE, S. A.; PROUDFOOT, A. T.; VALE, J. A. Poisoning due to pyrethroids. **Toxicological Reviews**, Springer Science and Business Media LLC, v. 24, n. 2, p. 93–106, 2005. Acesso em 10 abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.2165/00139709-200524020-00003>.

BUSSAB W. O.; MORETTIN, P. A. **Estatística básica: métodos quantitativos**. 5. ed. [S.l.: s.n.]: Saraiva, 2002.

CARO-ASTORGA, J.; FRENZEL, E.; PERKINS, J. R.; ÁLVAREZ-MENA, A.; VICENTE, A. de; RANEA, J. A. G.; KUIPERS, O. P.; ROMERO, D. Biofilm formation displays intrinsic offensive and defensive features of *Bacillus cereus*. **npj Biofilms and Microbiomes**, Springer Science and Business Media LLC, v. 6, n. 1, jan. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41522-019-0112-7>.

CAVERO, E. **O piretro e os piretróides**. Nacional: Acta Toxicológica, 1980. v. 3. 19-35 p.

CETESB, C. S. A. **Manual de gerenciamento de áreas contaminadas. Capítulo X – Investigação para Biorremediação**. 2004.

COOK, R. Biological control of plant pathogens: theory to application. **Phytopathology**, v. 75, n. 1, p. 25–29, January 1985. ISSN 0031-949X. Acesso em: 25 mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1094/Phyto-75-25>.

COSTA, L. G. Toxic effects of pesticide. In: **Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 7. ed. New York: McGraw Hill, 2007. cap. 22.

DELATORRE, A. B.; LADEIRA, S. A.; ANDRADE, M. V. V.; BARBOSA, J. B.; MARTINS, M. L. L. Microrganismos termofílicos e enzimas termoestáveis de importância comercial. *Perspectivas Online*, p. 16–16, 2010.

FARON, M. L.; BUCHAN, B. W.; HYKE, J.; MADISEN, N.; LILLIE, J. L.; GRANATO, P. A.; WILSON, D. A.; PROCOP, G. W.; NOVAK-WEEKLEY, S.; MARLOWE, E.; CUMPIO, J.; GRIEGO-FULLBRIGHT, C.; KINDIG, S.; TIMM, K.; YOUNG, S.; LEDEBOER, N. A. Multicenter evaluation of the bruker MALDI biotyper CA system for the identification of clinical aerobic gram-negative bacterial isolates. **PLOS ONE**, Public Library of Science (PLoS), v. 10, n. 11, p. e0141350, nov. 2015. Acesso em: 25 out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141350>.

FELISBINO, J. K. R. P. **Identificação de substâncias produzidas pelos fungos *Cercospora brachiata*, *Beauveria bassiana* e *Verticillium* sp. e avaliação da atividade antibacteriana**. 2019. Tese (Doutorado), 2019. Acesso em: 25 mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2019.349>.

FENNER, K.; CANONICA, S.; WACKETT, L. P.; ELSNER, M. Evaluating pesticide degradation in the environment: Blind spots and emerging opportunities. **Science**, American Association for the Advancement of Science (AAAS), v. 341, n. 6147, p. 752–758, ago. 2013. Acesso em: 25 ago. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1126/science.1236281>.

FIGUEIREDO, A. C. P. **Piretróides: uma nova geração de insecticidas**. 2014. Tese (dissertation) — ULHT - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, 2014. Acesso em: 25 set. 2020. Disponível em: <http://hdl.handle.net/10437/5421>.

FREITAS, B.; ALVES, J. Efeito do número de visitas florais da abelha melífera (*Apis melífera L.*) na polinização da goiabeira (*Psidium guajava L.*) cv. *Paluma*. **Revista Ciencia Agronomica**, v. 39, p. 148–154, 11 2008.

GAYLARD, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. 2005. Disponível em: <http://www.bioteecnologia.com.br/edicoes/ed34.php>.

GONÇALVES, D.; LAHR, F. A. R. Deterioro y preservación de maderas mediante el uso de preservadores naturales de potencial interés en Brasil. **Bosque (Valdivia)**, scielocl, v. 41, p. 213 – 220, 12 2020. ISSN 0717-9200. Acesso em: 20 mar. 2021. Disponível em: [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0717-92002020000300213&nrm=iso](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-92002020000300213&nrm=iso).

GRAHAME, D.; BRYKSA, B.; YADA, R. 2 - factors affecting enzyme activity. *In*: YADA, R. Y. (ed.). **Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality**. Woodhead Publishing, 2015, (Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition). p. 11–55. ISBN 978-1-78242-285-3. Acesso em: 20 mar. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781782422853000028>.

HEMSWORTH, G. R.; DÉJEAN, G.; DAVIES, G. J.; BRUMER, H. Learning from microbial strategies for polysaccharide degradation. **Biochemical Society Transactions**, Portland Press Ltd., v. 44, n. 1, p. 94–108, fev. 2016. Acesso em: 20 mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1042/bst20150180>.

HOFLING, J. **Microscopia de luz em microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2008. ISBN 8536314478.

HUANG, W.; YE, C.; HOCKADAY, W. C.; HALL, S. J. Trade-offs in soil carbon protection mechanisms under aerobic and anaerobic conditions. **Global Change Biology**, v. 26, n. 6, p. 3726–3737, 2020. Acesso em: 20 fev. 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/gcb.15100>.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, Springer Science and Business Media LLC, v. 20, n. 5-6, p. 801–821, jun. 2014. Acesso em: 20 mar. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10450-014-9623-y>.

JUNQUEIRA, L. **Biologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. ISBN 9788527720786.

KALANTARY, R. R.; MOHSENI-BANDPI, A.; ESRAFILI, A.; NASSERI, S.; ASHMAGH, F. R.; JORFI, S.; JA'FARI, M. Effectiveness of biostimulation through nutrient content on the bioremediation of phenanthrene contaminated soil. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, Springer Science and Business Media LLC, v. 12, n. 1, dez. 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s40201-014-0143-1>.

KIRAN, G. S.; PRIYADHARSINI, S.; SAJAYAN, A.; RAVINDRAN, A.; SELVIN, J. An antibiotic agent pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro isolated from a marine bacteria *Bacillus tequilensis* msi45 effectively controls multi-drug resistant *Staphylococcus*

*aureus*. **RSC Adv.**, The Royal Society of Chemistry, v. 8, p. 17837–17846, 2018. Acesso em: 20 mar. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/C8RA00820E>.

KIRSCHNING, A. Coenzymes and their role in the evolution of life. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 60, n. 12, p. 6242–6269, 2021. Acesso em: 20 abr. 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/anie.201914786>.

KOCH, L.; LODIN, A.; HEROLD, I.; ILAN, M.; CARMELI, S.; YARDEN, O. Sensitivity of *Neurospora crassa* to a marine-derived *Aspergillus tubingensis* anhydride exhibiting antifungal activity that is mediated by the MAS1 protein. **Marine Drugs**, MDPI AG, v. 12, n. 9, p. 4713–4731, set. 2014. Acesso em: 20 abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/md12094713>.

KWAK, M. M.; JENNERSTEN, O. Bumblebee visitation and seedset in melampyrum pratense and viscaria vulgaris: heterospecific pollen and pollen limitation. **Oecologia**, Springer Science and Business Media LLC, v. 86, n. 1, p. 99–104, mar. 1991. Acesso em: 20 abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/bf00317395>.

LEE, P. W. Fate of fenvalerate (pydrin insecticide) in the soil environment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, American Chemical Society (ACS), v. 33, n. 5, p. 993–998, set. 1985. Acesso em: 20 abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jf00065a053>.

LEHNINGER, T. M.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. Porto Alegre: Artmed, 2014. ISBN 9788582710722.

LEWIS T; STONE, W. L. Biochemistry, proteins enzymes. In: StatPearls [Internet], 2021.

LIMA, D. F.; OLIVEIRA, O. M. C. de; CRUZ, M. J. M. Utilização dos fungos na biorremediação de substratos contaminados por petróleo: estado da arte. **Cadernos de Geociências**, p. 113–121, 2011.

LIU, X.; CAO, A.; YAN, D.; OUYANG, C.; WANG, Q.; LI, Y. Overview of mechanisms and uses of biopesticides. **International Journal of Pest Management**, Informa UK Limited, v. 67, n. 1, p. 65–72, out. 2019. Acesso em: 20 abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/09670874.2019.1664789>.

MADIGAN, M. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Sao Paulo: Pearson Education do Brasil, 2016. ISBN 8587918516.

MALERBO-SOUZA, D.; COUTO, R. H.; COUTO, L.; SOUZA, J. Atrativo para as abelhas *Apis mellifera* e polinização em café (*Coffea arabica* L.). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 40, 01 2003.

MELO, I. S. E. Importância da rizosfera na biodegradação de xenobióticos. In: . [S.l.: s.n.]: Embrapa Meio Ambiente, 2008. p. 589–607.

MICHEREFF SAMI J.; ANDRADE, D. E. G. T. M. M. **Ecologia e manejo de patógenos radiculares em solos tropicais**. Nacional: Universidade Federal e Rural de Pernambuco, 2005.

- MISHRA, V.; LAL, R.; SRINIVASAN. Enzymes and operons mediating xenobiotic degradation in bacteria. **Critical Reviews in Microbiology**, Taylor Francis, v. 27, n. 2, p. 133–166, 2001. Acesso em: 20 abr. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/20014091096729>.
- MONTANHA, F. P.; PIMPÃO, C. T. Efeitos toxicológicos de piretróides (cipermetrina e deltametrina) em peixes-revisão. *Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária*, n. 18, p. 1–58, 2012.
- MORAIS, E. B. **Biodegradação de resíduos oleosos provenientes de refinaria de petróleo através do sistema de biopilhas**. 2005. Tese (dissertation) — Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2005.
- MOREIRA, J. C.; PERES, F.; SIMÕES, A. C.; PIGNATI, W. A.; DORES, E. de C.; VIEIRA, S. N.; STRÜSSMANN, C.; MOTT, T. Contaminação de águas superficiais e de chuva por agrotóxicos em uma região do estado do mato grosso. **Ciência & Saúde Coletiva**, FapUNIFESP (SciELO), v. 17, n. 6, p. 1557–1568, jun. 2012. Acesso em: 20 jul. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1413-81232012000600019>.
- MORETTO, J. A. S. **Investigação da influência de diferentes herbicidas sobre a microbiota do solo**. 2016. Tese (dissertation) — Universidade de São Paulo, 2016.
- MORTZFELD, F. B.; HASHEM, C.; VRANKOVÁ, K.; WINKLER, M.; RUDROFF, F. Pyrazines: Synthesis and industrial application of these valuable flavor and fragrance compounds. **Biotechnology Journal**, v. 15, n. 11, p. 2000064, 2020. Acesso em: 20 mar. 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/biot.202000064>.
- NASCIMENTO, W. M.; GOMES, E. M. L.; BATISTA, E. A.; FREITAS, R. A. Utilização de agentes polinizadores na produção de sementes de cenoura e pimenta doce em cultivo protegido. **Horticultura Brasileira**, scielo, v. 30, p. 494 – 498, 09 2012. ISSN 0102-0536. Acesso em: 20 abr. 2020. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-05362012000300023&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-05362012000300023&nrm=iso).
- NYGAARD, D.; YASHCHUK, O.; NOSEDA, D. G.; ARAOZ, B.; HERMIDA Élida B. Improved fermentation strategies in a bioreactor for enhancing poly(3-hydroxybutyrate) (phb) production by wild type *Cupriavidus necator* from fructose. **Heliyon**, v. 7, n. 1, p. e05979, 2021. ISSN 2405-8440. Acesso em: 20 abr. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844021000840>.
- OLIVEIRA, E. C. d.; MULLER, E. I.; ABAD, F.; DALLAROSA, J.; ADRIANO, C. Internal standard versus external standard calibration: an uncertainty case study of a liquid chromatography analysis. **Química Nova**, scielo, v. 33, p. 984 – 987, 00 2010. ISSN 0100-4042. Acesso em: 20 ago. 2020. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422010000400041&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000400041&nrm=iso).
- OLIVEIRA, J. C. de; ARRUDA, A. B.; BORGES, A. P. C.; VENTURA, M. V. A.; TEIXEIRA, R. C.; ALVES, R. A. INFLUENCE OF INSECTICIDES AND FUNGICIDES IN THE RIZOSPHERE OF UNCONVENTIONAL FOOD PLANTS (UFP's). **Ipê Agronomic Journal**, Associação Educativa Evangélica, v. 3, n. 2, p. 64–69, fev. 2020. Acesso em: 20 abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.37951/2595-6906.2019v3i2.5320>.

OLIVEIRA, J. M.; LOSANO, N. F.; CONDESSA, S. S.; FREITAS, R. M. P. de; CARDOSO, S. A.; FREITAS, M. B.; OLIVEIRA, L. L. de. Exposure to deltamethrin induces oxidative stress and decreases of energy reserve in tissues of the neotropical fruit-eating bat *artibeus lituratus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Elsevier BV, v. 148, p. 684–692, fev. 2018. Acesso em: 20 mai. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.11.024>.

OLIVER, C. J.; SOFTLEY, S.; WILLIAMSON, S. M.; STEVENSON, P. C.; WRIGHT, G. A. Pyrethroids and nectar toxins have subtle effects on the motor function, grooming and wing fanning behaviour of honeybees (*apis mellifera*). **PLOS ONE**, Public Library of Science, v. 10, n. 8, p. 1–12, 08 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0133733>.

ORGANIZATION, W. H.; SAFETY, I. P. on C. **The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification 2009**. [S.l.: s.n.]: World Health Organization, 2010. 78 p. p. (WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification).

PACÍFICO-DA-SILVA I.; MELO M. M.; BLANCO, B. S. Efeitos tóxicos dos praguicidas para abelhas. *Revista brasileira de higiene e sanidade animal*, v. 10, n. 1, p. 142–157, 2016.

PANICH, J.; FONG, B.; SINGER, S. W. Metabolic engineering of *Cupriavidus necator* h16 for sustainable biofuels from CO<sub>2</sub>. **Trends in Biotechnology**, Elsevier BV, v. 39, n. 4, p. 412–424, abr. 2021. Acesso em: 20 abr. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.01.001>.

PELCZAR, M.; REID, R.; CHAN, E. **Microbiologia: conceitos e aplicações**. Nacional: McGraw-Hill, 1996. v. 1.

PERES, N. T. de A.; MARANHÃO, F. C. A.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, FapUNIFESP (SciELO), v. 85, n. 5, p. 657–667, out. 2010. Acesso em: 20 mai. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s0365-05962010000500009>.

PINHATI, F. R.; AGUILA, E. M. D.; TÔRRES, A. P. R.; SOUSA, M. P. de; SANTIAGO, V. M. J.; SILVA, J. T.; PASCHOALIN, V. M. F. EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF DETERIORATION OF AROMATIC HYDROCARBONS BY BACTERIA FROM WASTEWATER TREATMENT PLANT OF OIL REFINERY. **Química Nova**, GN1 Genesis Network, 2014. Acesso em: 20 mai. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.5935/0100-4042.20140221>.

POHARE, M. B.; WAGH, S. G.; UDAYASURIYAN, V. *Bacillus thuringiensis* as potential biocontrol agent for sustainable agriculture. In: **Environmental and Microbial Biotechnology**. Springer Singapore, 2020. p. 439–468. Disponível em: [https://doi.org/10.1007/978-981-15-6949-4\\_18](https://doi.org/10.1007/978-981-15-6949-4_18).

REGINATO, C. Z.; CADORE, G. C.; MENEZES, F. R. de; SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. S. F. Efficacy of commercial synthetic pyrethroids and organophosphates associations used to control *Rhipicephalus (Boophilus)* microplus in southern brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, FapUNIFESP (SciELO), v. 26, n. 4, p. 500–504, out. 2017. Acesso em: 20 abr. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1984-29612017054>.



RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. A. F. A. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, scielo, v. 27, p. 771 – 780, 10 2004. ISSN 0100-4042. Acesso em: 20 abr. 2020. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422004000500017&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000500017&nrm=iso).

ROS, D.; AN, P.; ESTUAR, F.; OAKLAND, C.; WERNER, I. Pyrethroid insecticides: An analysis of use patterns, distributions, potential toxicity and fate in the sacramento-san joaquin delta and central valley. 11 2005. Acesso em: 20 abr. 2020.

SALIU, B. A. P. O. I. F. O. A. A. E. A. M. I. O. J. K. Bioaccumulation of Pyrethroid in Parasite *Wenyonia acuminata* (Cestoda: *Caryophyllaeidae*) and Host fish *Synodontis clarias* (Linnaeus, 1758) from Lekki Lagoon, Lagos Nigeria. **Brazilian Journal of Biology**, scielo, v. 81, p. 822 – 834, 09 2021. ISSN 1519-6984. Acesso em: 20 abr. 2020. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-69842021000300822&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-69842021000300822&nrm=iso).

SANTOS, M. dos; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. Piretróides—uma visão geral. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, v. 18, n. 3, p. 339–349, 2008.

SANTOS, R. A. F. **Avaliação das propriedades biológicas dos derivados sintéticos do beta-sitosterol e triperpenos**. 2010. Tese (dissertation) — Instituto de Química - Universidade Federal da Bahia, 2010.

SASIKALA, C.; JIWAL, S.; ROUT, P.; RAMYA, M. Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial consortium isolated from agriculture soil. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, Springer Science and Business Media LLC, v. 28, n. 3, p. 1301–1308, set. 2011. Acesso em: 20 mai. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0879-z>.

SEYFARTH, F.; ZIEMER, M.; SAYER, H. G.; BURMESTER, A.; ERHARD, M.; WELKER, M.; SCHLIEMANN, S.; STRAUBE, E.; HIPLER, U.-C. The use of its dna sequence analysis and maldi-tof mass spectrometry in diagnosing an infection with *Fusarium proliferatum*. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 11, p. 965–971, 2008. Acesso em: 20 abr. 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1600-0625.2008.00726.x>.

SILVA, M. M.; BUCKNER, C. H.; PICANÇO, M.; CRUZ, C. D. Influência de *Trigona spinipes* Fabr. (Hymenoptera: *Apidae*) na polinização do maracujazeiro amarelo. **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, scielo, v. 26, p. 217 – 221, 08 1997. ISSN 0301-8059. Acesso em: 20 abr. 2020. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-80591997000200001&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-80591997000200001&nrm=iso).

SILVA, P. Isolamento, caracterização e resistência a antimicrobianos de bactérias gram-negativas aeróbias e anaeróbias facultativas de amostras de solo. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, v. 64, n. 2, p. 245–251, 2005.

SILVERMAN, R. B. Chapter 7 - drug metabolism. *In*: SILVERMAN, R. B. (ed.). **The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action (Second Edition)**. Second edition. San Diego: Academic Press, 2004. p. 405–495. ISBN 978-0-12-643732-4. Acesso em: 12 ago. 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080513379500122>.

SINITOX. **SINITOX- Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas/dados de intoxicação**. 2021. Acessado em 01 de Janeiro de 2021. Disponível em: <https://sinitox.iciet.fiocruz.br/dados-nacionais>.

SOUZA, V.; CARBO, L.; DORES, E. F. C.; RIBEIRO, M. L.; CCHIATO, A. B. V. melo; WEBER, O. L. S.; CUNHA, M. L. F. Determinação de pesticidas em água de poços tubulares em áreas de cultura de algodão na microrregião de primavera do leste, mato grosso. Águas subterrâneas. Embrapa, 2004.

SUJATHA, S.; ANAND, S.; SANGEETHA, K.; SHILPA, K.; LAKSHMI, J.; BALAKRISHNAN, A.; LAKSHMI, B. Biological evaluation of (3)-STIGMAST-5-EN-3-OL as potent anti-diabetic agent in regulating glucose transport using in vitro model. **International Journal of Diabetes Mellitus**, Elsevier BV, v. 2, n. 2, p. 101–109, ago. 2010. Acesso em: 26 jul. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijdm.2009.12.013>.

TAKESHITA, V.; MENDES, K.; ALONSO, F.; TORNISIELO, V. Effect of Organic Matter on the Behavior and Control Effectiveness of Herbicides in Soil. **Planta Daninha**, sciELO, v. 37, 00 2019. ISSN 0100-8358. Acesso em set. 2020. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-83582019000100304&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-83582019000100304&nrm=iso).

TALLUR, D. P.; MEGADI, V.; NINNEKAR, H. Biodegradation of cypermethrin by *Micrococcus* sp. strain cpn 1. **Biodegradation**, v. 19, p. 77–82, 03 2008.

TAVARES, S. R. L. **Técnicas de Remediação**. Nacional: Embrapa Solos-Capítulo em livro científico (ALICE), 2013.

TORTORA G.J.; FUNKE, B. C. C. **MICROBIOLOGIA**. 12. ed. Rio Grande do Sul: Artmed, 2017. ISBN 978-8582713532.

VICENTIN, R. P. **Remoção e alocação de metais pesados por bactérias diazotróficas nodulíferas da espécie *Cupriavidus necator***. 2016. Tese (thesis) — Universidade Federal de Lavras, 2016.

VIDAL, L.; SILVA, M. V.; ALONSO, M.; FEO, M.; CORCELLAS, C.; BISI, T.; FLACH, L.; FRAGOSO, A.; SILVA, F.; CARVALHO, V.; MEIRELLES, A.; DOMIT, C.; BARBOSA, L.; CREMER, M.; AZEVEDO, A.; TORRES, J. P. M.; MALM, O.; BRITO, J. L.; ELJARRAT, E. Pyrethroid insecticides along the southwestern atlantic coast: Guiana dolphin (*Sotalia guianensis*) as a bioindicator. **Science of The Total Environment**, v. 728, p. 138749, 04 2020.

VOET DONALD; VOET, J. G. P. C. W. **Fundamentos de bioquímica: a vida em nível molecular**. 4. ed. Nacional: Artmed, 2014.

WARE, G. W. **The Pesticide Book**. Språk, Engelska. Pocketbok: Thomson Pubns, 1994. ISBN 9780913702581.

WEIL, R. R.; BRADY, N. C.; LEPSCH, I. F. **Elementos da Natureza e Propriedades dos Solos**. Porto Alegre - RS: Bookman, 2012. ISBN 9788565837743.

WOLFE D.; MICHEL, J. H. M. H. J. G. J. W. G. B. J. S. J. O. C. R. S. The fate of the oil spilled from the Exxon Valdez. **Environmental Science & Technology**, American Chemical Society (ACS), v. 28, n. 13, p. 560A–568A, dez. 1994. Acesso em: 17 out. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/es00062a001>.

---

YANG, L.-L.; HUANG, Y.; LIU, J.; MA, L.; MO, M.-H.; LI, W.-J.; YANG, F.-X. *Lysinibacillus mangiferahumii* sp. nov., a new bacterium producing nematocidal volatiles. **Antonie van Leeuwenhoek**, Springer Science and Business Media LLC, v. 102, n. 1, p. 53–59, fev. 2012. Acesso em: 15 nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10482-012-9712-4>.

ZARA A. L. D. S. A.; SANTOS, S. M. D. F.-O. E. S. C. R. G. C. G. E. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. epidemiologia e serviços de saúde. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 25, p. 391–404, 2016.

ZHANG, H. W.; SONG, Y. C.; TAN, R. X. Biology and chemistry of endophytes. **Natural Product Reports**, Royal Society of Chemistry (RSC), v. 23, n. 5, p. 753, 2006. Acesso em: 24 jul. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/b609472b>.

## APÊNDICES

## APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS OBTIDOS DOS EXPERIMENTOS DE DEGRADAÇÃO DO ESFENVALERATO

Figura 58 – Cromatogramas (reação em triplicatas/controle biótico) obtidos por CG-EM para os quatro melhores fungos *Rhizopus* sp. (QOB-F01), (QOB-F02), (QOB-F03) e *Penicillium* sp. (QOB-F05).

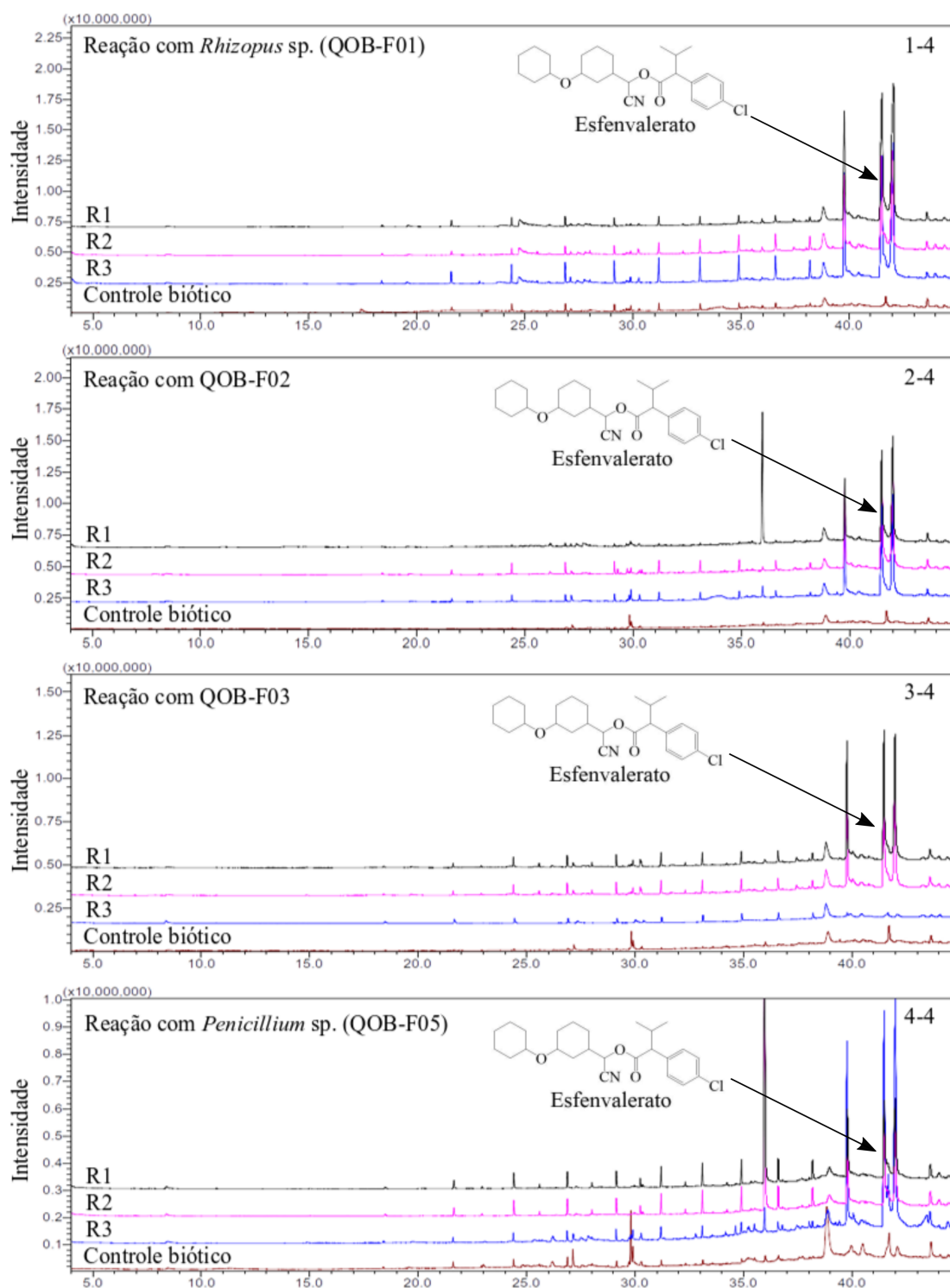


Figura 59 – Cromatogramas (controle de células mortas/controle de recuperação/controle abiótico) obtidos por CG-EM para as reações envolvendo os isolados fúngicos em meio líquido de Malte 2% na concentração de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ .

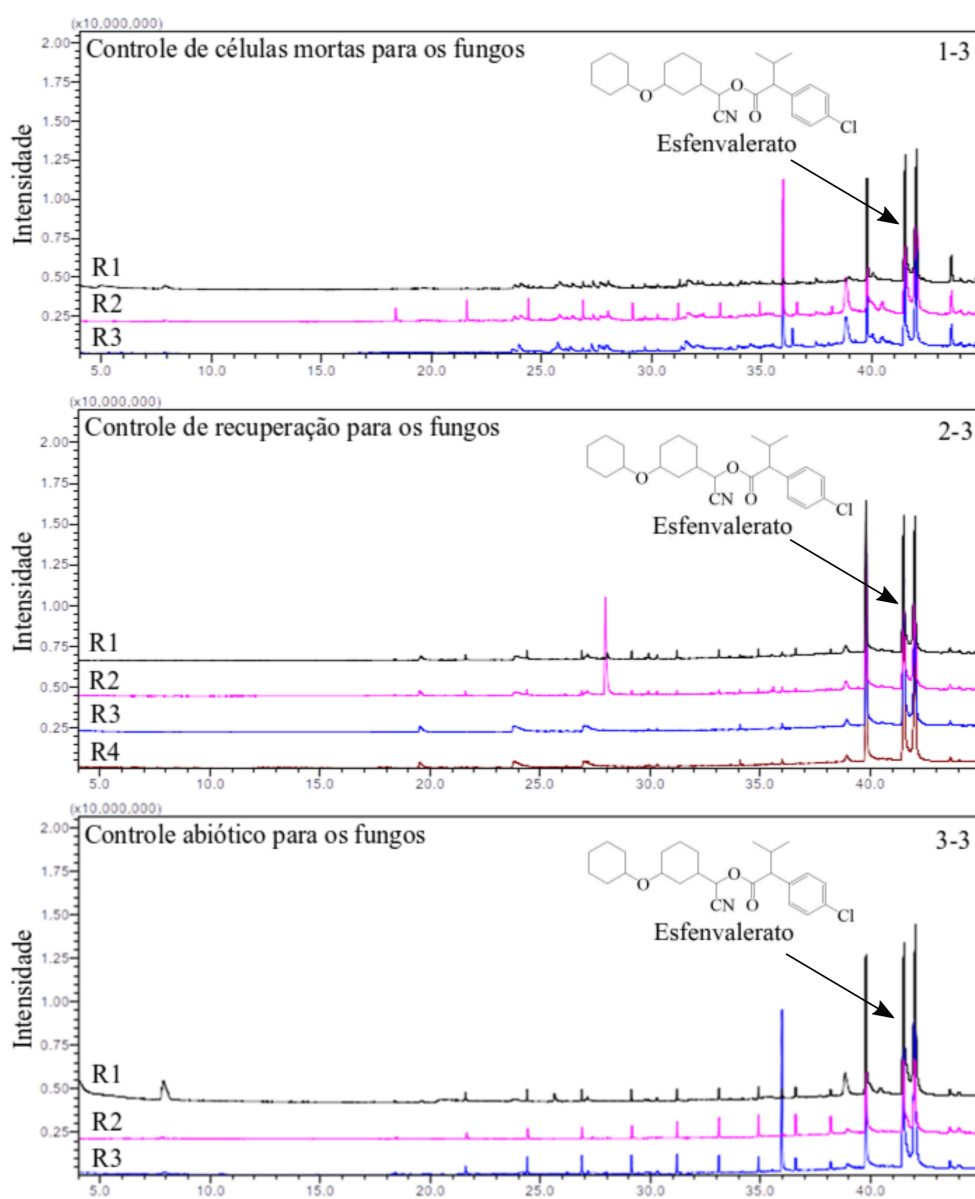
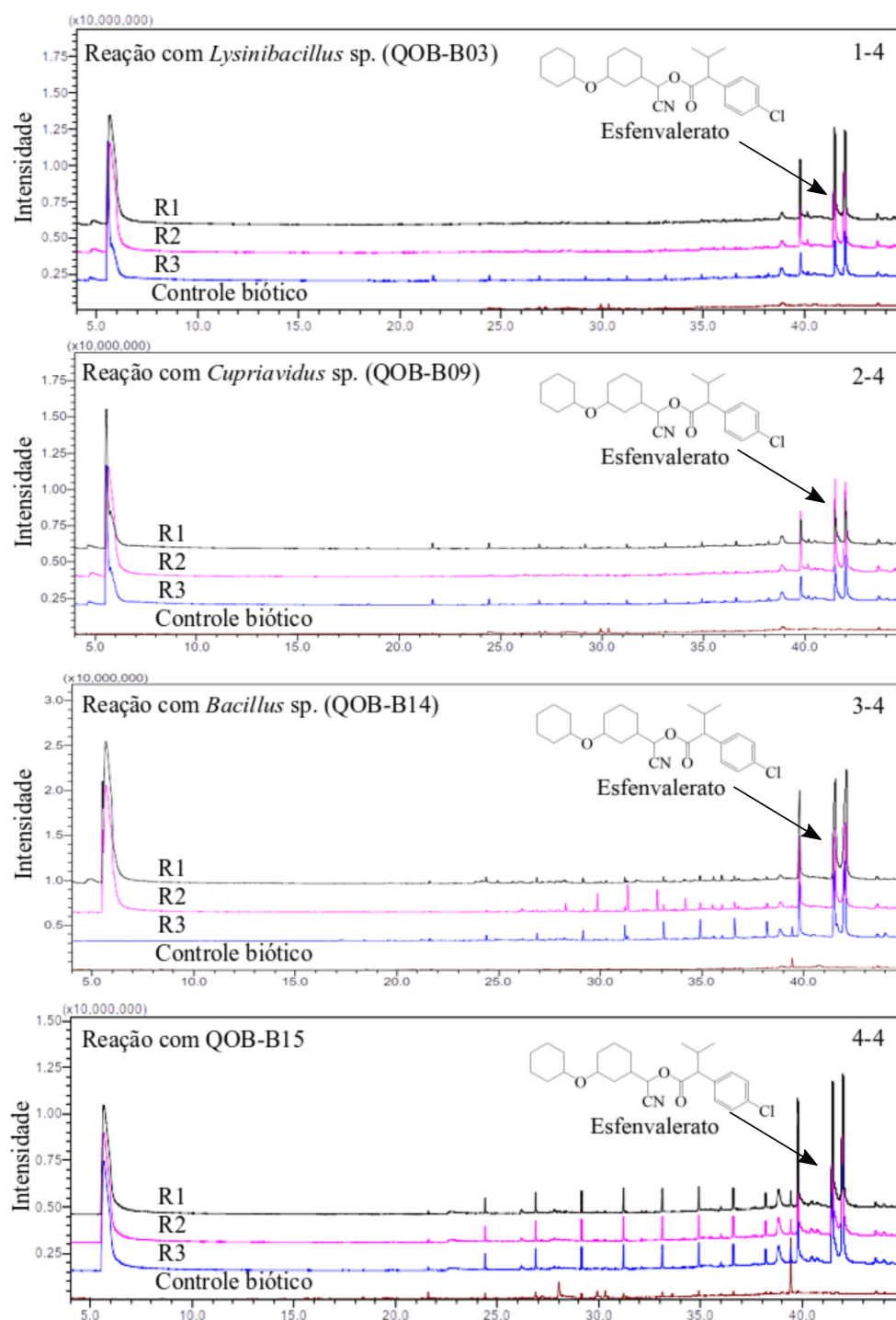


Figura 60 – Cromatogramas (reação em triplicatas/controle biótico) obtidos por CG-EM para as quatro melhores bactérias *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Cupriavidus* sp. (QOB-B09), *Bacillus* sp. (QOB-B14) e (QOB-B15).



Condições da reação: As reações foram realizadas em meio líquido de Caldo Nutriente (32 °C, 130 rpm, 5 dias) na presença de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$  de esfenvalerato.

Figura 61 – Cromatogramas (controle de células mortas/controle de recuperação/controle abiótico) obtidos por CG-EM para as reações envolvendo os isolados bacterianos em meio líquido de Caldo Nutriente na concentração de  $100\text{ mg.L}^{-1}$ .

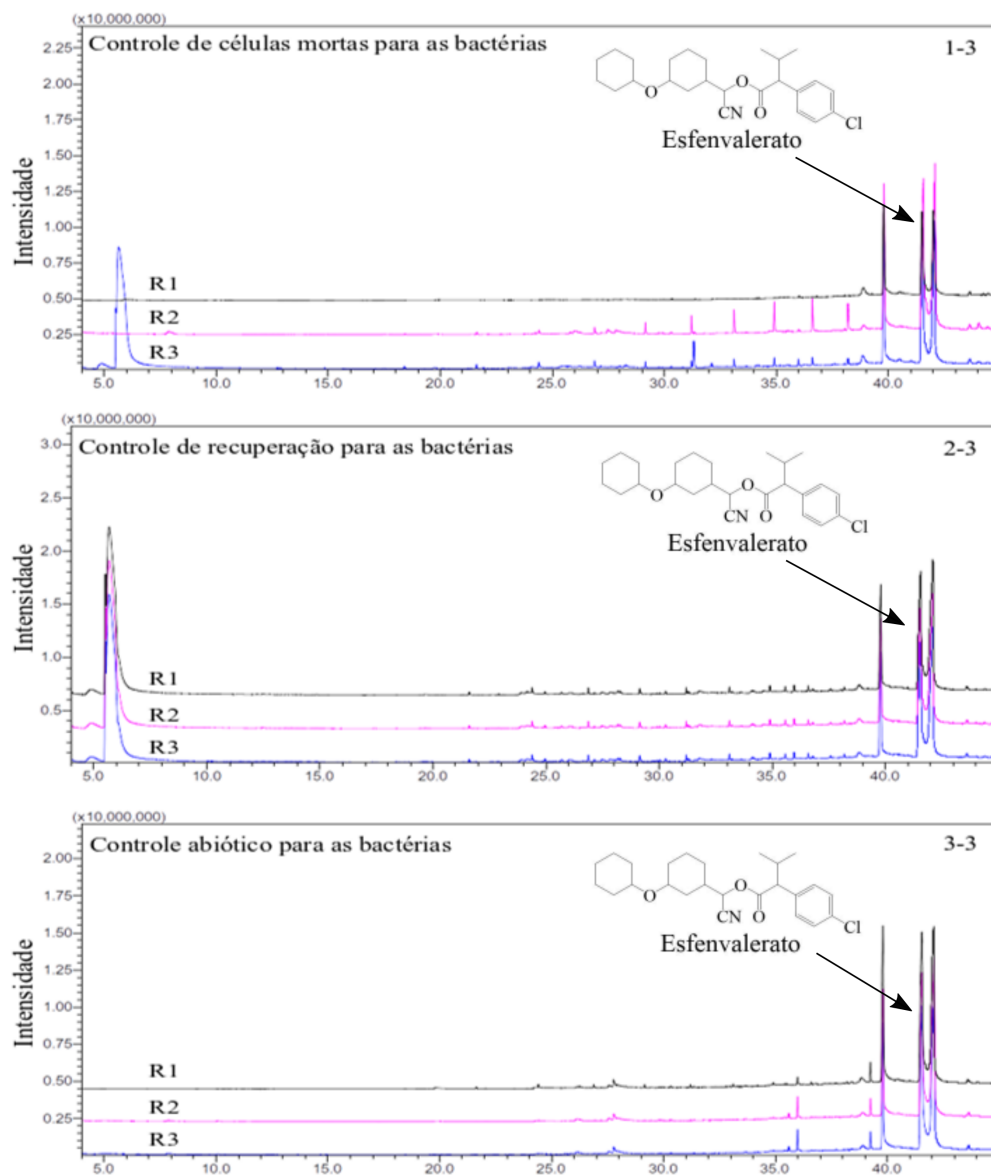
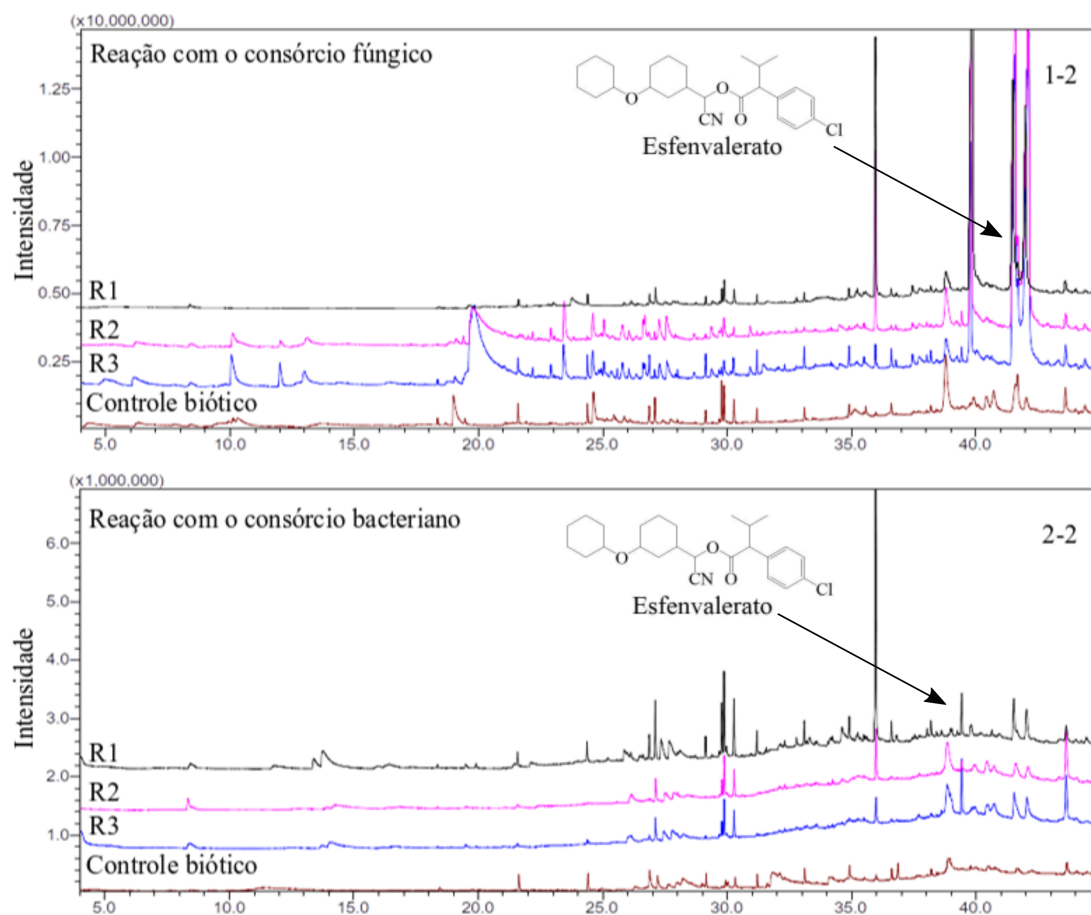




Figura 62 – Cromatogramas (consórcio fúngico/consórcio bacteriano) obtidos por CG-EM para as reações realizadas em meio líquido de Malte 2% e Caldo Nutriente na concentração de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ .



Consórcio bacteriano: QOB-B01, QOB-B02, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. QOB-B09, QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15.  
 Consórcio fúngico: *Rhizopus* sp. (QOB-F01), QOB-F02, QOB-F03 e o *Penicillium* sp. (QOB-F05).

Figura 63 – Cromatogramas (microbioma; 7-28 dias) obtidos por CG-EM para as reações realizadas no solo.

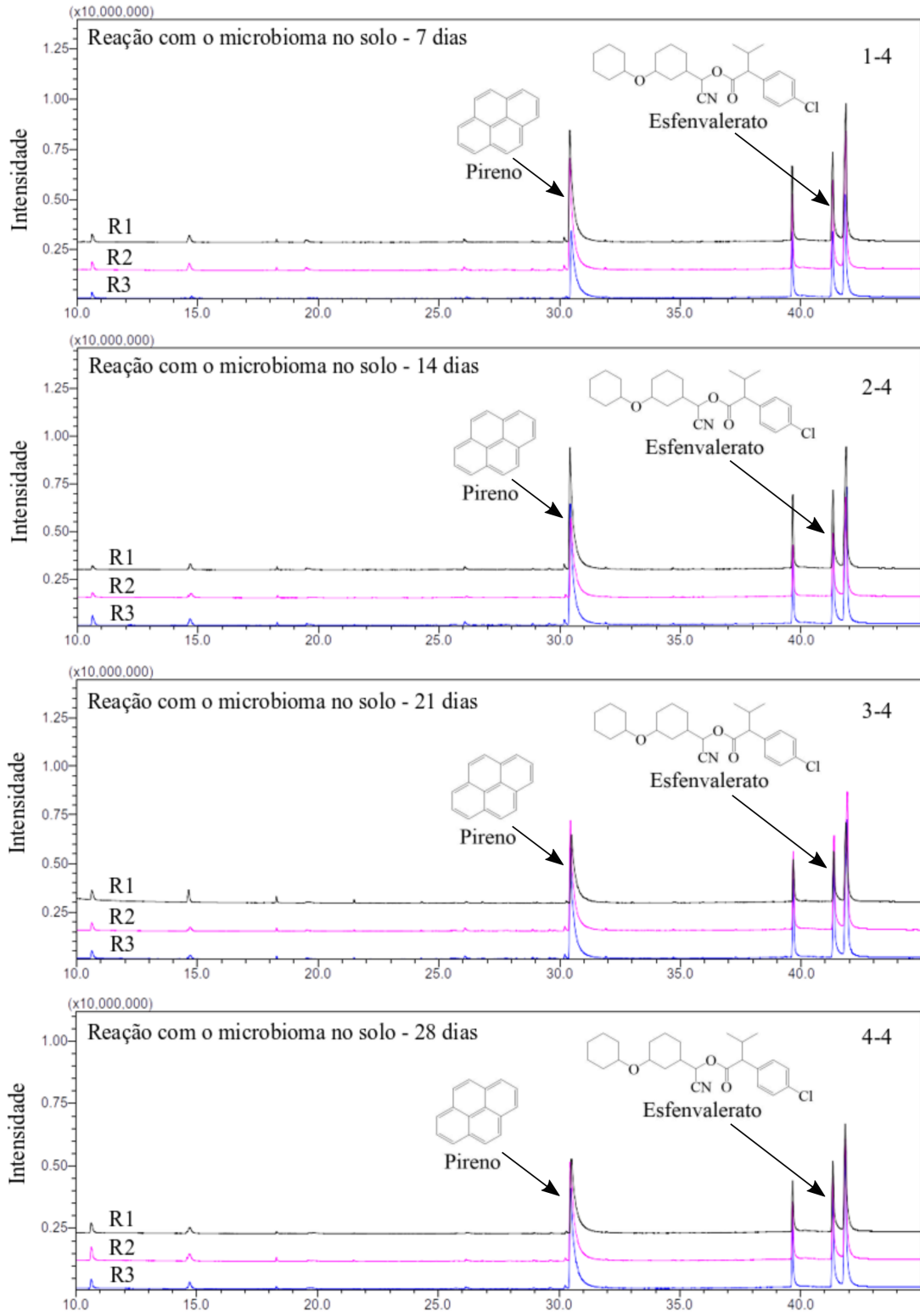
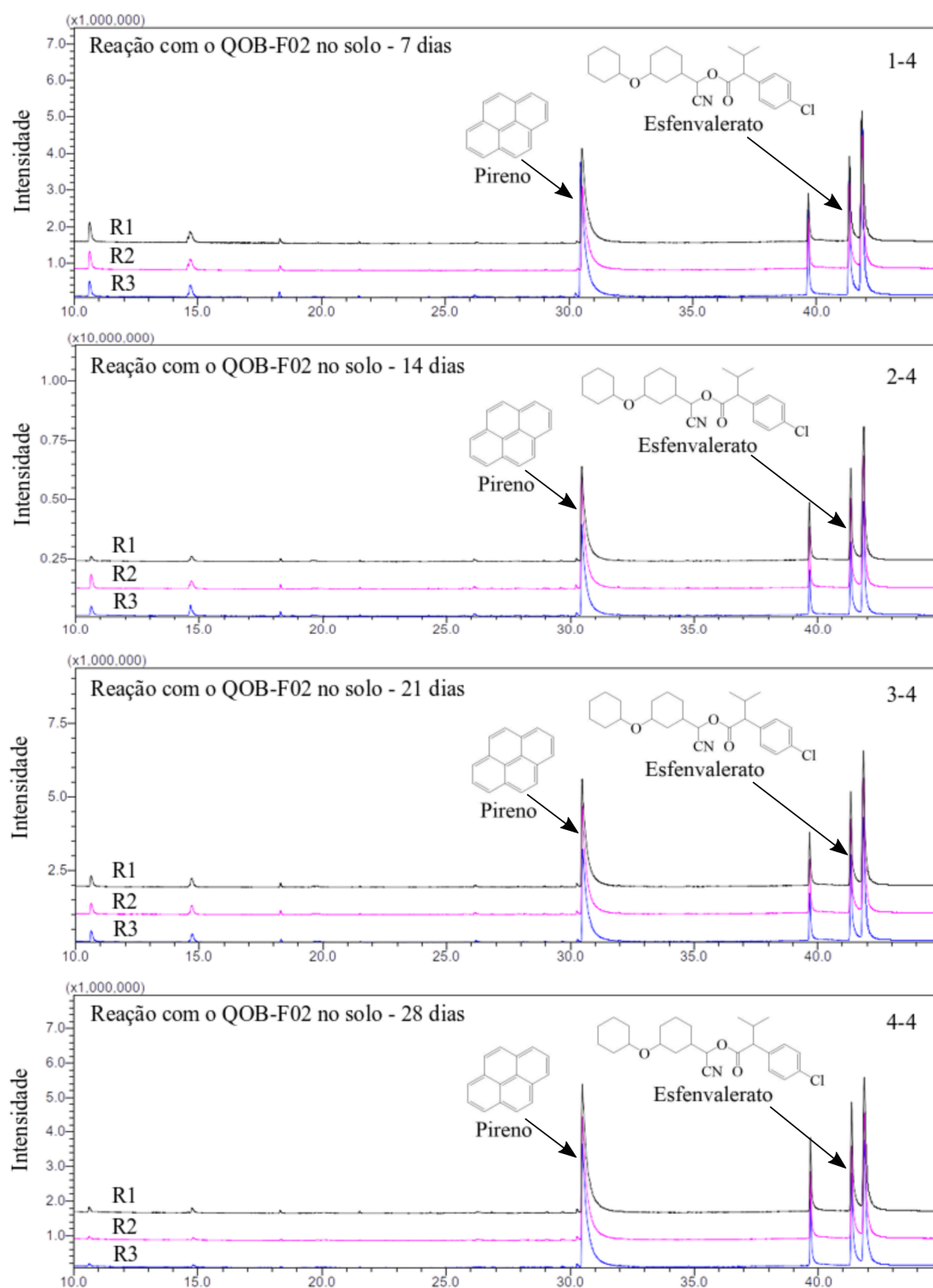
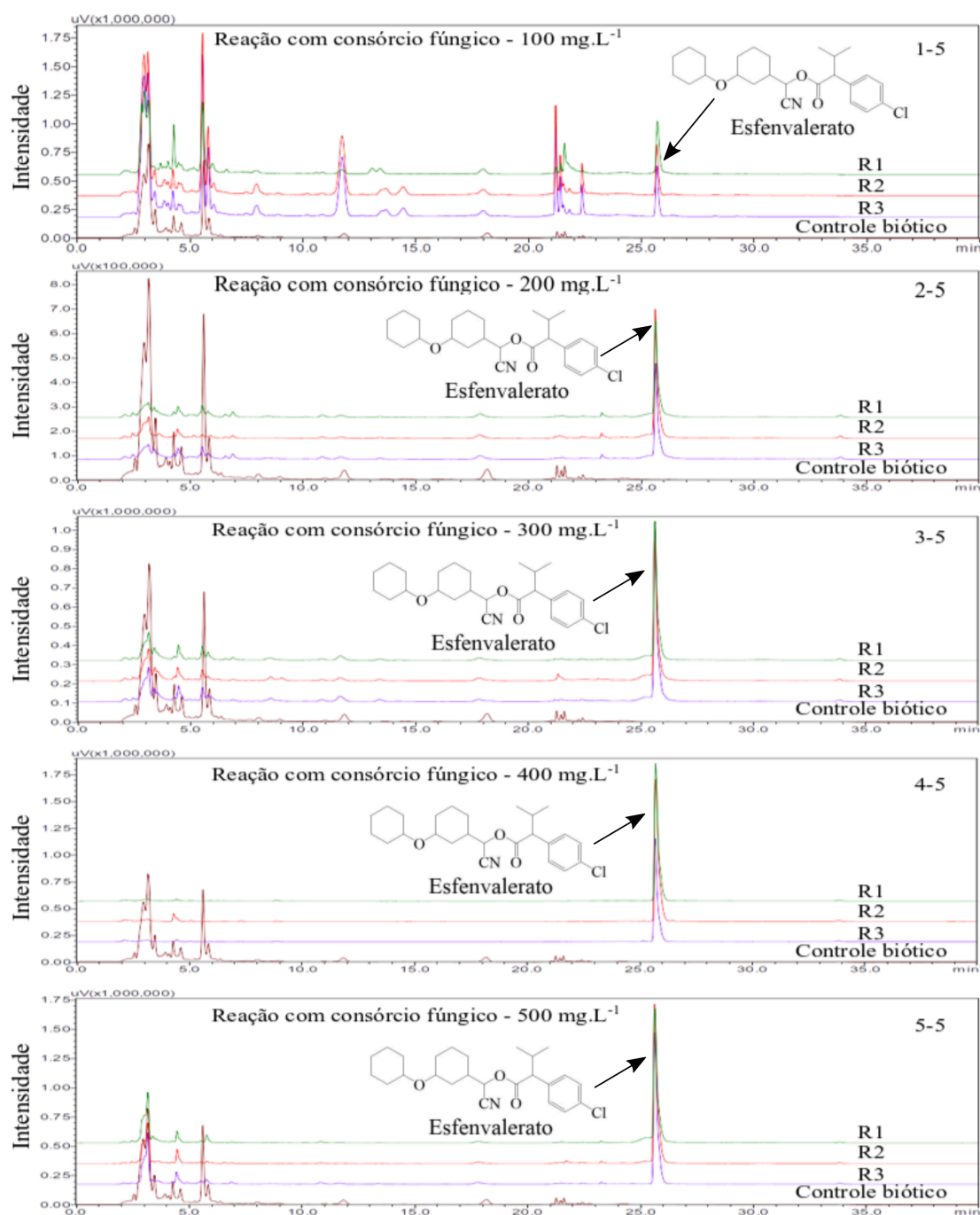


Figura 64 – Cromatogramas (reação com QOB-F02; 7-28 dias) obtidos por CG-EM para as reações realizadas no solo.



Consórcio bacteriano: QOB-B01, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. QOB-B09, QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15.

Figura 65 – Cromatogramas (consórcio fúngico) obtidos por HPLC para as reações realizadas em meio líquido de Malte 2% nas concentrações de 100-500  $mg.L^{-1}$ .



Consórcio fúngico: *Rhizopus* sp. (QOB-F01), QOB-F02, QOB-F03 e o *Penicillium* sp. (QOB-F05).

Figura 66 – Cromatogramas (reação QOB-F02) obtidos por HPLC para as reações realizadas em meio líquido de Malte 2% nas concentrações de 100-500  $\text{mg.L}^{-1}$ .

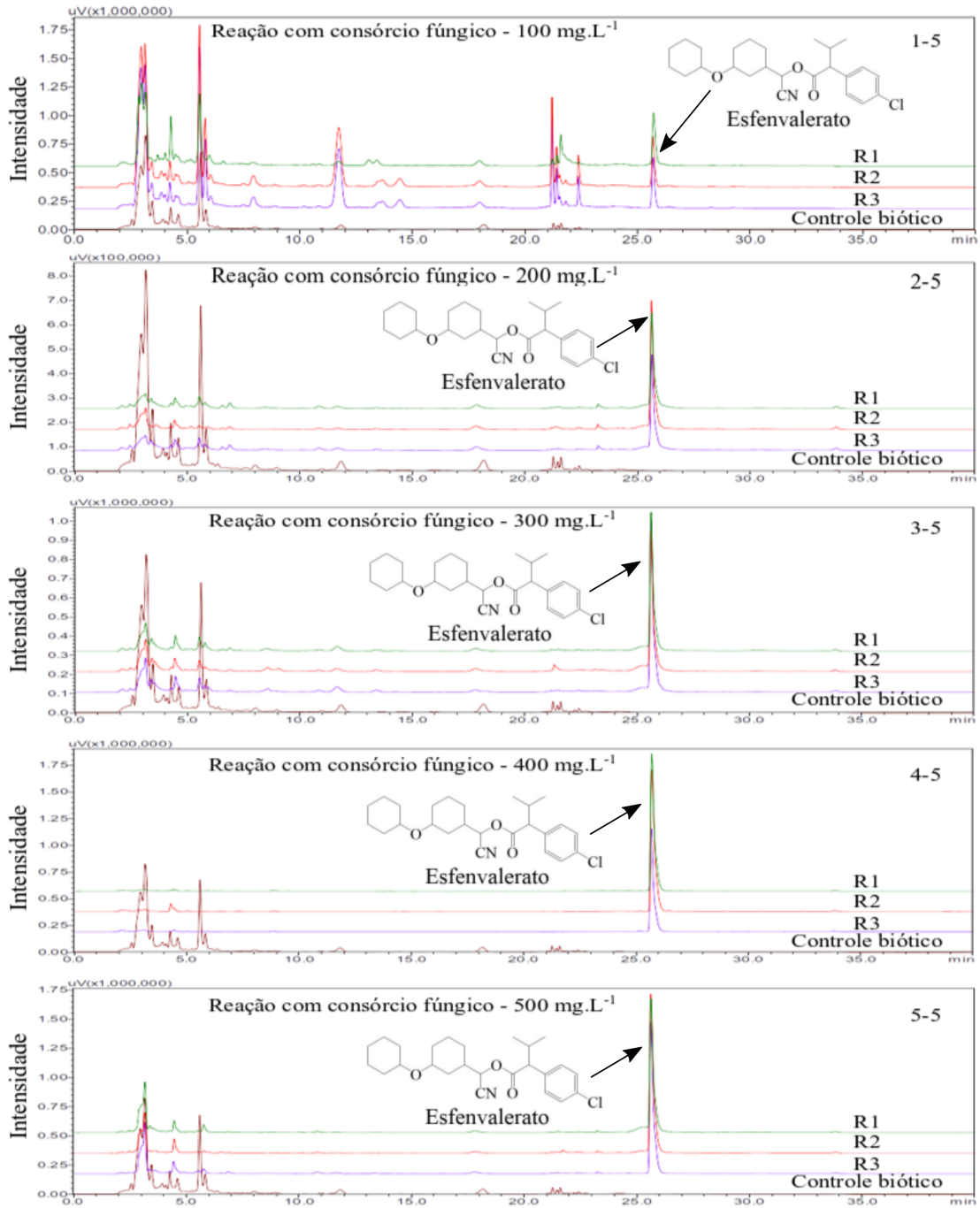


Figura 67 – Cromatogramas (reação *Rhizopus* sp. QOB-F01/ QOB-F03/ *Penicillium* sp. QOB-F05) obtidos por HPLC para as reações realizadas em meio líquido de Malte 2% na concentração de  $100\text{ mg.L}^{-1}$ .

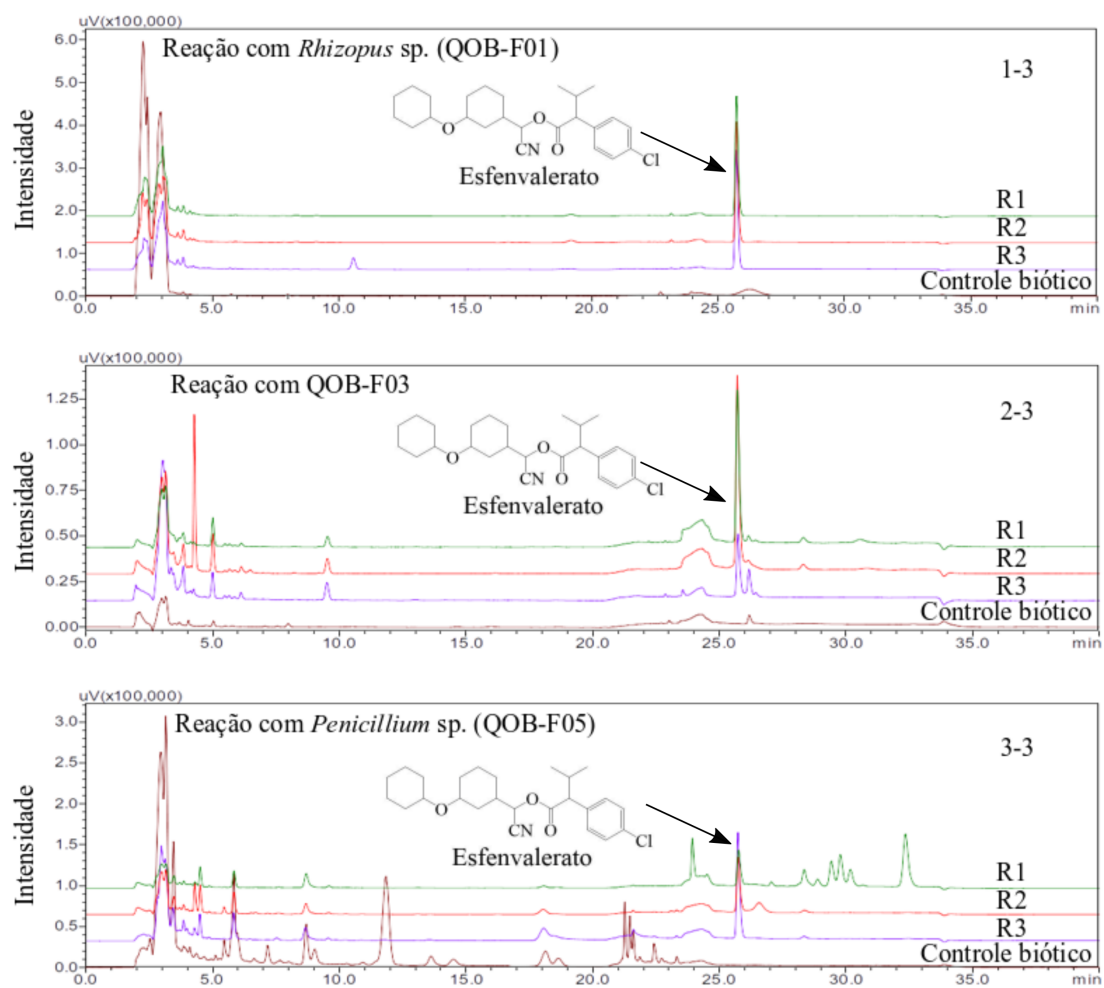


Figura 68 – Cromatogramas (controle de células mortas/ controle de recuperação/ controle abiótico) obtidos por HPLC para as reações realizadas em meio líquido de Malte 2% na concentração de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ .

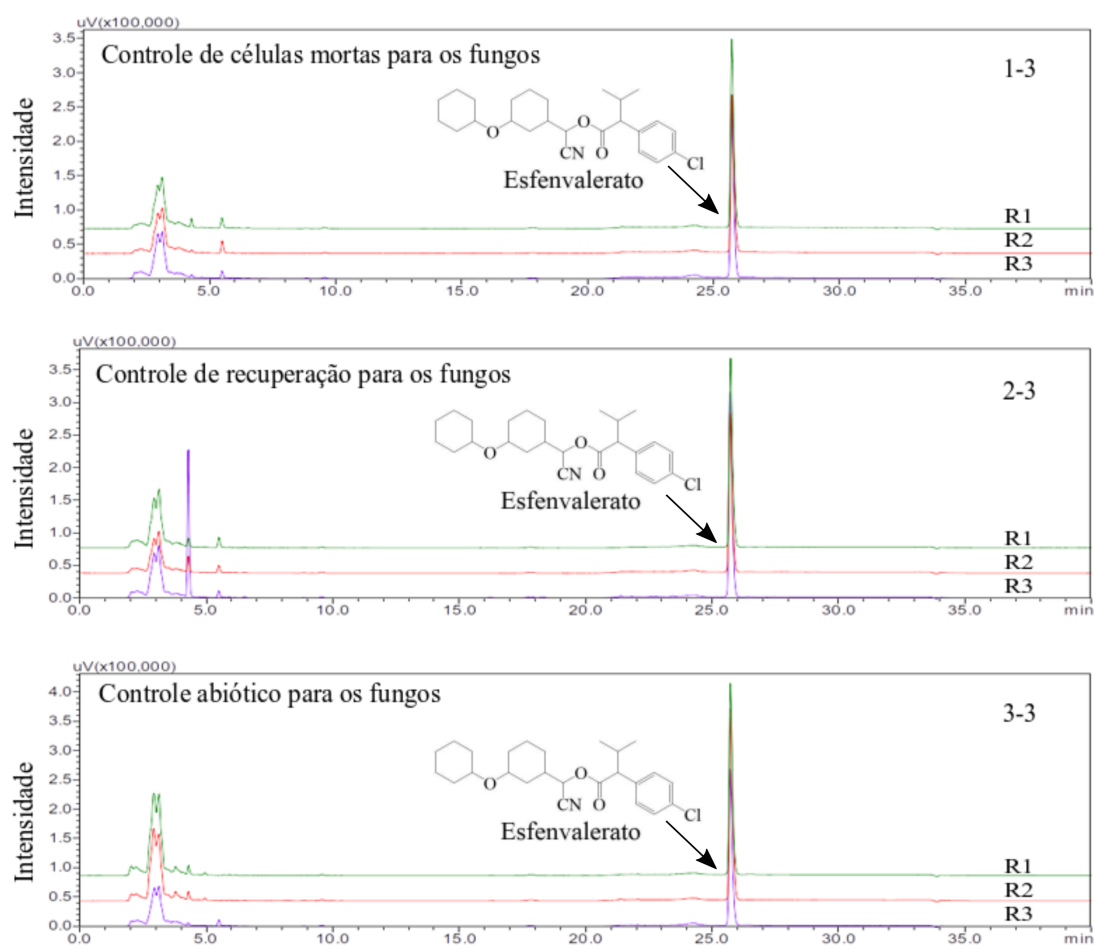
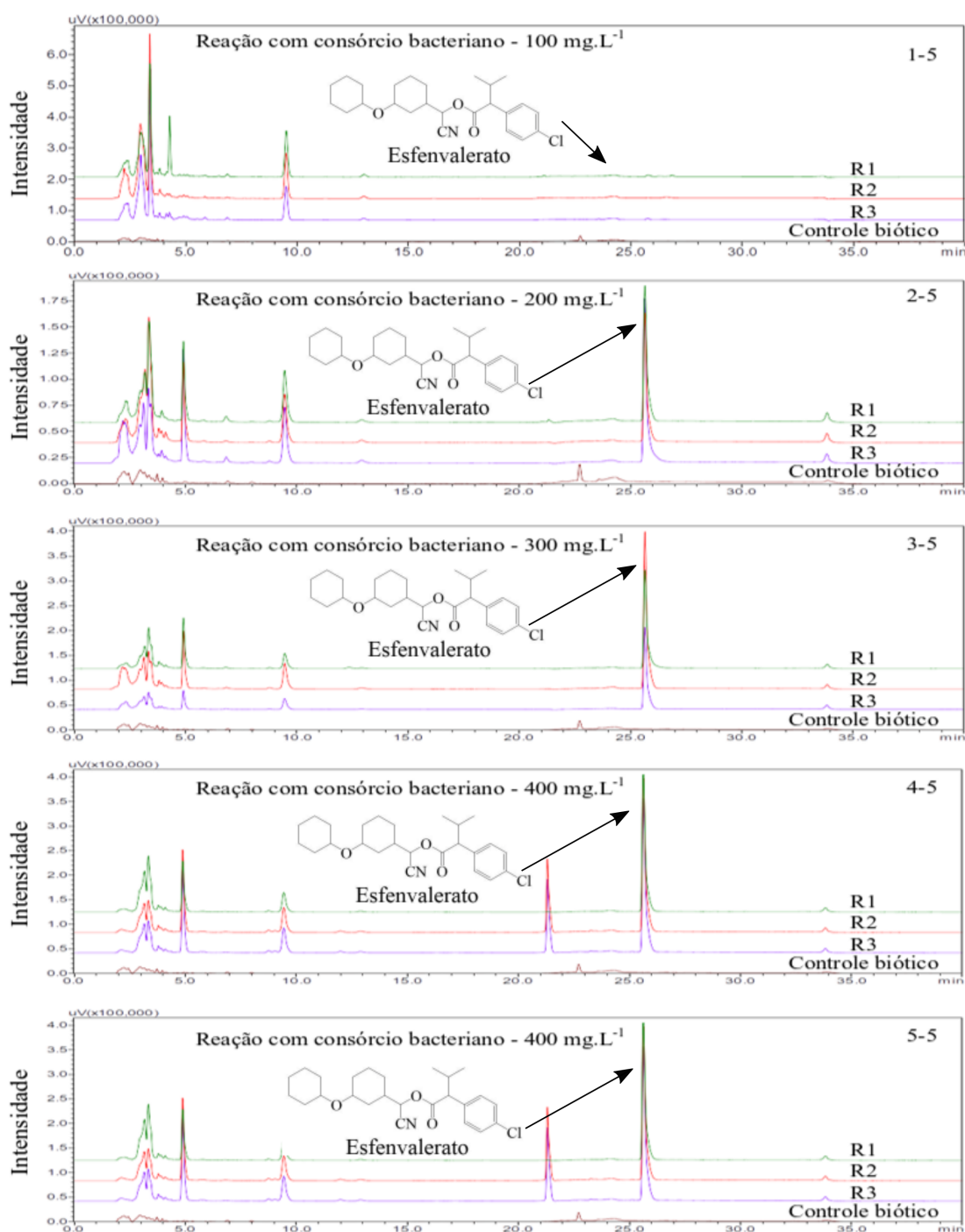


Figura 69 – Cromatogramas (consórcio bacteriano) obtidos por HPLC para as reações realizadas em meio líquido de Caldo Nutriente nas concentrações de 100-500  $mg.L^{-1}$ .



Consórcio bacteriano: QOB-B01, QOB-B02, *Lysinibacillus* sp. (QOB-B03), *Lysinibacillus* sp. (QOB-B08), *Cupriavidus* sp. QOB-B09, QOB-B10, *Bacillus* sp. (QOB-B14) e QOB-B15.



Figura 70 – Cromatogramas (reação *Cupriavidus* sp. QOB-09) obtidos por HPLC para as reações realizadas em meio líquido de Caldo Nutriente nas concentrações de 100-500  $mg.L^{-1}$ .

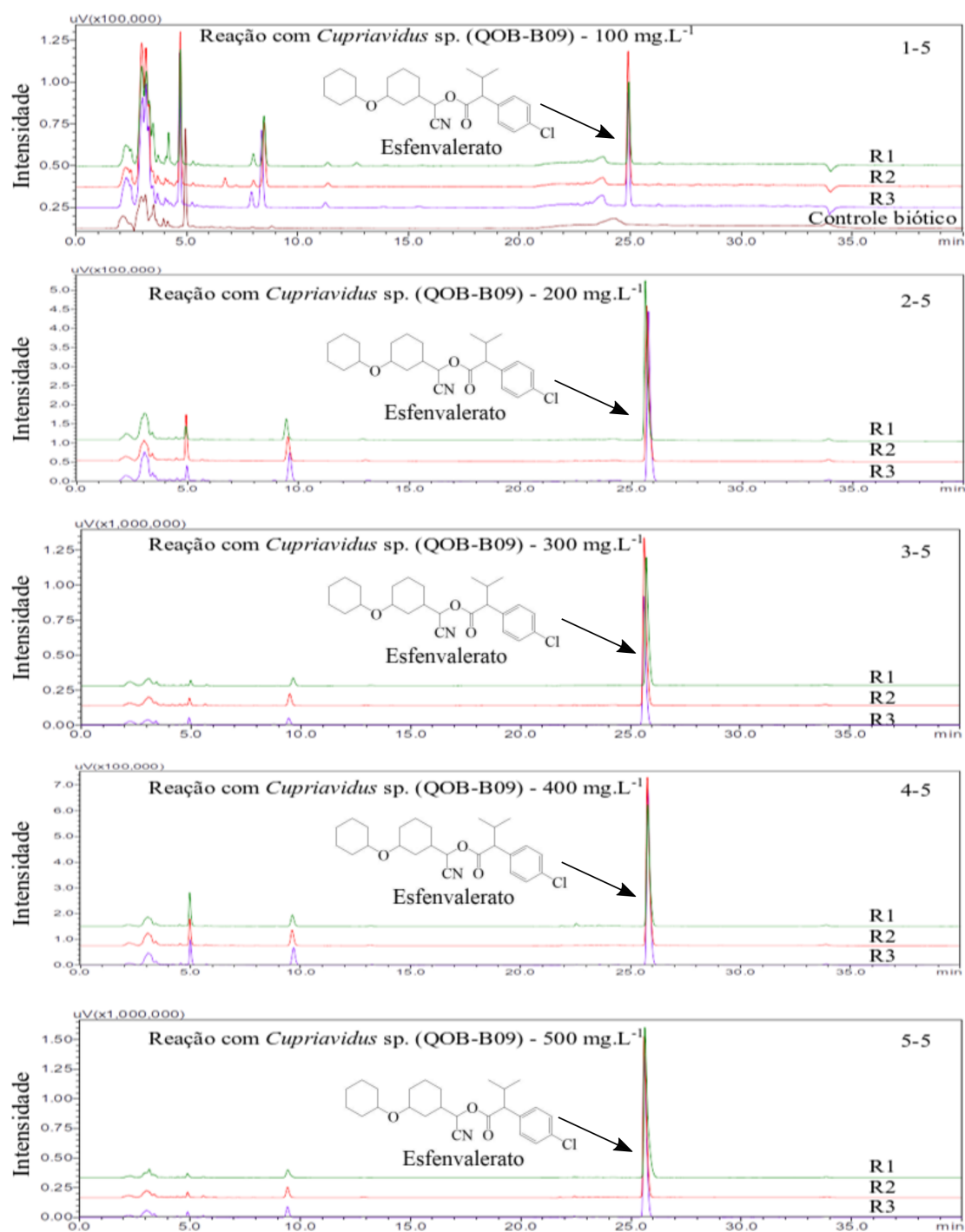


Figura 71 – Cromatogramas (reação *Lysinibacillus* sp. QOB-B03, *Bacillus* sp. QOB-B14 e QOB-B15) obtidos por HPLC para as reações realizadas em meio líquido de Caldo Nutriente na concentração de  $100\text{ mg.L}^{-1}$ .

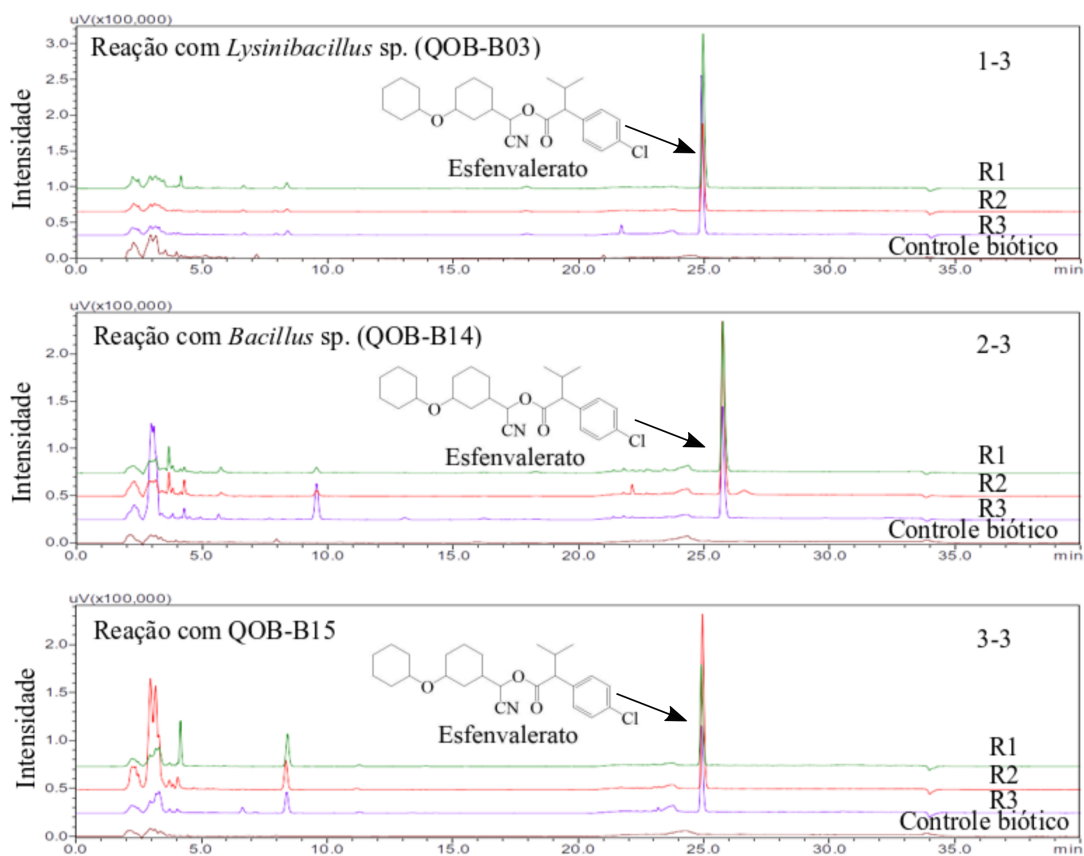


Figura 72 – Cromatogramas (Controle de células mortas/ controle de recuperação/ controle abiótico) obtidos por HPLC para as reações realizadas em meio líquido de Caldo Nutriente na concentração de  $100 \text{ mg.L}^{-1}$ .

