



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**FLAVIANA MEDEIROS ARAUJO**

**POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DO IMIDACLOPRIDO POR  
ACTINOBACTÉRIAS PERTENCENTES AOS GÊNEROS *GORDONIA* E  
*MICROCOCCUS***

**FORTALEZA**

**2021**

FLAVIANA MEDEIROS ARAUJO

POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DO IMIDACLOPRIDO POR  
ACTINOBACTÉRIAS PERTENCENTES AOS GÊNEROS *GORDONIA* E  
*MICROCOCCUS*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Davila Zampieri.  
Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Elisane Longhinotti.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- A689p Araujo, Flaviana Medeiros.  
Potencial de biodegradação do imidacloprido por actinobactérias pertencentes aos gêneros *Gordonia* e *Micrococcus* / Flaviana Medeiros Araujo. – 2021.  
64 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2021.  
Orientação: Prof. Dr. Davila de Souza Zampieri .  
Coorientação: Prof. Dr. Elisane Longhinotti .
1. Biorremediação. 2. Actinobactérias. 3. Imidacloprido. 4. GC-MS. 5. ESI-MS. I. Título.
- CDD 540
-

FLAVIANA MEDEIROS ARAUJO

POTENCIAL DE BIODEGRADAÇÃO DO IMIDACLOPRIDO POR  
ACTINOBACTÉRIAS PERTENCENTES AOS GÊNEROS *GORDONIA* E  
*MICROCOCCUS*

Dissertação apresentada a Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Davila Zampieri (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. André Henrique Barbosa de Oliveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Vania Maria Maciel Melo  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Pedro Vendarimini  
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)

A Deus.

Aos meus pais, Luisa e Flávio.

## AGRADECIMENTOS

A Deus primeiramente por me conceder o dom da vida, pela saúde, pelas portas abertas que me trouxeram oportunidades de me preparar como profissional nessa instituição e por tantas outras coisas que viabilizaram a minha caminhada até aqui.

Aos meus familiares, em especial aos meus pais por me incitarem desde sempre à estudar e me apoiarem em todos os momentos para que eu obtivesse sucesso em cada etapa. Aos meus amigos e colegas de laboratório que me ajudaram dedicando muitas vezes tempo e atenção para me auxiliar na pesquisa.

Sou grata aos meus colegas de apartamento pelo companheirismo e ajuda nos momentos difíceis e em especial ao Pedro Gonçalves por toda atenção e apoio que me deu em quase todos os momentos da minha trajetória na universidade até aqui.

Às minhas orientadoras Dávila Zampieri e Elisane Longhinotti pela tamanha dedicação nos ensinamentos práticos e teóricos, sem os quais eu não poderia ter chegado aqui, pela inspiração trazida nas palavras de ânimo que foram por muitas vezes para mim um combustível necessário, pela paciência e compreensão durante todo o tempo de trabalho juntas.

A Profa. Vânia Melo e ao Prof. Diego Lomonaco, que me deram grande apoio em recursos materiais tornando possível a execução desse trabalho.

À Profa. Vânia Melo e a Dra. Mirella Leite que me proporcionaram a rica oportunidade de adquirir novos conhecimentos na área de microbiologia contribuindo fortemente para o enriquecimento do presente trabalho.

Aos professores responsáveis pelo grupo de Bioinorgânica que também contribuíram grandemente com espaço e equipamentos, em especial agradeço ao Wellinson Gadelha por ceder um pouco do seu tempo para me auxiliar em alguns experimentos.

Ao NUTEC e a Dra. Renata de Oliveira Silva, pelas análises de ESI-MS

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

Aos professores participantes da banca examinadora Profa. Vânia Maria Maciel Melo, Prof. Dr. André Henrique Barbosa de Oliveira e Dr. Pedro Henrique Vendramini, pelas valiosas colaborações e sugestões.

Aos colegas da turma de mestrado, pelas reflexões, críticas e sugestões recebidas.

“Existem recursos suficientes neste planeta para atender as necessidades de todos, mas não o bastante para satisfazer o desejo de posse de cada um.”

Mahatma Gandhi

## RESUMO

Os neonicotinoides compreendem um dos grupos mais importantes de pesticidas, sendo o imidacloprido um dos neonicotinoides mais amplamente utilizados. Trata-se de um contaminante que oferece grandes riscos aos organismos não-alvo, como os polinizadores. A biorremediação explora dois processos que ocorrem naturalmente no meio ambiente, a biodegradação e a biotransformação. Consiste numa ferramenta biotecnológica, econômica, ecologicamente correta. Nesse contexto, o presente estudo visa verificar a capacidade de biodegradação do inseticida imidacloprido por cepas de actinobactérias. O princípio ativo imidacloprido foi extraído de um produto comercial para ser utilizado nos ensaios de biodegradação. Duas cepas foram selecionadas a partir da avaliação qualitativa da curva de crescimento em meio de cultura controle. As cepas HEXBA05 e HEXBA06 apresentaram menor tempo de crescimento e foram utilizadas nos ensaios de biodegradação do imidacloprido. As técnicas de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas e Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray por infusão direta foram utilizadas nas análises. Os metabólitos de degradação foram sugeridos com base em espectros padrão obtidos por ionização por Impacto de Elétrons disponíveis na base de dados NIST 11 e por comparação com espectros de análise sequencial de massas (MS/MS). Os metabólitos ácido nicotínico e 2-hidrazino-2-imidazolina foram sugeridos com base na comparação com espectros padrão de fragmentação obtidos por impacto de elétrons com 94% e 87% de similaridade respectivamente. Foi possível, verificar a capacidade metabólica das cepas para possível aplicação em biorremediação do inseticida em estudo, uma vez que os metabólitos ácido 3-piridinocarboxílico, 2-hidrazino-2-imidazolina, imidacloprido-urea e imidacloprido-guanidina foram observados, os quais apresentam menor toxicidade aos insetos e/ou menor persistência ambiental que o precursor imidacloprido de acordo com dados da literatura. Metabólito de igual toxicidade ou mais tóxicos que o precursor imidacloprido como, 5-hidroxi-imidacloprido, ácido 6-clorinicotínico e imidacloprido-olefina não foram detectados no presente estudo.

**Palavras-chave:** Biorremediação. Actinobactérias. Imidacloprido. GC-MS. ESI-MS.

## ABSTRACT

Neonicotinoids comprise one of the most important groups of pesticides, with imidacloprid being one of the most widely used neonicotinoids. It is a contaminant that poses great risks to non-target organisms, such as pollinators. Bioremediation explores two processes that occur naturally in the environment, biodegradation and biotransformation. It consists of a biotechnological, economical, ecologically correct tool. In this context, the present study aims to verify the biodegradation capacity of the imidacloprid insecticide by strains of actinobacteria. The imidacloprid active ingredient was extracted from a commercial product to be used in biodegradation tests. Two strains were selected from the qualitative evaluation of the growth curve in control culture medium. Strains HEXBA05 and HEXBA06 showed shorter growth times and were used in imidacloprid biodegradation tests. The Gas Chromatography techniques coupled to Mass Spectrometry and Mass Spectrometry with Electrospray ionization by direct infusion were used in the analysis. Degradation metabolites were suggested based on standard spectra obtained by electron impact ionization available in the NIST 11 database and by comparison with sequential mass analysis (MS / MS) spectra. The metabolites nicotinic acid and 2-hydrazino-2-imidazoline have been suggested based on the comparison with standard fragmentation spectra obtained by electron impact with 94% and 87% similarity respectively. It was possible to verify the metabolic capacity of the strains for possible application in the bioremediation of the under study, since the metabolites 3-pyridinecarboxylic acid, 2-hydrazine-2-imidazoline, imidacloprid-urea and imidacloprid-guanidine were observed, which present lower toxicity to insects and / or less environmental persistence than the precursor imidacloprid according to literature data. Metabolites of equal toxicity or more toxic than the imidacloprid precursor such as, 5-hydroxy-imidacloprid, 6-chloronicotinic acid and imidacloprid-olefin were not detected in the present study.

**Keywords:** Bioremediation. Actinobacteria. Imidacloprid. GC-MS. ESI-MS.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Estrutura molecular da nicotina.....	16
Figura 2	– Supostos mecanismos de interação entre o imidacloprido adsorvido à argila e ácidos húmicos.....	19
Figura 3	– Esquema geral do acompanhamento das curvas de crescimento microbiano.....	28
Figura 4	– Esquema geral do ensaio de biodegradação do imidacloprido e análise de metabólitos por GC-MS.....	30
Gráfico 1	– Curvas de crescimento dos isolados HEXBA05 e HEXBA06 em meio mineral suplementado com extrato de levedura e 1% (m/v) de glicose.....	32
Gráfico 2	– Curvas de crescimento dos isolados PETBA15 e QUEBA 05 em meio mineral suplementado com extrato de levedura e 1% (m/v) de glicose.....	33
Gráfico 3	– Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de um padrão de imidacloprido em água (■). Solução de imidacloprido 20 mg L <sup>-1</sup> preparada a partir dos cristais obtidos da extração do CIGARAL <sup>®</sup> 70% (▲).....	34
Figura 8	– FTIR dos cristais de imidacloprido.....	35
Figura 9	– Espectro de RMN de <sup>1</sup> H em CDCl <sub>3</sub> a 300 Hz dos cristais de imidacloprido.....	36
Figura 10	– Estrutura molecular do imidacloprido com posicionamento dos átomos de carbono e hidrogênio.....	37
Figura 11	– Espectro de RMN de <sup>13</sup> C-BB em CDCl <sub>3</sub> a 300 Hz dos cristais de imidacloprido.....	39
Figura 12	– Espectro ESI(+)-MS obtido a partir de uma solução aquosa na concentração de 10 ppm preparada a partir dos cristais de imidacloprido padrão analítico.....	40
Figura 13	– Espectro ESI(+)-MS obtido a partir de uma solução aquosa na concentração 10 ppm preparada a partir dos cristais extraídos de imidacloprido.....	40
Figura 14	– Espectro de MS/MS do íon <i>m/z</i> 256, a partir dos cristais extraídos (a) e do padrão analítico de imidacloprido (b).....	41

Figura 15 – Proposta de fragmentação para o íon de $m/z$ 256 referente à espécie $[M + H]^+$ do imidacloprido.....	42
Figura 16 – Clivagem oxidativa da molécula de imidacloprido nas porções cloropiridinil e imidazolidina e formação do ácido 6-CNA.....	44
Figura 17 – Via metabólica para o imidacloprido com biotransformação na porção nitroimina.....	47
Figura 18 – Espectro ESI(+)-MS obtido a partir do sistema de degradação com tempo de incubação de 312 h.....	48
Figura 19 – Espectro de MS/MS do íon de $m/z$ 211 a partir do sistema de biodegradação com tempo de incubação de 312h.....	48
Figura 20 – Proposta de fragmentação para o íon de $m/z$ 211 referente à espécie $[M + H]^+$ do imidacloprido guanidina.....	49
Figura 21 – Espectro de ESI(+)-MS obtido a partir do sistema de biodegradação com tempo de incubação de 312 h.....	50
Figura 22 – Espectro de MS/MS do íon de $m/z$ 212 obtido a partir do sistema de biodegradação com tempo de incubação de 312h.....	50
Figura 23 – Proposta de fragmentação para o íon $m/z$ 212 referente à espécie $[M + H]^+$ do imidacloprido ureia.....	51

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1</b>	<b>Pesticidas</b> .....	14
<b>1.2</b>	<b>Neonicotinoides</b> .....	16
<b>1.3</b>	<b>Imidacloprido</b> .....	17
<b>1.4</b>	<b>Destino ambiental</b> .....	18
<b>1.5</b>	<b>Biorremediação</b> .....	21
<b>1.6</b>	<b>Actinobactérias</b> .....	22
<b>1.7</b>	<b><i>Gordonia e Micrococcus</i></b> .....	23
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	26
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	26
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	26
<b>3</b>	<b>EXPERIMENTAL</b> .....	27
<b>3.1</b>	<b>Cepas bacterianas</b> .....	27
<b>3.2</b>	<b>Curvas de crescimento para as cepas HEXBA06, HEXBA05, PETBA15 e QUEBA05</b> .....	27
<b>3.3</b>	<b>Extração do imidacloprido</b> .....	28
<b>3.4</b>	<b>Ensaio de biodegradação</b> .....	29
<b>3.4.1</b>	<b><i>Pré-inóculo</i></b> .....	29
<b>3.4.2</b>	<b><i>Inóculo</i></b> .....	29
<b>3.4.3</b>	<b><i>Estudos analíticos</i></b> .....	30
<b>3.4.3.1</b>	<b><i>Análises por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) dos cristais</i></b> .....	30
<b>3.4.3.2</b>	<b><i>Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do imidacloprido</i></b> .....	30
<b>3.4.3.3</b>	<b><i>Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas na identificação dos metabólitos de degradação</i></b> .....	31
<b>3.4.3.4</b>	<b><i>ESI-MS na identificação dos metabólitos de degradação</i></b> .....	31
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	32
<b>4.1</b>	<b>Curva de crescimento</b> .....	32
<b>4.2</b>	<b>Obtenção dos cristais de imidacloprido por extração em acetato de etila</b> .....	34
<b>4.3</b>	<b>Análises de FTIR dos cristais</b> .....	35
<b>4.4</b>	<b>Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)</b> .....	35
<b>4.5</b>	<b>Perfil espectral obtido por ESI(+)-MS</b> .....	39

<b>4.6</b>	<b>Tentativa de identificação dos produtos de degradação do imidacloprido.....</b>	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>53</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>
	<b>APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS ADQUIRIDOS POR CG-MS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS.....</b>	<b>65</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Pesticidas

“Pesticida” é o termo dado à todo produto químico cuja finalidade é combater certos grupos de organismos. O uso demasiado de pesticidas é uma consequência do aumento da população mundial. O crescimento exponencial da população mundial leva a humanidade a intensificar as atividades de exploração dos recursos naturais da terra. A crescente demanda referente ao aumento na produção de alimentos por exemplo, é uma das consequências causadas por tal crescimento demográfico. Estima-se que houve um significativo crescimento da população mundial de aproximadamente 2 bilhões de pessoas nas primeiras décadas do século XX para 7,8 bilhões em 2020. (CAZALIS; LOREAU; HENDERSON, 2018; WORLDOMETER, 2021).

Uma vez que a agricultura cresce proporcionalmente ao aumento da demanda mundial de alimentos, alguns métodos que ajudam no aumento da produção agrícola são usados, como os pesticidas (CAZALIS; LOREAU; HENDERSON, 2018). Estima-se que desde o ano 2000, o valor em dólares das importações globais de pesticidas aumentou quase 300% (FAOSTAT, 2018). Tal crescimento ocorre mais rapidamente em locais onde uma porcentagem significativa da população está envolvida na agricultura. O uso geral de pesticidas está aumentando duas vezes mais rápido que a produção de alimentos (SHATTUCK, 2021). Estes insumos diminuem a perda na produção causadas por pragas, mantendo assim o alto rendimento na produtividade agrícola (ZIKANKUBA *et al.*, 2019).

Os inseticidas combatem os insetos, herbicidas combatem plantas daninhas e os fungicidas, os fungos. Estas são as principais classes de pesticidas e cada uma delas abrange uma gama de compostos definidos por suas diferentes propriedades, tais como propriedade iônica, não iônica e hidrofóbica, além dos mecanismos de ação e estrutura molecular (EEVERS *et al.*, 2017; GAVRILESCU, 2005). De fato os pesticidas são eficientes para melhorar a produtividade agrícola assim como na prevenção de doenças, desse modo tais produtos beneficiam a sociedade diretamente. No entanto, à medida que estes insumos são utilizados em grande escala, acabam se tornando uma ameaça ao meio ambiente uma vez que penetram no solo, nas águas (subterrâneas e superficiais), na atmosfera e biomassa até afetar também a saúde humana quando inalados, ingeridos ou através do contato dérmico (LI; JENNINGS, 2018). A contaminação por pesticidas portanto, tornou-se um dos problemas mais graves de saúde pública no mundo (LIU *et al.*, 2019).

Mais de 140.000 novos compostos químicos e pesticidas foram sintetizados desde os anos 50, deste número, os 5000 mais produzidos estão amplamente espalhados no meio ambiente, causando danos também a saúde humana. Estima-se que menos da metade destes produtos passaram por testes seguros e somente nos últimos 10 anos é que se começou a realizar testes rigorosos nos países desenvolvidos (LANDRIGAN *et al.*, 2018). Foi estimado que mais de 20.000 pesticidas comerciais incluindo herbicidas, fungicidas e inseticidas estão disponíveis no mercado, sendo gasto a cada ano a nível mundial cerca de cinco bilhões de libras com esses produtos (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2007; LANDRIGAN *et al.*, 2018). A experiência com três categorias de pesticidas, dentre elas os neonicotinoides, ilustra os desafios colocados por estes produtos relativamente novos e inadequadamente testados (LANDRIGAN *et al.*, 2018). Um dos pilares da economia do Brasil é a produção agrícola, sendo, por exemplo, o segundo maior produtor de soja do mundo e um importante produtor e exportador de várias outras culturas de commodities (PAUMGARTTEN, 2020). Para proteger a cultura de soja em particular, os neonicotinoides são também comumente utilizados no Brasil (FARIAS *et al.*, 2020).

Diante disso, o uso de pesticidas no país teve um aumento considerável sendo proporcional ao aumento acentuado na produção de grãos. O Brasil é um dos quatro maiores consumidores de pesticidas do mundo juntamente com EUA, UE e China que também fazem parte da lista de principais consumidores de pesticidas (PAUMGARTTEN, 2020). O uso de inseticidas no Brasil, por exemplo, aumentou mais de 150% nos últimos 15 anos, sendo considerado em 2018 o país com maior consumo de inseticidas do mundo (DOS SANTOS; OTESBELGUE; BLOCHTEIN, 2018). Outro agravante está relacionado com a flexibilização da legislação de agrotóxicos no país, uma vez que o compromisso de proibição ou eliminação gradual de pesticidas no Brasil pode ser revertido (DONLEY, 2019).

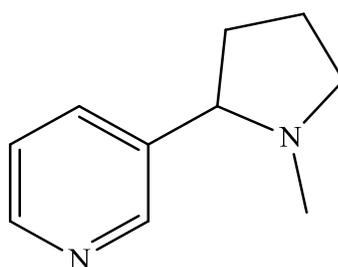
O governo atual do Brasil por exemplo, têm flexibilizado a legalização de pesticidas atingindo número recorde de registros. Ainda que a proibição de um determinado pesticida seja uma medida eficaz no impedimento da exposição, a substituição desses produtos por outros muitas vezes pode causar danos semelhantes. Um exemplo desse fato é a substituição de pesticidas organofosforados por neonicotinoides, que resolveu o problema dos danos causados aos seres humanos, porém oferece um risco muito maior aos polinizadores (DONLEY, 2019). Seguindo essa tendência de regulamentações, tem-se que desde 2019 foram aprovados 475 novos agrotóxicos, segundo o governo essa aceleração na aprovação de novos insumos tem como finalidade a desburocratização do licenciamento destes novos produtos, processo esse que duravam em média 6 a 8 anos. Apenas 8% dos 475 pesticidas são biológicos (utilisa-se

organismos vivos para o controle de pragas), enquanto que 92% restante são “químicos” (BRAGA *et al.*, 2020).

## 1.2 Neonicotinoides

Os neonicotinoides são compostos sintéticos e possuem uma estrutura semelhante à da nicotina (Figura 1) (HLADIK; MAIN; GOULSON, 2018). Estes foram desenvolvidos no início dos anos 90 e têm autorização de uso para mais de 140 cultivos no mundo como, grãos, frutas, legumes, cereais, flores dentre outros (BRASIL, 2016a; MORRISSEY *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2018), gem no combate de insetos como, pulgões, tripses, moscas brancas, cupins, insetos de grama, besouros, dentre outros (WANG *et al.*, 2009) e compreendem um dos grupos mais importantes de pesticidas. Devido às vantagens reportadas pela literatura (EXTOXNET, 1996; VIEIRA *et al.*, 2018), este grupo tem se tornado um forte substituto aos grupos de pesticidas mais antigos como os organofosforados e substituem também os carbamatos em todo o mundo (JESCHKE *et al.*, 2010; VIEIRA *et al.* 2018). Os neonicotinoides estão em uso a mais de duas décadas (HLADIK; MAIN; GOULSON, 2018). O primeiro neonicotinoide, imidacloprido, foi introduzido no mercado em 1991, mais tarde, em 1995, acetamiprido, tiametoxan em 1998, tiacloprido e clotianidina em 2001 e dinotefuran em 2002 (BASS *et al.*, 2015; HLADIK; MAIN; GOULSON, 2018).

Figura 1 – Estrutura molecular da nicotina.



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

Desde os anos 2000, o uso de neonicotinoides tem se intensificado em todo mundo, tornando-se a classe que representa 25% do mercado global de inseticidas (BASS *et al.*, 2015; HLADIK; MAIN; GOULSON, 2018; VIEIRA *et al.*, 2018). Assim, as vendas globais por ano chegam a ultrapassar US \$ 3,5 bilhões (WANG, X. *et al.*, 2018). As regiões que mais usam neonicotinoides são América Latina, Ásia e América do Norte, contribuindo com 75% do uso

total e Europa com 11% (BASS *et al.*, 2015; WANG, X. *et al.*, 2018). Diante desse cenário, é conhecido que a utilização indiscriminada destes pesticidas na agricultura causa danos ao meio ambiente como a contaminação do solo das culturas tratadas, seguida de uma consequente transferência de resíduos para os corpos hídricos (ITURBURU *et al.*, 2018; SÁNCHEZ-BAYO; GOKA; HAYASAKA, 2016).

Estudos anteriores mostraram os danos que os neonicotinoides causam aos organismos não alvo (CHEN *et al.*, 2019; JIANG *et al.*, 2019; TANG *et al.*, 2019). Uma das maiores preocupações causadas pela utilização indiscriminada desses compostos se dá pela periculosidade que estes apresentam aos insetos polinizadores (DIAMOND, 2017). As abelhas são os polinizadores mais importantes atualmente, uma vez que, 75 a 80% da produção de alimentos dependem delas (JIMÉNEZ-LÓPEZ *et al.*, 2019). Os danos causados às abelhas pelos neonicotinoides permanecem no centro das atenções desde 1996 quando o imidacloprido foi associado à morte de colmeias. Outros estudos apontam que os inseticidas são tóxicos à aves (HLADIK; MAIN; GOULSON, 2018), invertebrados aquáticos peixes, anfíbios e morcegos (ITURBURU *et al.*, 2018; MORRISSEY *et al.*, 2015; VIEIRA *et al.*, 2018). Também foi relatado o acúmulo de neonicotinoides em vegetação não alvo (MAIN *et al.*, 2017). Em vista disso, em 2013, a comissão europeia decidiu restringir o uso de três neonicotinoides, sendo um destes, o imidacloprido (DIAMOND, 2017).

### 1.3 Imidacloprido

O imidacloprido (IUPAC: 1-(6-cloro-3-piridinilmetil)-N-nitro-imidazolidin-2-ilidenoamina) é um inseticida amplamente usado também como alternativa aos inseticidas organoclorados carcinogênicos, como o DDT (diclorodifeniltricloroetano) (LACSON *et al.*, 2018). É potencialmente eficiente no controle de pragas sugadoras (ADAK *et al.*, 2012; MAHAPATRA *et al.*, 2017a) e desde sua introdução no mercado tem sido utilizado para diferentes finalidades, como proteção de cultivos em jardins, por exemplo, (ITURBURU *et al.*, 2018; SIMON-DELSO *et al.*, 2014) e também como medicamento para tratamentos veterinários (WANG *et al.*, 2018). Quanto à aplicação agrícola, o imidacloprido é usado no tratamento de sementes de arroz, algodão, milho, soja, trigo, dentre outras (BRASIL, 2016a). Todavia, sua toxicidade às abelhas causou preocupação mundial e sua aplicação passou a ser regulada pela Comissão Europeia (Regulamento UE n.º 485/2013), já na França, o uso desse composto foi proibido (DIAZ *et al.*, 2017).

A China é o maior exportador e produtor de imidacloprido, chegando a produzir e

exportar anualmente 14.000 e 8.000 toneladas, respectivamente (GUO *et al.*, 2018). O imidacloprido por ser considerado persistente em solos arenosos, com o tempo de meia vida de quase um ano, oferece grandes riscos de contaminação aos recursos hídricos. Além disso, esse composto possui solubilidade considerada alta de aproximadamente  $580 \text{ mg L}^{-1}$ , o que agrava ainda mais os riscos de contaminação (DIAZ *et al.*, 2017; LACSON *et al.*, 2018). Durante os estudos de monitoramento de águas superficiais globais, o imidacloprido chegou a ser detectado em 89–100% das amostras analisadas (HLADIK; MAIN; GOULSON, 2018; STARNER; GOH, 2012; VAN DIJK; VAN STAALDUINEN; SLUIJS, 2013).

O imidacloprido também foi detectado em efluentes de estações de tratamentos situados no norte da Califórnia nos EUA com um baixo percentual de remoção, em que aproximadamente 40% do composto foi removido com o auxílio de técnicas tradicionais de tratamento como por exemplo, desinfecção ultravioleta e desinfecção por cloração (LACSON *et al.*, 2018; SADARIA *et al.*, 2016; SADARIA; SUPOWIT; HALDEN, 2016). Os recentes valores de referência de ecotoxicidade aquática estabelecidos pela *United States Environmental Protection Agency* (EPA) referentes à toxicidade aguda e crônica do imidacloprido são de 385 e  $10 \text{ ng L}^{-1}$ , respectivamente (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2017; HLADIK; MAIN; GOULSON, 2018).

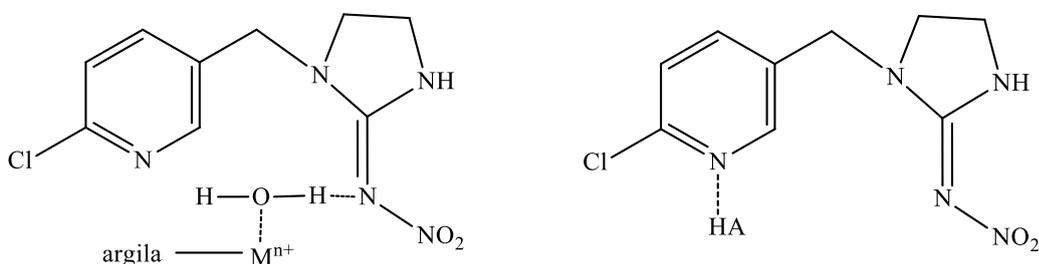
Os LRMs (Limites Residuais Máximos) para o imidacloprido foram estabelecidos pela Comissão Europeia (EUROPEAN COMMISSION, 2016) em várias legislações oficiais. No Brasil, por exemplo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) juntamente ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) monitoram diversos resíduos de agrotóxicos em alimentos. No relatório de monitoramento da ANVISA entre os anos de 2013 e 2015, o imidacloprido foi detectado em concentrações acima do LMR ( $0,07 \text{ mg L}^{-1}$ ) (ARMELIM *et al.*, 2018; BRASIL, 2016b). No relatório de 2017 e 2018 mais recente publicado pela ANVISA, destacou o imidacloprido como um dos insumos com maior índice de detecção. O imidacloprido foi detectado em amostras não autorizadas para a cultura e em 37 amostras com concentração acima do LRM (BRASIL, 2019).

Muitos métodos são empregados na determinação de imidacloprido. Técnicas analíticas instrumentais tais como Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) apresentam alta sensibilidade e precisão, o que torna viável o estudo de identificação desse contaminante em diferentes matrizes (SI *et al.*, 2018).

#### **1.4 Destino ambiental**

O imidacloprido é considerado persistente, uma vez que não é rapidamente degradado. Liu *et al.* (2002) elucidaram o mecanismo de sorção do imidacloprido no solo por espectrometria no infravermelho, demonstrando que a sorção ocorre através das ligações de hidrogênio entre N=N do imidacloprido e os cátions hidratados da superfície dos argilominerais. Além disso, foi comprovado que o grupo C=N pode formar ligações de hidrogênio com os grupos hidroxila do ácido húmico, de acordo com a Figura 2. (LIU; ZHENG; GAN, 2002; SATKOWSKI *et al.*, 2018).

Figura 2 – Suposto mecanismo de interação entre o imidacloprido adsorvido à argila e ácidos húmicos.



Fonte: Adaptado de Liu *et al.* (2002).

Outros fatores influenciam no processo de degradação como a textura do solo, temperatura, radiação ultravioleta, estrutura da comunidade microbiana e sua capacidade de degradação, pH, dentre outros (BARRIUSO; BENOIT; DUBUS, 2008; VRYZAS, 2018). A umidade também é um fator determinante; em solo seco a adsorção de pesticida é maior e a atividade microbiana é reduzida, assim o tempo de meia-vida pode aumentar significativamente nessa condição (GUPTA; GAJBHIYE, 2007; VRYZAS, 2018). Outras formas de dissipação de pesticidas além da degradação biótica e abiótica que ocorrem são: drenagem, evaporação, diluição, absorção e lixiviação, porém, a degradação biótica é a mais investigada. Portanto, a estrutura microbiana em questão e a sua capacidade de degradação é um fator primordial na descontaminação ambiental por pesticidas (VRYZAS, 2018).

A lixiviação de pesticidas de modo geral a partir do solo é responsável pela contaminação das águas subterrâneas, mas também podem atingir as águas superficiais de várias formas. A aplicação por pulverização, a utilização de sementes revestidas de pesticidas e a dispersão pelo vento provocam a contaminação das águas superficiais de forma direta. Assim como no solo, a dissipação desses compostos em água também depende de alguns fatores como a luz do sol, pH, temperatura, matéria orgânica dissolvida, peixes, zooplâncton e microrganismos. Nesse caso, a fotodegradação é uma das principais vias de dissipação de

pesticidas em água. Pesticidas com alta solubilidade são facilmente movidos do solo para as águas superficiais, seja pela ação do escoamento da água da chuva ou da irrigação (VRYZAS, 2018).

O imidacloprido sofre hidrólise de forma lenta em meio ácido e neutro. Em um estudo realizado por Zheng e Liu (1999), apenas 1,5% do conteúdo inicial de imidacloprido foi perdido após três meses em pH 7. A hidrólise se tornou mais rápida em condições básicas, com perda de 20% após três meses em pH 9, formando o derivado imidacloprido ureia como produto majoritário. Os valores de meia-vida em pH 10,8 e pH 11,8 resultaram em 20,0 e 2,85 dias, respectivamente. Esses resultados também corroboram com os resultados obtidos por Guzsvány *et al.* (2007). Nesse último estudo, o imidacloprido se manteve estável em pH 7 e 4. Com base nesses estudos, pode-se afirmar que o imidacloprido é estável à hidrólise em pH ambientalmente relevante, portanto, não se é esperado que esse seja um processo preferencial de dissipação desse inseticida no meio ambiente (CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT, 2007). A fotodegradação também é acelerada em pH alto (MAHAPATRA *et al.*, 2017b).

Apesar da exposição à luz se mostrar eficiente na degradação do imidacloprido (MAHAPATRA *et al.*, 2017b), outro estudo (DIAMOND, 2017) relata algumas consequências negativas a partir da fotodegradação desse composto. Um dos resultados obtidos identificou o N<sub>2</sub>O como único produto gasoso formado, esse explicado pela clivagem inicial do grupo -NO<sub>2</sub>. O NO<sub>2</sub> se mantém preso ao sólido, recombina-se com outro fragmento gerado na fotólise, o que libera energia suficiente para provocar reações intramoleculares, resultando na formação do N<sub>2</sub>O. A problemática ambiental gerada a partir da formação desse gás é alarmante, uma vez que contribui para o efeito estufa, com potencial de aquecimento global 250 vezes maior que o do CO<sub>2</sub>, além de contribuir para a destruição do ozônio estratosférico (CHAO; CASIDA, 1997; DIAMOND, 2017).

Além da formação de N<sub>2</sub>O, outro estudo indica que a fotodegradação do imidacloprido leva à formação de dois compostos principais, um derivado de ureia (IMD-UR) e um derivado desnitro (IMD-DN), na proporção respectiva de 80:20. Ambos os produtos são mais estáveis, resistindo à fotodegradação sob condições ambientais (AREGAHEGN, *et al.*, 2017; DIAMOND, 2017). O IMD-DN, por sua vez, tem uma afinidade de ligação mais elevada que o seu precursor para os locais receptores da acetilcolina, implicando, desse modo, também na toxicidade aos mamíferos (CHAO; CASIDA, 1997; DIAMOND, 2017). Em vista disso, procedimentos ideais de degradação que permitam a completa degradação e/ou

transformação de pesticidas em produtos não tóxicos, tem gerado grande interesse na comunidade científica (DERBALAH *et al.*, 2019), dentre estes, destaca-se a biorremediação, que será abordada a seguir.

### 1.5 Biorremediação

Esforços têm sido empregados no desenvolvimento de métodos de remediação mais eficientes, ecologicamente sustentáveis, ambientalmente amigáveis e com custo efetivo, tudo isso recorrendo às ferramentas biotecnológicas (HUSSAIN, 2018; KUPPUSAMY, 2017). A biorremediação responde a todos os quesitos anteriormente mencionados, pois se trata de uma ferramenta biotecnológica, econômica, ecologicamente correta, sendo alimentada por enzimas microbianas (KAUSHAL *et al.*, 2018). A biorremediação é um processo que depende essencialmente de microrganismos que utilizam enzimas para degradar os poluentes, convertendo-os em produtos inóxicos (NEWMAN *et al.* 1998) *apud* (KAUSHAL *et al.*, 2018). Sem contar com a vantagem de que os microrganismos são muito abundantes, consequentemente, são encontrados facilmente em solo natural (RAMADAN *et al.*, 2018).

Os microrganismos e suas vias metabólicas são os principais responsáveis pelas mais diversas transformações em níveis biológicos que ocorrem na biosfera. Estes seres podem degradar compostos tóxicos através da mineralização completa e do cometabolismo em condições aeróbicas ou anaeróbicas. As bactérias são microrganismos preferíveis para serem aplicadas em biorremediação, pois apresentam muitas vantagens, como tamanho reduzido do genoma, simplicidade relativa da célula, tempo de replicação curto e fácil adaptação (DVOŘÁK *et al.*, 2017).

Microrganismos são os primeiros colonizadores no meio ambiente e representam uma espécie de repositório microbiano com uma grande diversidade e riqueza molecular na natureza. Devido a essa característica onipresente, esses organismos são capazes de se adaptar, praticamente, a qualquer nicho ecológico, seja natural ou artificial. A diversidade microbiana é enorme, desse modo, a literatura disponível sobre os microrganismos caracterizados até a presente data representa apenas uma pequena fração da diversidade natural existente (MANASI *et al.* 2018).

A biorremediação é basicamente classificada em dois tipos: biorremediação *in situ* e *ex situ*. Na biorremediação *in situ* as técnicas que estão relacionadas a esse tipo de remediação são: *biosparging*, bioaugmentação e bioaeração. Estas possuem as vantagens de serem mais econômicas, relativamente passivas, não invasivas e envolverem processos de atenuação

natural (AZIZ, 2018; PARWEEN *et al.*, 2018). Porém possuem algumas desvantagens como, restrições ambientais e tempo de tratamento relativamente prolongado (AZIZ, 2018).

Na técnica *biosparging* o ar é injetado sob pressão abaixo do lençol freático permitindo desse modo o deslocamento da água para a matriz do solo. Essa tecnologia promove a remoção física dos compostos voláteis por volatilização direta enquanto contaminantes de baixa volatilidade que permanecem adsorvidos ou dissolvidos são primariamente degradados pelo processo de biodegradação. Já a bioaeração fornece ar ou oxigênio ao solo contaminado com a finalidade de estimular a biodegradação aeróbica. Essa técnica é portanto melhor aplicada para qualquer contaminante que seja mais facilmente degradado aerobicamente que anaerobicamente. A bioaumentação consiste na transferencia de microorganismos degradadores para o local poluído onde pode ocorrer a resistência de degradação dos contaminantes pelos microrganismos indígenas ou a esterilização do solo pelos contaminantes (Norris *et al.*, 1993). Essa estratégia visa ampliar a degradação, é portanto uma estratégia que está geralmente relacionada a bioestimulação em que água e suprimentos alimentares são intruduzidos no local contaminado promovendo assim uma melhoria no potencial de biodegradação dos microrganismos envolvidos (PARWEEN *et al.*, 2018).

As técnicas relativas à biorremediação *ex situ* são: biopilhas, compostagem e *landfarming*. Estas também possuem as vantagens de ter baixo custo, bom custo benefício além de poder ser realizada no local onde há contaminação. No entanto, existem algumas desvantagens associadas como, a necessidade de espaço para a implementação, tempo prolongado de tratamento e limitação de biodisponibilidade. Na técnica *landfarming* a matriz do solo contaminado é escavado sobre um leito de tratamento onde será combinado com nutrientes para a indução da biodegradação. Solos poluídos por pesticidas são frequentemente tratados por *landfarming*. A tecnologia da biopilha é semelhante, com a diferença de serem utilizados leitos de tratamento fechados (PARWEEN *et al.*, 2018). A compostagem tem como princípio a mistura do solo contaminado com aditivos orgânicos não perigosos como, esterco e resíduos agrícolas para estimular o crescimento de bactérias, minhocas e outros que são capazes de degradar os poluentes do solo (MORILLO; VILLAVARDE, 2017).

## 1.6 Actinobactérias

Diferentes microrganismos bacterianos já foram experimentados na biodegradação do imidacloprido (AKOIJAM *et al.*, 2018; ERGUVEN; YILDIRIM, 2019; RODRÍGUEZ-CASTILLO *et al.*, 2019). As actinobactérias pertencem a ordem Actinomycetales

(CHATURVEDI; KHURANA, 2019) são um grupo especial de bactérias Gram-positivas ou Gram-variáveis que possuem considerável capacidade de degradar pesticidas, propiciando assim a sua aplicação na estratégia de bioaugmentação (RAIMONDO *et al.*, 2019), desempenham portanto um papel muito relevante no meio ambiente, uma vez que têm a capacidade de degradar moléculas complexas, além disso, têm um potencial biotecnológico comprovado também na remoção de poluente inorgânicos recalcitrantes. Essa habilidade é o motivo pelo qual as actinobactérias são candidatas especiais para serem utilizadas em biorremediação, além de serem amplamente distribuídas em ecossistemas aquáticos e terrestres (ALVAREZ *et al.* 2012; ALVAREZ *et al.* 2017).

Estas bactérias utilizam ácido húmico no processo de reciclagem das substâncias, com incrível capacidade metabólica podem degradar também compostos clorados, nitroaromáticos, compostos aromáticos, metais pesados dentre outros, além disso, possuem capacidade de sobreviver em ambientes com condições extremas como, alta temperatura, baixa umidade e inanição de nutrientes (CHATURVEDI; KHURANA, 2019). As actinobactérias também possuem algumas características fisiológicas e metabólicas interessantes para o processo de biodegradação como a produção de enzimas extracelulares e a formação de uma ampla variedade de metabólitos secundários (ALVAREZ *et al.* 2017). Zhang *et al.* (2018) relataram que uma flora de solo agrícola sendo constituída principalmente por actinobactérias e proteobactérias, pode ter influência muito positiva na degradação de neonicotinoides, o que permite uma triagem de genes cruciais na capacidade de degradação microbiana.

### **1.7 *Gordonia* e *Micrococcus***

O gênero bacteriano *Gordonia* é composto por uma série de espécies versáteis que foram isoladas de inúmeros ambientes. *Gordonia* foi descrito como genero a cerca de 22 anos e até o ano de 2018 cerca de 39 espécies foram identificadas. Estes microrganismos são encontrados predominantemente em áreas de mangues e locais terrestres (SOWANI; KULKARNI; ZINJARDE, 2018), foram isolados de poços produtores de petróleo, solos contaminados com hidrocarbonetos, biofiltros de tratamento de águas residuais e de seres humanos (ARENSKÖTTER; BRÖKER; STEINBÜCHEL, 2004).

Tais actinomicetos foram anteriormente descritos como microrganismos de extenso valor biotecnológico, possuindo potencial para serem utilizados tanto em biotecnologia ambiental quanto industrial (ARENSKÖTTER; BRÖKER; STEINBÜCHEL, 2004; SOWANI; KULKARNI; ZINJARDE, 2018) uma vez que são adaptáveis ao ambiente pois podem crescer

em diferentes condições, possuem a capacidade de sintetizar uma gama de compostos como, compostos neuroativos, surfactantes, agentes antimicrobianos, além de excretar enzimas hidrolíticas, nitrilases, oxidoredutases, lipases, dentre outras que promovem biotransformação (SOWANI; KULKARNI; ZINJARDE, 2019, 2018) demonstrando assim, a capacidade de degradar xenobióticos, poluentes ambientais, polímeros naturais de biodegradação lenta dentre eles, hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos, compostos aromáticos alogenados, benzotiofenos, nitrilo, ftalatos, alquil piridinas dentre outros (ANDALIBI; FATAHI-BAFGHI, 2017; ARENSKÖTTER; BRÖKER; STEINBÜCHEL, 2004). Além disso, estas bactérias possuem a capacidade de degradação de compostos hidrofóbicos devido a presença de longas cadeias alifáticas dos ácidos micólicos constituintes da parede celular (ARENSKÖTTER; BRÖKER; STEINBÜCHEL, 2004). Diante disso, várias espécies desse gênero foram aplicadas em biorremediação de diferentes ambientes (SOWANI; KULKARNI; ZINJARDE, 2018). Espécies do gênero *Gordonia* já foram utilizadas na biodegradação de pesticidas como clorpirifós (ABRAHAM; SHANKER; SILAMBARASAN, 2013).

Algumas espécies desse gênero são patógenas oportunistas o que pode restringir em alguns casos a sua aplicação para fins de remediação ambiental, porém a tecnologia de transferência de genes possibilita a transferência de características genotípicas dessas espécies para outros microrganismos viabilizando dessa forma a sua aplicação (ARENSKÖTTER; BRÖKER; STEINBÜCHEL, 2004).

*Micrococcus* é um gênero pertencente a ordem Actinomycetales que compreende um grupo diversificado de bactérias do solo gram-positivas, não móveis e que não formam esporos. Embora bactérias pertencentes a esse gênero sejam considerados inofensivos e não patogênicos, alguns foram relacionados a algumas infecções causadas em humanos mais especialmente em pessoas imunocomprometidas, algumas dessas infecções são: foliculite, meningite, pneumonia dentre outras (DIB *et al.*, 2012). Estes microrganismos são frequentemente descritos na literatura como isolados de locais contaminados por hidrocarbonetos, sendo descritos como eficientes degradadores de petróleo, assim como os microrganismos do gênero *Gordonia*, linhagens do gênero *Micrococcus* também produzem biosurfactantes o que incrementa ainda mais seu valor biotecnológico (DELLAGNEZZE *et al.*, 2014).

Trata-se de um gênero de grande utilidade para aplicações biotecnológicas, podendo conter diversas enzimas como, glutaminase, esterases, catalase, oxidase dentre outras. Têm se mostrado também importante para aplicações em biorremediação, uma vez que podem catabolizar uma gama de compostos xenobióticos, como piridinas, inseticidas, herbicidas,

corantes, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs), polímeros de poliacrilonitrila, compostos clorados, sem contar com a capacidade de algumas espécies de acumular metais pesados (DIB *et al.*, 2012). Uma cepa pertencente a esse gênero mostrou por exemplo, tolerância de arsênio além de acumular uma ampla gama de concentrações ambientalmente relevantes do referido metal na forma inorgânica (PAUL *et al.*, 2018), além disso, espécies desse gênero já foram utilizadas na biodegradação de pesticidas como diuron (SHARMA; SURI, 2011).

Diante disso, o presente trabalho visa contribuir com uma investigação sistemática da capacidade metabólica de duas cepas inéditas em estudos com neonicotinoides pertencentes ao filo actinobactéria de dois gêneros distintos, *Gordonia* sp. e *Micrococcus* sp.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Avaliar a viabilidade da aplicação de duas cepas pertencentes a dois gêneros distintos de actinobactéria em biorremediação de solo contaminado com imidacloprido, a partir da análise da capacidade metabólica de ambas na degradação do inseticida.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Obter cristais de imidacloprido por uma extração líquido-líquido a partir de uma formulação comercial do pesticida utilizando acetato de etila como solvente extrator.
- Selecionar duas cepas para o ensaio de biodegradação do imidacloprido, partindo da avaliação qualitativa da taxa de velocidade de crescimento microbiano.
- Identificar os prováveis metabólitos obtidos a partir da biodegradação do imidacloprido com o auxílio da técnica de GC-MS e ESI-MS.

### 3. EXPERIMENTAL

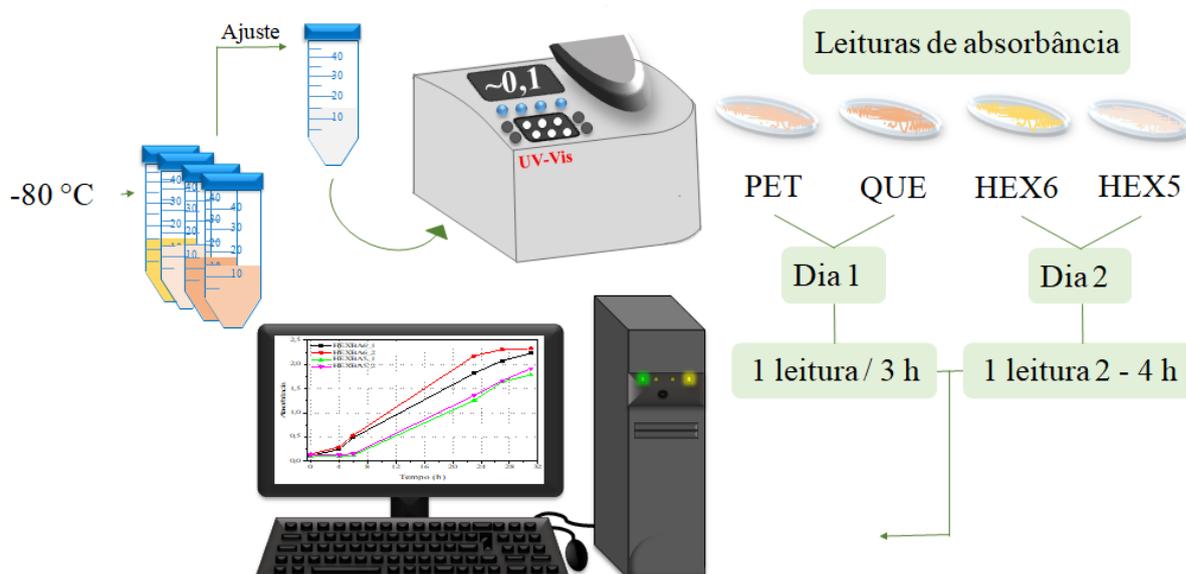
#### 3.1 Cepas bacterianas

No presente estudo, foram selecionadas duas cepas bacterianas a partir de quatro destas denominadas HEXBA06, PETBA15, HEXBA05 e QUEBA05. Todas estas cepas mencionadas são inéditas em estudos de biorremediação e/ou biodegradação com imidacloprido, sendo a HEXBA06 pertencente ao gênero *Micrococcus*, enquanto as demais pertencem ao gênero *Gordonia*. Estas cepas compõem a coleção de microrganismos do Laboratório de Ecologia Microbiana e Biotecnologia (LEMBIOTEC) da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os isolados são provenientes de amostras de sedimento contaminado com petróleo procedente do manguezal da Baía de Todos os Santos (Salvador-BA) (ANGELIM, 2012; AQUINO, 2015). Todos os microrganismos pertencentes à coleção mencionada acima são mantidos à -80 °C em tubos contendo caldo TGE (Tryptona Glicose Extrato de levedura) enriquecido com glicerol 20% v/v (AQUINO, 2015).

#### 3.2 Curvas de crescimento para as cepas HEXBA06, HEXBA05, PETBA15 e QUEBA05

Medidas de absorvância a 600 nm foram realizadas durante o acompanhamento do aumento de biomassa das cepas HEXBA06, HEXBA05, PETBA15 e QUEBA05 e foram usadas para esboçar uma curva de crescimento em duplicata para cada uma delas. As cepas foram inoculadas isoladamente em 15 mL de meio de cultura. Em capela de fluxo laminar foram retiradas alíquotas de 1 mL das culturas para as medidas de concentração indireta das células através da leitura da densidade óptica. A curva de crescimento foi levantada em dois dias, em que para cada dia 3 leituras foram executadas aproximadamente a cada 4 horas. O caldo complexo suplementado composto por extrato de levedura 5 g L<sup>-1</sup>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 g L<sup>-1</sup>, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6 g L<sup>-1</sup>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3 g L<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,21 g L<sup>-1</sup>, NaCl 0,93 g L<sup>-1</sup> e C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>O<sub>6</sub> 10 g L<sup>-1</sup> foi utilizado como meio de cultura. Um caldo estéril contendo a mesma composição foi empregado no ajuste da concentração da cultura para obter um valor de absorvância de ~0,1, esse valor foi usado como ponto inicial da curva de crescimento (AQUINO, 2015). Além disso um meio idêntico foi utilizado para zerar o espectrofotômetro antes do início das medidas. O procedimento para a construção da curva de crescimento está ilustrado na Figura 3.

Figura 3: Esquema geral do acompanhamento das curvas de crescimento microbiano.



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

### 3.3 Extração do Imidacloprido

Os cristais de imidacloprido foram obtidos a partir do pesticida comercial CIGARAL<sup>®</sup> com teor de 70%. A extração do imidacloprido da mistura comercial foi realizada utilizando acetato de etila P.A. (*Synth*, 99,5%) como solvente. O imidacloprido foi obtido na forma de cristais de coloração branca/incolor. Para a extração, partiu-se de 0,4008g de CIGARAL<sup>®</sup> para qual foi preparada uma solução aquosa de 10 mL, em seguida, 5 mL dessa solução foi extraída com 5 mL de acetato de etila por 3 vezes. A mistura foi mantida sob agitação manual por 4 min e, em seguida, a fase orgânica foi separada e deixada em repouso até à total evaporação do solvente. Os cristais formados foram recolhidos e mantidos sob refrigeração para serem posteriormente utilizados nos ensaios. Para o cálculo do rendimento do método de extração descrito, partiu-se de 0,3001 g de CIGARAL<sup>®</sup> para perfazer uma solução de 10 mL do pesticida. A extração dessa última também foi realizada em acetato de etila na proporção 1:1 para obter um sólido branco/incolor cristalino (0,2687 g). O rendimento calculado para essa extração foi de 89,53%.

Para verificar a viabilidade da utilização dos cristais obtidos por extração em acetato de etila nos ensaios, uma curva de calibração foi construída utilizando cristais de imidacloprido padrão (Sigma Aldrich, 99,9%). Para tal, foram preparadas, em triplicata, soluções aquosas de concentrações compreendendo a faixa de 0,5 a 25 mg L<sup>-1</sup>. Além disso, a partir dos cristais de imidacloprido extraídos do pesticida comercial, foram preparadas, em triplicata, soluções

aquosas de 20 mg L<sup>-1</sup> para sobreposição na curva de calibração. Água purificada do sistema Milli-Q (Millipore) foi utilizada para a preparação das soluções e todas as concentrações foram preparadas em triplicata. As absorvâncias máximas em 270 nm foram coletadas a partir das leituras realizadas em um espectrofotômetro Cary 60 UV-Vis (Agilent Technologies). Os valores utilizados para a construção da curva de calibração foram obtidos por meio da média aritmética das triplicatas de cada concentração com seus respectivos valores de desvio padrão.

### **3.4 Ensaio de biodegradação**

#### ***3.4.1 Pré-inóculo***

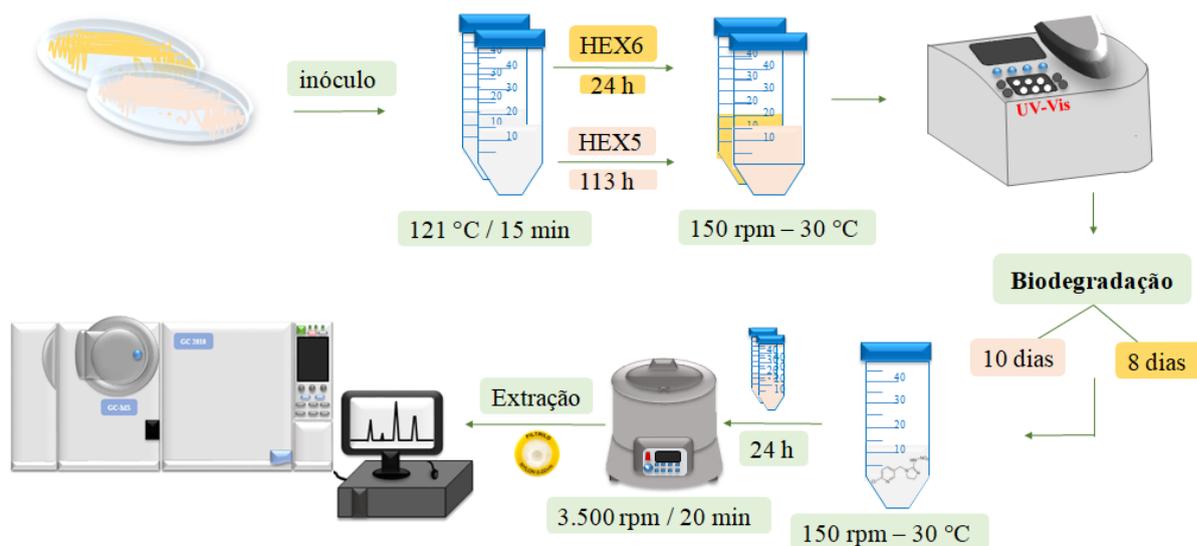
O pré-inóculo para cada cepa selecionada foi preparado separadamente em um tubo Falcon de 50 mL contendo 15 mL de um meio de cultura com a mesma composição descrita anteriormente. O meio de cultura foi preparado utilizando água destilada conforme as instruções do fabricante (Sigma-Aldrich) e autoclavado a 121 °C por 15 minutos para garantir a esterilização. Após o resfriamento do meio (~24 h), uma colônia retirada de cada cultura previamente preparada em placa ATGE + 2% de NaCl foi então inoculada no caldo descrito em tubos distintos. O pré-inóculo foi incubado por 24 h (HEXBA06) e 113 h (HEXBA05) sob agitação a 150 rpm a 30 °C. Anterior a execução do experimento de biodegradação, a densidade óptica (DO<sub>600</sub>) de cada pré-inóculo foi mensurada.

#### **3.4.2 Inóculo**

O ensaio de biodegradação foi realizado durante 8 dias para HEXBA06 e 10 dias para HEXBA05. Em experimentos separados para o preparo de cada cultura, foram utilizados tubos Falcon contendo 15 mL do caldo mencionado anteriormente com 400 ppm de imidacloprido. Nos tubos foram adicionados 100 µL do pré-inóculo. Outros dois tubos contendo os mesmos reagentes, porém sem a adição do microrganismo de interesse foram utilizados como controle abiótico. Todos os sistemas foram realizados em duplicata e mantidos sob agitação de 150 rpm a 30 °C. A cada 24 h, dois tubos eram retirados da agitação e então submetidos à centrifugação por 20 minutos a 3.500 rpm para a separação da biomassa. A solução sobrenadante de cada sistema foi submetida a 2 extrações com acetato de etila na proporção 1:1 (acetato de etila : sobrenadante) por agitação manual de 4 min para cada extração, o extrato de cada sistema foi rotaevaporado até a secura. Cada extrato foi ressuspendido em 1

mL de acetato de etila e filtrado em filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  e analisados posteriormente em GC-MS. O procedimento experimental realizado para o ensaio de biodegradação está ilustrado na Figura 4.

Figura 4: Esquema geral do ensaio de biodegradação do imidacloprido e análise de metabólitos por GC-MS.



Fonte: Elaborada pela autora (2021)

### 3.4.3 Estudos analíticos

#### 3.4.3.1 Análises por Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) dos cristais.

O espectro de FTIR dos cristais obtidos após a extração do CIGARAL<sup>®</sup> com acetato de etila foi registrado por um espectrômetro IRTracer-100 (Shimadzu). A amostra foi preparada misturando-se os cristais (~2 mg) com KBr e pressionando sob uma prensa hidráulica (600 kg  $\text{cm}^{-2}$ ) para formar um pellet para a análise. Foram realizadas 64 varreduras com uma faixa espectral de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 3.4.3.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN) do imidacloprido

Para análise de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$ -BB e RMN  $^{13}\text{C}$ -DEPTq foram pesadas 11,20 mg da amostra em que foram dissolvidas em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e acondicionadas

em tubos de RMN. Para a leitura das amostras foi utilizado um espectrômetro Bruker Avance DPX – 300 pertencente ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear, da Universidade Federal do Ceará (CENAUREMN-UFC). Foram aplicadas frequências de 300 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 75 MHz( $^{13}\text{C}$ ).

#### 3.4.3.3 Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas na identificação dos metabólitos de degradação

As análises por GC-MS foram realizados em equipamento SHIMADZU 2010, com fonte de ionização por impacto de elétrons (70 eV). Utilizou-se uma coluna capilar SPB<sup>TM</sup>-5 (25 m × 0,25 mm × 0,25 μm) da marca SUPELCO, com programa de temperatura de 100 °C (5 min), 100 °C a 300 °C (10 °C min<sup>-1</sup>) e 300 °C (5 min). A temperatura do injetor foi mantida a 280 °C min<sup>-1</sup> e a temperatura do detector a 300 °C, o tempo total de análise foi de 30 min para cada injeção. Os dados foram coletados em um intervalo de 50 a 500 *m/z*. As injeções foram realizadas por injetor automático, o volume de injeção foi de 2 μL no modo splitless (ITURBURU *et al.*, 2018). As amostras foram processadas com o auxílio do programa GC-MS Postrun Analysis, o qual também foi utilizado no tratamento dos dados cromatográficos.

#### 3.4.3.4 ESI-MS na identificação dos metabólitos de degradação

Para as análises de ESI-MS novos sistemas de biodegradação foram preparados utilizando a mesma metodologia descrita anteriormente de pré-inóculo e inóculo, porém, com um tempo de incubação de 312h. As análises por espectrometria de massas, foram realizadas em um espectrômetro de massas triplo quadrupolo LC-MS/MS (TQS Quantum Access, Thermo Scientific) equipado com fonte de ionização *electrospray* operando no modo positivo, com capilar na temperatura 270 °C, voltagem do spray 4,0 kV, voltagem do capilar 3,0 kV e gás de secagem N<sub>2</sub>. O fluxo da seringa foi de 20,0 μL min<sup>-1</sup>. Para os experimentos de fragmentação MS/MS, ajustou-se a energia de colisão para proporcionar a formação de íons produto com abundâncias mensuráveis, utilizando como gás de colisão o argônio.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Curva de crescimento

Quatro cepas de actinobactérias dos gêneros *Gordonia* sp. (HEXBA05, PETBA15, QUEBA05) e *Micrococcus* sp. (HEXBA06), foram escolhidas de início, porém das quatro cepas somente duas foram testadas nos ensaios de biodegradação. A escolha inicial das cepas se deu pelo fato destas terem mostrado uma alta resistência em ambientes contaminados com óleos. Em estudos anteriores, as cepas HEXBA05 e HEXBA06 se destacaram na biodegradação de *n*- hexadecano (AQUINO, 2015), enquanto a cepa PETBA15 e a cepa QUEBA05 se mostraram eficazes na degradação de petróleo (ANGELIM *et al.* 2013) e querosene (REIS *et al.* 2018), respectivamente. Porém, nenhuma destas cepas foram empregadas em estudo de biodegradação do pesticida imidacloprido. Para se estudar a viabilidade da utilização das cepas escolhidas nos ensaios de biodegradação, curvas de crescimento utilizando um caldo de composição descrita no item 3.2 foram traçadas para comparar a taxa crescimento de cada cepa escolhida, como mostram os Gráficos 1 e 2.

Gráfico 1 – Curvas de crescimento dos isolados HEXBA05 e HEXBA06 em meio mineral suplementado com extrato de levedura e 1% (m/v) de glicose.

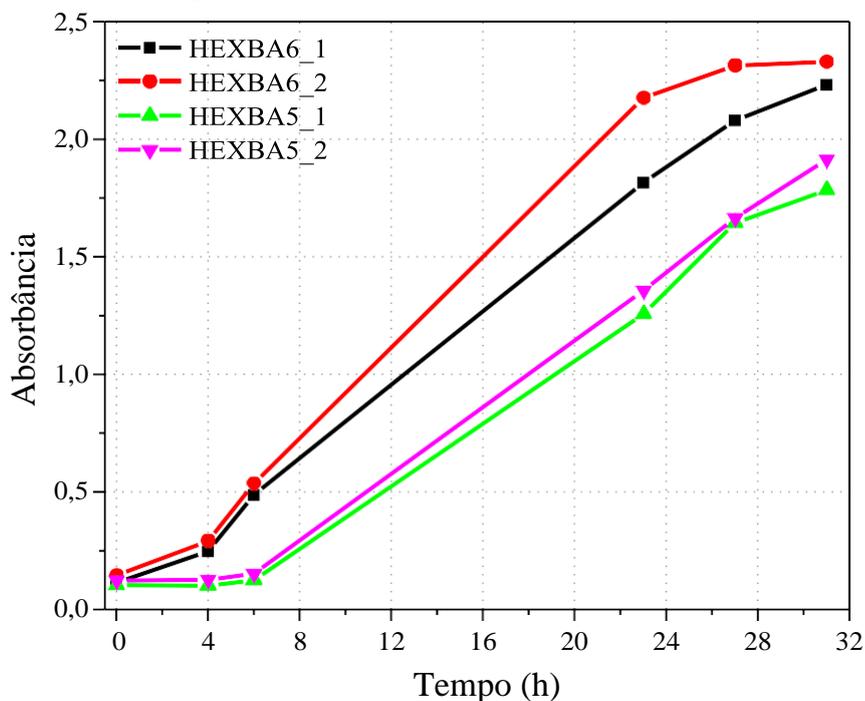
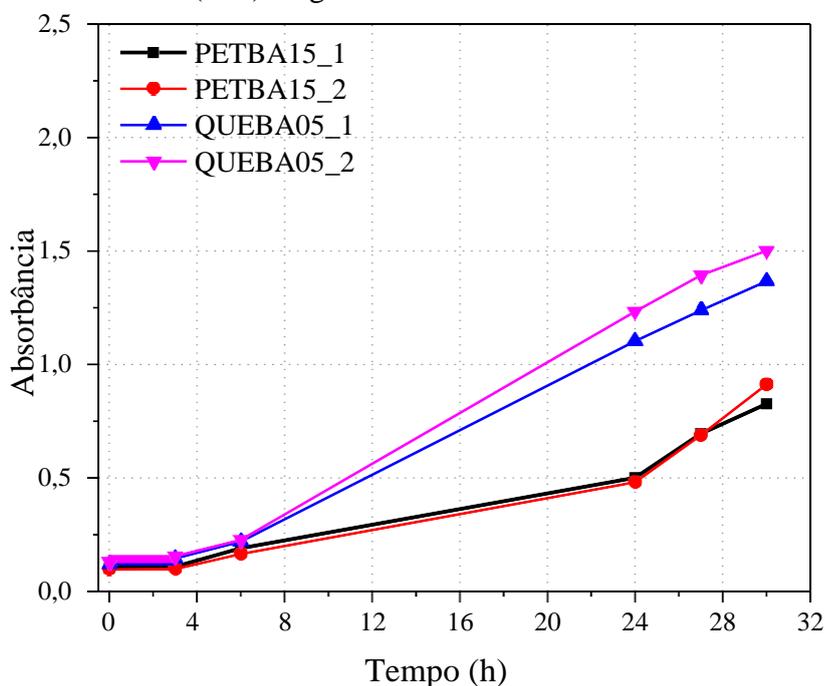


Gráfico 2 – Curvas de crescimento dos isolados PETBA15 e QUEBA05 em meio mineral suplementado com extrato de levedura e 1% (m/v) de glicose.



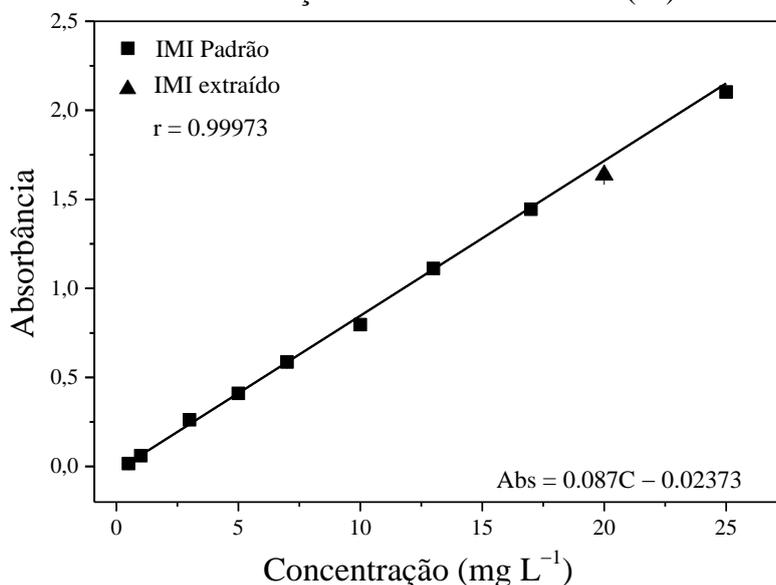
A determinação da densidade celular é uma etapa de extrema importância em pesquisa microbiana, para tal, tem sido utilizado os padrões de turbidez de MacFarland desde que o seu método de comparação visual da turbidez de suspensões celulares foi proposto (MCFARLAND, 1907; ZAPATA; RAMIREZ-ARCOS, 2015). O valor de absorbância de ~0,1 foi fixado como ponto inicial da curva de crescimento no intuito de atingir a turbidez compatível com a solução padrão do tubo 0,5 da escala de McFarland que corresponde a aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (Unidade Formadora de Colônia por mililitro) (LOZANO *et al.*, 2018).

As estirpes que apresentaram maior taxa de crescimento atingindo um valor de absorbância próximo de 1 (fase exponencial de crescimento bacteriano) em menos tempo foram HEXBA06 e HEXBA05, logo, estas foram escolhidas para os ensaios de biodegradação do imidacloprido. Os valores de densidade óptica (DO<sub>600</sub>) obtidos para cada pré-inóculo foram 1,316 para a estirpe HEXBA06 e 1,331 para a estirpe HEXBA05. A fase exponencial de crescimento bacteriano indica o período de tempo em que as células começam a se dividir aumentando seu número exponencialmente. As células atingem o máximo de sua atividade metabólica na fase exponencial de crescimento ou fase log, é nessa fase onde o maior número de células ativas é obtido (MADIGAN *et al.*, 2010). Portanto foram preparados inóculos bacterianos nessas condições para o ensaio de biodegradação do presente trabalho.

## 4.2 Obtenção dos cristais de imidacloprido por extração em acetato de etila

Tanto na indústria quanto na pesquisa, na escolha dos solventes a serem utilizados durante os estudos de interesse deve-se levar em consideração também os possíveis impactos que tais solventes podem causar tanto ao meio ambiente como à saúde. Dentre os solventes mais bem classificados para aplicação industrial, por exemplo, encontra-se o acetato de etila (GRUNDTVIG *et al.*, 2018). Além disso, o imidacloprido apresenta solubilidade satisfatória ( $\sim 6,7 \text{ g L}^{-1}$ ) neste solvente, o que viabilizou ainda mais a sua utilização nos estudos do presente trabalho. A partir da sobreposição à curva de calibração das absorbâncias máximas resultantes das soluções preparadas com os cristais extraídos com o referido solvente, foi possível verificar que estes possuem um grau de pureza semelhante aos cristais de padrão analítico, como mostrado no Gráfico 3.

Gráfico 3 – Curva de calibração obtida a partir de diferentes concentrações de um padrão de imidacloprido em água (■). Solução de imidacloprido  $20 \text{ mg L}^{-1}$  preparada a partir dos cristais obtidos da extração do CIGARAL<sup>®</sup> 70% (▲).

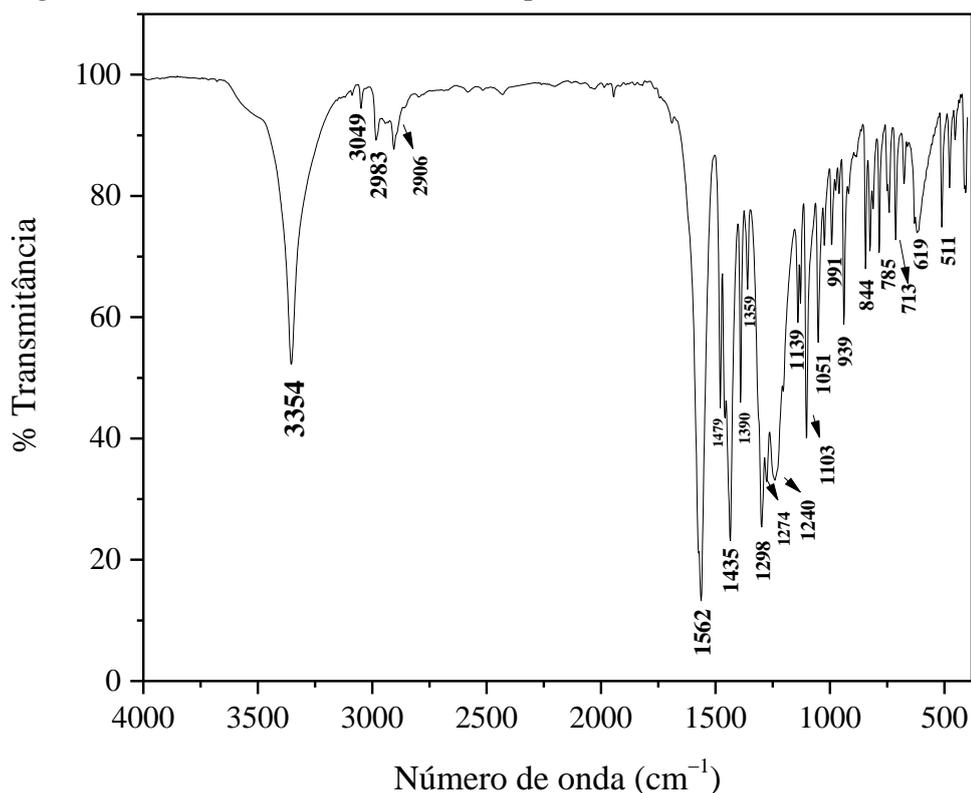


Esse resultado mostra a viabilidade da utilização dos cristais extraídos a partir da metodologia descrita utilizando acetato de etila como solvente extrator em detrimento dos cristais de alta pureza.

### 4.3 Análises de FTIR dos cristais

A análise de FTIR dos cristais obtidos na extração foi realizada para confirmar a estrutura esperada do imidacloprido. A Figura 8 mostra o espectro obtido.

Figura 8 - FTIR dos cristais de imidacloprido.



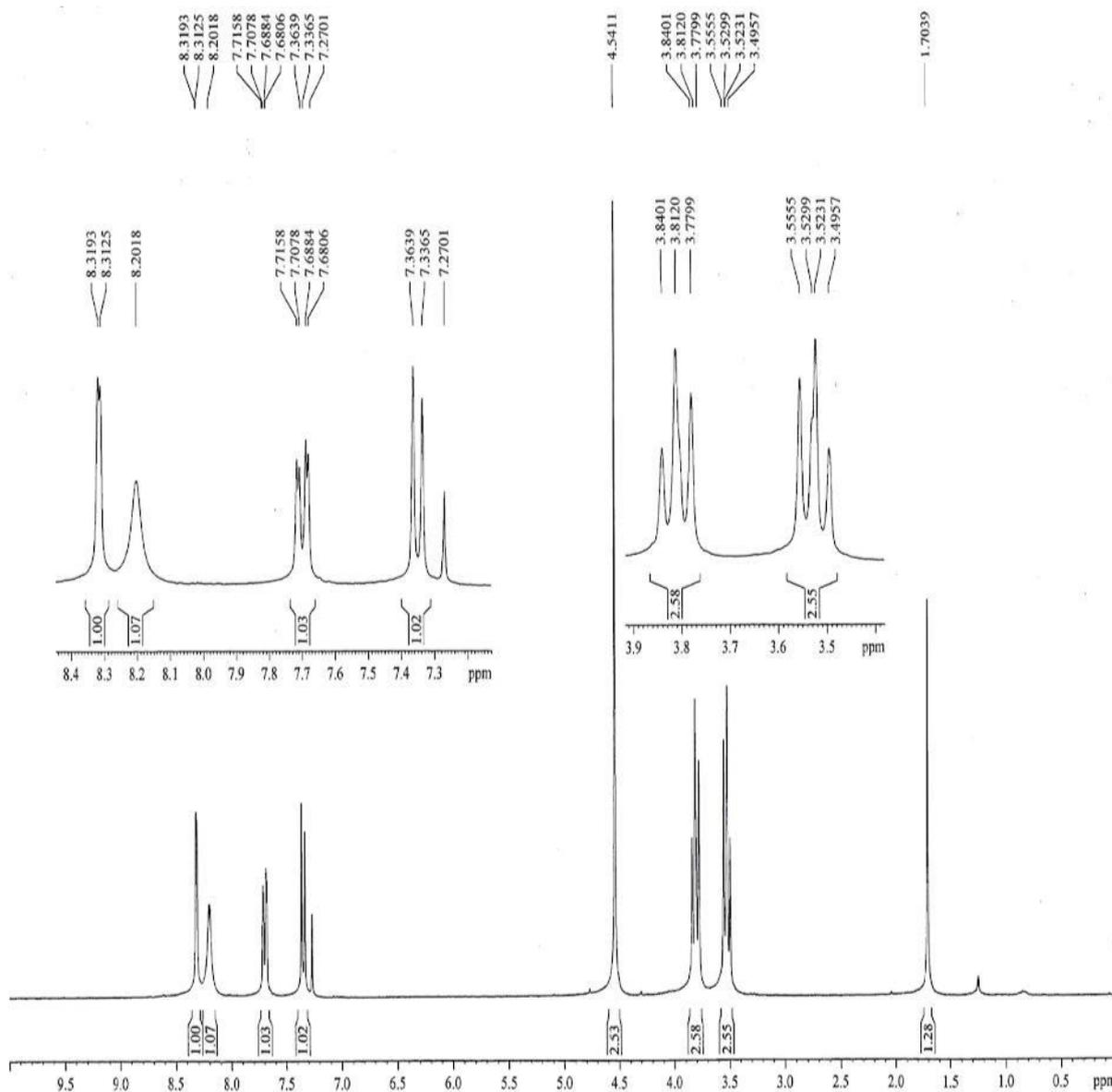
O espectro exibe picos característicos da molécula de imidacloprido. Os dois picos a 3354 cm<sup>-1</sup> e 1298 cm<sup>-1</sup> estão relacionados aos estiramentos N-H e N-C da amina secundária, respectivamente. A região de 713-939 cm<sup>-1</sup> pode ser atribuída à deformação no plano do anel piridínico (MESQUITA, 2012). Já os picos que aparecem a 1562 cm<sup>-1</sup> e 1390 cm<sup>-1</sup> representam o estiramento assimétrico forte e o estiramento simétrico médio do grupo nitro (PAVIA, 2010). O espectro obtido está de acordo com o espectro encontrado na literatura (SPECTRAL DATABASE FOR ORGANIC COMPOUNDS, 2019a). Análises de RMN também foram realizadas para confirmar a estrutura do imidacloprido como mostradas nas Figuras 9 e 11.

### 4.4 Caracterização por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Como mostrado na Figura 9, os sinais de deslocamento químico ( $\delta$ ) situados acima

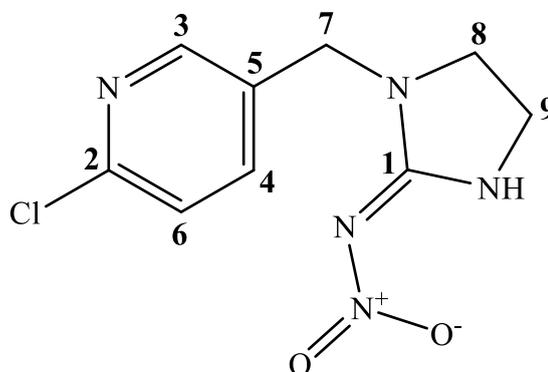
de 7 ppm indicam a presença de hidrogênios ligados a anel aromático. O campo anisotrópico decorrente do sistema de elétrons  $\pi$  do anel ocasiona a desblindagem dos hidrogênios em questão resultando em um  $\delta$  relativamente alto (PAVIA, 2010).

Figura 9 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$  a 300 Hz dos cristais de imidacloprido.



Na Tabela 1 estão organizados os valores atribuídos ao  $\delta$ , constante de acoplamento  $J$  e multiplicidade obtidos na análise de RMN para  $^1\text{H}$  do imidacloprido, cuja fórmula molecular está apresentada na Figura 10.

Figura 10 – Estrutura molecular do imidacloprido com posicionamento dos átomos de carbono e hidrogênio.



Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Tabela 1 – Valores de  $\delta_H$  (ppm), multiplicidade e constante de acoplamento (Hz) para o imidacloprido.

Posição de hidrogênio na molécula	Multiplicidade	$\delta_H$ (ppm)	$J$ (Hz)
H – 6	Dubleto	7,35	8,19
H – 4	dubleto-dubleto	7,70	2,43 e 2,40
H – 3	Dubleto	8,37	2,19
H – 7	Singlete	4,54	-
H – 8	Tripleto	3,81	8,43 e 9,63
H – 9	tripleto	3,52	8,49 e 9,66
N-H	singlete	8,19	-

Fonte: Elaborada pela autora (2021).

Hidrogênios pertencentes a anéis aromáticos interagem entre si causando acoplamento em diferentes intensidades. O H-6 (orto ao H-4) acopla com o H-4 gerando um duplete de  $\delta$  aproximadamente 7,35 ppm, outro duplete também é formado a partir do acoplamento meta entre H-3 e H-4 com  $J$  igual a 2,19 Hz e deslocamento de 8,37 ppm, já o H-4 acopla tanto com o hidrogênio orto (H-6) quanto com o hidrogênio na posição para (H-3) gerando um  $\delta$  de 7,70 ppm e dois valores de  $J$ , 2,43 e 2,40 Hz. A presença dos tripletos em  $\delta$  3,81 e 3,52 representam os acoplamentos entre H-9 e H-8. Pode-se notar também um sinal de

intensidade baixa em  $\delta$  3,53, esse sinal surge do acoplamento fraco entre N-H e H-9, esse acoplamento diferenciado se dá devido ao heteroátomo de nitrogênio ao qual o hidrogênio está ligado diretamente. Nesse caso, o nitrogênio causa interferência nas transições de spin do hidrogênio sendo então pouco “enxergado” pelo H-9. Outra consequência da presença do átomo de nitrogênio é o alargamento quadrupolar observado no singlete em  $\delta$  8,19 ppm, que pode ser atribuído ao acoplamento N-H.

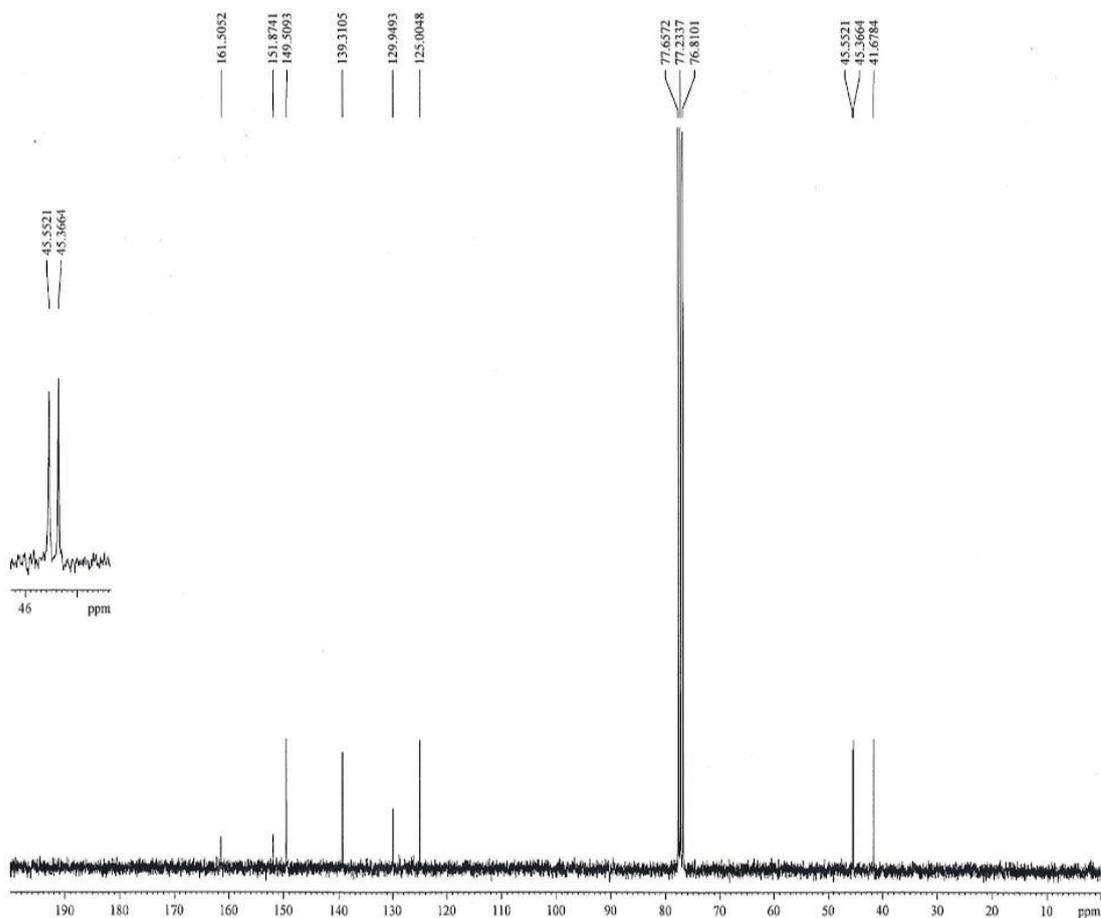
Tabela 2 – Picos de absorção do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para os cristais de imidacloprido.

Posição dos carbonos na molécula de imidacloprido	$\delta_c$ (ppm)
C – 6	125,00
C – 4	139,31
C – 5	129,94
C – 3	149,50
C – 2	151,87
C – 7	45,55
C – 8	45,36
C – 9	41,67
C – 1	161,50

Fonte: Elaborada pela autora (2019).

A anisotropia desprotege os átomos de carbono do mesmo modo que desprotege os de hidrogênio em uma estrutura aromática. Desse modo, os sinais que aparecem acima de  $\delta$  125 ppm são correspondentes à C-6 ( $\delta$  125,00 ppm), C-4 ( $\delta$  139,31 ppm), C-5 ( $\delta$  129,94 ppm), C-3 ( $\delta$  149,50 ppm) e C-2 ( $\delta$  151,87 ppm) pertencentes ao anel piridínico, exceto o sinal em  $\delta$  161,50 ppm, que pode ser atribuído ao C-1 ligado diretamente aos três átomos de nitrogênio do grupo imidazolina, sendo, portanto, o carbono mais desprotegido. O espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  para os cristais de imidacloprido pode ser visto na Figura 11.

Figura 11 – Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ -BB em  $\text{CDCl}_3$  a 300 Hz dos cristais de imidacloprido.



O tripleto que aparece em  $\delta$  77,65, 77,23 e 76,81 ppm deve-se ao clorofórmio-d,  $\text{CDCl}_3$ , composto usado comumente como solvente em RMN de  $^{13}\text{C}$ . Ligados diretamente ao mesmo átomo de nitrogênio, C-7 e C-8 são quimicamente semelhantes, o que confere a estes átomos deslocamentos bem próximos de 45,55 e 45,36 ppm, respectivamente, sendo o sinal único em  $\delta$  41,67 ppm atribuído ao C-9. Todas as atribuições acima estão de acordo com os dados espectrais de  $^{13}\text{C}$  para o imidacloprido disponibilizados pela Spectral Database for Organic Compounds (SDBS) (SPECTRAL DATABASE FOR ORGANIC COMPOUNDS, 2019b).

#### 4.5 Perfil espectral obtido por ESI(+)-MS

Os Espectros de ESI(+)-MS (Figura 12 e 13) confirmam que os cristais de imida obtidos por extração utilizados como substrato nos sistemas reacionais, apresenta um perfil espectral semelhante ao espectro obtido a partir do imida padrão de alto grau de pureza adquirido comercialmente.

Figura 12: Espectro de ESI(+)-MS obtido a partir de uma solução aquosa na concentração de 10 ppm preparada a partir dos cristais de imidacloprido padrão analítico.

S#: 3316 FULL: Q1MS CT: 0.51 6.20e6

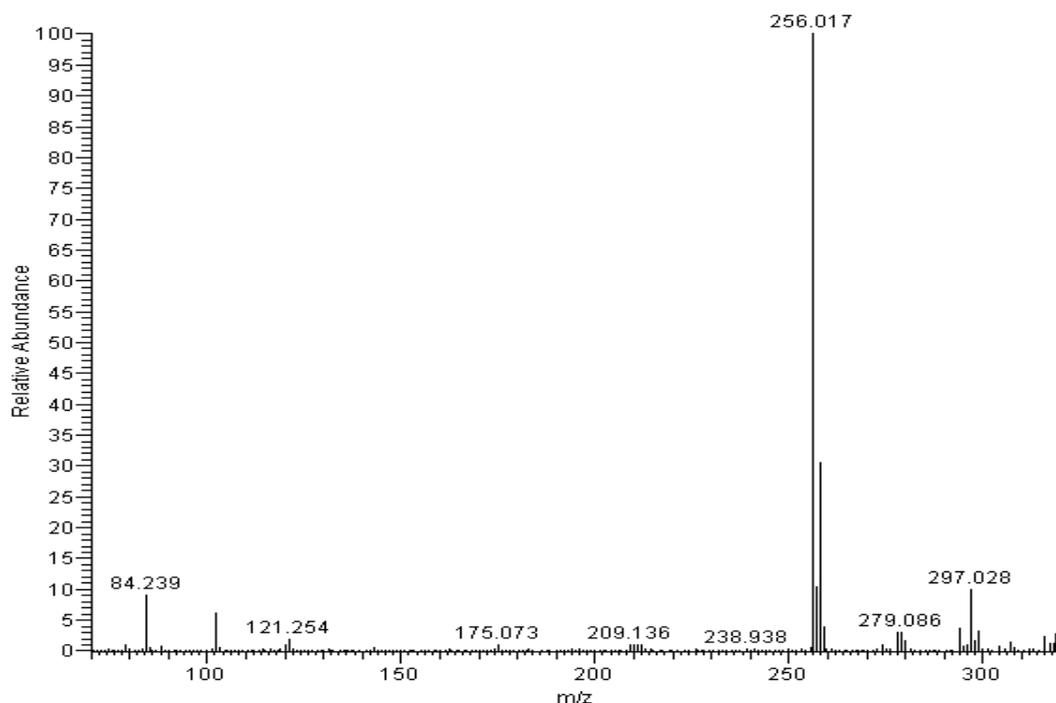
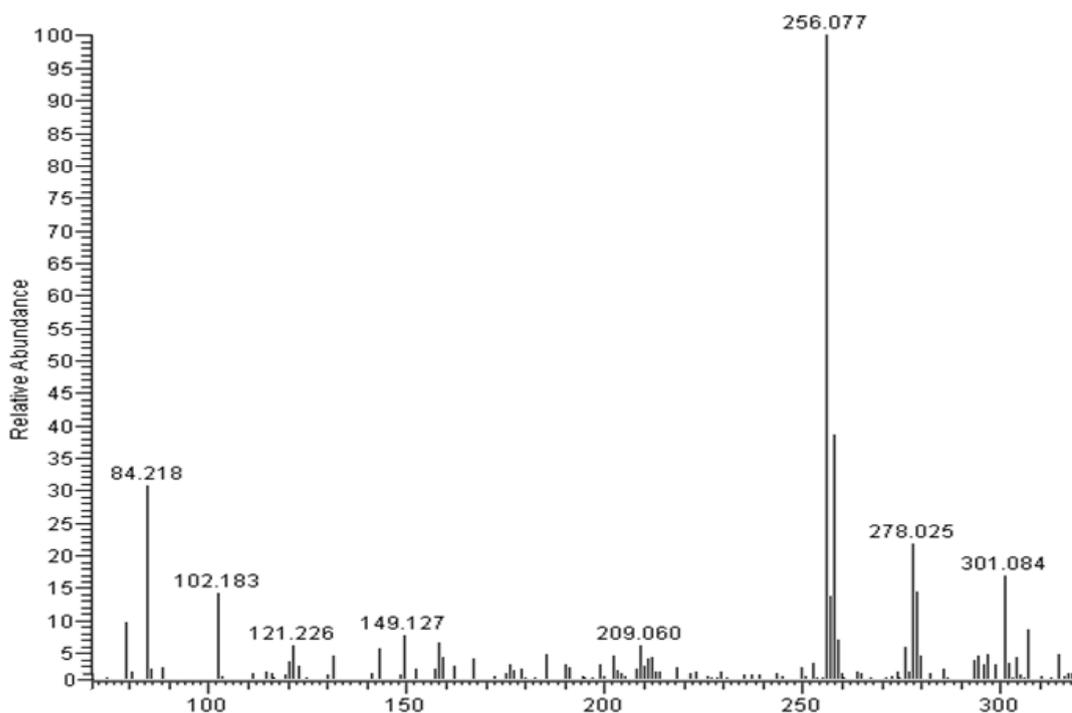


Figura 13: Espectro de ESI(+)-MS obtido a partir de uma solução aquosa na concentração 10 ppm preparada a partir dos cristais extraídos de imidacloprido.

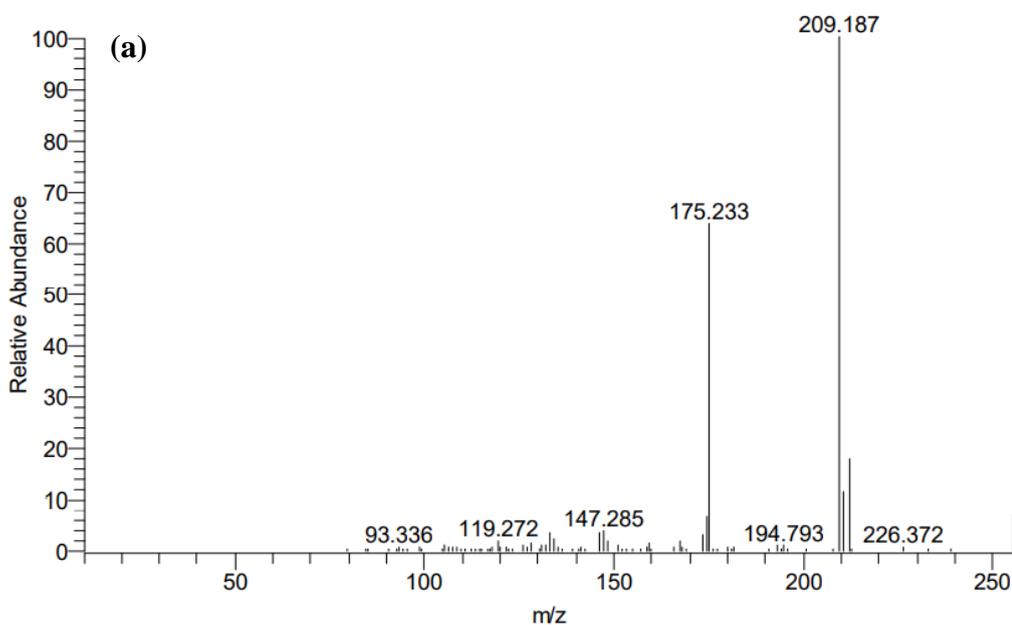
S#: 2860 FULL: Q1MS CT: 0.52 1.14e6



A Figura 14 apresenta íons de  $m/z$  209 e  $m/z$  175 que são reportados na literatura como íons característicos obtidos por MS/MS do íon pseudo molecular de imidacloprido  $[M + H]^+$  com  $m/z$  256. A fragmentação desse íon foi anteriormente proposta e pode ser observada na Figura 15.

Figura 14: Espectro de MS/MS do íon de  $m/z$  256, a partir dos cristais extraídos (a) e do padrão analítico de imidacloprido (b).

S#: 2140 FULL: PRO: 256 CT: 0.51 #A: 9 8.17e5



S#: 1133 FULL: PRO: 256 CT: 0.51 #A: 9 1.13e7

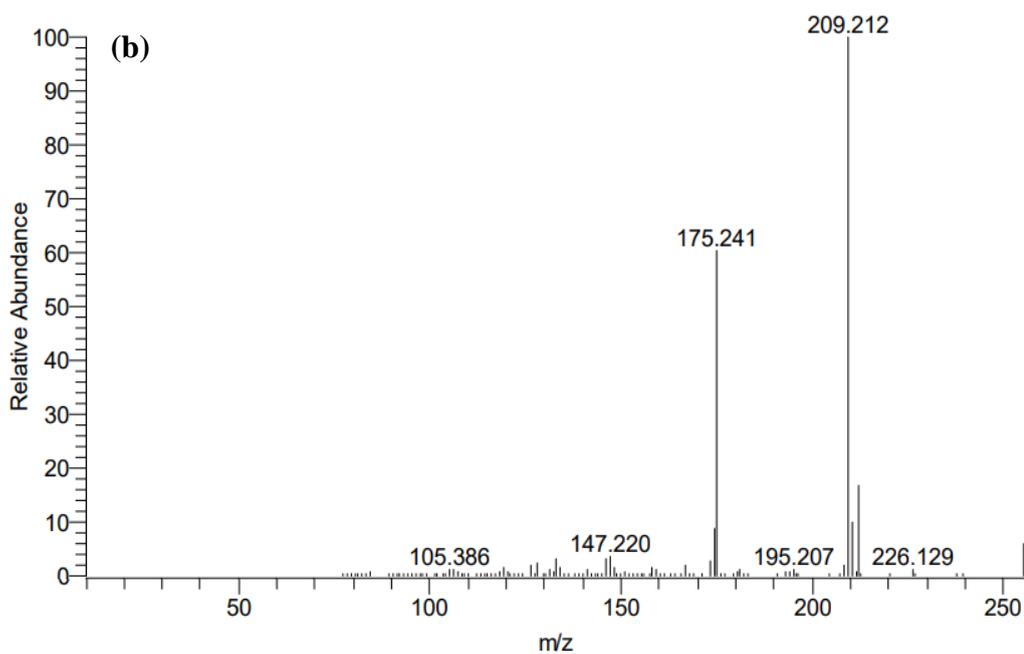
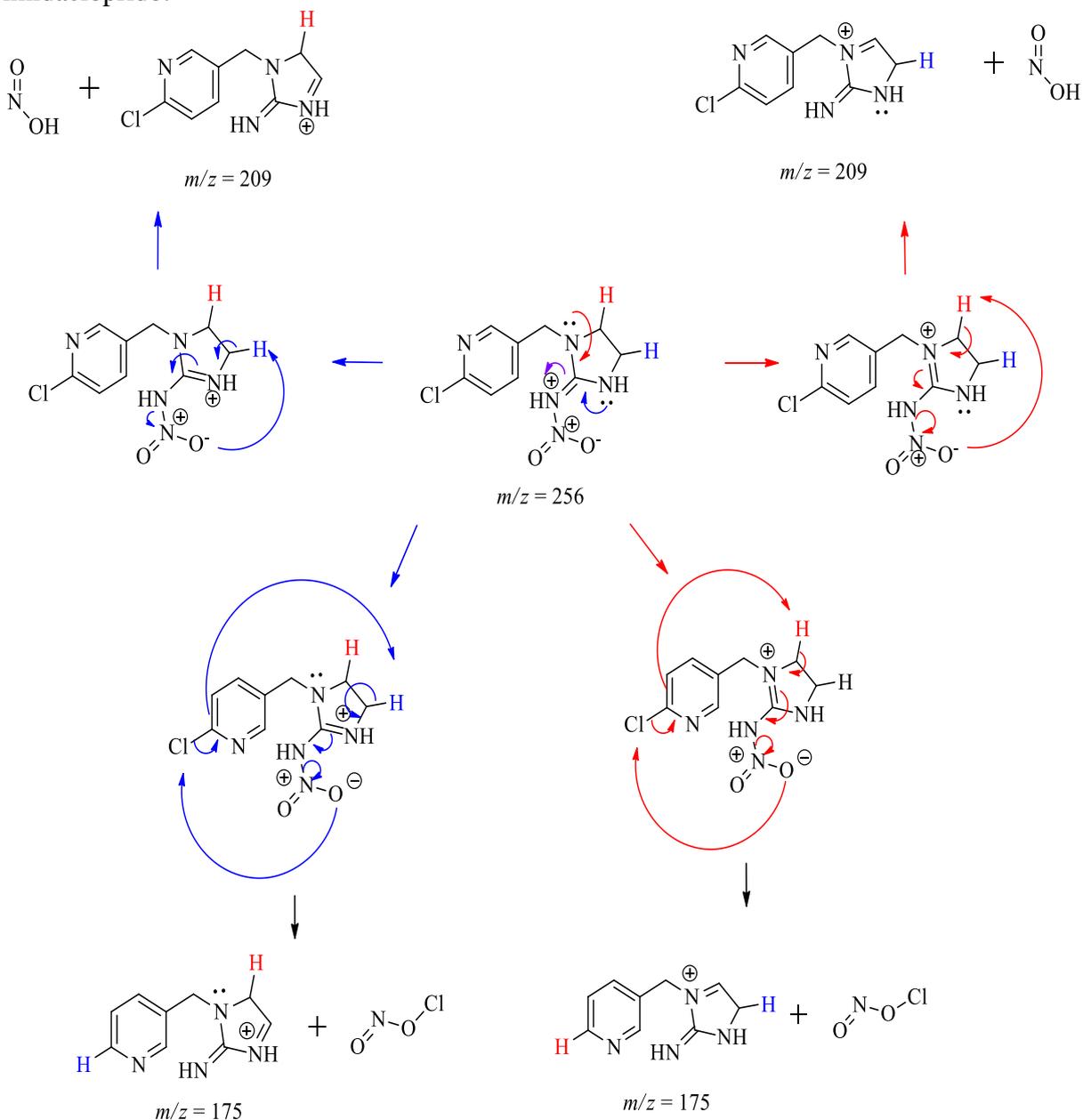


Figura 15: Proposta de fragmentação para o íon de  $m/z = 256$  referente à espécie  $[M + H]^+$  do imidacloprido.



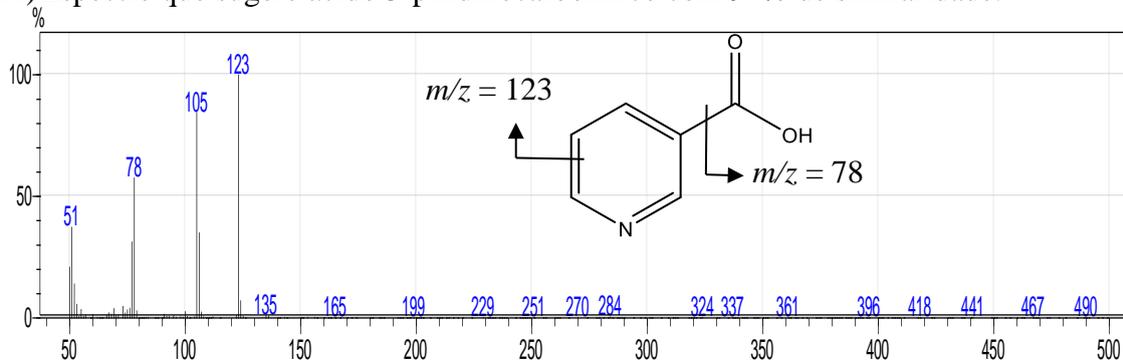
Fonte: Adaptado de Ferrer e Thurman (2004).

#### 4.6 Tentativa de identificação dos produtos de degradação do imidacloprido

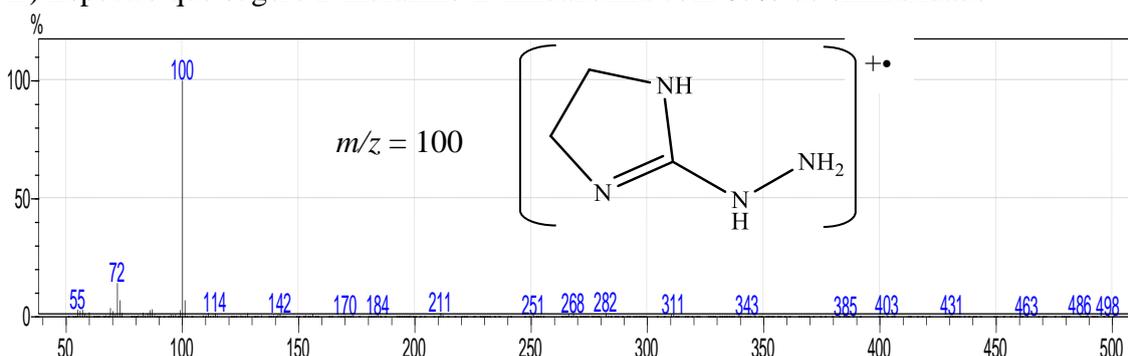
Os metabólitos sugeridos a partir dos dados de CG-EM para as duas cepas foram identificados por meio da comparação com os espectros da base de dados do NIST 11 considerando grau de similaridade acima de 80% e por meio da interpretação dos espectros de MS/MS para os íons mais abundantes. Os cromatogramas de onde foram obtidos cada espectro estão listados no Apêndice A. Dois metabólitos puderam ser observados a partir dos dados de

GC-MS, ácido 3-piridinocarboxílico (A) no tempo de retenção 8,384 min e 2-hidrazino-2-imidazolina (B) no tempo de retenção 21,786 min.

A) Espectro que sugere ácido 3-piridinocarboxílico com 94% de similaridade.



B) Espectro que sugere 2-hidrazino-2-imidazolina com 87% de similaridade.



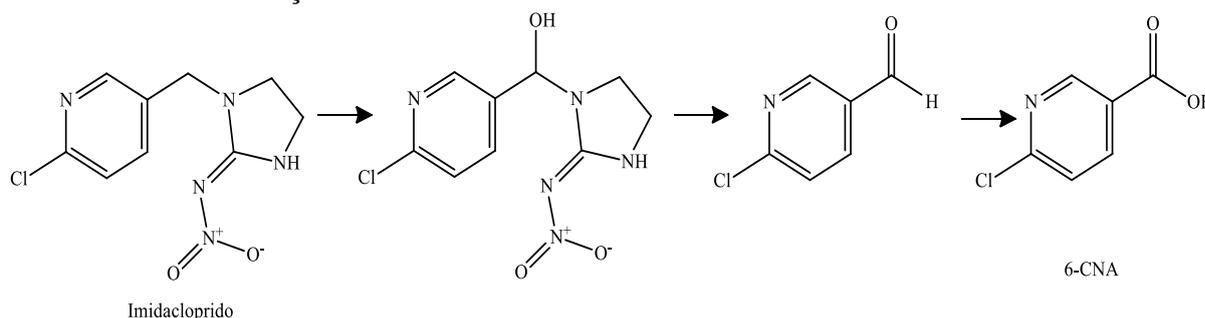
Os possíveis metabólitos acima apresentados foram identificados com base nos padrões de fragmentação dos espectros padrão por Impacto de Elétrons. O metabolismo do imidacloprido foi definido em três vias, dentre elas, a clivagem oxidativa na ponte de metileno que liga os dois substituintes heterocíclicos, foi anteriormente reportada (DICK; KANNE; CASIDA, 2005). Como pode ser observado, os produtos A e B apresentados indicam que os grupos heterociclos cloropiridinil e imidazolidina da molécula original foram desconetados, tal separação pode ter ocorrido pela clivagem oxidativa mencionada acima.

Os neonicotinoides podem ser rapidamente biodegradados em culturas puras por meio de vários processos, um dos processos mais comuns é a hidroxilação (ZHANG, 2018; DAI *et al.*, 2010a). Tanto no solo quanto na água a hidroxilação é uma das principais vias do metabolismo do imidacloprido, sendo predominante a degradação microbiana (LU *et al.*, 2016; SARKAR *et al.*, 2001). Um estudo realizado por Dai *et al.* (2010b), mostrou que uma

monooxigenase P450 participou do processo de hidroxilação de neonicotinoides por uma proteobactéria. As enzimas P450 são ideais para a remediação de pesticidas ambientalmente persistentes e podem ser encontradas em mais de 200 subfamílias tanto em eucariotos como em procariotos (LANDRIGAN *et al.* 2018).

Embora alguns trabalhos tenham desvendado vias de biotransformação em que a hidroxilação ocorre preferencialmente no carbono vizinho da amina terciária ligada ao anel piridínico (DAI *et al.*, 2010b; LU *et al.*, 2016; SHARMA; SINGH; GUPTA, 2014) para formar o metabólito 5-hidroxi-imidacloprido, que não foi detectado no presente estudo, outra via também foi proposta por Kandil *et al.* (2015). Nesta última, um actinomiceto isolado metabolizou o imidacloprido através da clivagem oxidativa da ponte de metileno para formar o ácido 6-cloronicotínico (6-CNA). O mecanismo dessa mesma via foi confirmado por Casida John E. (2011) em que afirma a ocorrência da clivagem oxidativa nas moléculas de neonicotinoides, separando os grupos heterocíclicos através da hidroxilação da ponte de metileno que liga ambos (DICK; KANNE; CASIDA, 2005). Essa clivagem pode levar a formação de um aldeído heterocíclico que é principalmente oxidado ao ácido 6-CNA (CASIDA, 2011; SCHULZ-JANDER; LEIMKUEHLER; CASIDA, 2002). Este mecanismo poderia explicar uma possível formação do ácido 6-CNA no presente trabalho, indicado pela presença do metabólito B ao invés da detecção do metabólito 5-hidroxi-imidacloprido. A via descrita por Casida John E. é apresentada na Figura 16.

Figura 16 – Clivagem oxidativa da molécula de imidacloprido nas porções cloropiridinil e imidazolidina e formação do ácido 6-CNA.



Fonte: Adaptada de Casida John E. (2011).

Dentre os metabólitos de degradação microbiana mais citados do imidacloprido, o 6-CNA é um dos mais comumente encontrados, sendo inclusive mencionado em um caso como o principal produto de biodegradação desse pesticida por uma actinobactéria (KANDIL, *et al.*, 2015), outro trabalho também reportou esse ácido a partir da degradação bacteriana (ANHALT;

MOORMAN; KOSKINEN, 2007). Esse ácido também apresenta toxicidade para insetos devido às interações não covalentes entre este e os biopolímeros (DING; PENG, 2015; WANG *et al.*, 2018).

Notavelmente, o 6-CNA não foi detectado no presente estudo, o que poderia indicar que ele não foi formado durante o experimento. Porém, como já mencionado, a presença do metabólito A pode indicar a provável formação do 6-CNA. Este seria, possivelmente, um produto intermediário com uma taxa de eliminação mais rápida que a taxa de formação do metabólito A, não atingindo dessa forma uma concentração detectável nas amostras. Uma consideração semelhante foi feita por Rodríguez-Castillo *et al.* (2019) a partir do estudo da aplicação de um consórcio bacteriano composto por bactérias pertencente aos filos *Firmicutes*, *Actinobactéria*, *Betaproteobactéria* e *Gammaproteobactéria* na degradação de neonicotinoides, em que o imidacloprido foi degradado de forma mais eficiente.

O ácido nicotínico (A) diferente do imidacloprido, tem atividade biológica relevante e pode ser encontrado naturalmente em uma variedade de alimentos, como café, frango, carne bovina, legumes dentre outros (BUENO *et al.*, 2011). Esta substância compõe a vitamina B<sub>3</sub> e é de extrema importância para o funcionamento celular (FAN *et al.*, 2019; KIRKLAND, 2009; SUN *et al.*, 2017), uma vez que está envolvida nos processos de reparo do DNA, além da produção de hormônios (FAN *et al.*, 2019) e é um dos precursores da nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD) e nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato (NADP) que são coenzimas essenciais em muitas reações bioquímicas em todas as células vivas (FAN *et al.*, 2019; KIRKLAND, 2009).

Devido ao grande consumo de produtos que contêm o ácido nicotínico ou precursores, como o café, este é lançado constantemente no meio ambiente tornando-se assim um contaminante (BUENO *et al.*, 2011). Diferente do imidacloprido que não apresenta dissociação, este ácido não fica retido no solo fortemente, uma vez que seu pK<sub>a</sub> é 4,75, logo existirá principalmente na forma de ânion no ambiente (BUENO *et al.*, 2011). Isso sugere que esse composto pode estar mais propício à biodegradação que o imidacloprido, uma vez que os microrganismos preferem substâncias dissolvidas (MEGHARAJ *et al.*, 2011). Além disso, segundo dados de toxicidade disponíveis no banco de dados ChemIDplus, o ácido nicotínico apresenta menor toxicidade (3.720 mg kg<sup>-1</sup>) comparada a do imidacloprido (410 mg kg<sup>-1</sup>) em teste de Dose Letal média (DL<sub>50</sub>) oral em rato.

No produto A foi possível observar a ausência do cloro ligado ao anel piridínico, que pode sugerir a presença de uma enzima desalogenase na degradação do pesticida em

questão. As desalogenases desempenham um papel fundamental na mineralização aeróbica de compostos xenobióticos halogenados (GUPTA *et al.*, 2016; JANSSEN *et al.*, 2005). Essa enzima foi anteriormente mencionada como responsável pela liberação de íons cloreto durante o processo de degradação de três pesticidas, dentre eles, o imidacloprido usando uma cepa identificada como *Pseudomonas* sp. (GUPTA *et al.*, 2016). Actinobactérias também já foram relatadas como degradadoras de compostos clorados. Patil, Matsumura e Boush (1970) verificou que uma *Micrococcus* sp. isolada do solo foi capaz de degradar os pesticidas endrina e aldrina (PATIL; MATSUMURA; BOUSH, 2970), além desse isolado, outros actinomicetos como *Arthrobacter* sp. (PATIL; MATSUMURA; BOUSH, 2970) e *Streptomyces* sp. (FUENTES *et al.*, 2013; PARTE; MOHEKAR; KHARAT, 2017) também apresentaram atividade metabólica positiva na desalogenação de pesticidas organoclorados.

Quanto ao metabólito B, foi possível observar a biotransformação do grupo nitroimina, essa transformação pode ocorrer tanto no metabolismo animal quanto no metabolismo microbiano (DAI *et al.*, 2010a). A alta seletividade do imidacloprido aos insetos se dá pelo grupo farmacóforo nitroimina ( $N=NO_2$ ), sendo assim, um agonista dos receptores nicotínicos da acetilcolina. Desse modo, a perda desse grupo pode reverter completamente a toxicidade desse composto para insetos (DAI *et al.*, 2010a; IHARA; MATSUDA, 2018; TOMIZAWA; CASIDA, 2003). Valores relacionados ao destino ambiental de substâncias disponíveis no site do banco de dados COMPTOX da EPA (Environmental Protection Agency) apresenta um tempo de meia vida para a biodegradação (3,53 dias) do referido composto, um pouco menor que a do imidacloprido (3,54 dias). Além disso, esse composto fica menos retido em solo com alto teor de carbono orgânico uma vez que o seu coeficiente de partição  $K_{oc}$  (4,23  $L\ kg^{-1}$ ) é menor que o do imidacloprido (89,1  $L\ kg^{-1}$ ), implicando assim na sua maior biodisponibilidade.

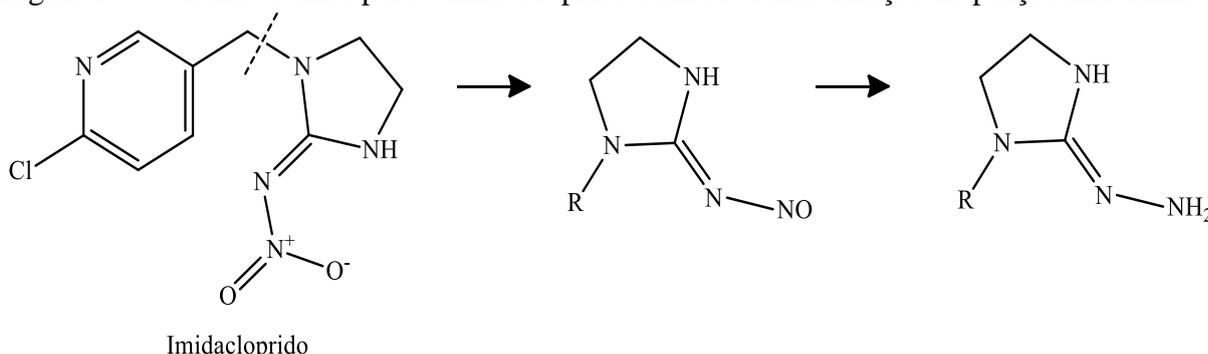
Um grande número de óxido-redutases são capazes de reduzir substituintes nitro (PARKINSON, KLAASSEN, 2001) *apud* (SCHULZ-JANDER; LEIMKUEHLER; CASIDA, 2002). Uma aldeído oxidase, outra enzima capaz de biotransformar o grupo nitroimina em grupo amino ( $=N-NH_2$ ) por meio de um intermediário nitroso ( $=N-NO$ ) também foi relatada por Dick *et al.* (2005). Nesse estudo uma molibdo-flavoenzima aldeído oxidase (AOX EC 1.2.3.1) foi identificada como a “nitro redutase” citosólica do fígado de coelho responsável pela transformação do grupo nitroimina.

Apesar da enzima aldeído oxidase ser mais comumente encontrada nos organismos de várias espécies de animais, também pode estar presente em microrganismos bacterianos, inclusive já foram encontradas em actinobactérias (AKINORI *et al.*, 2002). No estudo de

biotransformação do imidacloprido e tiametoxan por *Pseudomonas* sp. 1G, o metabólito amino não foi observado, porém o metabólito nitroso foi sugerido (PANDEY *et al.*, 2009). Para explicar a formação desse último, os autores do referido trabalho consideraram a presença de uma aldeído oxidase semelhante a relatada por Dick *et al.* (2005) para operar na linhagem estudada, sendo assim possível a redução do grupo “nitro mágico” em nitroso. Diante disso, também podemos inferir que as mesmas sugestões apresentadas acima podem ser consideradas no presente trabalho, a fim de explicar a formação do metabólito B.

Schulz-Jander (2002) e colaboradores sugeriram vias metabólicas para o imidacloprido considerando também o citosol de coelho. Tais vias corroboram com a formação do metabólito nitroso mencionado nos estudos anteriormente citados, como mostrado na Figura 17. O asterisco (\*) indica a posição cloropiridinilmetil (R).

Figura 17 – Via metabólica para o imidacloprido com biotransformação na porção nitroimina.

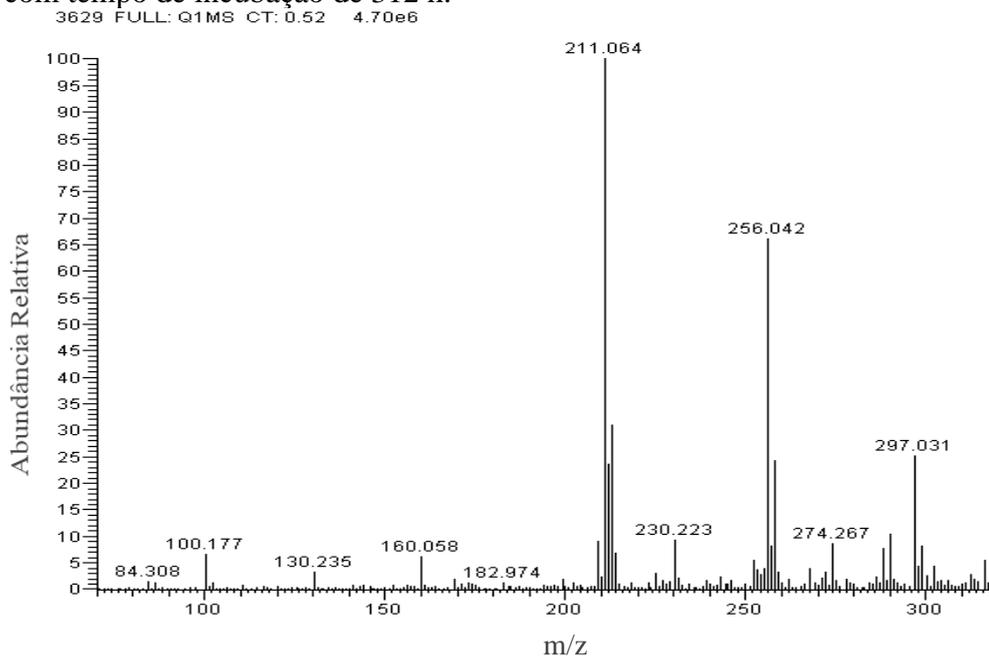


Imidacloprido

Fonte: Adaptada de Schulz-Jander (2002).

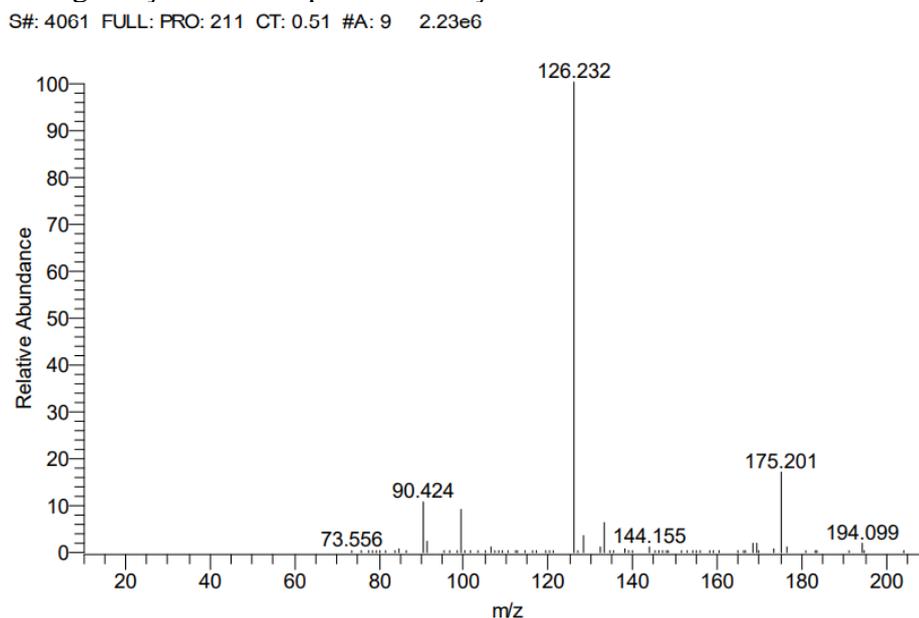
Tanto oxidases quanto óxido-redutases, são mencionadas como enzimas de extrema importância em processos biológicos, especialmente em processos que visam o tratamento de resíduos de pesticidas (SCOTT *et al.*, 2008). Além da biotransformação do grupo nitroimina em nitroso (=N-NO), outros estudos também demonstraram a capacidade bacteriana de biotransformar o grupo nitroimina em metabólito imina/guanidina (=NH) (ANHALT; MOORMAN; KOSKINEN, 2007; PANDEY *et al.*, 2009; TOMIZAWA; CASIDA, 2005). Outros estudos sugerem a formação do metabólito guanidina (=NH) a partir do derivado aminoguanidina (N=NH<sub>2</sub>) por enzimas hepáticas desconhecidas (Schulz-Jander; Leimkuehler e Casida 2002). Tais vias metabólicas podem explicar a formação do metabólito imidacloprido-guanidina no presente trabalho de acordo com o espectro de massa na Figura 18.

Figura 18: Espectro ESI(+)-MS obtido a partir do sistema de biodegradação com tempo de incubação de 312 h.



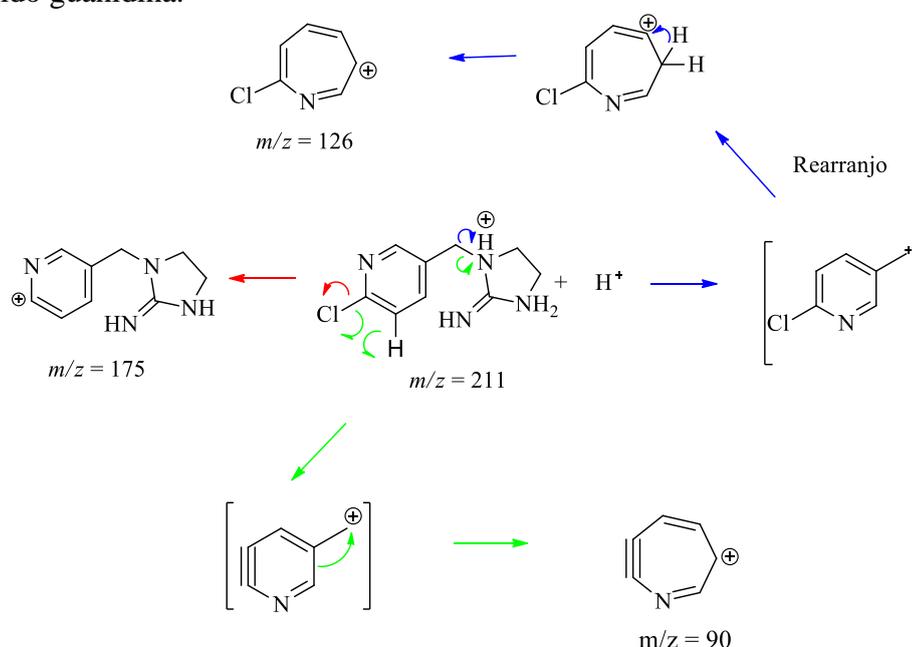
O íon de  $m/z$  211 obtido nesse estudo se assemelhou ao resultado observado em estudos de biodegradação realizados por Anhalt *et al.* (2007), por Pandey *et al.* (2009) com  $m/z$  211,0790 no qual utilizou a cepa *Pseudomonas* sp. 1G do mesmo modo que Sharma e Rajor (2014) que utilizaram a estirpe ATA 1 e obtiveram um  $m/z$  211,1. Todos esses trabalhos atribuíram o íon de  $m/z$  211 ao metabólito imidacloprido guanidina. O espectro de MS/MS para o íon mencionado pode ser observado na Figura 19.

Figura 19: Espectro de MS/MS do íon de  $m/z$  211 a partir do sistema de biodegradação com tempo de incubação de 312h.



Alguns dos íons fragmentos da Figura 19 estão de acordo com os íons característicos encontrados na literatura para o metabólito imidacloprido guanidina, alguns desses íons são:  $m/z$  211,  $m/z$  126,  $m/z$  175 (Ohtsu *et al.*, 2018; Schulz-Jander *et al.*, 2002) além desses o  $m/z$  194 é também mencionado sugerindo a perda de  $\text{NH}_3$  do íon precursor (Laurent e Rathahao, 2003). Esses resultados também estão de acordo com bancos de dados que fornecem espectros com os íons já mencionados além do íons  $m/z$  90 e  $m/z$  98 no MassBank e em menor intensidade, os íons  $m/z$  144 e  $m/z$  72 no MoNA. O mecanismo de fragmentação para esse metabólito foi proposto por Laurent e Rathahao, 2003 e também pode ser observado na Figura 20.

Figura 20: Proposta de fragmentação para o íon  $m/z$  211 referente à espécie  $[\text{M} + \text{H}]^+$  do imidacloprido guanidina.



Também foi possível observar um pico mais intenso com  $m/z$  212,037 como mostrado na Figura 21. Esse resultado se assemelha ao resultado obtido em um estudo de degradação bacteriana realizado por Anhalt *et al.* (2007) em que um actinomiceto isolado foi capaz de degradar o imidacloprido em alguns metabólitos dos quais um metabólito foi atribuído ao  $m/z$  212, do mesmo modo, o íon de  $m/z$  212,0575 foi obtido como resultado da biodegradação do imidacloprido em um trabalho realizado por Pandey *et al.* (2009), Outro estudo que corrobora com esses resultados foi realizado por Sharma e Rajor (2014). Nos três trabalhos os íons mencionados foram atribuídos ao metabólito imidacloprido ureia no qual foi identificado também com o auxílio de uma fonte de ionização ESI no modo positivo. O espectro de MS/MS

para o íon mencionado pode ser observado na Figura 22.

Figura 21: Espectro de ESI(+)-MS obtido a partir do sistema de biodegradação com tempo de incubação de 312 h.

S#: 4805 FULL: Q1MS CT: 0.52 5.98e6

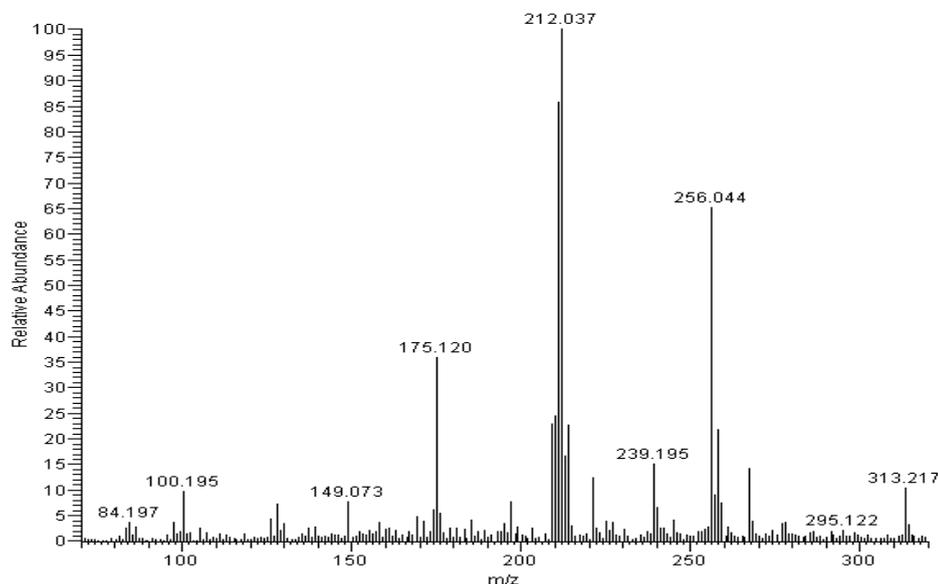
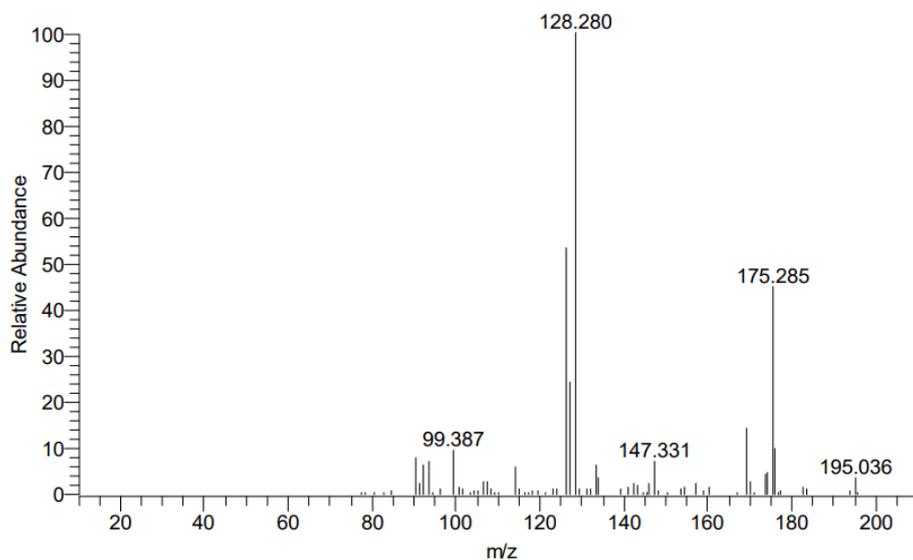


Figura 22: Espectro de MS/MS do íon de  $m/z$  212 obtido a partir do sistema de biodegradação com tempo de incubação de 312h.

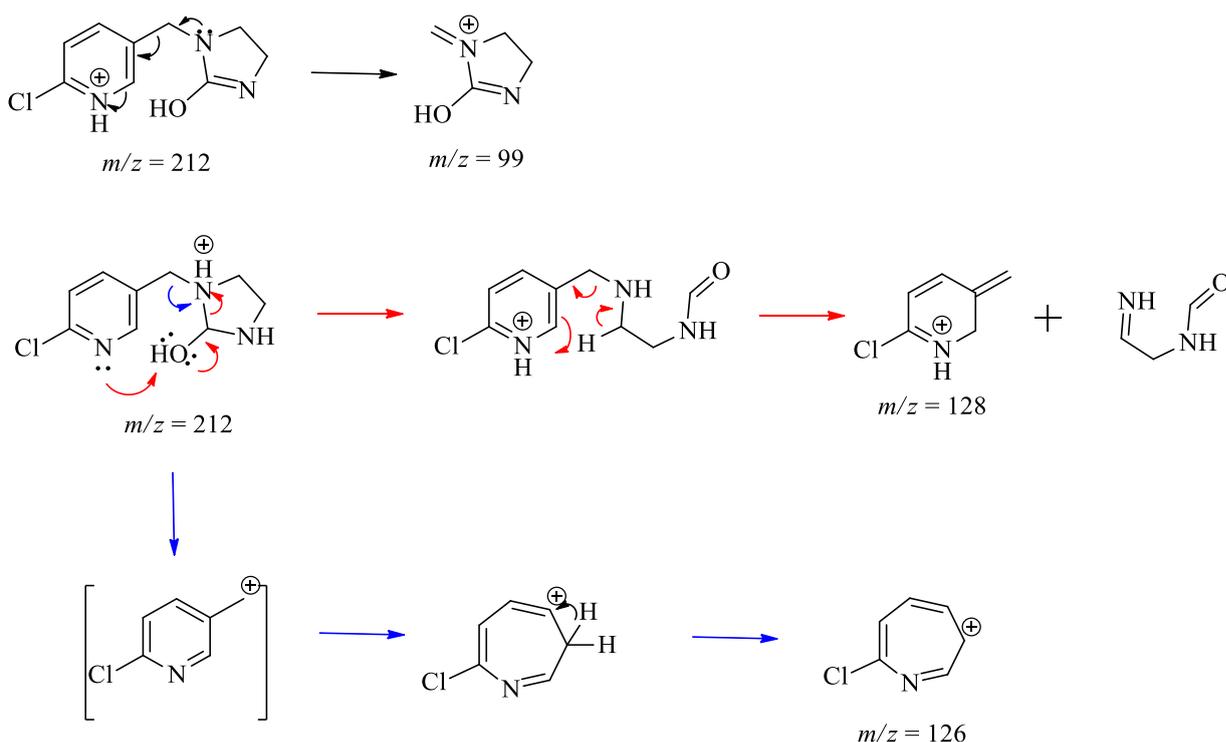
S#: 5166 FULL: PRO: 212 CT: 0.51 #A: 9 2.34e5



Alguns dos íons fragmentos da Figura 22 estão de acordo com os íons característicos encontrados na literatura do metabólito imidacloprido ureia (Raina-Fulton e Behdarvandan, 2016) alguns desses íons são:  $m/z$  128,  $m/z$  126,  $m/z$  99,  $m/z$  176,  $m/z$  195 e  $m/z$  212 do íon precursor (MoNA; MassBank), que podem indicar espécies  $C_6H_7ClN^+$  para  $m/z$  128 (Donald; Leeming e O'Hair 2012; Pous *et al.* 2001),  $C_6H_5ClN^+$  para  $m/z$  126 (Schulz-Jander;

Leimkuehler e Casida 2002; Thurman e Ferrer), entretanto os íons de  $m/z$  128 e  $m/z$  99 já foram reportado na literatura como desconhecidos (Klarich, 2017). As propostas de fragmentação do íon  $m/z$  212 pode ser observado na Figura 23.

Figura 23: Proposta de fragmentação para o íon  $m/z$  212 referente à espécie  $[M + H]^+$  do imidacloprido ureia.



Adaptado de: Donald, W. A.; Leeming, M. G.; O'Hair R. A. J. (2012).

A via metabólica sugerida para a formação do imidacloprido ureia é propõe que este metabólito é formado a partir da oxidação do imidacloprido guanidina (Liu *et al.* 2011, Pandey *et al.* 2009; Rodríguez-Castilho *et al.* 2018). Inicialmente dois átomos de oxigênio são removidos da molécula de imidacloprido para formar nitrosoguanidina e aminoguanidina, respectivamente, após isso há uma clivagem na ligação N-N para formar o intermediário guanidina que por sua vez oxida em mais uma etapa para formar o metabólito ureia que é considerado não tóxico (Pandey *et al.* 2009; Pang *et al.* 2020; Phugare *et al.* 2013).

Outro estudo realizado por Nauen, Ebbinghaus-Kintscher e Schmuck (2001) obtiveram resultados que corroboram com a baixa toxicidade do imidacloprido ureia para abelhas com  $\text{LD}_{50} > 99.500$  ng/abelha enquanto que o imidacloprido apresentou um valor de 41 ng/abelha. A biotransformação do metabólito imidacloprido guanidina em imidacloprido ureia é altamente desejável, uma vez que, o primeiro apresenta toxicidade aos vertebrados causada pela distribuição de carga positiva que promove uma alta afinidade pelos receptores nicotínicos

dos mamíferos, apesar de ser considerado menos tóxico para insetos do que o seu precursor imidacloprido (Muerdter; Lefevre 2019).

Nauen, Ebbinghaus-Kintscher e Schmuck (2001) que verificaram a toxicidade causada as abelhas estudadas pelos metabólitos contendo o farmacóforo nitroimina já os metabólitos que não contêm esse farmacóforo como o imidacloprido ureia, por exemplo, não apresentaram toxicidade para as abelhas estudadas. COMPTOX da EPA (Environmental Protection Agency) apresenta um valor de meia vida para a biodegradação (3,54 dias) do referido composto, igual a do imidacloprido. Porém esse composto fica menos retido em solo com alto teor de carbono orgânico uma vez que o seu coeficiente de partição  $K_{oc}$  ( $36,5 \text{ L kg}^{-1}$ ) é menor que o do imidacloprido, sendo assim, mais biodisponível que o seu precursor. O imidacloprido ureia também foi relatado no solo por Anhalt *et al.* (2007), na transformação por cepas de *Leifsonia* sp. e *Enterobacter* sp. (Sharma *et al.* 2014 ) e em um estudo utilizando biomisturas em sistemas de biopurificação (Rodríguez-Castilho *et al.* 2018).

## 5 CONCLUSÕES

A partir de uma extração simples em acetato de etila de um pesticida comercial, foi possível obter cristais de imidacloprido. Duas estirpes bacterianas, HEXBA05 (*Gordonia* sp.) e HEXBA06 (*Micrococcus* sp.) puderam ser selecionadas para o ensaio de biodegradação do imidacloprido, com base no menor tempo de crescimento possível em meio de cultura contendo glicose como fonte de carbono. Quatro produtos de biodegradação/biotransformação puderam ser sugeridos a partir das análises de GC-MS como o ácido nicotínico e 2-hidrazino-2-imidazolidina e por comparação dos espectros de MS/MS com os espectros de MS/MS da literatura para os metabólitos imidacloprido-ureia e imidacloprido guanidina. Tais metabólitos são reportados na literatura como menos tóxicos aos insetos se comparados com o precursor imidacloprido. Com isso, as estirpes estudadas apresentam potencial de degradação para o inseticida imidacloprido. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, J.; SHANKER, A.; SILAMBARASAN, S. Role of *Gordonia* sp JAAS 1 in biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysing metabolite 3, 5, 6-trichloro-2-pyridinol. **Letters in Applied Microbiology**, [S. l.], v. 57, n. 6, p. 510-516, ago. 2013.
- ADAK, T. *et al.* Residue and bio-efficacy evaluation of controlled release formulations of imidacloprid against pests in soybean (*Glycine max*). **Journal of Environmental Science and Health B**, [S. l.], v. 47, n. 3, p. 226-231, mar. 2012.
- AKINORI, Y. *et al.* Production of aldehyde oxidases by microorganisms and their enzymatic properties. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, [S. l.], v. 94, n. 2, p. 124-129, jan. 2002.
- AKOIJAM, R. *et al.* The Degradation Capability of *Bacillus alkalinitrilicus* for Imidacloprid Bioremediation in Soil. **Pesticide Research Journal**, [S. l.], v. 30, n. 1, p. 37-44, 2018.
- ANDALIBI, F.; FATAHI-BAFGHI, M. *Gordonia*: isolation and identification in clinical samples and role in biotechnology. **Folia Microbiologica**, [S. l.], v. 62, n. 3, p. 245-252, jan. 2017.
- ANHALT, J. C.; MOORMAN, T. B.; KOSKINEN, W. C. Biodegradation of imidacloprid by an isolated soil microorganism. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, [S. l.], v. 42, n. 5, p. 509-514, jun. 2007.
- ALVAREZ, A. *et al.* Actinobacteria: Current research and perspectives for bioremediation of pesticides and heavy metals. **Chemosphere**, [S. l.], v. 166, p.41-62, jan. 2017.
- ALVAREZ, A. *et al.* Maize plants (*Zea mays*) root exudates enhance lindane removal by native *Streptomyces* strains. **International Biodeterioration & Biodegradation**, [S. l.], v. 66, n. 1, p. 14-18, jan. 2012.
- ANGELIM, A. L. *et al.* An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosan beads. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], v. 127, p. 10-17, set. 2013.
- ANGELIM, A. L. **Seleção e imobilização de consórcios de bactérias hidrocarbonoclásticas e produtoras de compostos ativos de superfície para aplicações em processos de biorremediação**. 2012. Tese (Doutorado em Biotecnologia), Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
- AQUINO, L. F. **Biorremediação de sedimentos de manguezal contaminados com n-hexadecano por consórcio de actinobactérias imobilizado em esferas de quitosana**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Marinhas Tropicais) – Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.
- AREGAHEGN, K. Z. *et al.* Photochemistry of Thin Solid Films of the Neonicotinoid Imidacloprid on Surfaces. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 51, n. 5, p. 2660-2668, jan. 2017.

ARENSKÖTTER, M.; BRÖKER, D.; STEINBÜCHEL, A. Biology of the metabolically diverse genus *Gordonia*. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 70, n. 6, p. 3195-3204, jun. 2004.

ARMELIM, J. M. *et al.* The Dissipative Potential of Gamma Irradiation in Residues of Imidacloprid and Thiamethoxam in the Postharvest of Common Beans. **Journal of Food Science**, [S. l.], v. 83, n. 10, p. 2669-2674, set. 2018.

AZIZ, S. S. Bioremediation of environmental waste: a review. **University of Wah Journal of Science and Technology (UWJST)**, [S. l.], v. 2, p. 35-42, set. 2018.

BARRIUSO, E.; BENOIT, P.; DUBUS, I. G. Formation of Pesticide Nonextractable (Bound) Residues in Soil: Magnitude, Controlling Factors and Reversibility. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 42, n. 6, p. 1845-1854, mar. 2008.

BASS, C. *et al.* The global status of insect resistance to neonicotinoid insecticides. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 121, p. 78-87, jun. 2015.

BRAGA, A. R. C. *et al.* Global health risks from pesticide use in Brazil. **Nature Food**, [S. l.], v. 1, n. 6, p. 312-314, jun. 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Índice Monográfico. **Imidacloprido**, [S. l.], 4 p. 2016a. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2822328/CONSULTA+P%C3%A9BLICA+N+223+GGTOX.pdf/d1ca4f77-b962-42b0-9100-d17464642a71>. Acesso em: 10 ago. 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos – Para relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2013 a 2015**. Brasília, 2016b. 246 p. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+2013-2015\\_VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8](http://portal.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+PARA+2013-2015_VERS%C3%83O-FINAL.pdf/494cd7c5-5408-4e6a-b0e5-5098cbf759f8). Acesso em: 02 out. 2019.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Programa de análise de resíduos de agrotóxicos em alimentos – Para relatório das análises de amostras monitoradas no período de 2017 a 2018**. Brasília, 2019. 246 p. Disponível em: [http://antigo.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+%E2%80%93+PARA+2017-2018\\_Final.pdf/e1d0c988-1e69-4054-9a31-70355109acc9](http://antigo.anvisa.gov.br/documents/111215/0/Relat%C3%B3rio+%E2%80%93+PARA+2017-2018_Final.pdf/e1d0c988-1e69-4054-9a31-70355109acc9). Acesso em: 02 out. 2019.

BUENO, M. J. M. *et al.* Evaluation of selected ubiquitous contaminants in the aquatic environment and their transformation products. A pilot study of their removal from a sewage treatment plant. **Water Research**, [S. l.], v. 45, n. 6, p. 2331-2341, mar. 2011.

CANADIAN COUNCIL OF MINISTERS OF THE ENVIRONMENT. **Canadian Water Quality Guidelines for the Protection of Aquatic Life: Imidaclopride**, Winnipeg, Manitoba, 2007. Disponível em: <http://ceqg-rcqe.ccme.ca/download/en/187>. Acesso em: 03 nov. 2019.

CASIDA, J. E. Neonicotinoid metabolism: compounds, substituents, pathways, enzymes,

organisms, and relevance. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 59, n. 7, p. 2923-2931, abr. 2011.

CAZALIS, V.; LOREAU, M.; HENDERSON, K. Do we have to choose between feeding the human population and conserving nature? Modelling the global dependence of people on ecosystem services. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 634, p. 1463-1474, set. 2018.

CHAO, S. L.; CASIDA, J. E. Interaction of imidacloprid metabolites and analogs with the nicotinic acetylcholine receptor of mouse brain in relation to toxicity. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, [S. l.], v. 58, n. 1, p. 77-88, mai. 1997.

CHATURVEDI, S.; KHURANA, S. M. P. Importance of Actinobacteria for Bioremediation. In: **Plant Biotechnology: Progress in Genomic Era**. Springer, Singapore, 2019. p. 277-307.

CHEN, Y. *et al.* Ecological risk assessment of the increasing use of the neonicotinoid insecticides along the east coast of China. **Environment International**, [S. l.], v. 127, p. 550-557, jun. 2019.

DAI, Y. *et al.* Metabolism of the neonicotinoid insecticides acetamiprid and thiacloprid by the yeast *Rhodotorula mucilaginosa* strain IM-2. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 58, n. 4, p. 2419-2425, jan. 2010a.

DAI, Y. *et al.* Biotransformation of thianicotinyl neonicotinoid insecticides: diverse molecular substituents response to metabolism by bacterium *Stenotrophomonas maltophilia* CGMCC 1.1788. **Bioresource technology**, [S. l.], v. 101, n. 11, p. 3838-3843, jun. 2010b.

DELLAGNEZZE, B. M. *et al.* Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. **Marine pollution bulletin**, [S. l.], v. 89, n. 1-2, p. 191-200, dez. 2014.

DERBALAH, A. *et al.* Kinetics of photocatalytic removal of imidacloprid from water by advanced oxidation processes with respect to nanotechnology. **Journal of Water and Health**, [S. l.], v. 17, n. 2, p. 254-265, fev. 2019.

DIAMOND, M. L. Surprising Degradation Products from an Under-Fire Insecticide. **Acs Central Science**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 97-98, fev. 2017.

DIAZ, J. M. C. *et al.* Fate and effect of imidacloprid on vermicompost-amended soils under dissimilar conditions: Risk for soil functions, structure, and bacterial abundance. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 579, p. 1111-1119, fev. 2017.

DIB, J. R. *et al.* Extrachromosomal genetic elements in *Micrococcus*. **Applied microbiology and biotechnology**, [S. l.], v. 97, n. 1, p. 63-75, nov. 2012.

DICK, R. A.; KANNE, D. B.; CASIDA, J. E. Identification of aldehyde oxidase as the neonicotinoid nitroreductase. **Chemical research in toxicology**, [S. l.], v. 18, n. 2, p. 317-323, fev. 2005.

DING, F.; PENG, W. Biological assessment of neonicotinoids imidacloprid and its major metabolites for potentially human health using globular proteins as a model. **Journal of**

**Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [S. l.], v. 147, p. 24-36, jun. 2015.

DONALD, W. A.; LEEMING, M. G.; RICHARD, A. J. Gas-phase ion chemistry of the pesticide imidacloprid: proton driven radical fragmentation of the nitro-guanidine functional group. **International Journal of Mass Spectrometry**, [S. l.], v. 316, p. 91-99, abr. 2012.

DONLEY, N. The USA lags behind other agricultural nations in banning harmful pesticides. **Environmental Health**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 44, jun. 2019.

DOS SANTOS, C. F.; OTESBELGUE, Alex; BLOCHTEIN, Betina. The dilemma of agricultural pollination in Brazil: Beekeeping growth and insecticide use. **PloS one**, [S. l.], v. 13, n. 7, p. 1-14, jul. 2018.

DVOŘÁK, P. *et al.* Bioremediation 3. 0: Engineering pollutant-removing bacteria in the times of systemic biology. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 35, n. 7, p. 845-866, nov. 2017.

EEVERS, N. *et al.* Bio-and phytoremediation of pesticide-contaminated environments: a review. In: **Advances in botanical research**, [S. l.], Academic Press, 2017. p. 277-318.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Aquatic Life Benchmarks and Ecological Risk Assessments for Registered Pesticides**, [S. l.], 2017. Disponível em: <https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/aquatic-life-benchmarks-and-ecological-risk>. Acesso em: 02 out. 2019.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Pesticides Industry Sales and Usage**, [S. l.], 2007. Disponível em: [https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/market\\_estimates2007.pdf](https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-10/documents/market_estimates2007.pdf). Acesso em: 15 out. 2020.

European Commission. **Pesticides Data Base**, [S. l.], 2016. Disponível em: <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=pesticide.residue.displayMRL&language=EN>. Acesso em: 02 nov. 2019.

ERGUVEN, G. O.; YILDIRIM, N. The Evaluation of Imidacloprid Remediation in Soil Media by Two Bacterial Strains. **Current Microbiology**, [S. l.], v. 76, n. 12, p. 1461-1466, set. 2019.

EXTOXNET. Extension Toxicology Network. **Pesticide Information Profiles: Imidacloprid**, [S. l.], 1996. Disponível em: <http://extoxnet.orst.edu/pips/imidaclo.htm>. Acesso em: 02 out. 2019.

FAN, Y. *et al.* Extraction behavior of nicotinic acid and nicotinamide in ionic liquids. **Chemical Engineering Research and Design**, [S. l.], v. 146, p. 336-343, jun. 2019.

FAOSTAT, **FAO**, [S. l.], Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data>. Acesso em: 22 fev. 2021.

FARIAS, M. A. G. L. *et al.* Spray nozzles and droplet size effects on soybean canopy deposits and stink bugs control in west region of São Paulo state-Brazil. **Phytoparasitica**, [S. l.], p. 1-11, jan. 2020.

FERRER, I.; THURMAN, E. M. Determination of Chloronicotinyl Insecticides in Salad Vegetables by LC/MS/ESI/TOF and LC/MS Ion Trap. **Agilent Technologies publication**, [S. l.], 2004.

FUENTES, M. S. *et al.* Enhanced removal of a pesticides mixture by single cultures and consortia of free and immobilized *Streptomyces* strains. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2013, 2013.

GAVRILESCU, M. Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. **Engineering in Life Sciences**, [S. l.], v. 5, n. 6, p. 497-526, dez. 2005.

GRUNDTVIG, I. P. Rosinha *et al.* Screening of organic solvents for bioprocesses using aqueous-organic two-phase systems. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 36, n. 7, p. 1801-1814, nov. 2018.

GUO, J. *et al.* Genotoxic effects of imidacloprid in human lymphoblastoid TK6 cells. **Drug and Chemical Toxicology**, [S. l.], p. 1-5, ago. 2018.

GUZSVÁNY, V. *et al.* NMR Study of the Influence of pH on the Persistence of some Neonicotinoids in Water. **Acta Chimica Slovenica**, [S. l.], v. 53, n. 1, p. 52, jan. 2007.

GUPTA, M. *et al.* A study on metabolic prowess of *Pseudomonas* sp. RPT 52 to degrade imidacloprid, endosulfan and coragen. **Journal of hazardous materials**, [S. l.], v. 301, p. 250-258, jan. 2016.

GUPTA, S.; GAJBHIYE, V. T. Persistence of acetamiprid in soil. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, [S. l.], v. 78, n. 5, p. 349-352, jun. 2007.

HLADIK, M. L.; MAIN, A. R.; GOULSON, D. Environmental Risks and Challenges Associated with Neonicotinoid Insecticides. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 52, n. 6, p. 3329-3335, fev. 2018.

HUSSAIN, I. *et al.* Microbe and plant assisted-remediation of organic xenobiotics and its enhancement by genetically modified organisms and recombinant technology: A review. **Science of The Total Environment**, [S. l.], v. 628-629, p. 1582-1599, jul. 2018.

IHARA, M.; MATSUDA, K. Neonicotinoids: molecular mechanisms of action, insights into resistance and impact on pollinators. **Current Opinion In Insect Science**, [S. l.], v. 30, p. 86-92, dez. 2018.

ITURBURU, F. G. *et al.* Imidacloprid Causes DNA Damage in Fish: Clastogenesis as a Mechanism of Genotoxicity. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [S. l.], v. 100, n. 6, p. 760-764, abr. 2018.

JANSSEN, D. B. *et al.* Bacterial degradation of xenobiotic compounds: evolution and distribution of novel enzyme activities. **Environmental microbiology**, [S. l.], v. 7, n. 12, p. 1868- 1882, nov. 2005.

JESCHKE, P. *et al.* Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. **Journal of**

**Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 59, n. 7, p. 2897-2908, abr. 2010.

JIANG, J. *et al.* Comparative ecotoxicity of neonicotinoid insecticides to three species of Trichogramma parasitoid wasps (Hymenoptera: Trichogrammatidae). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 183, p. 1-7, nov. 2019.

JIA, X.Y. *et al.* Genetic characterization of the chlorothricin gene cluster as a model for spirotetronate antibiotic biosynthesis. **Chemistry & Biology**, [S. l.], v. 13, n. 6, p. 575-585, jun. 2006.

JIMÉNEZ-LÓPEZ, J. *et al.* Analysis of neonicotinoid pesticides in the agri-food sector: a critical assessment of the state of the art. **Applied Spectroscopy Reviews**, [S. l.], v. 55, n. 8, p. 613-646, mai. 2019.

KANDIL, M. M. *et al.* Isolation and characterization of a novel imidacloprid-degrading Mycobacterium sp. strain MK6 from an Egyptian soil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 63, n. 19, p. 4721-4727, mai. 2015.

KAUSHAL, J. *et al.* Catalase enzyme: Application in bioremediation and food industry. **Biocatalysis And Agricultural Biotechnology**, [S. l.], v. 16, p. 192-199, out. 2018.

KIRKLAND, J. B. Niacin status, NAD distribution and ADP-ribose metabolism. **Current Pharmaceutical Design**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 3-11, jan. 2009.

KLARICH, K. L. **Transformation and fate of neonicotinoid insecticides during drinking water treatment**. MS (Master of Science) thesis, University of Iowa, 2017.

KUPPUSAMY, S. *et al.* Remediation approaches for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soils: Technological constraints, emerging trends and future directions. **Chemosphere**, [S. l.], v. 168, p. 944-968, fev. 2017.

LACSON, C. F. Z. *et al.* Fluidized-bed Fenton treatment of imidacloprid: Optimization and degradation pathway. **Sustainable Environment Research**, [S. l.], v. 28, n. 6, p. 309-314, nov. 2018.

LANDRIGAN, P. J. *et al.* The Lancet Commission on pollution and health. **The lancet**, [S. l.], v. 391, n. 10119, p. 462-512, fev. 2018.

LAURENT, F. M.; RATHAHAO, E. Distribution of [<sup>14</sup>C] imidacloprid in sunflowers (*Helianthus annuus* L.) following seed treatment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 51, n. 27, p. 8005-8010, dez. 2003.

LIU, M. *et al.* Aptasensors for pesticide detection. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 130, p. 174-184, abr. 2019.

LIU; ZHENG, W.; GAN, J. Competitive Sorption between Imidacloprid and Imidacloprid-urea on Soil Clay Minerals and Humic Acids. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [S. l.], v. 50, n. 23, p. 6823-6827, nov. 2002.

LIU, Z. *et al.* Soil microbial degradation of neonicotinoid insecticides imidacloprid,

acetamiprid, thiacloprid and imidacloprid and its effect on the persistence of bioefficacy against horsebean aphid *Aphis craccivora* Koch after soil application. **Pest Management Science**, [S. l.], v. 67, n. 10, p. 1245-1252, mai. 2011.

LI, Z.; JENNINGS, A. Global variations in pesticide regulations and health risk assessment of maximum concentration levels in drinking water. **Journal of environmental management**, [S. l.], v. 212, p. 384-394, abr. 2018.

LOZANO, G. E. *et al.* Low accuracy of the McFarland method for estimation of bacterial populations. **African Journal of Microbiology Research**, [S. l.], v. 12, n. 31, p. 736-740, ago. 2018.

LU, T. *et al.* Regulation of Hydroxylation and Nitroreduction Pathways during Metabolism of the Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid by *Pseudomonas putida*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 64, n. 24, p. 4866-4875, mai. 2016.

MADIGAN, M.T. *et al.* **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

MAHAPATRA, B. *et al.* Imidacloprid application changes microbial dynamics and enzymes in rice soil. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 144, p. 123-130, out. 2017a.

MAHAPATRA, B. *et al.* Effect of abiotic factors on degradation of imidacloprid. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [S. l.], v. 99, n. 4, p. 475-480, ago. 2017b.

MAIN, A. R. *et al.* Reduction of neonicotinoid insecticide residues in Prairie wetlands by common wetland plants. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 579, p. 1193-1202, fev. 2017.

MANASI *et al.* Identification and Characterization of the microbial communities found in electronic industrial effluent and their potential for bioremediation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 164, p. 379-387, nov. 2018.

MassBank Europe. Disponível em: <https://massbank.eu/MassBank/Search>. Acesso em: 19 nov. 2020.

MCFARLAND, J. The nephelometer: An instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. **Jama: The Journal of the American Medical Association**, [S. l.], n. 14, p.1176-1178, out. 1907.

MEGHARAJ, M. *et al.* Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. **Environment International**, [S. l.], v. 37, n. 8, p. 1362-1375, nov. 2011.

MESQUITA, R. S. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE INSETICIDA DE NOVOS DERIVADOS DE NEONICOTINÓIDES EM *Anopheles darlingi* ROOT, 1926 (DIPTERA: CULICIDAE)**. 2012. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2012.

MoNA, **MassBank of North America**, [S. l.], Disponível em: <https://mona.fiehnlab.ucdavis.edu/> Acesso em: 25 dez. 2020.

MORILLO, E.; VILLAVERDE, J. Advanced technologies for the remediation of pesticide-contaminated soils. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 586, p. 576-597, mai. 2017.

MORRISSEY, C. A. *et al.* Neonicotinoid contamination of global surface waters and associated risk to aquatic invertebrates: A review. **Environment International**, [S. l.], v. 74, p. 291- 303, jan. 2015.

MUERDTER, C. P.; LEFEVRE, G. H. Synergistic Lemna Duckweed and Microbial Transformation of Imidacloprid and Thiacloprid Neonicotinoids. **Environmental Science & Technology Letters**, [S. l.], v. 6, n. 12, p. 761-767, nov. 2019.

NAUEN, R.; EBBINGHAUS-KINTSCHER, U.; SCHMUCK, R. Toxicity and nicotinic acetylcholine receptor interaction of imidacloprid and its metabolites in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, [S. l.], v. 57, n. 7, p. 577-586, 2001.

NEWMAN, L. A. *et al.* Phytoremediation of Organic Contaminants: A Review of Phytoremediation Research at the University of Washington. **Journal of Soil Contamination**, [S. l.], v. 7, n. 4, p. 531-542, jul. 1998.

OHTSU, S. *et al.* Development of a visualization method for imidacloprid in *Drosophila melanogaster* via imaging mass spectrometry. **Analytical Sciences**, [S. l.], p. 1-19, set. 2018.

PANDEY, G. *et al.* Biotransformation of the neonicotinoid insecticides imidacloprid and thiamethoxam by *Pseudomonas* sp. 1G. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S. l.], v. 380, n. 3, p. 710-714, mar. 2009.

PANG, S. *et al.* Insights into the microbial degradation and biochemical mechanisms of neonicotinoids. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 11, p. 868, mai. 2020.

PARKINSON, A. KLAASSEN, C. D. **Biotransformation of xenobiotics. In Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons**. 6. ed. New York: McGraw-Hill. 2001.

PARTE, S. G.; MOHEKAR, A. D.; KHARAT, A. S. Microbial degradation of pesticide: a review. **African Journal of Microbiology Research**, [S. l.], v. 11, n. 24, p. 992-1012, jun. 2017.

PARWEEN, T. *et al.* Bioremediation: a sustainable tool to prevent pesticide pollution. In: **Modern Age Environmental Problems and their Remediation**. Springer, Cham, out. 2018. p. 215-227.

PATIL, K. C.; MATSUMURA, F.; BOUSH, G. M. Degradation of endrin, aldrin, and DDT by soil microorganisms. **Applied Microbiology**, [S. l.], v. 19, n. 5, p. 879-881, mai. 1970.

PAUL, T. *et al.* Arsenic bioremediation potential of arsenite-oxidizing *Micrococcus* sp. KUMAs15 isolated from contaminated soil. **Pedosphere**, [S. l.], v. 28, n. 2, p. 299-310, abr. 2018.

PAUMGARTTEN, F. J. R. Pesticides and public health in Brazil. **Current Opinion in**

**Toxicology**, [S. l.], v. 22, p. 7-11, ago. 2020.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introdução à Espectroscopia**. Tradução da 4ª edição norte-americana. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PHUGARE, S. S. *et al.* Microbial degradation of imidacloprid and toxicological analysis of its biodegradation metabolites in silkworm (*Bombyx mori*). **Chemical Engineering Journal**, [S. l.], v. 230, p. 27-35, ago. 2013.

RAMADAN, B. S. *et al.* An overview of electrokinetic soil flushing and its effect on bioremediation of hydrocarbon contaminated soil. **Journal of Environmental Management**, [S. l.], v. 218, p. 309-321, jul. 2018.

RAIMONDO, E. E. *et al.* Lindane Bioremediation in Soils of Different Textural Classes by an Actinobacteria Consortium. **Journal of Soil Science and Plant Nutrition**, [S. l.], v. 19, n. 1, p. 29-41, fev. 2019.

RAINA-FULTON, R.; BEHDARVANDAN, A. Liquid Chromatography-mass spectrometry for the determination of neonicotinoid insecticides and their metabolites in biological, environmental and food commodity matrices. **Trends Chromatography**, [S. l.], v. 10, p. 51-79, 2016.

R. D. Norris *et al.* **Handbook of Bioremediation**. Lewis, Boca Raton, FL, 1993.

REIS, M. L. F. *et al.* **Biodegradação de hidrocarbonetos voltada para a identificação de biomarcadores de biorremediação de áreas contaminadas com petróleo ou seus derivados**. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, v. 3, n. 1, p. 1049. 2018.

RODRÍGUEZ-CASTILLO, G. *et al.* Removal of Two Neonicotinoid Insecticides and Mineralization of 14 C-Imidacloprid in Biomixtures. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [S. l.], v. 101, n. 1, p. 137-143, jun. 2018.

RODRÍGUEZ-CASTILLO, G. *et al.* Simultaneous removal of neonicotinoid insecticides by a microbial degrading consortium: Detoxification at reactor scale. **Chemosphere**, [S. l.], v. 235, p. 1097-1106, nov. 2019.

SADARIA, A. M. *et al.* Passage of fiproles and imidacloprid from urban pest control uses through wastewater treatment plants in northern California, USA. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [S. l.], v. 36, n. 6, p. 1473-1482, dez. 2016.

SADARIA, A. M.; SUPOWIT, S. D.; HALDEN, R. U. Mass Balance Assessment for Six Neonicotinoid Insecticides During Conventional Wastewater and Wetland Treatment: Nationwide Reconnaissance in United States Wastewater. **Environmental Science & Technology**, [S. l.], v. 50, n. 12, p. 6199-6206, jun. 2016.

SÁNCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K.; HAYASAKA, D. Contamination of the Aquatic Environment with Neonicotinoids and its Implication for Ecosystems. **Frontiers in Environmental Science**, [S. l.], v. 4, p. 1-14, nov. 2016.

SARKAR, M. A. *et al.* Persistence and metabolism of imidacloprid in different soils of West

Bengal. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, [S. l.], v. 57, n. 7, p. 598-602, 2001.

SATKOWSKI, L. E. *et al.* Imidacloprid Sorption and Transport in Cropland, Grass Buffer, and Riparian Buffer Soils. **Vadose Zone Journal**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1-12, jan. 2018.

SCHULZ-JANDER, D. A.; LEIMKUEHLER, W. M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticides: reduction and cleavage of imidacloprid nitroimine substituent by liver microsomal and cytosolic enzymes. **Chemical research in toxicology**, [S. l.], v. 15, n. 9, p. 1158- 1165, set. 2002.

SCOTT, C. *et al.* The enzymatic basis for pesticide bioremediation. **Indian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 65, mar. 2008.

SHARMA, P.; SURI, C. R. Biotransformation and biomonitoring of phenylurea herbicide diuron. **Bioresource technology**, [S. l.], v. 102, n. 3, p. 3119-3125, fev. 2011.

SHARMA, S.; SINGH, B.; GUPTA, V. K. Assessment of imidacloprid degradation by soil-isolated *Bacillus alkalinitrilicus*. **Environmental Monitoring and Assessment**, [S. l.], v. 186, n. 11, p. 7183-7193, jul. 2014.

SHARMA, T.; RAJOR, A.; TOOR, A. P. Degradation of imidacloprid in liquid by *Enterobacter* sp. strain ATA1 using co-metabolism. **Bioremediation Journal**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 227-235, jul. 2014.

SHATTUCK, A. Risky subjects: Embodiment and partial knowledges in the safe use of pesticide. **Geoforum**, [S. l.], v. 123, p. 153-161, jul. 2021.

SI, F. *et al.* Inner filter effect-based homogeneous immunoassay for rapid detection of imidacloprid residue in environmental and food samples. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 148, p. 862-868, fev. 2018.

SIMON-DELISO, N. *et al.* Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. **Environmental Science and Pollution Research**, [S. l.], v. 22, n. 1, p. 5-34, set. 2014.

Spectral Database for Organic Compounds. **IR: KBr disk**, [S. l.]. Disponível em: [https://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct\\_frame\\_disp.cgi?sdbno=51126](https://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_disp.cgi?sdbno=51126). Acesso em: 02 nov. 2019a.

Spectral Database for Organic Compounds. **<sup>13</sup>C NMR: in CDCl<sub>3</sub>**, [S. l.]. Disponível em: [https://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct\\_frame\\_disp.cgi?sdbno=51126](https://sdbs.db.aist.go.jp/sdbs/cgi-bin/direct_frame_disp.cgi?sdbno=51126). Acesso em: 02 nov. 2019b.

STARNER, K.; GOH, K. S. Detections of the Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid in Surface Waters of Three Agricultural Regions of California, USA, 2010–2011. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, [S. l.], v. 88, n. 3, p. 316-321, jan. 2012.

SOWANI, H.; KULKARNI, M.; ZINJARDE, S. An insight into the ecology, diversity and adaptations of *Gordonia* species. **Critical reviews in microbiology**, [S. l.], v. 44, n. 4, p. 393-

413, dez. 2018.

SOWANI, H.; KULKARNI, M.; ZINJARDE, S. Harnessing the catabolic versatility of *Gordonia* species for detoxifying pollutants. **Biotechnology advances**, [S. l.], v. 37, n. 3, p. 382-402, mai. 2019.

SUN, W. *et al.* Comparison of the effects of nicotinic acid and nicotinamide degradation on plasma betaine and choline levels. **Clinical Nutrition**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 1136- 1142, ago. 2017.

TANG, T. *et al.* An integrated assessment and spatial-temporal variation analysis of neonicotinoids in pollen and honey from noncrop plants in Zhejiang, China. **Environmental Pollution**, [S. l.], v. 250, p. 397-406, jul. 2019.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. **Annual Review Pharmacology and Toxicology**, [S. l.], v. 45, p. 247-268, set. 2005.

TOMIZAWA, M.; CASIDA, J. E. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. **Annual review of entomology**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 339-364, jan. 2003.

VAN DIJK, T. C.; VAN STAALDUINEN, M. A.; SLUIJS, J. P. van D. Macro- Invertebrate Decline in Surface Water Polluted with Imidacloprid. **Plos One**, [S. l.], v. 8, n. 5, p. 1- 10, mai. 2013.

VIEIRA, C. E. D. *et al.* DNA damage and oxidative stress induced by imidacloprid exposure in different tissues of the Neotropical fish *Prochilodus lineatus*. **Chemosphere**, [S. l.], v. 195, p.125-134, mar. 2018.

VRYZAS, Z. Pesticide fate in soil-sediment-water environment in relation to contamination preventing actions. **Current Opinion In Environmental Science & Health**, [S. l.], v. 4, p. 5-9, ago. 2018.

WANG, X. *et al.* Mechanism of Neonicotinoid Toxicity: Impact on Oxidative Stress and Metabolism. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, [S. l.], v. 58, n. 1, p. 471-507, jan. 2018.

WANG, Z. *et al.* Cross-resistance, inheritance and biochemical mechanisms of imidacloprid resistance in B-biotype *Bemisia tabaci*. **Pest Management Science: formerly Pesticide Science**, [S. l.], v. 65, n. 11, p. 1189-1194, jun. 2009.

WORLDOMETER. **Worldometers.info**. [S. l.]. Disponível em: <https://www.worldometers.info/world-population/>. Acesso em: 09 fev. 2021.

ZAPATA, A.; RAMIREZ-ARCOS, S. A Comparative Study of McFarland Turbidity Standards and the Densimat Photometer to Determine Bacterial Cell Density. **Current Microbiology**, [S. l.], v. 70, n. 6, p.907-909, mar. 2015.

ZHANG, P. *et al.* Sorption, desorption and degradation of neonicotinoids in four agricultural

soils and their effects on soil microorganisms. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 615, p. 59-69, fev. 2018.

ZHENG, W.; LIU, W. Kinetics and mechanism of the hydrolysis of imidacloprid. **Pesticide Science**, [S. l.], v. 55, n. 4, p. 482-485, mai. 1999.

ZIKANKUBA, V. L. *et al.* Pesticide regulations and their malpractice implications on food and environment safety. **Cogent Food & Agriculture**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1-32, jan. 2019.

## APÊNDICE A – CROMATOGRAMAS ADQUIRIDOS POR CG-MS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS

