

XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

PLANEJAMENTO FATORIAL APLICADO À BIODEGRADAÇÃO DO PESTICIDA ESPIRODICLOFENO

**Charlene Souza dos anjos¹, Marcelo Pedreira de Miranda², Rodrigo Facchini
Magnani² e André Luiz Meleiro Porto¹**

¹Universidade de São Paulo – Instituto de Química de São Carlos

Caixa Postal 780 – 13563-120 São Carlos – SP - E-mail: charlene_gonzaga@hotmail.com

²Fundo de Defesa da Citricultura Fundecitrus Caixa Postal 391 – 14807-040 Araraquara– SP

RESUMO

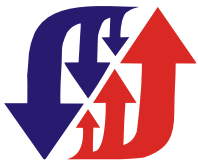
A biodegradação é um processo no qual os microrganismos (nativos) de uma região agem para realizar a reciclagem de compostos (nocivos) em busca de preservar, recuperar e proteger o ambiente natural. O espirodiclofeno (Esp.) tem a função de inibir a biossíntese lipídica e, é um pesticida cancerígeno para os seres humanos. O processo de biodegradação do pesticida realizado neste trabalho foi alcançado por meio Planejamento Fatorial (método Taguchi), utilizando o microrganismo Bacillus sp. 6F em um período de reação de 3 d. Observou-se que a melhor condição para biodegradação obtida pelo Planejamento Fatorial foi na presença do meio de cultura Peptona G, pH 5, temperatura 40 °C e rotação 200 rpm.

Palavras-chave: Espirodiclofeno, Bacillus sp. 6F, Planejamento Fatorial.

INTRODUÇÃO

Existe uma grande diversidade de pesticidas que são utilizados na produção integrada na citricultura, que incluem inseticidas, fungicidas e acaricidas. Devido à grande utilização desses compostos no combate a pragas, estudos foram realizados por Golge e Kabak (2015) para avaliar a presença de resíduos de 115 pesticidas que são utilizados na citricultura. Dentre os agroquímicos encontrados estão às classes de neocotinoídeos, piretroides, lactonas macrocíclicas, carbamatos, organofosforados, clopirifós entre outros. Esses compostos além de impedirem a proliferação de microrganismos nocivos as plantações podem em excesso pelo processo de lixiviação alcançar os rios e lagos contaminando as águas e até mesmo provocar doenças pelo consumo desses alimentos (referencia).

A biodegradação é um processo no qual os microrganismos (nativos) de uma região agem para realizar a reciclagem de compostos tóxicos ou xenobiotícos em busca de preservar, recuperar e proteger o ambiente natural (Tortora GJ, Funke BR, Case LC, 2012). Este processo de desintoxicação do meio ambiente utilizando bactérias possibilita o aumento da biodegradação, tornando o processo de biorremediação mais eficaz em alguns casos com total eliminação do contaminante no ambiente (Pinhatia et al., 2014). Dentre os pesticidas utilizados na cultura de citros há o espirodiclofeno um acaricida pertencente à família dos ácidos tetrônicos espirociclos (cetoenois) (Demaegh P. et al., 2013), que durante um período de uso pode causar sérios danos ao meio ambiente além de ser cancerígeno para seres humanos de acordo com Gabinete Ambiental de Proteção dos Estados Unidos das Américas (EUA) bem como, inibe a biossíntese lipídica (XIE, L.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

et al., 2012). Sendo assim, os estudos de degradação realizados neste trabalho poderão trazer informações importantes para o processo de biorremediação, produzindo metabólitos que sejam menos tóxicos que o composto utilizado.

MATERIAL E MÉTODOS

Cultivo do microrganismo em meio sólido

O crescimento da bactéria *Bacillus* sp. 6F foi realizado em placas de Petri com 25 mL de meio de cultura [15 g L⁻¹ de ágar, 8 g L⁻¹ de caldo nutriente, pH 7, 100 ppm de *Esp.*]. A ausência de contaminação dos meios sólidos foi confirmada previamente por incubação em estufa BOD a 34 °C durante 24 h. Placas controles na ausência do pesticida também foram realizadas.

Cultivo do microrganismo em meio líquido

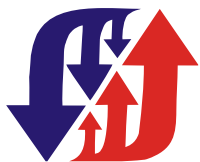
Os experimentos de biodegradação foram realizados em frascos Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio de cultura (Peptona G 12 g L⁻¹, caldo nutriente 8 g L⁻¹ e Solução Salina 0,86%) e foi utilizado um inóculo contendo 1 mL de suspensão (108 CFU/mL) da bactéria *Bacillus* sp. 6F obtida após 24 h de crescimento em cultura sólida.

Cada experimento para a biodegradação de *Esp.* foi incubado em um agitador orbital nas condições fornecidas pelo *Planejamento Fatorial* (Tabela 1) durante 24 h e, subsequentemente, a suspensão de bactérias foi transferida para um tubo de centrífuga de 250 mL (CR22GIII de alta velocidade refrigerado Centrifugue- HITACHI), 5000 rpm, 4 ° C, 2 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o sedimento (bactérias) foi adicionado ao frasco Erlenmeyer de 125 mL com 50 mL de meio de cultura nas condições dadas pelo *Planejamento Fatorial* (Tabela 1). Em seguida, o *Esp.* (100 ppm) foi adicionado à suspensão de bactérias previamente cultivadas na presença do pesticida e o frasco foi incubado em um agitador orbital nas condições dadas pelo *Planejamento Fatorial* (Tabela 1).

Após 120 h, o *Esp.* e os seus metabólitos foram extraídos da suspensão de bactérias de cada experimento de biodegradação utilizando 30 mL de acetato de etila por agitação vigorosa durante 30 min. Em seguida foi realizada uma centrifugação (CR22GIII de alta velocidade refrigerado Centrifugue- HITACHI), 10.000 rpm, 20 min e o sobrenadante foi transferido para um frasco de Erlenmeyer de 125 mL. O pH do meio foi ajustado para pH 7,0 e realizou-se a extração líquido-líquido com 30 mL de AcOEt em triplicata. A fase orgânica foi seca com Na₂SO₄ anidro e o solvente foi evaporado a vácuo. As amostras foram suspensas em metanol em balão volumétrico de 5 mL e em seguida analisadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

Planejamento Fatorial (método Taguchi)

Para o *Planejamento Fatorial* utilizou-se de quatro variáveis e três níveis. Neste caso as variáveis utilizadas foram *meio de cultura* (Peptona G, caldo nutriente, solução salina), *temperatura* (24, 32, 40°C), *pH* (5, 7, 9) e *rotação* (60, 130, 200). Optou-se por utilizar o método Taguchi pois reduz significativamente o número de experimentos, dando um total de nove experimentos (Tabela 1) (McEwan et al., 1993).



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Quantificação do pesticida *Esp.* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAEUV)

As análises foram realizadas utilizando sistema cromatográfico Shimadzu, composto pelos seguintes módulos: sistema de bombeamento LC-20AT, desgaseificador DGU-20A5, amostrador automático SIL-20AHT, detector UV-VIS SPD20A, forno de coluna CTO-20A, controlador de sistema CBM-20A e coluna Phenomenex (250 x 4,6 mm). O material foi eluído com uma mistura de 0,5% de ácido fórmico em água (solvente A) e 0,5% de ácido fórmico em acetonitrila (solvente B): 0-15 min, 20% B, 0,5 fluxo; 15-16 min, 20% B, 0,7 fluxo; 16-49 min em 75% B, 1,0 fluxo (gradiente linear). A temperatura do forno foi de 40°C, fluxo de 1,0 mL min⁻¹ e volume de injeção de 10 µL. A detecção ultravioleta foi realizada em 277 nm. Tempo total de análise foi de 50 min e o tempo de retenção do *Esp.* 45,3 min. O *Esp.* foi determinado quantitativamente utilizando soluções padrões de concentrações 5, 10, 25, 200, 400, 600 e 1000 ppm de *Esp.* em metanol gerando a equação linear $c = 3508,8 x + 48420$ com $R^2 = 0,9954$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

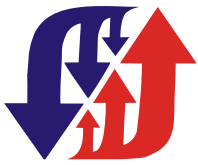
O processo de biodegradação do pesticida *Esp.* foi realizado com a bactéria *Bacillus* sp. 6F isolada do Cerrado Reflorestado localizado próximo ao CAMPUS II da Universidade de São Paulo (USP). Com aplicação do método estatístico (Taguchi), nove condições experimentais foram realizadas. Como pode-se observar na Tabela 1 as condições 3 (96,32%) e 7 (88,55%) foram as que melhor biodegradaram o pesticida em 3d.

Tabela 1: Condições obtidas para o *Planejamento Fatorial* baseado no método Taguchi e quantificação da biodegradação do pesticida *Esp.* pela bactéria *Bacillus* sp. 6F.*

Condições	Meio de cultura	pH	Temperatura (°C)	Rotação (rpm)	Concentração de biodegradação do <i>Esp.</i> (3 d) (ppm)
1	Peptona G	5	24	60	0,00 ± 0,00
2	Peptona G	7	32	130	52,44 ± 3,84
3	Peptona G	9	40	200	96,32 ± 0,93
4	Solução Salina	5	24	60	69,62 ± 2,21
5	Solução Salina	7	32	130	0,01 ± 0,01
6	Solução Salina	9	40	200	15,23 ± 0,44
7	Caldo Nutriente	5	24	60	88,55 ± 1,20
8	Caldo Nutriente	7	32	130	21,35 ± 5,80
9	Caldo Nutriente	9	40	200	7,81 ± 1,55

*Concentração inicial *Esp.* 100 ppm.

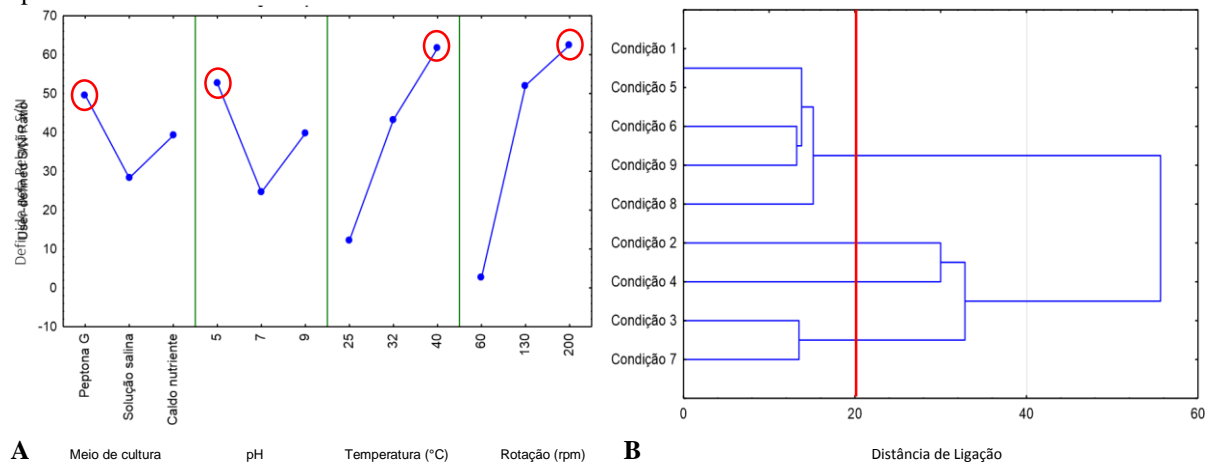
O gráfico obtido na Figura 1-A mostra os níveis que melhor induziram na biodegradação do *Esp.* Podemos observar que o meio de cultura *Peptona G*, pH 5, temperatura 40°C e rotação 200 rpm foram os parâmetros que influenciaram significativamente a obtenção de altos valores de biodegradação em 3 d.



XII Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática ENZITEC 2016

Análises estatísticas por meio de dendogramas (Figura 1-B) foi realizada para melhor interpretação da Tabela 1. Estabelecendo 20 como distância de ligação há a formação de 4 grupos. Sendo o primeiro *cluster* formado pelas *condições 1, 5, 6, 8 e 9* (0,0%, 0,0%, 15%, 21% e 8%) tendo os menores valores de biodegradação, o segundo *cluster* formado pelas *condições 3 e 7* (96% e 88%) tendo os melhores valores de biodegradação e as *condições 2 (52%) e 4 (70%)* permaneceram isoladas, estando com valores intermediários de degradação entre os outros dois *cluster*.

Figura 1: (A) Influência das variáveis com relação a melhor resposta, (B) Dendograma representando a relação de similaridade entre as condições testadas para a biodegradação do *Esp.* Pela bactéria *Bacillus sp.* 6F.



CONCLUSÕES

Com os estudos realizados por *Planejamento Fatorial* para a degradação de *Esp.*, foi possível observar que houve quase que completa degradação do composto na *condição 3* ($96,32 \pm 0,93$) e *condição 7* ($88,55 \pm 1,20$) com 3 d de reação. Além de averiguar que a melhor condição para a degradação do *Esp.* obtida pelo *Planejamento Fatorial* foi meio de cultura Peptona G, pH 5, temperatura 40 °C e rotação 200 rpm. Sendo assim, a bactéria *Bacillus sp.* 6F é um microrganismo promissor para a degradação do *Esp.*

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Demaegh P, Dermauw W, Tsakireli D, Khajehali J, Nauen R, Tirry L, Vontas J, Lümme P, Van Leeuwen T.2013. Molecular analysis of resistance to acaricidal spirocyclic tetrone acids in *Tetranychus urticae*: CYP392E10 metabolizes spirodiclofen, but not its corresponding enol. *Insect Biochem Mol Biol* 43:544-554.

Golge O, Kabak B.2015. Determination of 115 pesticide residues in oranges by high-performance liquid chromatography –triple-quadrupole mass spectrometry in combination with QuEChERS method. *J Food Compos Anal* 41:86-97.

Pinhatia FR., Aguilab EMD, Tórresc APR, Sousac MP, Santiagoc VMJ, Silvab JT, Paschoalimb VMF.2014. Avaliação da eficiência de degradação de hidrocarbonetos aromáticos por bactérias provenientes de estação de tratamento de efluente de refinaria de petróleo. *Quím Nova* 8:1269-1274.

Tortora GJ, Funke BR, Case LC.2010. *Microbiology: An introduction*. Editora Atmed SA, Copyright. São Paulo. pp.767-779.