

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA REGIÃO TOCANTINA DO MARANHÃO-  
UEMASUL

CURSO DE QUÍMICA LICENCIATURA

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS, NATURAIS E TECNOLÓGICAS

**GESSELE ALMEIDA DA SILVA**

**BIODEGRADAÇÃO DE DIURON POR NANOEMULSÕES COM  
BIOSURFACTANTES DE RIZOBACTÉRIAS**

IMPERATRIZ

2022

**GESSELE ALMEIDA DA SILVA**

**BIODEGRADAÇÃO DE DIURON POR NANOEMULSÕES COM  
BIOSURFACTANTES DE RIZOBACTÉRIAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto ao curso de Química da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão como requisito para obtenção do grau de licenciatura em Química.

Orientador: Prof. D. Sc. José Fábio França Orlanda

IMPERATRIZ

2022

S586b

Silva, Gessele Almeida da

Biodegradação de diuron por nanoemulsões com biossurfactantes de risobactérias / Gessele Almeida da Silva. – Imperatriz, MA, 2022.

50 f.; il.

Monografia (Curso de Licenciatura em Química) – Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão – UEMASUL, Imperatriz, MA, 2022.

1. Setor agrícola. 2. Agroquímicos. 3. Biodegradação. I. Título.

CDU 54:504

**GESSELE ALMEIDA DA SILVA**

**BIODEGRADAÇÃO DE DIURON POR NANOEMULSÕES COM  
BIOSSURFACTANTES DE RIZOBACTÉRIAS**

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto ao curso de Química da Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão como requisito para obtenção do grau de licenciatura em Química.

Orientador: Prof. D. Sc. José Fábio França Orlanda

Aprovado em: 14 / 09 / 2022

**BANCA EXAMINADORA**



---

**Prof. Dr. José Fábio França Orlanda (orientador)**

Doutor em Química



---

**Prof. Dr. Marco Antônio Bandeira Azevedo (Membro 1)**

Doutor em Química



---

**Prof. Dr. Marcelo Francisco da Silva (Membro 2)**

Doutor em Biologia de Agentes Infecciosos e Parasitários

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente a Deus, por me dar forças e não me deixar desistir. Agradeço a minha família, por todo apoio, incentivo e conforto nos momentos difíceis. Aos amigos que sempre estiveram comigo desde o começo do curso, Claudia, Stefanny, Carol, Isla, Marcos e Maria Deusa, agradeço pelos momentos de muita diversão e pelos momentos de aprendizados que levarei para a vida, sempre foi a gente, juntos para tudo. Principalmente a Stefanny, obrigada amiga, por nunca ter soltado minha mão, por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava, por todas as loucuras acadêmicas que a gente fez juntas, e no fim deram certo, foi ótimo dividir todas elas contigo.

Ao meu orientador Fábio França, por conceder oportunidades acadêmicas, por acreditar em mim para desenvolver pesquisa e por me ensinar a ter confiança em mim mesma com o famoso “Te vira gatinho” sim, eu sou capaz de fazer qualquer coisa que eu quiser, a insegurança não pode me parar!

Aos meus irmãozinhos de laboratório, Labitec é realmente uma família. Agradeço pelos momentos leves, de muitas risadas e também pela ajuda diretamente no meu trabalho de pesquisa, Maria Eduarda, Mayara, Fernando e especialmente ao Natan que nos últimos meses tem sido meu apoio.

*“Um dos segredos do sucesso é se recusar a  
deixar que as adversidades temporárias nos  
derrotem. ”*

*(Mary Kay Ash)*

## RESUMO

O setor agrícola é um dos principais responsáveis pela poluição do meio ambiente, devido as aplicações de agroquímicos. Dentre eles, o Diuron [3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea], herbicida não-ionizável, pertencente ao grupo dos organoclorados, de amplo espectro no controle das plantas daninhas. Apresenta baixa solubilidade em água, elevada persistência e bioacumulação no ambiente. A ação dos microrganismos do solo é um dos mecanismos de maior importância na degradação dos agroquímicos, que na maioria dos casos, contribui efetivamente para a dissipação da molécula no ambiente. Uma alternativa para a remediação de áreas contaminadas com agrotóxicos é a biorremediação, que consiste na utilização de microrganismos ou suas enzimas para remover compostos químicos persistentes. Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a biorremediação de diuron por nanoemulsões contendo biossurfactantes de bactérias rizosféricas. Os resultados obtidos demonstraram que das vinte e quatro cepas bacterianas rizosféricas isoladas inicialmente, somente quatro apresentaram melhores resultados para produtoras de biossurfactantes. As nanoemulsões, das cepas bacterianas 1A4 e 2A2 apresentaram maior índice de degradação do Diuron a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  as outras duas, 1A1 e 2B3 apresentaram atividade metabólica menor. Dessa forma, é possível utilizar essas bactérias selecionadas para dar continuidade ao estudo de processo de biorremediação do Diuron através da sua ação biossurfactante na forma de nanoemulsão.

**Palavras-chave:** 1. Rizobactérias; 2. Diuron; 3. Nanoemulsões.

## **ABSTRACT**

The agricultural sector is one of the main responsible for the pollution of the environment, due to agrochemical applications. Among them, Diuron [3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea], a non-ionizable herbicide, belonging to the group of organochlorines, with a broad spectrum in the control of weeds. It has low water solubility, high persistence and bioaccumulation in the environment. The action of soil microorganisms is one of the most important mechanisms in the degradation of agrochemicals, which in most cases effectively contributes to the dissipation of the molecule in the environment. An alternative for the remediation of areas contaminated with pesticides is bioremediation, which consists of the use of microorganisms or their enzymes to remove persistent chemical compounds. Therefore, the aim of this study was to evaluate the diuron bioremediation by nanoemulsions containing biosurfactants from rhizospheric bacteria. The results obtained showed that of the twenty-four rhizospheric bacterial strains initially isolated, only four presented better results for biosurfactant producers. The nanoemulsions of bacterial strains 1A4 and 2A2 showed a higher rate of Diuron degradation at 50 µg mL<sup>-1</sup>, the other two, 1A1 and 2B3, showed lower metabolic activity. Thus, it is possible to use these selected bacteria to continue the study of Diuron bioremediation process through its biosurfactant action in the form of nanoemulsion.

**Keywords: 1. Rhizobacteria; 2. Diuron; 3. Nanoemulsions.**

## SUMÁRIO

|                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. INTRODUÇÃO .....</b>                                     | <b>14</b> |
| <b>2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>                           | <b>15</b> |
| 2.1 Microbiologia do solo.....                                 | 15        |
| 2.2 Agroquímicos na agricultura .....                          | 18        |
| 2.3 Diuron.....                                                | 20        |
| 2.4 Biodegradação de agrotóxicos.....                          | 21        |
| 2.5 Biossurfactantes.....                                      | 23        |
| 2.6 Nanoemulsões.....                                          | 25        |
| <b>3 OBJETIVOS .....</b>                                       | <b>27</b> |
| 3.1 Objetivo geral .....                                       | 27        |
| 3.2 Objetivo específico .....                                  | 27        |
| <b>4 METODOLOGIA.....</b>                                      | <b>27</b> |
| 4.1 Coleta das amostras de solos rizosféricos.....             | 27        |
| 4.2 Seleção de bactérias produtoras de biossurfactantes .....  | 27        |
| 4.3 Determinação da presença de biossurfactantes .....         | 28        |
| 4.3.1 Atividade emulsificante e índice de emulsificação .....  | 28        |
| 4.3.2 Colapso de gota .....                                    | 28        |
| 4.4 Produção de biossurfactantes.....                          | 29        |
| 4.5 Produção das nanoemulsões .....                            | 29        |
| 4.5.1 Caracterização das nanoemulsões .....                    | 30        |
| 4.6 Curva de crescimento bacteriano na presença de Diuron..... | 30        |

|                                                                |           |
|----------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.7 Biomassa seca.....                                         | 30        |
| 4.8 Coloração de gram.....                                     | 30        |
| 4.9 Microcosmos .....                                          | 31        |
| <b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>                          | <b>32</b> |
| 5.1 Teste de atividade hemolítica .....                        | 32        |
| 5.2 Índice de emulsificação .....                              | 33        |
| 5.3 Colapso de gota .....                                      | 35        |
| 5.4 Produção de biossurfactantes.....                          | 36        |
| 5.5 Produção e caracterização das nanoemulsões .....           | 37        |
| 5.6 Curva de crescimento bacteriano na presença de Diuron..... | 38        |
| 5.7 Biomassa seca.....                                         | 40        |
| 5.8 Coloração de gram.....                                     | 41        |
| 5.9 Microcosmos .....                                          | 42        |
| <b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>                            | <b>44</b> |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>                     | <b>45</b> |

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**BSs** – Biossurfactantes

**DL50** – Dose letal média

**EIF** – Emulsificação de inversão de fases

**E24** – Índice de emulsificação

**NBR** – Norma brasileira

**PCA** – Agar para contagem em placas

**PKa** – Constante de dissociação

**UFC** – Unidades formadoras de colônia

**3,4 DCA** – 3,4 Dicloroanilina

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 01</b> Estrutura molecular do Diuron.....                                   | 20 |
| <b>Figura 02</b> Aparato utilizado para simular o processo de biorremediação .....    | 31 |
| <b>Figura 03</b> Teste de atividade hemolítica dos isolados bacterianos .....         | 32 |
| <b>Figura 04</b> Índice de emulsificação.....                                         | 35 |
| <b>Figura 05</b> Produção de biossurfactantes .....                                   | 36 |
| <b>Figura 06</b> Nanoemulsões estáveis .....                                          | 37 |
| <b>Figura 07</b> Coloração de gram das bactérias produtoras de biossurfactantes ..... | 42 |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                |    |
|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Tabela 01</b> Classificação toxicológica dos agroquímicos .....             | 19 |
| <b>Tabela 02</b> Estudo da atividade hemolítica dos isolados bacterianos ..... | 33 |
| <b>Tabela 03</b> Índice de emulsificação em porcentagem .....                  | 34 |
| <b>Tabela 04</b> Teste de Colapso de gota .....                                | 36 |
| <b>Tabela 05</b> Biomassa seca .....                                           | 41 |
| <b>Tabela 06</b> Identificação bacteriana por coloração de gram .....          | 42 |

## LISTA DE GRÁFICOS

|                                                                                                                                                                                                          |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Gráfico 01</b> Curva de crescimento da linhagem bacteriana 1A1 na presença de Diuron a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por 3 dias.....                                                                      | 38 |
| <b>Gráfico 02</b> Curva de crescimento da linhagem bacteriana 1A4 na presença de Diuron a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por 3 dias.....                                                                      | 39 |
| <b>Gráfico 03</b> Curva de crescimento da linhagem bacteriana 2A2 na presença de Diuron a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por 3 dias.....                                                                      | 39 |
| <b>Gráfico 04</b> Curva de crescimento da linhagem bacteriana 2B3 na presença de Diuron a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ por 3 dias.....                                                                      | 40 |
| <b>Gráfico 05</b> mg de $\text{CO}_2$ produzido pelas nanoemulsões bacterianas 1A1, 1A2, 2A2 e 2B3 em microcosmos com solo suplementado com 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Diuron após 5, 10 e 15 dias..... | 43 |

## 1. INTRODUÇÃO

Podendo ser definido como uma porção de corpos naturais, o solo é composto por partes sólidas, líquidas e gasosas, tridimensionais, dinâmicos, formados por materiais minerais que incluem minerais inorgânicos e partículas de areia, silte e argila e matérias orgânicas que derivam da ação da biota do solo, composta de minhocas, insetos, bactérias, fungos, algas e nematoides e gases como  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{N}_2$ , contém matéria viva e podem ser vegetados na natureza e, eventualmente, terem sido modificados por ações do homem (SANTOS *et al.*, 2018).

Os solos são submetidos à inúmeros sistemas de cultivo, o que modifica a microbiota do solo e tendem a um novo estado de equilíbrio, apresentando diferentes manifestações de seus atributos, as quais podem ser desfavoráveis à conservação da capacidade produtiva dos mesmos ou favoráveis variando de acordo com a contribuição da cultura com o solo. Logo, a relação entre o manejo e a qualidade dos solos pode ser avaliada pelos seus atributos físicos, químicos e microbiológicos (FARIAS, 2018).

Na agricultura moderna, os agrotóxicos ocupam uma posição de destaque, com a função aumentar a produtividade agrícola e melhorar a relação custo-benefício. No entanto, a aplicação indiscriminada por longos períodos pode levar à disposição, contaminação e acúmulo desses poluentes tóxicos no meio ambiente, resultando em graves efeitos indesejáveis ao ecossistema e a saúde pública (NIE *et al.*, 2019).

A persistência dos herbicidas no solo varia com sorção, lixiviação e degradação ou transformação biológica, visto que esses fatores regulam a concentração, o fluxo e o tempo de permanência destas moléculas na solução do solo. A exemplo temos o Diuron, [3-(3,4-diclorofenil) -1,1-dimetilurea], um contaminante potencial do meio ambiente quando usado em desacordo com as doses recomendadas por se tratar de um herbicida não-ionizável, pertencente ao grupo dos organoclorados, de amplo espectro no controle das plantas daninhas. Apresenta baixa solubilidade em água, elevada persistência e bioacumulação no ambiente (ANVISA, 2020).

A biorremediação utiliza o metabolismo de organismos vivos, para a eliminação rápida dos poluentes, com o objetivo de reduzir a níveis aceitáveis de segurança desejável, no ponto de vista ambiental e agrícola. Neste método, os microrganismos secretam enzimas, que ao entrarem em contato com as moléculas, desencadeiam uma série de reações químicas (oxidação, redução, hidrólise, dealquilação, descarboxilação, hidroxilação, metilação, etc), que tem a

finalidade de degradação como fonte de carbono, energia e nutrientes, necessários a manutenção fisiológica dos microrganismos (DANGI *et al.*, 2019).

As principais técnicas convencionais para remediação de áreas contaminadas com agroquímicos, envolvem processos de adsorção, precipitação ou degradação química que na grande maioria são caros, ineficientes e difíceis de serem executados, em condições ambientais. As alternativas mais promissoras disponíveis atualmente, derivam do estudo de tecnologias biotecnológicas empregando microrganismos produtores de biossurfactantes, capazes de promover a degradação dos poluentes a compostos inócuos (WANG *et al.*, 2016).

Os biossurfactantes podem ser preparados utilizando alguns microrganismos, por serem biomoléculas que apresentam características diferenciadas comparadas aos surfactantes químicos, seu uso é proposto em diversos setores. Pois possuem índices de maior biodegradabilidade, capacidade de formar agregados moleculares e atividade biológica, como antimicrobiana e antitumoral, e além disso possuem menor toxicidade e por serem moléculas formadoras de emulsões em misturas de óleo e água, suas propriedades são influenciadas pela natureza das fontes de carbono, nitrogênio e elementos minerais, que determinam a sua composição química e estrutural (DANGE *et al.*, 2020).

As emulsões são definidas como um sistema heterogêneo no qual um líquido encontra-se imiscível em outro em forma de gotículas, esse sistema é composto de duas fases, sendo uma denominada interna ou dispersa e outra, externa ou dispersante, sendo que a segunda envolve a primeira. Emulsões simples são classificadas de acordo com suas fases interna e externa. Existem emulsões água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A) (GORE; PICARD; SAVARY., 2018).

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Microbiologia do Solo**

O solo é o equilíbrio do ecossistema terrestre, pois interage com a atmosfera, biosfera, litosfera e hidrosfera. É conhecido como litosfera, mais precisamente uma porção superior do regolito, é constituído de rochas alterada e inúmeras outras substâncias combinadas com fatores ambientais, resultando em diversos tipos de solos, que comportam uma série de organismos vivos variados de acordo com os tipos de solo, região, fauna e flora (XAVIER, 2021).

Segundo (FORTES, 2018) diversos autores relatam que o solo é o habitat de mais de um quarto de todas as espécies que vivem na terra, é possível que em aproximadamente 5 gramas de substrato de um jardim contenha milhares de espécies e milhões de microrganismos. A interação entre organismos vivos no solo é variável entre os taxos e a interação pode ocorrer

entre si, ou entre os organismos e o solo, a depender também das alterações ambientais ou interferências humanas.

No estudo publicado por (XAVIER, 2021) o solo está organizado em seções paralelas e distintas entre si e com características peculiares, estas seções são determinadas a partir do próprio processo de formação do solo, onde estão presentes todas as informações do substrato, que são fundamentais para o desenvolvimento científico, além de definir ações de uso e manejo correto do solo. Visto que os solos são submetidos à inúmeros sistemas de cultivo, o que modifica a microbiota do solo e tendem a um novo estado de equilíbrio, apresentando-se e diferentes manifestações de seus atributos, as quais podem ser desfavoráveis à conservação da capacidade produtiva dos mesmos ou favoráveis variando de acordo com a contribuição da cultura com o solo. Logo, a relação entre o manejo e a qualidade dos solos pode ser avaliada pelos seus atributos físicos, químicos e microbiológicos (FARIAS, 2018).

A principal função do solo é a ciclagem de nutrientes, que depende exclusivamente da população microbiana indicadores da variabilidade de concentração de nutrientes e propriedades do solo, que por sua vez é o suporte para esses organismos vivos. A partir dos processos abióticos e biológicos que se dão os processos que influenciam a formação dos agregados no solo, a matéria orgânica é um dos principais agentes na formação e na estabilidade de agregados. A qualidade de um solo é definida por sua capacidade de absorver, armazenar e reciclar sustentavelmente os recursos como água e nutrientes minerais, que dependem diretamente dos seus fatores de formação e das interferências humanas relacionadas ao uso e manejo do solo (FORTES, 2018).

Os microrganismos presentes no solo influenciam diretamente em suas características físicas, químicas e biológicas, que são fatores essenciais para o desenvolvimento dos vegetais e impactam nas produções agrícolas principalmente quando o ambiente é propício para seu desenvolvimento. (KRELING *et al.*, 2022) afirmam que “os microrganismos são os responsáveis diretos pelo funcionamento do solo, atuando, principalmente, nos processos de gênese, decomposição de resíduos orgânicos e ciclagem de nutrientes e representando a parte viva da matéria orgânica do solo”.

Os microrganismos são os principais responsáveis pela agregação de partículas do solo que são fundamentais para evitar perdas de nutrientes e manter o controle da biodiversidade, tendo as coberturas vegetais como protetoras da biota do solo. Ao manter o controle ambiental para o desenvolvimento dos microrganismos no solo, o controle de pragas e doenças torna-se mais eficientes reduzindo o impacto nas produções das lavouras e a redução de intensivos agrícolas (KRELING *et al.*, 2022).

A microbiota do solo é a principal responsável pela decomposição dos resíduos orgânicos, pela ciclagem de nutrientes e pelo fluxo de energia no solo, podendo ter influência tanto na transformação da matéria orgânica, quanto na estocagem do carbono e nutrientes minerais. Entretanto, somente a quantificação da biomassa não fornece indicações sobre os níveis de atividade das populações microbianas do solo, sendo importante também avaliar parâmetros que estimem a atividade microbiana, como a respiração microbiana e atividade enzimática, para verificar o estado metabólico das comunidades de microrganismos do solo (FERREIRA, STONE, MARTIN-DIDONET, 2017).

Os atributos microbianos do solo incluem sua diversidade, atividades enzimáticas, taxas de respiração e a biomassa microbiana, os quais são indicadores sensíveis que possibilita o monitoramento e as alterações ambientais ocorridas no solo decorrente das intervenções agrícolas e culturas. Na avaliação qualitativa do solo, os indicadores biológicos de carbono da massa microbiana, respiração e quociente metabólico, são frequentemente sugeridos como os mais sensíveis aos impactos causados ao solo nos manejos de plantio de culturas no solo, isso porque o sistema influencia diretamente os sistemas metabólicos dos microrganismos (FARIAS, 2018).

A biomassa microbiana, é o componente vivo da matéria orgânica e sua avaliação é útil para obter informações rápidas sobre mudanças nas propriedades orgânicas do solo, detectar variações causadas por cultivos ou por devastação de florestas, medir a regeneração dos solos após a remoção da camada superficial e avaliar os efeitos de poluentes como metais pesados e pesticidas. Os compostos de carbono, nitrogênio e fósforo na massa microbiana é de grande importância para o fluxo de nutrientes no ecossistema, a respiração basal do solo reflete na maior produção de CO<sub>2</sub> no solo advinda dos protozoários, nematoides, insetos, anelídeos e raízes do solo. Esta por sua vez, é um indicador sensível e revela rapidamente alterações nas condições ambientais que por ventura afetem a atividade microbiana, que necessita de monitoramento para que haja recuperação ambiental da área (SARTORE, 2021).

A matéria orgânica influencia os atributos físicos, químicos e biológicos que estabelecem a funcionalidade do solo. O manejo do solo obedecendo aos princípios de conservação pode manter a capacidade produtiva da terra e evita desencadear o processo de

degradação, a estabilidade dos agregados, dentre outros fatores, e influenciada pela matéria orgânica do solo, que age como um cimento unindo as partículas de areia, silte e argila (XAVIER, 2021).

## **2.2 Agroquímicos na Agricultura**

Os agroquímicos são substâncias químicas, que tem por finalidade, direta ou indireta, prevenir, repelir ou acabar, com agentes infecciosos, nocivos e prejudiciais aos cultivos e criações, são classificados pelo Ministério do Meio Ambiente de acordo com o grau de contaminação e setor utilizado. Atualmente o Brasil é um dos maiores produtores de alimentos no mundo e, também, um dos países que mais consomem agrotóxicos nos processos de produção agrícola em larga escala, segundo (MORAES, 2019) o crescimento do uso de intensivos agrícolas teve seu início na década de 90, e trouxe para o Brasil ganhos de produtividade.

Na agricultura moderna, os agrotóxicos ocupam uma posição de destaque, com a função aumentar a produtividade agrícola e melhorar a relação custo-benefício. No entanto, a aplicação indiscriminada por longos períodos pode levar à disposição, contaminação e acúmulo desses poluentes tóxicos no meio ambiente, resultando em graves efeitos indesejáveis ao ecossistema e a saúde pública (NIE *et al.*, 2019). Na medida em que o consumo de agroquímicos aumenta no Brasil, cresce o interesse, por parte dos produtores rurais e dos fabricantes de pesticidas, em evitar que seu uso se torne mais restrito, o que pode trazer serias consequências futuras.

Os agrotóxicos quando usados na agricultura podem gerar uma série de impactos negativos que refletem na perda de agrobiodiversidade, podendo afetar a saúde do solo, como também a saúde humana. O processo de degradação do solo provocado pelos agrotóxicos inicia-se com a esterilização – eliminação de flora e fauna –, que, associada aos processos erosivos, pode levar a maior demanda por aplicação de produtos químicos. Isso direciona o agricultor a entrar em um ciclo vicioso de dependência de insumos químicos, que consequentemente passa a depender das grandes multinacionais detentoras da produção dos agrotóxicos, dessa forma retirando toda a sua autonomia (MIRANDA; MELO; ARAÚJO, 2017).

Os agrotóxicos são divididos em diferentes classes de acordo com a finalidade, podendo ser: herbicidas, fungicidas, algicidas e inseticidas, podem também ser classificados em função da DL50 (dose letal mediana), que é expressa em miligramas de princípio ativo por quilogramas

de peso vivo ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) que constitui a quantidade de cada determinada substância que possa provocar a mortalidade de 50% de espécies utilizadas em testes experimentais, contudo a classificação toxicológica dos agrotóxicos é realizada de acordo com as exigências da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, órgão de controle do Ministério da Saúde, se dividindo em quatro classes de perigo para a saúde humana (WHO, 2018).

**Tabela 01.** Classificação toxicológica dos agrotóxicos

| Classe | Toxidade             | Cor      |
|--------|----------------------|----------|
| I      | Extremamente tóxico  | Vermelho |
| II     | Altamente tóxico     | Amarelo  |
| III    | Moderadamente tóxico | Azul     |
| IV     | Pouco tóxico         | Verde    |

Fonte: ANVISA (2018).

Os problemas provenientes de contaminações por agrotóxicos podem acontecer em pequenas ou grandes concentrações, por muito deles possuírem alto potencial de toxicidade ambiental, sendo necessário, antes do uso, o conhecimento adequado sobre as características químicas desses agroquímicos (WHO, 2018).

As práticas agrícolas destinadas a alimentação ou produção de matéria prima para indústrias, apresentam altos riscos de intoxicação do solo por agrotóxicos, essas práticas contaminam e causam infertilidade do solo, contaminação dos reservatórios aquáticos, entre outros, tornando mais improdutivo ao longo do tempo e aumentando o custo da manutenção, limitando assim o uso dos recursos e potencial para a produtividade agrícola (CARVALHO; NODARI; NODARI, 2017).

De acordo com a Lei de número 6.938 de 1981 da Política Nacional de Meio Ambiente o conceito de poluição é dado como a deterioração da qualidade ambiental resultante de atividades que direta ou indiretamente prejudiquem a saúde, segurança e bem-estar da população e afetem desfavoravelmente da biota, os recursos ambientais, a atmosfera, as águas interiores, superficiais e subterrâneas, os estuários, o mar territorial, o solo, o subsolo e os elementos que constituem a biosfera, o que é ferido pelo uso intensivo de agrotóxicos (MORAES, 2019).

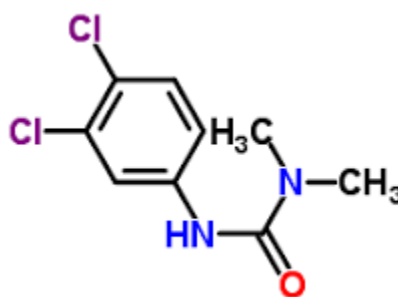
O solo sofre alterações físicas contínuas devido as atividades agrícolas, como gradagem, queimadas, e as erosões, impermeabilização química como fertilização artificial, salinização, aplicação de pesticidas, disposição de resíduos sólidos e líquidos, porém os principais objetivos no uso desses agroquímicos é a disponibilização e o aumento do suprimento de nutrientes e

correção do pH do solo e, a proteção das lavouras pelo controle de pragas e doenças (MORAES, 2019).

### 2.3 Diuron

O Diuron [3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea], pertence ao grupo químico das ureias substituídas, é comercializado na forma de suspensão concentrada (500 g L<sup>-1</sup>), granulado dispersível (900 g kg<sup>-1</sup>) e grânulos dispersíveis em água (800 g kg<sup>-1</sup>), como também na forma de mistura com outros herbicidas (hexazinone, paraquat e o bromacil) em várias combinações de concentrações distintas. É utilizado na produção agrícola em todo o mundo, pois atua combatendo tanto espécies daninhas monocotiledôneas quanto dicotiledôneas, é recomendado para aplicação nas culturas do algodão, café, cana-de-açúcar, citros, alfafa, abacaxi, alho, chá, pimenta-do-reino, banana e videira (AGROFIT, 2018). A figura 1 abaixo mostra a estrutura molecular do Diuron.

**Figura 01** Estrutura Molecular do Diuron



Fonte: ChemSpider, 2015.

O Diuron é um herbicida pouco lixiviável por apresentar baixa solubilidade em água (42 mg L<sup>-1</sup>) e por ter alto índice de adsorção, principalmente para solos com alto teor de matéria orgânica e argila. Sua dose letal para 50% dos ratos testados (DL50) é da ordem de 1,02 g kg<sup>-1</sup> de peso vivo do animal (SIMÕES *et al.*, 2017). Sua solubilidade em água é de 42 mg L<sup>-1</sup> a 25 °C, o coeficiente de partição octanol/água de 589, o mecanismo de ação deste herbicida ocorre no fotossistema II, com ligação das moléculas do diuron à proteína D1, no sítio de acoplamento da proteína “Qb”, após a ligação do herbicida à proteína, o fluxo de elétrons do fotossistema II para o I é interrompido, promovendo a formação de espécies reativas de oxigênio que peroxidam as membranas celulares (BOSCOLO *et al.*, 2018).

Classificado como herbicida não-iônico (pKa = 0), não troca prótons com a solução do solo, por sua polaridade intermediária, o comportamento do Diuron na solução do solo pode ser influenciado pelo pH do meio, conteúdo de matéria orgânica e tipos de argilominerais. Apresenta log KOW igual a 2,87, indicando mais afinidade da molécula pela fase apolar do

sistema solo/água, direcionando-o para ser retido preferencialmente pela parte orgânica ou mineral do solo (CEDERLUND; BÖRJESSON; STENSTRÖM, 2017).

A persistência dos herbicidas no solo varia com sorção, lixiviação e degradação ou transformação biológica, visto que esses fatores regulam a concentração, o fluxo e o tempo de permanência destas moléculas na solução do solo. A exemplo disso é o uso elevado do Diuron, pois este herbicida é um contaminante potencial do meio ambiente quando usado em desacordo com as doses recomendadas, porém são poucos os estudos que mostram os efeitos de sua interação com o ambiente, isso devido o comportamento no solo ser variável mudando dependendo das suas características físico-químicas (CHAGAS, 2017).

A degradação desse herbicida é prioritariamente pela ação da população microbiana presente no solo (VILLA VERDE *et al.*, 2017). No entanto, quando o Diuron sofre uma degradação natural o principal produto produzido é a 3,4 dicloroanilina (3,4 DCA), mas caso essa degradação ocorra em meio neutro a 3,4 DC será o único produto formado. A 3,4 DCA é uma substância que possui uma toxicidade maior que a do próprio Diuron e que também é persistente no solo e na água, podendo causar danos ainda maiores, em outras palavras, a degradação natural do Diuron não é uma boa opção para o meio ambiente (LACERDA, 2016).

O Diuron é uma substância que causa grandes impactos ao meio ambiente. Portanto, o total conhecimento sobre os danos causados por ele, tanto a saúde humana quanto a natureza, é de extrema importância para se avaliar quais as melhores alternativas de tratamento ou degradação dessa substância (LACERDA, 2016).

## **2.4 Biodegradação de Agroquímicos**

O uso de herbicidas facilita o controle das plantas daninhas, por possuir maior eficiência de controle em relação aos demais métodos, além de sua praticidade são os principais motivos pelos quais ele é utilizado com intensidade, porém podem trazer sérios impactos ambientais, por esta razão muitos cientistas buscam entender mais sobre os herbicidas e as suas relações com o ambiente e desenvolver novas técnicas que minimizem os impactos ambientais causados por eles (CHAGAS, 2017).

O uso contínuo de herbicidas causa vários problemas por sua persistência na água, no solo e sua toxicidade ao homem. A degradação de poluentes orgânicos no solo pode levar anos, e uma alternativa para acelerar esse processo é a utilização de microrganismos no processo de degradação desses agroquímicos. Atualmente existem diversas técnicas que vêm sendo estudadas e aplicadas na remoção ou degradação de contaminantes orgânicos da água e do solo, mais utilizadas são baseadas em processos físicos e biológicos, por exemplo, adsorção, coagulação, filtração e biorremediação (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

As principais técnicas convencionais para remediação de áreas contaminadas com agroquímicos, envolvem processos de adsorção, precipitação ou degradação química que na grande maioria são caros, ineficientes e difíceis de serem executados, em condições ambientais. As alternativas mais promissoras disponíveis atualmente, derivam do estudo de tecnologias biotecnológicas empregando microrganismos produtores de biossurfactantes, capazes de promover a degradação dos poluentes a compostos inócuos (WANG *et al.*, 2016).

A biodegradação é um processo natural de degradação de um xenobiótico por um organismo, constitui estratégia de sobrevivência, pois provê carbono e energia para o crescimento e reprodução dos microrganismos, quando a biodegradação é de um determinado contaminante depende da disponibilidade do produto para os organismos que promoverão a degradação, contudo somente agrotóxicos presentes na solução do solo estão disponíveis para a ação microbiana (SANTOS *et al.*, 2019).

Assim, a biodegradação é capaz de remover substâncias tóxicas do meio ambiente e é uma alternativa econômica e sustentável. Em estudos realizados por (DELGADO-MORENO; NOGALES; ROMERO, 2017), os sistemas biológicos também conhecidos por biobeds, nos quais predomina o processo de biodegradação, implementados com resíduos orgânicos da agroindústria do azeite, foram capazes de remover os agrotóxicos dimetoato, imidacloprido, tebuconazol, diuron e oxifluorfen.

A biodegradação dos herbicidas sofre influência das propriedades quantitativas e qualitativas da comunidade microbiana do solo, a qual definirá maior ou menor cota de degradação, além da disponibilidade do composto para os microrganismos, a ação de microrganismos sobre os herbicidas constitui mecanismo da maior importância, pois a degradação microbiológica, na maioria dos casos, contribui para a dissipação da molécula no ambiente. A degradação biológica da molécula do contaminante em produtos menos tóxicos representa uma das formas de proteger o ambiente e de recuperar locais já contaminados. Nesse processo, denominado de biorremediação, a molécula degrada-se completamente a moléculas inorgânicas de ocorrência universal, como CO<sub>2</sub>, CO, H<sub>2</sub>O, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S e HCL (COSTA, 2018).

Os microrganismos transformam as substâncias através de processos metabólicos ou enzimáticos baseados no crescimento e no cometabolismo. No crescimento, eles utilizam as substâncias como fonte de carbono e energia, resultando em completa degradação. A microbiota

do solo exposto a pesticidas pode desenvolver a habilidade para degradá-los, as bactérias do solo tendem a ser mais efetivas para degradar contaminantes, devido à necessidade de adaptação por fontes de alimentação e constantes mudanças das características do solo à que devem se adaptar. No solo e no ambiente aquático, a degradação de pesticidas pode ocorrer através de hidrólise ou ação microbiana e envolve fatores químicos, microbiológicos e influência de fatores bióticos e abióticos, como valores de pH, presença de matéria orgânica, microrganismos presentes e temperatura, além do acúmulo dos produtos de degradação do próprio agrotóxico (PINTO, 2017).

Os microrganismos decompositores precisam de muita energia e as reações requerem consumo de  $O_2$  e a liberação de  $CO_2$ , exceto em casos dos anaeróbios e quimiotróficos. A evolução de  $CO_2$  é complicada pela solubilidade em soluções, além do que essas medidas representam a respiração total da comunidade, não distinguindo a contribuição individual de plantas ou dos microrganismos. A velocidade de decomposição de diferentes substratos varia de acordo com a atividade enzimática sendo, 84% de ácido benzóico foi decomposto após 28 semanas; 81% de ácido pirúvico após 12 semanas; 26% de catecol após 28 semanas e 69% de ácido fenólico também após 28 semanas (COSTA, 2018).

## **2.5 Biossurfactantes**

Atualmente com a preocupação em amenizar os impactos ambientais e sociais, as atenções estão voltadas para o desenvolvimento técnicas que não sejam agressivas ao ambiente e que possuam baixo custo. Para atenuar a poluição, buscam-se o tratamento de resíduos e a eliminação ou diminuição do consumo de produtos industriais nocivos ao ambiente, levando assim ao investimento de diferentes bioprodutos (SANTOS *et al.*, 2021).

Biomoléculas produzidas a partir de diferentes microrganismos, os biossurfactantes desenvolvem características diferenciadas quando comparados aos surfactantes químicos, eles se destacam por apresentarem uma toxicidade mais baixa, além da maior capacidade de formar agregados moleculares e atividade biológica que contribuem para uma maior degradabilidade e permita que os BSs possam ser utilizados em vários setores, além disso, são moléculas formadoras de emulsões em misturas de óleo e água, suas propriedades são influenciadas pela natureza das fontes de carbono, nitrogênio e elementos minerais, que determinam a sua composição química e estrutural (DANGE *et al.*, 2020).

As bactérias são produtoras de biossurfactantes através do metabolismo celular e presença de nutrientes como fonte de carbono e nitrogênio, no sistema ocorre a formação de moléculas tensoativas e micelas que se agregam no meio aquoso em uma determinada concentração. As funções da assimilação e degradação de compostos hidrofóbicos com

produção de surfactantes que podem ocorrer em ambas às fases de crescimento exponenciais e estacionárias do micro-organismo, embora ainda estejam sendo elucidada a fisiologia desse mecanismo celular de produção (DANGE *et al.*, 2020).

As principais propriedades dos biossurfactantes são bioemulsificação, redução na viscosidade de líquidos, redução na tensão superficial e interfacial, baixa concentração micelar crítica, força iônica solubilizante e estabilizante. A exploração do uso de biossurfactantes pode ser útil na melhoria da qualidade e produtividade agrícola, como rastreamento das populações microbianas na biosfera de solo, afim de investigar seu potencial em ambientes isolados e utilizá-las nas áreas agrícolas (SANTOS *et al.*, 2018).

Os biossurfactantes são moléculas com características tensoativas, isto é, tem o potencial de baixar a tensão superficial de líquidos, sendo indicados em diversas áreas de aplicação industrial e recuperação de derramamento de óleos em áreas afetadas. Através de atividades metabólicas, as bactérias e fungos sintetizam estes compostos anfipáticos na fase exponencial de crescimento microbiano, liberando moléculas com propriedades específicas de acordo com o tipo de substrato (ADETUJI; OLANIRAN, 2020).

Os surfactantes são substâncias bioativas constituídos por uma cadeia de hidrocarboneto e outra porção podendo ser aniônica, catiônica, não iônica e anfótera, quando produzidos naturalmente possuem vantagens na inclusão seletividade, biodegradabilidade e a facilidade de serem sintetizados a partir de compostos renováveis, porém os surfactantes disponíveis comercialmente são derivados do petróleo e podem assim causar danos ao meio ambiente (ADETUJI; OLANIRAN, 2020).

Produzidos através das células microbianas, os biossurfactantes, apresentam diferentes tamanhos de moléculas e propriedades químicas. As estruturas químicas são formadas por uma porção lipofílica, cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, ligados a uma porção hidrofílica. Dentre os biossurfactantes mais comuns encontra-se os glicolípídios, lipopeptídios, fosfolípídios, complexos de proteínas e polissacarídeos, ácidos graxos, lipídios neutros, surfactantes poliméricos e surfactantes particulados (ADETUJI; OLANIRAN, 2020).

Dessa forma, os biossurfactantes são classificados conforme a polaridade da parte hidrofílica, podendo ser: aniônicos, não-iónicos, catiônicos e anfóteros. Aniônicos são agentes com um ou mais grupamentos funcionais e um radical com carga negativa, quando se ionizam em solução aquosa liberam íons orgânicos carregados. Os não iônicos são agentes anfífilos obtidos a partir de álcoois de cadeia longa ou fenóis alquilados. Não possui cargas aparentemente influentes no meio, de modo que as soluções aquosas não se ionizam e apresentam uma reação neutra (LIMA *et al.*, 2020).

Os catiônicos são formados por um ou mais grupamentos funcionais com carga positiva. Em meio aquoso liberam íons orgânicos carregados positivamente e formam emulsões estáveis a partir de substratos renováveis. Anfóteros são agentes que apresentam características aniônicas ou catiônicas e são estáveis em meio neutro, interagem em soluções aquosas de acordo com as condições de pH (LIMA *et al.*, 2020).

No processo de produção dos biossurfactantes, para a obtenção de um melhor rendimento e diminuição dos custos, as fontes de carbono e nitrogênio são de fundamental importância. Sendo assim, o tipo de substrato utilizado na produção dos biossurfactantes e a sua concentração podem tanto alterar as quantidades produzidas quanto modificá-los estruturalmente, e por isso são determinantes na síntese de biossurfactantes (DANGE *et al.*, 2020).

## **2.6 Nanoemulsões**

As emulsões são definidas como um sistema heterogêneo no qual um líquido encontra-se imiscível em outro em forma de gotículas, esse sistema é composto de duas fases, sendo uma denominada interna ou dispersa e outra, externa ou dispersante, sendo que a segunda envolve a primeira. Emulsões simples são classificadas de acordo com suas fases interna e externa. Existem emulsões água em óleo (A/O) e óleo em água (O/A) (GORE; PICARD; SAVARY., 2018).

As emulsões de origem natural são geradas espontaneamente, encontramos esse tipo de emulsões como resultado de processos de digestão de comida, lactação, entre outros. Por outro lado, as emulsões sintéticas, formuladas e geradas em laboratório, são produzidas através de processos mecânicos de cisalhamento, escoamento submetido à extensão, entre outros mecanismos. O surfactante pode ser adicionado à formulação da emulsão ou estar presente naturalmente como no caso da formação de emulsões durante o escoamento imiscível de óleo e água nos processos de exploração de petróleo. As emulsões sintéticas são encontradas em muitas áreas industriais incluindo cosméticos, formulação de alimentos e bebidas, pinturas e impressões ou combustível para foguetes, bem como produtos farmacêuticos e agrícolas (GORE; PICARD; SAVARY., 2018).

Desse modo, as nanoemulsões são definidas como sistemas coloidais com capacidade de proteger, encapsular e liberar ativos lipofílicos. Também se caracterizam por serem dispersões obtidas a partir de dois líquidos imiscíveis, onde as gotículas da fase dispersa podem ser encontradas dentro de uma faixa de 20-200 nm. Elas possuem uma capacidade mais ampla de solubilização quando comparada a simples dispersões micelares, maior estabilidade cinética

do que emulsões grosseiras e encontraram uso na indústria cosmética e de pesticidas como base aquosa para produtos orgânicos (SINGH *et al.*, 2017).

Os componentes desse tipo de sistema são óleo, água, surfactante e cosurfactante e suas principais vantagens estão relacionadas à alta superfície de contato devido ao tamanho reduzido das gotículas, toxicidade reduzida e liberação controlada. Essas características tornam esse tipo de formulação muito útil para a distribuição de substâncias no local de ação bem como para aumentar a absorção de moléculas lipofílicas (DESAI; THAKKAR, 2019).

Os agentes emulsionantes, também chamados de emulsificantes ou tensoativos, possuem papel fundamental na composição de uma nanoemulsão, apresentam como função a redução da tensão interfacial, além de evitar a coalescência das gotículas no sistema, isso por que formam um filme ao redor das gotículas dispersas, reduzindo assim a tensão entre os líquidos. Os componentes presentes em uma nanoemulsão dependem principalmente das substâncias selecionadas para compor a formulação desejada e das propriedades apresentadas por elas. Dentre os principais elementos que compõem uma nanoemulsão tem-se os agentes emulsionantes, os conservantes e os antioxidantes, além disso, outros componentes podem ser utilizados nesta formulação (SINGH *et al.*, 2017).

Os emulsionantes são divididos em quatro tipos, aniônicos, que formam íons carregados negativamente durante a emulsificação. Os Catiônicos, que dissociam-se dando origem a íons positivos, responsáveis por suas propriedades emulsionantes, os não iônicos, que apresentam um balanço entre as porções hidrofóbicas e hidrofílicas da molécula e, os anfóteros, que apresentam grupamentos carregados positiva e negativamente, dependendo do pH do meio em que se encontram (KIM *et al.*, 2019).

A seleção do óleo utilizado na nanoemulsão é de grande importância, pois em um sistema de óleo disperso em água, o composto ativo deverá estar solubilizado nele, e o tipo de óleo escolhido pode determinar a fração biodisponível do constituinte ativo. Em nanoemulsões, o termo estabilidade refere-se à capacidade de uma emulsão de resistir a alterações em suas propriedades ao longo do tempo, podendo-se afirmar que quanto mais estável a emulsão, mais duradouras são as suas propriedades (SINGH *et al.*, 2017).

Uma emulsão pode se tornar instável devido a tipos diferentes de processos físicos e químicos, a instabilidade física produz uma alteração na distribuição espacial ou organização estrutural das moléculas, enquanto a instabilidade química traz como consequência uma alteração no tipo de moléculas presentes (KIM *et al.*, 2019).

A produção de nanoemulsões utilizando métodos de baixa energia tem mostrado algumas vantagens para aplicações específicas, por exemplo, baixo custo de equipamentos,

simplicidade de operação com capacidade de produzir tamanhos de gotículas muito pequenos. Um desses métodos é a emulsificação espontânea, nele ocorre a titulação de uma mistura de óleo e surfactante solúvel em água em uma fase aquosa com agitação. Gotículas de óleo são formadas de forma espontânea na interface óleo-água à medida que as moléculas do surfactante se movem da fase oleosa para a fase aquosa (KIM *et al.*, 2019).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Avaliar a biorremediação de Diuron por nanoemulsões contendo biossurfactantes de bactérias rizosféricas.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Selecionar e caracterizar bactérias rizosféricas produtoras de biossurfactantes.
- Preparar e caracterizar as nanoemulsões contendo biossurfactantes bacterianos.
- Estudar a biodegradação de Diuron por nanoemulsões com biossurfactantes.

### **4. METODOLOGIA**

#### **4.1 Coleta das amostras de solos rizosféricos**

As amostras de solos foram coletadas em áreas agrícolas nas proximidades do município de São João do Paraíso - MA, com histórico de aplicação do agroquímico Diuron. Em cada área foram coletadas 12 subamostras, com auxílio de trado holandês na profundidade de 0 a 20 cm, com os pontos arranjados em dois círculos concêntricos ao redor de um único monólito, com tamanho de 3 a 6 m de raio, a partir do monólito. Cada conjunto de 12 subamostras foi misturado para formar uma amostra composta de aproximadamente 500 g (MOREIRA *et al.*, 2010). Após a coleta, os solos foram peneirados (malha de 2 mm), acondicionados em sacos plásticos e mantidos à temperatura de  $4 \pm 0,1$  °C, até o momento das análises. As amostras de solos foram submetidas a análises físico-químicas de acordo com a metodologia proposta pela (EMBRAPA, 2017).

#### **4.2 Seleção de bactérias possíveis produtoras de biossurfactantes (Atividade hemolítica)**

As 24 cepas bacterianas foram cultivadas em Agar para contagem em placa (PCA) e, para selecionar as bactérias possíveis produtoras de biossurfactantes, foram inoculadas em meio nutriente líquido, composto por meat extract 1 g/L, extrato de levedura 2 g/L, peptone water 5 g/L e cloreto de sódio 5 g/L, por 7 dias a 22 °C, após este período foram semeadas em placa de Petri contendo meio ágar sangue, composto por blood agar base e sangue desfibrinado a 5%, e

acondicionadas a 22 °C.

Após um período de 48 horas verificou-se a formação de um halo claro ao redor da colônia indicando a ação hemolítica de moléculas de biossurfactantes (KREISCHER; SILVA, 2017).

#### **4.3 Determinação da presença de biossurfactante**

Para a determinação da presença de biossurfactantes, as cepas bacterianas selecionadas foram submetidas às análises de presença de atividade emulsificante, índice de emulsificação, teste de colapso de gota, microcosmo e preparo de nanoemulsões.

##### **4.3.1 Atividade emulsificante e índice de emulsificação (%)**

Cada colônia foi inoculada em tubos de ensaio de 15 mL, contendo 3 mL de meio nutriente líquido, e armazenadas em estufa de crescimento bacteriológico durante 72 horas a 22 °C. Após o período de crescimento as culturas sofreram centrifugação por 6 minutos a 6000 rpm. Foi transferido para um novo tubo de ensaio, de 15 mL, 2 mL do sobrenadante recuperado em cada colônia e adicionou-se 2 mL de óleo de milho comercial.

Em seguida, agitou-se as misturas em agitador Vórtex por 2 minutos deixando-as em repouso por 24 horas conforme o método descrito por (KREISCHER; SILVA, 2017). O líquido em cada tubo de ensaio atingiu 3 cm e o índice de emulsificação (E24) foi calculado como porcentagem.

A atividade emulsificante foi determinada a partir da adição de 2 mL de óleo de milho comercial em tubos de ensaio de 15 mL contendo 2 mL do sobrenadante recuperado em cada colônia. Em seguida as misturas foram agitadas por 2 minutos e deixadas em repouso por 24 horas conforme o método descrito por (KREISCHER; SILVA, 2017). A altura total do líquido em cada tubo de ensaio atingiu 3 cm. Foram realizadas amostragens do sobrenadante no tempo inicial e após 24 h para verificar a estabilidade da emulsão. E então o índice de emulsificação (E24) foi calculado como porcentagem de acordo com a fórmula:  $E24 = (\text{altura da camada de emulsão} / \text{altura total}) \times 100$  (IQBAL, KHALLD e MALIK, 1995).

##### **4.3.2 Colapso da gota**

As colônias bacterianas que apresentaram resultado satisfatório no teste de emulsificação, foram selecionadas para o teste de colapso da gota seguindo os passos da metodologia realizada por (KREISCHER; SILVA, 2017). Para isso, as colônias foram inoculadas em tubos de ensaio de 15 mL, contendo 3 mL de meio nutriente líquido e acondicionadas em estufa a 22 °C por 7 dias. Para o teste, foram adicionado 35 mL de água e

100 µL de óleo de milho no Becker de 50 mL para cada linhagem bacteriana, no qual formou-se uma gota visível do óleo na superfície da água. Logo após, adicionou-se 10 µL do inóculo bacteriano na superfície do óleo. Aproximadamente dois minutos depois, foi observado o formato de uma gota na superfície do óleo. Conforme (KREISCHER; SILVA, 2017), o resultado foi considerando positivo quando houve o espalhamento total ou parcial da gota, e negativo quando a gota continuou inalterada. O controle negativo, ou branco, foi realizado adicionando 10 µL de meio nutriente líquido estéril sem prévio crescimento.

#### **4.4 Produção de biossurfactantes**

As bactérias com melhores resultados nos testes de possíveis biorremediadoras foram selecionadas para a produção de biossurfactantes de acordo com a metodologia proposta por (ALMEIDA; VIEIRA NETA; *et al.*, 2020). A produção do inóculo para os ensaios de produção de biossurfactantes foi realizada em tubos de ensaio contendo 9 mL de solução salina (0,9%), após três dias verificou-se a absorbância em espectrofotômetro através da turbidez observada em um comprimento de onda de 550 nm.

O meio de cultura utilizado para a produção de biossurfactante, de acordo com (ALMEIDA; VIEIRA NETA; *et al.*, 2020) foi composto por: extrato de levedura (0,2 g/L), peptona (1 g/L), glicose (5 g/L), NaNO<sub>3</sub> (5 g/L), K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1 g/L), MgSO<sub>4</sub> (0,5 g/L), FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (0,01 g/L), KCl (0,03 g/L), CaCl<sub>2</sub> (0,02 g/L), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,8 g/L) e 1 % de óleo de milho comercial. O meio foi esterilizado em autoclave a 121 °C por 15 min. em frascos erlenmeyers de 250 mL e então foram realizadas as fermentações contendo 49 mL do meio de cultura e 1 mL do inóculo bacteriano em cada frasco. Após a inoculação, os frascos foram incubados a 30 °C e agitados a 200 rpm, durante 7 dias.

Uma parte das amostras do meio de cultura utilizadas para a produção de biossurfactantes, após a fermentação, foram transferidas para tubos de ensaio e centrifugadas a 4000 rpm por 20 min a 20 °C, para remoção das células bacterianas. O sobrenadante foi coletado e utilizado no preparo das nanoemulsões.

#### **4.5 Produção das nanoemulsões**

As emulsões foram formuladas pelo método de emulsificação de inversão das fases (EIF) por aquecimento e método a frio (FERNANDEZ *et al.*, 2004). Para o preparo, foi utilizado 5 mL do sobrenadante do meio utilizado no preparo do biossurfactante mais 5 mL de tensoativo não iônico (tween 80) e 90 mL de água destilada. A emulsão foi preparada pela adição de água à fase orgânica contendo tween 80 e surfactante, ambos previamente aquecidos a 80 °C, usando

um agitador magnético, convertendo a emulsão grossa em nanoemulsão. A caracterização das nanoemulsões foi realizada e a estabilidade da emulsão foi investigada.

#### **4.5.1 Caracterização das nanoemulsões**

Para comprovar sua estabilidade, a nanoemulsão foi testada pelos métodos de (SUGUMAR *et al*, 2014). Os métodos consistiram em centrifugação, no qual as nanoemulsões formuladas foram centrifugadas a 3000 rpm por 30 min e observadas quanto à separação de fases, se houver e o ciclo de aquecimento-arrefecimento, que foi realizado mantendo a nanoemulsão a 40°C e 4°C, alternando as duas temperaturas por 48 h. Isso foi feito para verificar a estabilidade da nanoemulsão em temperatura variável.

#### **4.6 Curva de crescimento bacteriano na presença de Diuron**

A cinética de crescimento bacteriano foi realizada em meio líquido composto por 9 mL de solução de Diuron 100 µg mL<sup>-1</sup> mais 1 mL de inóculo bacteriano cultivado em caldo lactosado, e em placas de petri contendo meio de cultura PCA suplementado com Diuron a 100 µg mL<sup>-1</sup>, incubação a 30 ± 0,1 °C e medição da absorbância no comprimento de onda de 560 nm (espectrofotômetro Femto 800 XI) durante 3 dias segundo Bergey (2005).

#### **4.7 Biomassa Seca**

Ao final dos ensaios de produção, foram centrifugados 15 mL da cultura (4000 rpm, 20 min a 20° C), o precipitado formado foi retirado, colocado em placas de Petri (previamente pesadas), levadas para estufa a 105° C e pesadas após 24 h.

#### **4.8 Coloração de gram**

A classificação das bactérias pela coloração de Gram foi realizada de acordo com método descrito por (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Um esfregaço fixado pelo calor é recoberto com um corante básico púrpura, geralmente o cristal violeta. Após um curto período de tempo, o corante púrpura é lavado, e o esfregaço é recoberto com iodo, um mordente. Quando o iodo é lavado, ambas as bactérias gram-positivas e gram-negativas aparecem em cor violeta escuro ou púrpura. A seguir, a lâmina é lavada com álcool ou uma solução de álcool-acetona, essa solução é um agente descolorante, que remove o púrpura das células de algumas espécies, mas não de outras. O álcool é lavado, e a lâmina é então corada com safranina, um corante básico vermelho. O esfregaço é lavado novamente, seco com papel e examinado microscopicamente.

#### 4.9 Microcosmos

Os microcosmos (SILVA *et al.*, 2004b; PEÑA *et al.*, 2005; MARTINS *et al.*, 2011) foram montados em potes de vidro de 600 mL com tampas. Em cada pote foi adicionado 100 g de solo estéril suplementado com 10 mL de solução aquosa de Diuron a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; 1 mL de cada uma das nanoemulsões das bactérias potencialmente degradadoras e água destilada estéril para manter a umidade. Um béquer de 50 mL foi depositado no centro dos microcosmos (Figura 02) e dentro dele foi colocado 40 mL de solução de NaOH  $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ .

Depois de montados, os microcosmos foram fechados e incubados a  $30^\circ\text{C}$  por um período total de 15 dias. Ao longo deste período, foram realizadas quatro titulações, sendo a primeira realizada após 24 horas, a segunda após cinco dias, a terceira após 10 dias e a quarta após 15 dias. Para as titulações, os microcosmos foram abertos, em capela de fluxo laminar, retirados 10 mL da solução de NaOH  $0,50 \text{ mol L}^{-1}$ , colocados em erlenmeyers de 125 mL e acrescentada duas gotas de indicador Fenolftaleína 1%. A solução foi titulada com HCl  $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  até o desaparecimento da cor rosa, e a quantidade de HCl  $0,50 \text{ mol L}^{-1}$  gasto na titulação foi anotado.

**Figura 02.** Aparato utilizado para simular o processo de biorremediação em microcosmo.



Fonte: Autora 2022

A partir das titulações foi possível calcular a respiração microbiana através da equação 4 e relacionar os resultados por meio das curvas de crescimento microbiano.

Equação 4: (BARTHA, 1965).

$$\text{mg de CO}_2 = (\text{VB} - \text{VA}) \times \text{C} \times \text{f} \times 22 \times \text{FA}$$

Onde:

VB = volume de HCl gasto na titulação do branco;

VA = volume de HCl gasto na titulação da amostra;

C = concentração de HCl

f = fator de correção da concentração do ácido;

22 = equivalente – gama do CO<sub>2</sub>

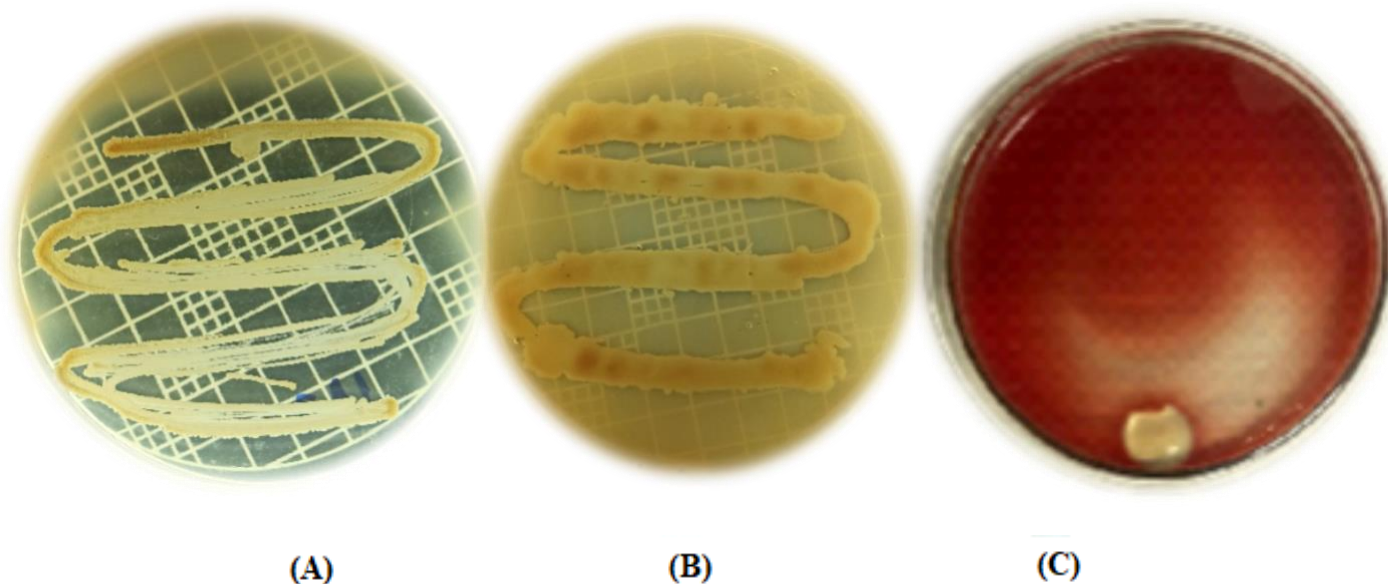
FA = fator de correção da alíquota usada na titulação (volume de NaOH) usado como armadilha de CO<sub>2</sub>/volume de alíquota de NaOH utilizado na titulação.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Teste de atividade hemolítica

O teste de atividade hemolítica foi realizado com as 24 cepas bacterianas rizosféricas isoladas das amostras de solos coletados com histórico de uso de agrotóxico. 18 delas apresentaram um halo claro em volta da colônia (Figura 03 e Tabela 02) que, de acordo com (KREISCHER; SILVA, 2017), é o resultado positivo para atividade hemolítica. Os resultados mostraram que das 24 colônias testadas, apenas 6 não apresentaram atividade hemolítica.

**Figura 03** Teste de hemólise dos isolados bacterianos. (a) placa positiva (b) placa negativa e (c) placa testemunha ou branco.



Fonte: Autora 2022

**Tabela 02** Estudo da atividade hemolítica dos isolados bacterianos.

| <b>Código</b> | <b>Atividade Hemolítica</b> | <b>Código</b> | <b>Atividade Hemolítica</b> |
|---------------|-----------------------------|---------------|-----------------------------|
| 1 A1          | +                           | 2 B2          | +                           |
| 1 A2          | +                           | 2 B3          | +                           |
| 1 A3          | +                           | 2 B4          | -                           |
| 1 A4          | +                           | 3 A1          | +                           |
| 1 B1          | +                           | 3 A2          | +                           |
| 1 B2          | -                           | 3 A3          | -                           |
| 1 B3          | +                           | 3 A4          | +                           |
| 1 B4          | +                           | 3 B1          | -                           |
| 2 A1          | +                           | 3 B2          | +                           |
| 2 A2          | +                           | 3 B3          | +                           |
| 2 A3          | -                           | 3 B4          | -                           |
| 2 A4          | +                           | Branco        | -                           |
| 2 B1          | +                           |               |                             |

Segundo (BICCA *et al.* 1999), o teste hemolítico pode ajudar a selecionar os microrganismos produtores de biossurfactantes. Portanto, os resultados do teste realizado permitiram selecionar 18 (dezoito) bactérias rizosféricas com formação de halo claro em volta da colônia bacteriana, indicando hemólise em meio ágar sangue, como mostram a tabela 02 e figura 03.

O teste de atividade hemolítica é significativo por levar em consideração o crescimento da bactéria usando a hemoglobina como fonte de ferro (SCHULTZ, 2010) além de ser considerado um teste primário para triagem de microrganismos produtores de biossurfactantes (KHOPADE *et al.*, 2012).

## 5.2 Índice de emulsificação

As bactérias que testaram positivo para a atividade hemolítica foram selecionadas para o teste de atividade emulsificante e em seguida foi calculado o índice de emulsificação através

da fórmula  $E_{24} = (\text{altura da camada de emulsão} / \text{altura total}) \times 100$  (IQBAL; KHALLD; MALIK, 1995).

O teste do índice de emulsificação é utilizado para determinar a capacidade que as colônias apresentam de emulsificar óleo em água, sugerindo assim se estes são capazes de produzir biossurfactantes (KREISCHER; SILVA, 2017).

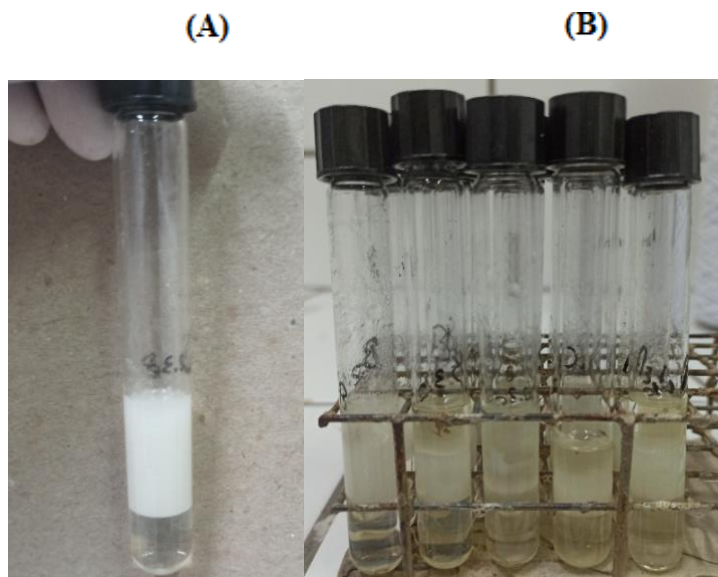
Dos isolados analisados, apenas quatro colônias (1B3, 1B4, 3A1 e 3A4) não mostraram nenhum índice de emulsificação, enquanto 9 colônias apresentaram índice abaixo de 40%, 3 colônias apresentaram índice entre 40 e 60%, e as duas linhagens com maiores índices foram 1A4 e 2A2 com 70 e 60% respectivamente. Como pode-se observar na tabela abaixo:

**Tabela 03** Índice de emulsificação em porcentagem (%).

| Código | Índice de emulsificação | Código | Índice de emulsificação |
|--------|-------------------------|--------|-------------------------|
| 1 A1   | 56,6%                   | 2 A4   | 23,3%                   |
| 1 A2   | 26,6%                   | 2 B1   | 23,3%                   |
| 1 A3   | 20%                     | 2 B2   | 46,6%                   |
| 1 A4   | 70%                     | 2 B3   | 53,3%                   |
| 1 B1   | 23,3%                   | 3 A1   | 0%                      |
| 1 B3   | 0%                      | 3 A2   | 36,6%                   |
| 1 B4   | 0%                      | 3 A4   | 0%                      |
| 2 A1   | 16,6%                   | 3 B2   | 23,3%                   |
| 2 A2   | 60%                     | 3 B3   | 16,6%                   |

A partir do teste de emulsificação ( $E_{24}$ ) foi possível selecionar 4 (quatro) bactérias com melhores resultados, (Figura 04). Sendo elas: 1A1, 1A4, 2A2 e 2B3.

**Figura 04** Índice de emulsificação. a) Tubos de ensaio durante o teste de Índice de Emulsificação; b) Camadas de emulsões estáveis no tubo de ensaio 24 horas após o teste.



Fonte: Autora 2022

Como o interesse em utilizar biossurfactantes está relacionado com sua capacidade de emulsionar líquidos não miscíveis e formar emulsões estáveis, de acordo com a literatura, os isolados que apresentam índice de emulsificação a partir de 40% são promissores para produção de biossurfactantes (ALMEIDA; VIEIRA, 2020).

### 5.3 Colapso de gota

A técnica de Colapso de gota propicia um resultado rápido para a visualização do efeito do biossurfactante sobre o óleo. Embora apresente um resultado qualitativo, contribui para melhor a avaliação da ação do biossurfactante de cada cepa bacteriana estudada, pois, se houver a presença de surfactantes na gota do inóculo, a tensão interfacial entre a gota e a superfície hidrofóbica, nesse caso o óleo comercial, é reduzida, o que resulta no espalhamento da gota do inóculo bacteriano sobre a superfície hidrofóbica e isso ocorre porque, em geral, os surfactantes que atuam como emulsificantes são agentes que auxiliam na dispersão de um líquido em outro, como óleo em água. Esses compostos químicos atuam nas tensões superficiais e interfaciais e são capazes de formarem micro emulsões, onde hidrocarbonetos podem se solubilizar em água e vice-versa, facilitando a degradação (KREISCHER; SILVA, 2017).

As quatro bactérias selecionadas pelo teste de emulsificação foram avaliadas quanto ao colapso de gota, constatando que todas as linhagens bacterianas selecionadas são capazes de produzir biossurfactantes. Foi possível observar que todas as cepas apresentaram deslocamentos superiores ao do branco, como mostra a Tabela 03.

**Tabela 04** Teste de colapso da gota dos isolados bacterianos.

| Código | Tempo (min.) |
|--------|--------------|
| 1A1    | 03:46        |
| 1A4    | 03:38        |
| 2A2    | 03:32        |
| 2B3    | 03:18        |
| Branco | 02:03        |

#### 5.4 Produção de biossurfactantes

Um grande número de espécies bacterianas de diferentes gêneros produz biossurfactantes. Esta propriedade é particularmente comum entre microrganismos que degradam compostos hidrofóbicos insolúveis em água (KREISCHER; SILVA, 2017).

As bactérias produzem biossurfactantes através do metabolismo celular e presença de nutrientes como fonte de carbono e nitrogênio, assim, as vantagens em desenvolver surfactantes microbianos permanecem na capacidade estrutural das moléculas tensoativas com possibilidade de resistirem às maiores tolerâncias para variações de temperaturas e pH (SANTOS, SILVA e COSTA, 2016).

Os biossurfactantes além de serem moléculas formadoras de emulsões em misturas de óleo e água, promoverem a redução de tensões superficiais e interfaciais, facilitando a biodegradação, pois estes aumentam a interação superficial água/óleo, e dessa forma, aceleram a degradação de vários óleos por microrganismos (KREISCHER; SILVA, 2017). A presença dos biossurfactantes, portanto, confirma a capacidade degradativa das bactérias isoladas.

**Figura 05** Produção de biossurfactantes.

Fonte: Autora 202

Os dados obtidos no estudo comprovam que todas as quatro linhagens de bactérias selecionadas apresentaram produção de biossurfactantes, como já havia sido previamente confirmado pelo índice de emulsificação e teste de colapso de gota.

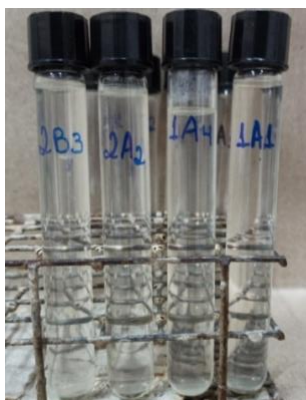
### 5.5 Produção e caracterização das nanoemulsões

As nanoemulsões podem ser preparadas usando métodos de alta energia como homogeneizador de alta pressão, ultra-som e microfluidização e métodos de baixa energia, como emulsificação espontânea, temperatura de inversão de fases e composição de inversão de fases (KWASIGROCH *et al*, 2016).

O método de baixa energia mais empregado é a emulsificação espontânea, na qual a adição lentamente de água em uma solução de surfactante e óleo resulta na formação espontânea de gotículas de nanoemulsão devido ao movimento de componente miscível em água (água-tensoativo solúvel) da fase orgânica para a fase aquosa (KATHIK; EZHILARASI; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2017). Portanto, as nanoemulsões são formadas quando a fase oleosa é dispersa em uma fase aquosa e é estabilizada devido à presença de tensoativo que forma uma camada na interface da gota, separando assim o óleo da fase aquosa devido à estabilidade da emulsão (SUGUMAR *et al*, 2014).

Quanto aos métodos de perturbação para verificar se as nanoemulsões eram estáveis, após a centrifugação, no qual as nanoemulsões formuladas foram centrifugadas a 3000rpm por 30min e observadas, não houve a separação de fases, indicando a estabilidade das mesmas, assim como para o ciclo de aquecimento-arrefecimento, que foi realizado mantendo as nanoemulsões a 40°C e 4°C, alternando as duas temperaturas por 48h constatando a estabilidade das nanoemulsões em temperatura variável.

**Figura 06** Nanoemulsões bacterianas estáveis.



Fonte: Autora 2022

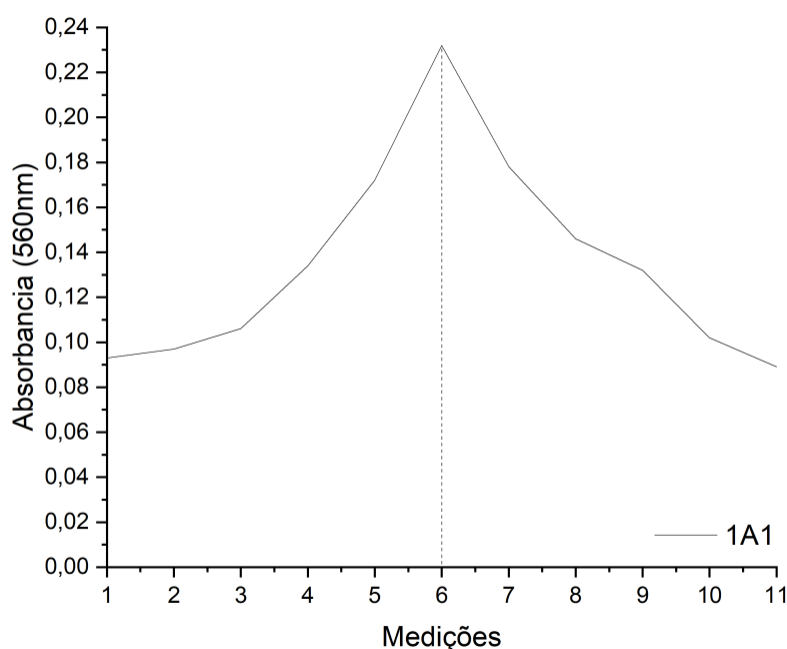
### 5.6 Curva de crescimento bacteriano na presença de Diuron

Como qualquer outro microrganismo, as bactérias requerem nutrientes específicos para seu crescimento e desenvolvimento, podendo se reproduzir por diferentes métodos, como brotamento, fissão binária, fragmentação, etc. É importante lembrar que, quando falamos em crescimento microbiano, estamos nos referindo ao aumento do número de células microbianas viáveis, ou unidades formadoras de colônia (UFC), e não ao seu tamanho (RODRIGUES, 2016).

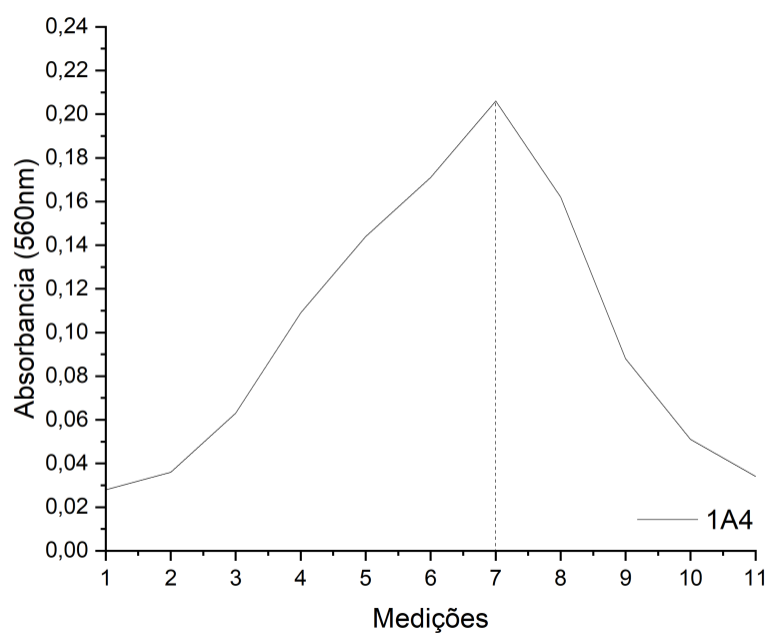
Quando o crescimento bacteriano é medido em função do tempo e em paralelo com as condições ambientais encontradas leva ao desenvolvimento do que chamamos de Curva de Crescimento, que pode ser obtida graficamente quando a contagem da população de bactérias é feita em diferentes intervalos de tempo (RODRIGUES, 2016).

Os resultados obtidos permitiram construir gráficos para a curva de crescimento das quatro linhagens bacterianas selecionadas.

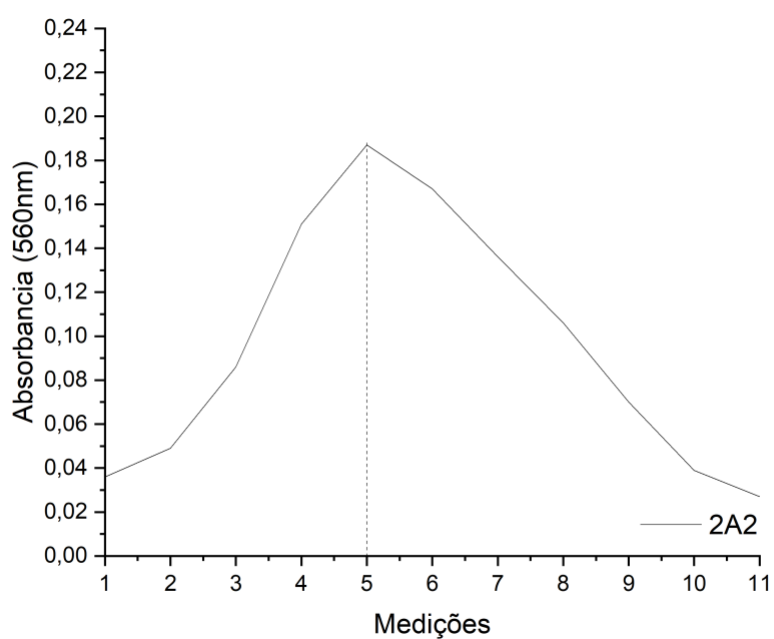
**Gráfico 01** Curva de crescimento da linhagem bacteriana 1A1 na presença de Diuron a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  por 3 dias.



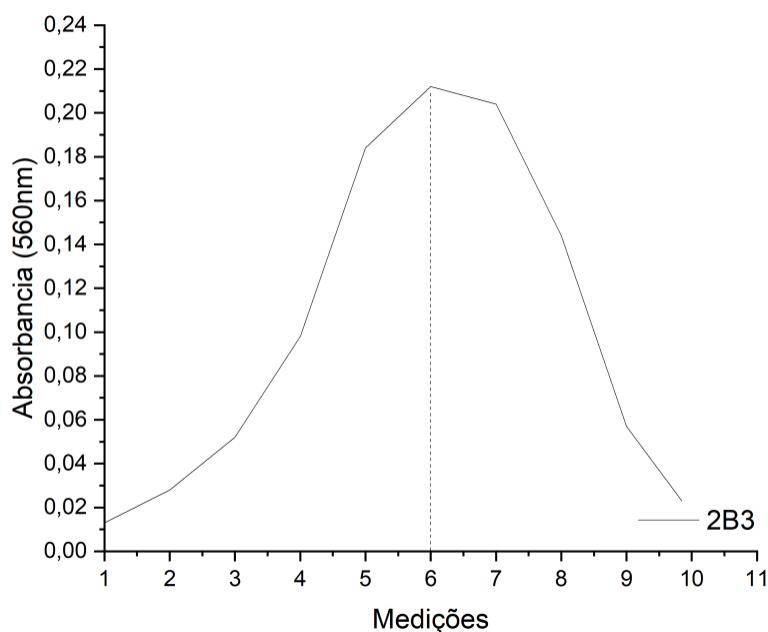
**Gráfico 02** Curva de crescimento da linhagem bacteriana 1A4 na presença de Diuron a  $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$  por 3 dias.



**Gráfico 03** Curva de crescimento da linhagem bacteriana 2A2 na presença de Diuron a  $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$  por 3 dias.



**Gráfico 04** Curva de crescimento da linhagem bacteriana 2B3 na presença de Diuron a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  por 3 dias.



A partir dos resultados obtidos foi possível perceber que houve a fase Lag, que é o intervalo de tempo entre a inoculação de uma cultura bacteriana e o início da sua taxa de crescimento, a fase Log, também chamada de fase exponencial, que é o período celular de maior atividade metabólica, a fase estacionária, que é quando os nutrientes do meio começam a se esgotar e os resíduos tóxicos provenientes da atividade metabólica das células começam a se depositar no meio. Estes fatores fazem com que a velocidade de multiplicação reduza e, conseqüentemente, o número de células novas diminui, ao mesmo tempo em que o número de células mortas aumenta (TORTORA; CASE; FUNKE, 2016).

### 5.7 Biomassa Seca

Ao final dos ensaios de produção, foram centrifugados 15 mL da cultura (4000 rpm, 20 min a  $20^{\circ}\text{C}$ ), o precipitado formado foi retirado, colocado em placas de Petri (previamente pesadas), levadas para estufa a  $105^{\circ}\text{C}$  e pesadas após 24 horas. A tabela 04 mostra a quantidade de biomassa produzida por cada bactéria.

**Tabela 05** Biomassa seca dos isolados bacterianos.

| Código | Massa em mg/L |
|--------|---------------|
| 1 A1   | 1,2878        |
| 1 A4   | 1,1894        |
| 2 A2   | 1,1716        |
| 2 B3   | 1,2254        |

### 5.8 Coloração de gram

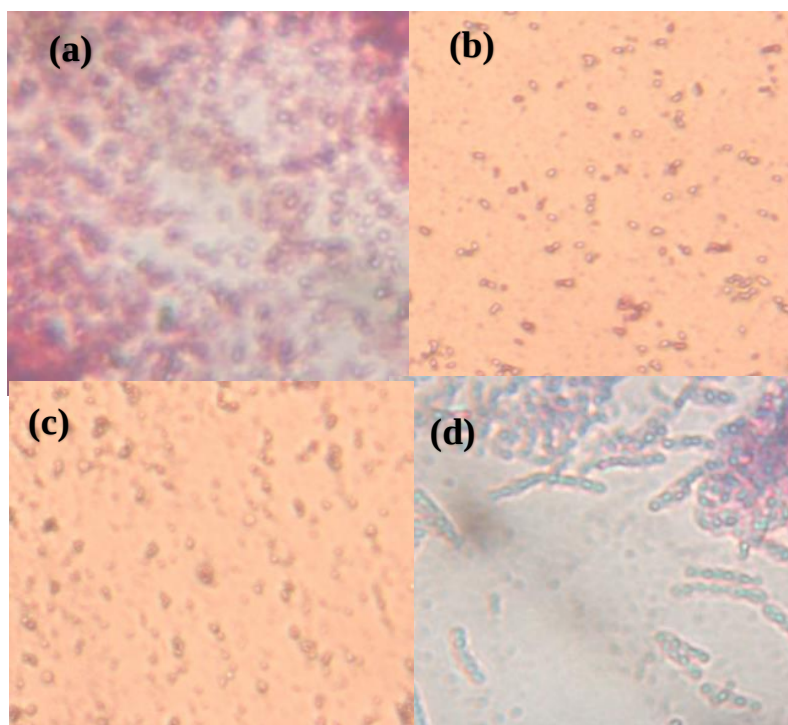
Segundo (FREITAS; PICOLI, 2017) a coloração de Gram é uma técnica específica muito utilizada na bacteriologia, com a finalidade de classificar microrganismos quanto a suas bases tintoriais, tamanho, forma e arranjo celular.

As bactérias coradas nessa técnica são divididas em dois grupos: bactérias Gram positivas que coram em roxo pelo cristal violeta, pois possuem várias camadas de peptidoglicano e outros componentes não solúveis em álcool; e bactérias Gram negativas se descoram com o álcool, que atua dissolvendo lipídios, o que contribui para permeabilidade da parede celular e posterior coloração em rosa pela fucsina (REINE *et al*, 2021).

Utilizando a técnica de coloração de Gram foi possível observar que as bactérias produtoras de biossurfactantes selecionadas nos testes anteriores foram todas classificadas como Gram negativas.

Na Tabela 05, temos a classificação das bactérias quanto a coloração de Gram e morfologia em: 1A1 Diplococos (-), 1A4 Cocos (-), 2A2 Cocos (-) e 2B3 Estreptococos (-). E na figura 09 temos as imagens microscópicas da coloração de Gram das bactérias selecionadas como produtoras de biossurfactantes.

**Figura 07** Coloração de Gram das bactérias produtoras de biossurfactantes. (a) 1A1; (b) 1A4; (c) 2A2; d) 2B3.



Fonte: Autora 2022

**Tabela 06** Identificação bacteriana por coloração de Gram.

| Código | Teste de Gram    |
|--------|------------------|
| 1A1    | Diplococos (-)   |
| 1A4    | Cocos (-)        |
| 2A2    | Cocos (-)        |
| 2B2    | Estreptococos(-) |

Como pode ser observado na Tabela 05, todas as bactérias selecionadas são Gram-negativas, resultado satisfatório para serem utilizadas na biodegradação de agroquímicos, pois, de acordo com (TORTORA; CASE; FUNKE, 2016), as bactérias Gram negativas têm paredes celulares diferente, com duas membranas de proteção, fazendo com que a camada de peptidoglicano não retenha o primeiro corante (cristal-violeta), evidenciando a resistência aos agrotóxicos.

### 5.9 Microcosmo

Para confirmar a eficácia de degradação das bactérias, foram realizados ensaios em microcosmos, que são experimentos realizados em laboratório para reproduzir as condições

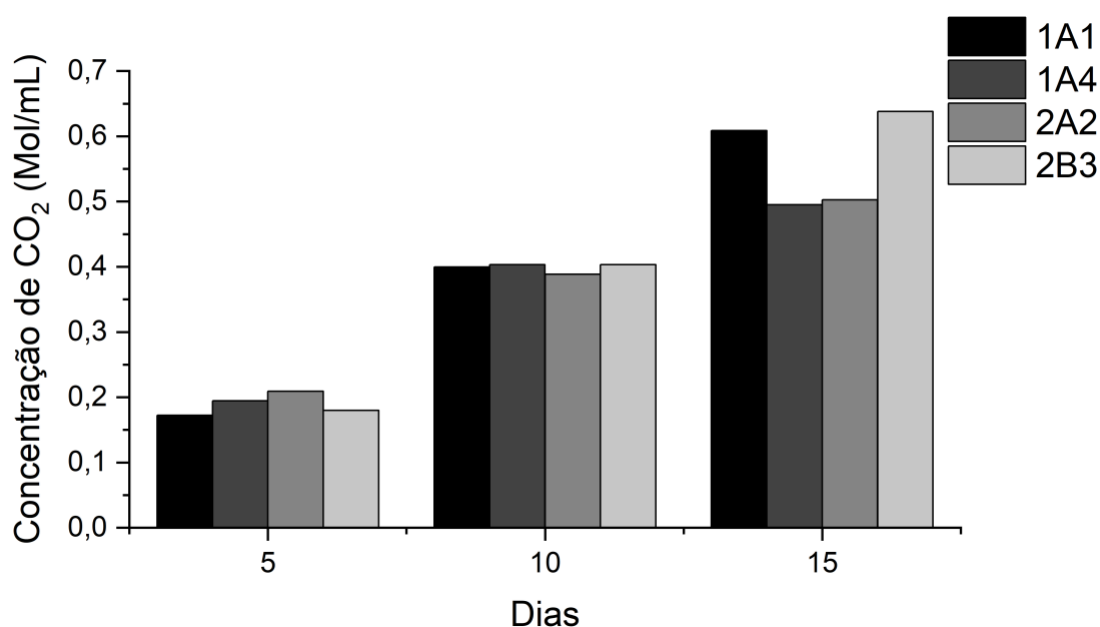
reais encontradas na natureza, e servem para representar uma biorremediação, constatando a capacidade mineralizadora dos microrganismos por meio da liberação de CO<sub>2</sub>.

A atividade respiratória bacteriana foi avaliada a partir da respiração aeróbia, utilizando o método respirométrico de Bartha. A metodologia é padronizada pela norma brasileira NBR 14283 (ABNT, 1999) e é aplicada no Brasil para precisar a respiração microbiana e indiretamente, a biodegradação de poluentes e resíduos no solo através da análise do consumo de oxigênio ou a produção de CO<sub>2</sub> por unidade de volume e de tempo originário da atividade metabólica dos microrganismos (BERNARDES; SOARES, 2005).

O experimento ocorreu em esquema fatorial com quatro linhagens bacterianas associado ao herbicida Diuron na concentração de (50 µg mL<sup>-1</sup>), o teste foi realizado em triplicata, resultando em 12 unidades experimentais.

As curvas de crescimento microbiano apresentam o CO<sub>2</sub> produzido pelas linhagens bacterianas após 5, 10 e 15 dias. Utilizou-se a equação 4 para calcular a respiração microbiana e relacionar os resultados a partir das curvas de crescimento microbiano por meio de realizadas 3 titulações realizadas após 5, 10 e 15. Com os resultados dos cálculos da respiração foi possível construir curvas que indicaram a liberação de CO<sub>2</sub> resultante da atividade metabólica das bactérias.

**Gráfico 05** mg de CO<sub>2</sub> produzido pelas nanoemulsões bacterianas 1A1, 1A2, 2A2 e 2B3 em microcosmos com solo suplementado com 50 µg mL<sup>-1</sup> de Diuron após 5, 10 e 15 dias.



A partir dos resultados obtidos podemos constatar que as bactérias apresentam uma alta atividade metabólica. Isso foi observado em todas as linhagens do quinto ao décimo dia, porém, para as linhagens 1A4 e 2A2 houve um declínio a partir do décimo dia que indica a morte do microrganismo. Essa fase continua até que a população tenha diminuído para uma pequena fração do número de células da fase anterior, ou até que tenha desaparecido totalmente, pois não há mais herbicida como fonte de carbono (BRAVIM, 2019). Portanto, a maior taxa de biodegradação foi obtida para a nanoemulsão contendo a bactéria 1A4 e 2A2 utilizando 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de diuron.

## **6. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, concluir-se que, dentre as vinte e quatro cepas bacterianas rizosféricas isoladas inicialmente, foram selecionadas apenas quatro com melhores resultados nos testes de possíveis produtoras de biossurfactantes, somente essas quatro foram submetidas a produção dos biossurfactantes e, logo depois, ao preparo e caracterização das nanoemulsões. Nos ensaios de biodegradação em Microcosmos, duas linhagens bacterianas apresentaram melhores resultados, com um declínio na emissão de  $\text{CO}_2$  do décimo ao décimo quinto dia, sugestivo de que a bactéria degradou mais rapidamente o Diuron e a população tenha diminuído devido à ausência do herbicida como fonte de carbono para continuação da atividade metabólica. À vista disso, pode-se concluir que é possível utilizar essas bactérias selecionadas para dar continuidade ao estudo de processo de biorremediação do Diuron através da sua ação biossurfactante na forma de nanoemulsão.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT. Resíduos em solos - **Determinação da biodegradação pelo método respirométrico**. ABNT/NBR 14.283. Projeto 01:603.06-007:1997. Rio de Janeiro. RJ. 1999. p.8.
- ADETUNJI, A. I; OLANIRAN, A. O. Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, p. 669-679, 2021.
- ADETUNJI, A; OLANIRAN, A. Production and potential biotechnological applications of microbial surfactants: An overview. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 28, 2020.
- AGROFIT. **Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em:<[http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit\\_cons/principal\\_agrofit\\_cons](http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons)>. Acesso em: 20 jun. 2022.
- ALMEIDA, G.A.M.; VIEIRA NETA, M.R.A.; et al., Produção de biossurfactante por *Lysinibacillus* sp. e *Bacillus* sp. a partir de diferentes óleos como fonte de carbono. **Revista Matéria**, v.25, n.4, 2020.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regularização de Produtos Agrotóxicos**. 2018. Disponível em:<<http://portal.anvisa.gov.br/registroseautorizacoes/agrotoxicos/produtos/reavaliacao-de-agrotoxicos>>. Acesso em 02 de Jun de 2022.
- BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of flask and method for measurement of the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, 68-70, 100, 1965.
- BERGEY'S. **Manual of Systematic Bacteriology**. 2. ed. USA: Williams & Wilkins; 2005.
- BERNARDES, R. S. E SOARES, S. R. A. Fundamentos da Respirometria no controle de poluição da água e do solo. Editora Universidade de Brasília: **Finatéc**, Brasília, DF, p.164, 2005.
- BICCA, F. C.; FLECK, L. C.; AYUB, M. A. Z. Production of biosurfactant by hydrocarbon degrading *Rhodococcus ruber* and *Rhodococcus erythropolis*. **Revista de Microbiologia**, 30(8):231-236, 1999.
- BOSCOLO, C. N. P. et al. Diuron metabolites act as endocrine disruptors and alter aggressive behavior in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Chemosphere**, v. 191, p. 832-838, 2018.

BRAVIM, N. P. B. Biodegradação dos herbicidas atrazina, glifosato e pendimetalina empregando consórcio fúngico. **Dissertação (Mestrado)** – Curso de Pós-Graduação em Agricultura e Ambiente, Universidade Estadual do Maranhão, 2018.

CARVALHO, M. M. X.; NODARI, E. S.; NODARI, R. O. “Defensives” or “pesticides”? A history of the use and perception of pesticides in the state of Santa Catarina, Brazil, 1950-2002. **História, Ciências, Saúde - Manguinhos**, v. 24, n. 1, p. 75-91, 2017.

CEDERLUND, H.; BÖRJESSON, E.; STENSTRÖM, J. Effects of a wood-based biochar on the leaching of pesticides chlorpyrifos, diuron, glyphosate and MCPA. **Journal of Environmental Management**, v. 191, p. 28-34, 2017.

CHAGAS, P.S.F. Influência dos atributos do solo nos processos de retenção do herbicida diuron. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. 2017.

COSTA, C.H.J. Avaliação da diversidade microbiana e sua aplicação biotecnológica no solo impactado com agroquímico-cultura de hortaliças. (**Dissertação**) Universidade CEUMA- São Luis/ MA. 2018.

DANGE, S. S. et al. Biosurfactant: process optimization by classical onde parameter at a time approach. **Research Journal of Biotechnology**, v. 15, 2020.

DANGI, A. K.; SHARMA, B.; HILL, R. T.; SHUKLA, P. Bioremediation through microbes: systems biology and metabolic engineering approach. **Critical Reviews in Biotechnology**, 39(1), 79-98, 2019.

DANGI, A. K.; SHARMA, B.; HILL, R. T.; SHUKLA, P. Bioremediation through microbes: systems biology and metabolic engineering approach. **Critical Reviews in Biotechnology**, 39(1), 79-98, 2019.

DELGADO-MORENO, L.; NOGALES, R.; ROMERO, E. Biodegradation of high doses of commercial pesticide products in pilot-scale biobeds using olive-oil agroindustry wastes. **Journal of Environmental Management**, v. 204, p. 160-169, 2017.

DESAI, J.; THAKKAR, H. Enhanced oral bioavailability and brain uptake of Darunavir using lipid nanoemulsion formulation. **Colloids and surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 143 - 149, 2019.

EMBRAPA. Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos. Manual de métodos de análise de solo. Rio de Janeiro. **Serviço Nacional de Levantamento e Conservação de Solos**. ed. 3, 2017.

- FARIAS, F.J. Atributos físicos, químicos e microbiológicos do solo em sistema agroecológico de produção. Trabalho de Conclusão de Curso. **Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia de Sergipe** - Campus São Cristóvão. 2018.
- FERNANDEZ, P.; ANDRÉ, V.; RIEGER, J.; KUMLE, A. Nano-emulsions formation by emulsion phase inversion. **Colloids Surf.**, 251, 2004.
- FERREIRA, E.P.B; STONE, L.F.; MARTIN-DIDONET, C.C.G. **População e atividade microbiana do solo em sistema agroecológico de produção**. Revista Ciência Agronômica, v. 48, n. 1, p. 22-31, jan-mar, 2017.
- FORTES, N.L.P. **Ciências Ambientais**. Copyright. Editora da UNITAU, 2018.
- FREITAS, V.R., PICOLI, S. U. A Coloração de Gram e as Variações na sua Execução. **NewsLab**, ed. 82, p.124-128, 2007.
- GONZÁLEZ, J. D. C.; BARRERA, M. A. R.; RAMÍREZ, Y. R.; SÁNCHEZ, A. A.; LEDEZMA, J. C. R.; TORIBIO-JIMÉNEZ, J. Pantoea agglomerans productora de biosurfactante aislada de rizosfera de pastos Tanzania y Llanero. **Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas**, 7(4), 961-968, 2016.
- GORE, E.; PICARD, C.; SAVARY, G. Spreading behavior of cosmetic emulsions: Impact of the oil phase. **Biotribology**, v. 16. p. 17-24. 2018.
- GOSWAMI, A.; JIANG, J-Q. Simultaneous quantification of gabapentin, sulfamethoxazole, terbutryn, terbuthylazine and diuron by UV-Vis spectrophotometer. **Biointerface Research in Applied Chemistry**, 8(1), 2018
- IQBAL, S; KHALID, ZM; MALIK, KA. Enhanced biodegradation and emulsification of crude oil and hyperproduction of biosurfactants by a gamma rayinduced mutant of *Pseudomonas aeruginosa*. **Letters in Applied Microbiology**, ed. 21, p. 176-179, 1995.
- KANG, S. M. et al. Integrated phytohormone production by the plant growth-promoting rhizobacterium *Bacillus tequilensis* SSB07 induced thermotolerance in soybean. **Journal of Plant Interactions**, 14 (1), 416-423. 2019.
- KARTHIK, P., EZHILARASI, P. N., & ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Challenges associated in stability of food grade nanoemulsions. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57(7), p.1435–1450, 2017.

- KHOPADE, A.; REN, B.; LIU, X.Y.; MAHADIK, K.; ZHANG, L.; Kokare C. Production and characterization of biosurfactant from marine *Streptomyces* species B3. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.367, p.311–318, 2012.
- KIM, S. J.; TOMA, H.; SHAH, R.; KOMPELLA, U. B.; VOOTURI, S. K.; SHENG, J. The safety, pharmacokinetics, and efficacy of intraocular celecoxib. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 55, n. 3, p. 1409-1418, 2019.
- KREISCHER, A.C, SILVA, L.P. Bioprospecção de bactérias produtoras de biossurfactantes a partir de solo contaminado por agrotóxicos. **Revista Eletrônica Estácio Saúde**, v. 6, n.1, 2017.
- KRELING, B.E. et al. Avaliação da atividade enzimática como uma promissora ferramenta indicadora da qualidade do solo. **Editora Científica Digital**, v. 1, 2022.
- KWASIGROCH, B. et al. As nanoemulsões de óleo em água são adequadas para transportar compostos hidrofóbicos: Indometacina como modelo de medicamento anti-inflamatório. **Revista internacional de farmacêutica**, v. 515, p.749-756, 2016.
- LACERDA, T. M. Avaliação da atividade fotocatalítica de nanotubos de titânio na degradação do herbicida diuron. Mestrado em tecnologia de processos sustentáveis. **Instituto federal de educação ciência e tecnologia de goiás**, 2016.
- LIMA, S. D. *et al.* Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from gas station leaking-contaminated groundwater in the Southern Amazon, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 80, n. 2, p. 354–361, 2020.
- MARTINS, G.S.L.; ABREU, V.P; CAMPOS, A.N.R. Respiração basal para avaliação da microbiota do solo de sistemas de produção do IF Sudeste MG – Campus Rio Pomba. **IV Fórum Regional de Agroecologia**. 2011.
- MIRANDA, A.A.C; MELO, L.F; ARAUJO, A.E. Impactos dos agrotóxicos na saúde do solo e humana: uma revisão. **Cointer**. 2017.
- MORAES, R.F. Agrotóxicos no Brasil: padrões de uso, política da regulação e prevenção da captura regulatória. Rio de Janeiro: **Ipea**. 2019.
- MOREIRA, F. M. S.; HUISING, E. J.; BIGNELL, D. E. **Manual de biologia dos solos tropicais: amostragem e caracterização da biodiversidade**. 1. ed. Lavras: UFLA. 2010. 368
- NIE, J.; SUN, Y.; ZHOU, Y.; KUMAR, M.; USMAN, M.; LI, J.; SHAO, J.; WANG, L.; TSANG, D. C. W. Bioremediation of water containing pesticides by microalgae: mechanisms, methods, and prospects for future research. **Science of The Total Environment**, v. 707, p. 136080, 2019.

- OLIVEIRA, G. R. F., S. *et al.* Influence of *Bacillus subtilis* in nematodes biological control and production aspects of bean. **Brazilian Journal of Biosystems Engineering**, 11 (1), 47-58.2017.
- PEÑA, M.L.P.; MARQUES, R.; JAHNEL, M.C.; ANJOS. A. Respiração microbiana como indicador da qualidade do solo em ecossistema florestal. **Floresta**. v. 35, p. 117-127, 2005.
- PINTO, G. D.A. Capacidade de degradação do agrotóxico clorpirifós por bactérias lácticas. **Dissertação de Mestrado**. UFRJ. Rio de Janeiro. 2017.
- RAMOS, R. F.; SOBUCKI, L.; ROHRIG, B.; LUDWIG, J.; DAROIT, D. J. Diversidade funcional de bactérias isoladas de solos rizosférico e não rizosférico em cultura de milho. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, n.17(3): 2018.
- REINE, F.U; SOUZA, L.A.B de.; MENEZES, J.L de.; GOMES, R.F.C.C.; SOUZA, A.C.R de.; MOTA, C.A.; ABREU FILHO, B.A de. Método alternativo e sustentável para a realização de coloração bacteriana de Gram e Wirtz-Conklin: relevância ambiental e econômica no ensino prático de microbiologia. **Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento**, [S. l.], v. 10, n. 9, p. 9510917585, 2021.
- RODRIGUES, K. G. P. Análise do crescimento bacteriano in vitro diferenciado de Salmonella enterica sorovar Typhimurium em ambientes extra- e intracelular. Trabalho de conclusão de curso (Farmácia-Bioquímica) - Universidade Estadual Paulista, **Faculdade de Ciências Farmacêuticas**, 2016.
- SANTOS, A. P. P. dos; SILVA, M. de S. S; COSTA, E.V.L. Biosurfactantes: Uma alternativa para o mercado industrial, **Journal of Social, Technological and Environmental Science**, v.5, n.1, p. 88-103, 2016.
- SANTOS, C.V.M. Biosurfactante – Conceitos Gerais e Perspectivas. **Ambiente & Sociedade: concepções, fundamentos, diálogos e práticas para conservação da natureza**. 2021.
- SANTOS, F. F. *et al.* Tiger Nut (*Cyperus esculentus*) Milk Byproduct and Corn Steep Liquor for Biosurfactant production by *Yarrowia lipolytica*. **Chemical Engineering**, v. 65, p. 331-336, 2018.
- SANTOS, R.D.S; SILVA, P.T.S; MONTEIRO, V.E.D; Melo, M.C. Avaliação da biodegradação do inseticida imidacloprido em reator de bancada. **Revista Eletrônica de Gestão e Tecnologias Ambientais (GESTA)** 2019.
- SARTORE, N. **A microbiologia do solo pode aumentar a produtividade?** - Agroinovadores. 2021.

- SCHULTZ, F. M. Avaliação de microrganismos com potencial de degradação de diesel e biodiesel. **Dissertação** (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 113f. 2010.
- SILVA, A. C. S. *et al.* Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, p. 1-12, 2018.
- SILVA, A. C. S. *et al.* Biosurfactant production by fungi as a sustainable alternative. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 85, p. 1-12, 2018.
- SILVA, E.; FIALHO, A.M.; SÁ-CORREIA, I.; BURNS, R. G.; SHAW, L. J. Combined bioaugmentation and biostimulation to cleanup soil contaminated with high concentrations of atrazine. **Environ Sci Technol**. Jan 15;38(2):632-7. 2004b.
- SIMÕES, M. *et al.* The metabolic effects of diuron in the rat liver. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 54, p. 53-61, 2017.
- SINGH, B. *et al.* Soil characteristics and herbicide sorption coefficients in 140 soil profiles of two irregular undulating to hummocky terrains of western Canada. **Geoderma**, v. 232, p. 107-116, 2017.
- SUGUMAR, S. *et al.* Nanoemulsion of eucalyptus oil and its larvicidal activity against *Culex quinquefasciatus*. **Bulletin of entomological research**, 104(3), 393-402, 2014.
- TORTORA, G. J.; CASE, CH. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia**, 12. ed., Artmed Editora, 2016.
- VILLAYERDE, J. *et al.* Bioremediation of diuron contaminated soils by a novel degrading microbial consortium. **Journal of Environmental Management**, v. 188, p. 379-386, 2017.
- WANG, Y. *et al.* Multi-walled carbon nanotubes with selected properties for dynamic filtration of pharmaceuticals and personal care products. **Water Research**, 92, 2016.
- WHO. World Health Organization. **World health statistics: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals**. 2018.
- XAVIER, F.A.S. **Solo – Definição e importância**. Recomendações de calagem e adubação para abacaxi, acerola, banana, citros, mamão, mandioca, manga e maracujá. 2021.