



IZABELLY CHRISTINY DA SILVA

**SÍNTESE DE NANOFIBRAS DE POLI(ÁLCOOL VINÍLICO)
INCORPORADAS COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE
FERRO E ENZIMAS FÚNGICAS PARA A
NANOBIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS
COM DERIVADOS DE PETRÓLEO**

**LAVRAS - MG
2022**

IZABELLY CHRISTINY DA SILVA

**SÍNTESE DE NANOFIBRAS DE POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) INCORPORADAS
COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE FERRO E ENZIMAS FÚNGICAS PARA
A NANOBIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM DERIVADOS DE
PETRÓLEO**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Lavras, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Física, área de
concentração em Física.

Prof. Dr. Robson André Armino
Orientador

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias
Coorientador

Profa. Dra. Tatiana Cardoso e Bufalo
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2022**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Siva, Izabelly Christiny da.

Síntese de nanofibras de poli(álcool vinílico) incorporadas com nanopartículas de óxidos de ferro e enzimas fúngicas para a nanobiorremediação de solos contaminados com derivados de petróleo / Izabelly Christiny da Silva. - 2022.

72 p. : il.

Orientador(a): Robson André Armino.

Coorientador(a): Eustáquio Souza Dias, Tatiana Cardoso e Bufalo.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Biorremediação. 2. Fiação por sopro em solução. 3. Nanofibras. I. Armino, Robson André. II. Dias, Eustáquio Souza. III. Cardoso e Bufalo, Tatiana. IV. Título.

IZABELLY CHRISTINY DA SILVA

**SÍNTESE DE NANOFIBRAS DE POLI(ÁLCOOL VINÍLICO) INCORPORADAS
COM NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDOS DE FERRO E ENZIMAS FÚNGICAS PARA
A NANOBIORREMEDIAÇÃO DE SOLOS CONTAMINADOS COM DERIVADOS DE
PETRÓLEO**

**SYNTHESIS OF POLY(VINYL ALCOHOL) NANOFIBERS INCORPORATED WITH
IRON OXIDE NANOPARTICLES AND FUNGAL ENZYMES FOR THE
NANOBIOREMEDIATION OF SOIL CONTAMINATED WITH PETROLEUM
DERIVATIVES**

Dissertação apresentada à Universidade
Federal de Lavras, como parte das
exigências do Programa de Pós-
Graduação em Física, área de
concentração em Física.

APROVADA em 29 de julho de 2022.
Dra. Tatiana Cardoso e Bufalo, UFLA
Dra. Ana Carolina Cortez Lemos, UFLA
Dr. Fabio Lucas Alves, NJU

Prof. Dr. Robson André Armino
Orientador

Prof. Dr. Eustáquio Souza Dias
Coorientador

Profa. Dra. Tatiana Cardoso e Bufalo
Coorientadora

**LAVRAS – MG
2022**

*À minha amada vovó Maria, que apesar
de não estar mais entre nós, estaria
orgulhosa de me ver chegar até aqui.
Dedico*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me dar o dom da vida, por me amar incondicionalmente e sempre escolher o melhor para mim.

À minha mãe, Izabel Silva, que sempre esteve ao meu lado, sendo minha maior incentivadora. À minha irmã, minha pequena Liz Maria, que alegra os meus dias com seu sorriso banguelo. À minha tia Jociléia, pelo apoio. Aos meus avós, Aurindo e Maria (*in memoriam*) por nunca medirem esforços para me ajudar. Sou honrada em ter vocês na minha vida.

Ao meu namorado, Lucas Oliveira, pela atenção, paciência e por todo o amor dedicado a mim. A vida ao seu lado é mais leve.

Ao meu orientador, Robson Armindo, pela orientação e apoio.

À minha coorientadora, Tatiana Cardoso, por acreditar no potencial do nosso projeto e pela oportunidade de crescer na minha vida acadêmica e profissional.

Ao meu coorientador, Eustáquio Dias, por disponibilizar o laboratório e sempre estar disposto a auxiliar na realização dos experimentos.

Aos professores participantes das bancas examinadoras de qualificação do projeto e defesa da dissertação: Prof. Dr. Joaquim Paulo da Silva (UFLA), Profa. Dra. Ângela Dayana Barrera de Brito (UFLA), Prof. Dr. Julio César Ugucioni (UFLA), Dra. Ana Carolina Cortez Lemos (UFLA) e Dr. Fabio Lucio Alves (NJU). Obrigada pelas contribuições que ajudaram na melhoria desse trabalho.

À minha amiga, Gláucia, pela parceria e experiências trocadas. Obrigada por viver esta aventura comigo.

Às minhas companheiras de apartamento e amigas, Victória e Isadora, por todos os momentos compartilhados, pelos sorrisos e brincadeiras. Vocês são incríveis.

Aos meus colegas de mestrado, em especial, aos meus amigos Lucas Gastaldon e Helena Rabelo, por sempre estarem dispostos a me ajudar. Levarei vocês no meu coração.

Aos alunos de iniciação científica, Matheus Siqueira, Mylene Ladislão e Amanda Fernandes, por toda a ajuda na parte experimental do projeto.

À equipe Inovafungi pela partilha de conhecimento.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela oportunidade de realizar esse sonho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Lavras pelas oportunidades oferecidas durante o mestrado.

Ao Laboratório de Microbiologia Agrícola (DBI-UFLA), em especial aos colegas do BioFungi, por tornarem a rotina no laboratório mais prazerosa.

Ao Laboratório de Energias Renováveis e Materiais Avançados (DFI-UFLA), pela estrutura oferecida para o desenvolvimento deste projeto de pesquisa e ao doutorando Caio, pela paciência e disponibilidade para me auxiliar com a técnica SBS.

Ao Laboratório de Fisiologia de Plantas Cultivadas (DBI-UFLA), pela disponibilidade. Ao Paulo e à Tais pela ajuda com o leitor de Elisa.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME-UFLA), ao Laboratório de Química Inorgânica (DQI-UFLA) e à Central de Análise e Prospeção Química (CAPQ-DQI) pelas caracterizações realizadas.

Ao Laboratório Multiusuário de Análises Instrumentais (EENG/UFLA) pela realização das análises cromatográficas.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

*"Até aqui nos ajudou o Senhor."
(I Samuel 7:12)*

RESUMO

A remediação de solos contaminados por derivados de petróleo representa um dos maiores desafios na área ambiental, e motiva pesquisas que buscam soluções mais eficientes com menores impactos ambientais. Neste contexto, a nanobiorremediação é uma estratégia que alia a aplicação de nanopartículas com a biorremediação para uma remediação eficiente e sustentável. O presente estudo versa o desenvolvimento de uma técnica integrada de nanobiorremediação para aplicação em solos contaminados com derivados de petróleo. Em particular, visa a síntese de nanofibras de poli(álcool vinílico) (PVA) por meio da fiação por sopro em solução incorporadas com nanopartículas de óxidos de ferro biossintetizadas por fungos e enzimas fúngicas. Deste modo, o processo de degradação ocorre em dois estágios distintos da vida útil da nanofibra: em sua fase íntegra, a degradação dos derivados de petróleo ocorre por meio das enzimas imobilizadas na nanofibra, ao passo que a biodegradação natural do PVA causada pela própria umidade do solo permite a liberação lenta de nanopartículas remediadoras de derivados de petróleo. A estratégia visa potencializar o processo de degradação dos derivados de petróleo no solo de forma ambientalmente amigável e sem a introdução de microrganismos no local contaminado. As nanopartículas de óxidos de ferro apresentaram tamanho médio de 14nm. As nanofibras apresentaram um diâmetro médio de 213nm, 200nm e 267nm para o PVA puro, PVA com filtrado fúngico e para PVA com filtrado fúngico e nanopartículas de óxidos de ferro, respectivamente. As nanofibras foram analisadas quanto ao potencial de degradação do óleo diesel. A integração das estratégias pode ser pensada como uma forma de amenizar os problemas de remediação, uma vez que as abordagens integradas podem superar as desvantagens das tecnologias individuais e fornecer melhores resultados. Portanto, esta pesquisa teve como resultado um biomaterial avançado para aplicação na remediação de solos contaminados com derivados de petróleo.

Palavras-chave: Biorremediação. Fiação por sopro em solução. Nanofibras. Nanopartículas de óxidos de ferro. Nanorremediação. Solos contaminados com derivados de petróleo.

ABSTRACT

The remediation of soils contaminated by petroleum derivatives represents one of the greatest challenges in the environmental area and motivates research that seeks more efficient with lower environmental impacts. In this context, nanobioremediation is a strategy that combines the application of nanoparticles to bioremediation for an efficient and sustainable remediation. The present study deals with the development of an integrated technique of nanobioremediation to be applied in soils contaminated with petroleum derivatives. In particular, the study aims at the synthesis of poly(vinyl alcohol) nanofibers (PVA) by solution blow spinning incorporated with iron oxide nanoparticles biosynthesized by fungi and fungal enzymes. Thus, the degradation process takes place at two distinct stages of the nanofiber's lifespan: in its entirety, the degradation of petroleum derivatives occurs through the enzymes immobilized in the nanofiber, while the natural biodegradation of PVA caused by soil moisture itself allows the slow release of nanoparticles capable to remedy soils contaminated by petroleum derived products. The strategy aims to enhance the process of degradation of petroleum derivatives in the soil in an eco-friendly way and without introducing microorganisms into the contaminated site. The iron oxide nanoparticles had an average size of 14nm. The nanofibers showed a mean diameter of 213nm, 200nm and 267nm for pure PVA, PVA with fungal filtrate and for PVA with fungal filtrate and iron oxide nanoparticles, respectively. The nanofibers produced in this study were analyzed regarding their degradation potential of diesel oil. The integration of strategies can be thought of as a way of diminishing the issues associated with remediation, as integrated approaches can overcome the disadvantages individual technologies and provide better results. Therefore, this research resulted in an advanced biomaterial with great potential to be used in soils contaminated with petroleum derivatives.

Keywords: Bioremediation. Solution Blow Spinning. Nanofibers. Iron oxide nanoparticles. Nanoremediation. Soils contaminated with petroleum derivatives.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Estrutura da magnetita	22
Figura 2.2 – Estrutura da hematita	22
Figura 2.3 – Curva de histerese	24
Figura 2.4 – Esquema das abordagens de síntese de nanopartículas	24
Figura 2.5 – Métodos de síntese de nanopartículas	25
Figura 2.6 – Mecanismos de síntese de nanopartículas por fungos	27
Figura 2.7 – Esquema do aparelho utilizado na técnica SBS	30
Figura 3.1 – Fungos crescidos em placas de Petri	32
Figura 3.2 – Meio de cultura sólido	33
Figura 3.3 – Fungo repicado em placa de Petri	34
Figura 3.4 – Extrato livre de células fúngicas	37
Figura 3.5 – Solução polimérica 1	38
Figura 3.6 – Solução polimérica 2	38
Figura 3.7 – Solução polimérica 3	39
Figura 3.8 – Visão geral - SBS	39
Figura 3.9 – Ensaio de avaliação do potencial de degradação dos derivados de petróleo pelas nanofibras	44
Figura 4.1 – Curvas de produção de lacase pelos fungos ao utilizar glicose e diesel como fonte de carbono	46
Figura 4.2 – Curvas de produção de lignina peroxidase pelos fungos ao utilizar glicose e diesel como fonte de carbono	47
Figura 4.3 – Curvas de produção de manganês peroxidase pelos fungos ao utilizar glicose e diesel como fonte de carbono	48
Figura 4.4 – Teste de degradação do óleo diesel pelo fungo <i>Aspergillus Niger</i> . . .	50
Figura 4.5 – Mudança de cor da solução	51
Figura 4.6 – Solução contendo as nanopartículas de óxidos de ferro	51
Figura 4.7 – Espectros de absorção do filtrado fúngico e das nanopartículas de óxidos de ferro	52
Figura 4.8 – Micrografias das nanopartículas de óxidos de ferro. Magnificação de 100kx.	53
Figura 4.9 – Distribuição de tamanhos das nanopartículas de óxidos de ferro . .	53

Figura 4.10 – Composição elementar das nanopartículas de óxidos de ferro	54
Figura 4.11 – Espectros de FTIR das nanopartículas de óxidos de ferro	55
Figura 4.12 – Nanofibras obtidas pela técnica de SBS.	56
Figura 4.13 – Micrografias e diâmetro médio das nanofibras. Magnificação de 10kx.	56
Figura 4.14 – Micrografias das nanofibras. Magnificação de 100kx.	57
Figura 4.15 – Composição elementar das nanofibras	58
Figura 4.16 – Espectros de FTIR das nanofibras obtidas pelo método SBS	59
Figura 4.17 – Teste de degradação do óleo diesel pelas nanofibras	60
Figura 4.18 – Cromatogramas do óleo diesel após 15 dias de degradação.	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Parâmetros utilizados para obtenção das nanofibras.	40
Tabela 3.2 – Condições utilizadas na cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa para biodegradação do óleo diesel.	45
Tabela 4.1 – Avaliação da imobilização das enzimas ligninolítica nas nanofibras poliméricas.	59

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
2.1	O solo	14
2.1.1	Contaminação dos solos por derivados de petróleo	15
2.2	Técnicas de remediação de solos contaminados por derivados de petróleo	16
2.3	Biorremediação de solos contaminados por derivados de petróleo	17
2.3.1	Utilização de fungos na remediação de solos contaminados por derivados de petróleo	18
2.4	Nanorremediação	20
2.4.1	Nanopartículas de óxidos de ferro	21
2.4.2	Propriedades magnéticas das nanopartículas	23
2.5	Síntese de nanopartículas	24
2.5.1	Miconanotecnologia: Síntese de nanopartículas por fungos	26
2.6	Nanobiorremediação: a combinação de nanomateriais e biorremediação	27
2.7	Nanofibras poliméricas	28
2.7.1	Técnica de fiação por sopro em solução (SBS)	29
3	MATERIAIS E MÉTODOS	32
3.1	Microrganismos	32
3.2	Processo de repicagem dos fungos	32
3.3	Determinação da atividade das enzimas ligninolíticas	34
3.3.1	Cultivo dos fungos para produção de enzimas ligninolíticas	34
3.3.2	Atividade enzimática da lacase	35
3.3.3	Atividade enzimática da lignina peroxidase	35
3.3.4	Atividade enzimática da manganês peroxidase	35
3.4	Avaliação do potencial de degradação dos derivados de petróleo	36
3.5	Preparação dos nanobiorremediadores	36
3.5.1	Síntese de nanopartículas de óxidos de ferro	36
3.6	Síntese de nanofibras por meio do método de fiação por sopro em solução (SBS)	37
3.6.1	Preparação das soluções	37
3.6.2	Fiação por SBS	39

3.7	Caracterização dos nanobiorremediadores	40
3.7.1	Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis)	40
3.7.2	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	41
3.7.3	Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS)	41
3.7.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	42
3.7.5	Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)	43
3.8	Avaliação do potencial de degradação dos derivados de petróleo pelas nanofibras	43
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1	Avaliação quantitativa da produção de enzimas ligninolíticas	46
4.2	Avaliação do potencial de degradação dos derivados de petróleo	49
4.3	Síntese de nanopartículas de óxidos de ferro	50
4.4	Síntese de nanofibras por meio do método de fiação por sopro em solução (SBS)	55
4.5	Avaliação do potencial de degradação dos derivados de petróleo pelas nanofibras	60
5	CONCLUSÃO	63
6	PERSPECTIVAS FUTURAS	64
	REFERÊNCIAS	65

1 INTRODUÇÃO

O petróleo se destaca como a principal fonte de energia do mundo, servindo de matéria-prima para diversos produtos, tais como: óleo diesel, gasolina, lubrificantes, tintas, parafinas, querosene, medicamentos, cosméticos, dentre outros (MARTINS et al., 2015). No entanto, o petróleo contém em sua composição contaminantes como enxofre, metais pesados, hidrocarbonetos aromáticos e alifáticos, que geram grandes riscos para o meio ambiente que podem ocorrer desde o processo de extração, transporte, refino, até o consumo (WU et al., 2016). Os derramamentos e vazamentos dos derivados de petróleo são provenientes de tanques, filtros, bombas de abastecimento de combustível e lavagem de veículos (SILVA, 2021). Sendo assim, a indústria do petróleo é considerada uma grande geradora de poluição no ar, na água e no solo.

A remediação de solos contaminados por derivados de petróleo representa um dos maiores desafios na área ambiental, devido à complexidade do solo e dos compostos envolvidos (MAGALHÃES, 2020). Em função disso, existem diversas tecnologias destinadas ao tratamento destes solos contaminados, como oxidação química, extração de vapores no solo, entre outras. As técnicas existentes para remediação de ambientes contaminados podem possuir custos elevados, baixa eficiência e produção de produtos secundários que necessitam de tratamento adicional. Além disso, a utilização de reagentes químicos pode afetar negativamente a qualidade do solo (WU et al., 2010).

Alternativas para remediação de solos contaminados com derivados de petróleo que buscam minimizar os impactos ambientais têm se destacado nos últimos anos. Neste contexto, a biorremediação vem ganhando espaço como uma alternativa sustentável para amenizar os problemas de contaminação causados por poluentes (QUINTELLA; MATA; LIMA, 2019). O processo de biorremediação pode ser definido como o uso de microrganismos para biodegradar poluentes ambientais do solo, água e sedimentos. Em especial, os fungos filamentosos são considerados bons degradadores de derivados de petróleo. Os fungos são microorganismos que secretam enzimas extracelulares, denominadas enzimas ligninolíticas, que podem contribuir para a transformação e degradação de compostos tóxicos (PASSARINI et al., 2015).

Por outro lado, a aplicação da nanotecnologia é vista como uma alternativa promissora para a remediação de áreas contaminadas com derivados de petróleo, uma vez que, as nanopartículas possuem propriedades físicas e químicas únicas,

possibilitando a remoção de contaminantes (IORIO et al., 2019). Neste caso, as nanopartículas de óxidos de ferro possuem potencial para degradar poluentes de forma eficiente devido à grande área superficial, alta capacidade de redução, baixa toxicidade e propriedades magnéticas (ROBINSON et al., 2020; GALDAMES et al., 2020; GIL-DÍAZ et al., 2022).

O uso de uma única estratégia pode não ser viável, devido a baixa eficiência e altos investimentos. Assim, é necessário desenvolver e utilizar técnicas combinadas que envolvam a aplicação de duas ou mais tecnologias para superar as limitações individuais. A nanobiorremediação é uma técnica de remediação que busca a redução da concentração de contaminantes com base na combinação dos benefícios da nanotecnologia e da biorremediação (RAJPUT et al., 2022). Portanto, é uma abordagem eficiente e sustentável para remediação de solos contaminados com derivados de petróleo (GUL; RUPULA; RAO, 2022).

Este projeto de pesquisa tem como objetivo o desenvolvimento de uma estratégia para aplicação na nanobiorremediação de solos contaminados com derivados de petróleo, combinando as propriedades das nanopartículas de óxidos de ferro e da biorremediação com enzimas produzidas pelos fungos.

A estratégia proposta consiste na síntese de nanofibras de poli(álcool vinílico) (PVA) incorporadas com nanopartículas de óxidos de ferro biossintetizadas por fungos e enzimas fúngicas por meio do método de fiação por sopro em solução (SBS – *Solution Blow Spinning*). O PVA é um polímero sintético, biodegradável, biocompatível e não tóxico que apresenta boa capacidade de formação de nanofibras (NIRANJAN et al., 2019; ADAMU et al., 2021). Além disso, é um dos poucos polímeros solúveis em água com boas características interfaciais e mecânicas (LIU; ZHANG; GUO, 2022).

O processo de degradação ocorre em dois estágios distintos da vida útil da nanofibra: em sua fase íntegra, a degradação dos derivados de petróleo ocorre por meio das enzimas imobilizadas na nanofibra, ao passo que a biodegradação natural do PVA causada pela própria umidade do solo permite a liberação lenta de nanopartículas remediadoras de derivados de petróleo. A estratégia visa potencializar o processo de degradação de forma ambientalmente amigável e sem a introdução de microrganismos no local contaminado.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O solo

O solo pode ser definido como a camada superficial da crosta terrestre gerado do intemperismo de rochas associado a agentes orgânicos e biológicos por diversos ciclos naturais. É o resultado das inúmeras combinações de fatores (clima, organismos, tempo e relevo) e de processos (remoção, adição, transporte e transformação) que atuam sobre os materiais de origem (rochas, sedimentos e depósitos orgânicos) e condicionam a diversidade de solos encontrados (PEDRON et al., 2004).

Os solos são fisicamente constituídos por três fases: sólida (mineral e orgânica), líquida (solução do solo) e gasosa (atmosfera do solo). Normalmente, a fase sólida ocupa em média 40-60% do volume total do solo, sendo que 40-50% são representados por minerais e 0-5% por matéria orgânica. O restante do volume do solo é ocupado pelas fases líquida e gasosa (PREVEDELLO; ARMINDO, 2015).

As partículas sólidas do solo são medidas por uma escala granulométrica definindo sua granulometria. Normalmente, distinguem-se três classes granulométricas principais: a areia, o silte e a argila. A textura do solo representa os teores de cada fração do tamanho de partículas. Os solos com diferentes teores de areia, silte e argila são classificados em diferentes classes texturais.

A matéria orgânica engloba uma grande variedade de seres vivos (bactérias, fungos, protozoários, entre outros). Os organismos do solo, em especial os microrganismos, são responsáveis pela decomposição de resíduos orgânicos e pela síntese de moléculas orgânicas com propriedades importantes como a capacidade de retenção de água, poder tamponante do solo¹ e uma fonte de nutrientes para a microbiota (BARROS, 2007).

A fase líquida está relacionada com a umidade do solo e é representada pela água ou solução do solo. A fase líquida pode completar integralmente ou parcialmente os poros do solo. O solo é dito saturado quando todos os poros estão preenchidos por água, e não saturado quando os poros estão parcialmente preenchidos por água. A fração de ar caracteriza a porosidade de aeração do solo ou porosidade livre de água, contendo vapor d'água e gases como dióxido de carbono, oxigênio, nitrogênio e traços

¹ Capacidade de resistir a alteração de pH por fatores externos.

de outros. Essas duas fases (líquida e gasosa) são complementares, ou seja, a máxima presença de uma resulta na ausência da outra (PREVEDELLO; ARMINDO, 2015).

As características e propriedades físicas do solo (textura, porosidade, densidade, permeabilidade ao fluxo de água, ar e calor) são responsáveis pelos mecanismos de atenuação física de poluentes, como filtração e lixiviação, possibilitando ainda condições para que os processos de atenuação química e biológica possam ocorrer (CETESB, 2020).

Dessa forma, o solo é um recurso natural fundamental à vida e ao equilíbrio do planeta, devido a sua capacidade de armazenar água, transmitir calor, trocar gases com a atmosfera, permitir a presença de macro e microrganismos, o crescimento de plantas, a produção de alimentos, além de contribuir para a fotossíntese e a redução do efeito estufa pelo sequestro de carbono na matéria orgânica (RODRIGUES; DUARTE, 2003). Portanto, a conservação do solo e a limitação dos processos de degradação deste recurso são imprescindíveis para um desenvolvimento sustentável.

2.1.1 Contaminação dos solos por derivados de petróleo

A contaminação do solo é atribuída a presença considerável de algum elemento ou substância - incorporados acidentalmente ou intencionalmente - que pode afetar componentes bióticos do ecossistema. Para o controle dessa contaminação, certos padrões e indicadores de qualidade do solo devem ser respeitados em um determinado local. A introdução de contaminantes no solo pode acarretar na perda de várias de suas funções e ainda provocar contaminação de águas subterrâneas (BRAGA et al., 2002).

As atividades de exploração, produção, refino e transporte de petróleo e de seus derivados apresentam riscos ambientais devido à existência de constituintes tóxicos em sua composição, assim como em seus resíduos (SANTANA et al., 2020). O petróleo é uma mistura de compostos sólidos, líquidos e gasosos que ocorre em rochas sedimentares em depósitos ao redor de todo o mundo (RODRIGUES, 2014). Do ponto de vista químico, o petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos² que pode ser dividida em quatro classes principais: saturados, aromáticos, resinas e asfaltenos (MORAIS, 2005).

Os hidrocarbonetos de petróleo, incluindo aqueles que são policíclicos aromáticos, são considerados poluentes ambientais perigosos pela Agência Norte Americana de

² Os hidrocarbonetos incluem compostos formados por carbono e hidrogênio com propriedades químicas e físicas definidas pelo número de átomos e arranjo das moléculas.

Proteção Ambiental - USEPA (*United States Environmental Protection Agency*) e por muitas outras organizações ambientais mundiais. Visto que, em função da sua estrutura química complexa, da sua baixa solubilidade em água e da forte tendência de sorção³ à fase sólida do solo, tornam-se resistentes e permanecem por longos períodos no ambiente, o que aumenta a possibilidade de exposição de humanos e animais a esses compostos (JACQUES et al., 2007).

Os derivados de petróleo representam fontes significativas de contaminação dos solos (GONZAGA, 2013). Esses compostos são persistentes no ambiente, possuem alta mobilidade e afetam a composição química do solo. Por este motivo, a contaminação dos solos por derivados de petróleo tornou-se uma das grandes preocupações ambientais, pois tais compostos são fontes significativas de poluição ambiental, representam riscos ao ambiente e à vida devido sua toxicidade e mutagenicidade (SOUSA; JÚNIOR; SANTOS, 2020). Sendo assim, medidas de preservação são necessárias para evitar a presença desses compostos no ambiente (MORAIS, 2005).

2.2 Técnicas de remediação de solos contaminados por derivados de petróleo

O processo de remediação e por conseguinte, a recuperação das áreas contaminadas, é lento e depende da capacidade de restabelecimento do solo, onde as características químicas, físicas e biológicas se recompõem a um nível mínimo, permitindo o desenvolvimento de espécies vegetais e da atividade microbiana (FILHO et al., 2010). Desta forma, a recuperação ambiental está relacionada ao desafio de reconstruir a estrutura e criar condições para que se restabeleçam os processos ecológicos naturais de cada ecossistema (ALVES, 2006; SOARES et al., 2011).

Neste contexto, destaca-se algumas das tecnologias de remediação que são empregadas atualmente para o tratamento de solos contaminados por derivados de petróleo: oxidação química in-situ, extração de vapores no solo, biorremediação, entre outras (ANDRADE; AUGUSTO; JARDIM, 2010).

A oxidação química baseia-se na injeção de oxidantes químicos em meios contaminados, com a finalidade de degradar o contaminante por meio de reações químicas e convertê-lo em substâncias inertes. Caso exista um sistema de irrigação

³ O termo sorção é utilizado para referir aos diversos mecanismos de retenção de íons e moléculas pela fase sólida.

instalado no local contaminando, uma outra forma de aplicar os produtos químicos seria utilizando a quimigação, que é uma técnica de aplicação de produtos químicos e biológicos por meio da água de irrigação (VIEIRA; SILVA, 2006). A extração de vapores no solo é uma técnica de remediação *in situ* utilizada na redução da concentração de compostos orgânicos voláteis presentes nos solos de zonas não saturadas (SANCHES, 2009).

A biorremediação se destaca por ser uma alternativa sustentável e econômica para a remediação de locais contaminados (FRANCISCO; QUEIROZ, 2018). Essa técnica se baseia na utilização de populações microbianas que possuem a habilidade de modificar ou decompor determinados poluentes. Entre os métodos mais recentes de remediação, a nanotecnologia, ou seja, o uso de nanomateriais, é ambientalmente atrativa para ser aplicada na remediação de uma grande variedade de contaminantes, promovendo a redução dos custos e o aumento da eficiência do processo (KARN; KUIKEN; OTTO, 2009). A técnica de nanorremediação utiliza as propriedades das nanopartículas, como tamanho nanométrico, grande área superficial e potencial redutor, para a degradação de contaminantes (PANAHI et al., 2018). Portanto, essa estratégia pode fornecer uma solução sustentável para a contaminação ambiental (GUERRA et al., 2018).

2.3 Biorremediação de solos contaminados por derivados de petróleo

A biorremediação pode ser definida como um conjunto de tecnologias que utilizam processos biológicos aplicados à recuperação ou remediação de áreas contaminadas. Para isso, em geral, utilizam-se microrganismos, plantas ou produtos biológicos, como enzimas e componentes celulares⁴ (DIAS, 2000; QUINTELLA; MATA; LIMA, 2019).

Essa técnica tem como principal objetivo utilizar a capacidade intrínseca dos microorganismos de decompor matéria orgânica para degradar compostos tóxicos. É uma abordagem ecologicamente aceitável para a remediação de solos contaminados por derivados de petróleo porque é simples de manter, possui aplicação em grandes áreas, baixo custo, além da possibilidade de provocar a destruição completa do contaminante (BENTO et al., 2005).

⁴ Os componentes celulares são as biomoléculas complexas e estruturas que compõem as células, também podem ser chamados de matéria biológica ou material biológico.

No tratamento biológico de solos contaminados por derivados de petróleo, os microrganismos utilizam os contaminantes como fonte alternativa de carbono e energia para formação de biomassa. Esse metabolismo transforma-os em unidades menores e, posteriormente, a incorporação como material celular (biotransformação) ou conversão a gás carbônico (mineralização), resultando na redução de sua concentração (MARTINS et al., 2003).

De acordo com o tipo de tratamento, as técnicas de biorremediação podem ser *in situ* ou *ex situ*, adotadas considerando não só os poluentes, mas o custo dos processos e a concentração final do contaminante ao término do tratamento. O processo denominado *in situ* ocorre no local contaminado e pode acontecer de forma intrínseca ou engenhada. O processo *ex situ* é aquele realizado fora do local contaminado e acontece apenas de forma engenhada (BARROS, 2007).

Apesar de apresentar inúmeras vantagens, o uso da biorremediação pode ser limitado por muitos fatores, dentre os quais se destacam: as características físico-químicas, concentração e biodisponibilidade do contaminante; as propriedades dos constituintes do solo, pH, temperatura, umidade e concentração de oxigênio e de nutrientes minerais; e a presença de microrganismos com capacidade de degradar o contaminante (BENTO et al., 2005).

Entre as estratégias para biorremediação natural e de baixo custo está o uso de tecnologias como atenuação natural, bioestimulação, bioventação, bioaumentação, *landfarming*, compostagem e fitorremediação (JACQUES et al., 2007).

2.3.1 Utilização de fungos na remediação de solos contaminados por derivados de petróleo

Os fungos são microrganismos de grande interesse científico presentes no solo, nas plantas, em organismos em decomposição e na água, também são encontrados em ambientes mais extremos, como os de baixas temperaturas, os muito quentes, os de alta salinidade ou mesmo os muito ácidos (SILVEIRA, 1995; DRES; LA; MACI, 2019).

Todos os fungos são heterotróficos, necessitando de materiais orgânicos, que servem como fonte de energia e como constituintes celulares. Devido à rigidez da parede celular, sua nutrição acontece por absorção, depois que as substâncias são parcialmente

digeridas no exterior das paredes celulares por enzimas produzidas pelos próprios fungos de maneira que possam ser absorvidas (BENEVIDES; MARINHO, 2015).

Os fungos necessitam de duas classes de nutrientes: os macronutrientes e os micronutrientes. Os macronutrientes são: carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo, potássio, nitrogênio, enxofre e magnésio, dos quais o primeiro é mais exigido, por ser um elemento estrutural, associado ao hidrogênio, oxigênio e nitrogênio. Entre os micronutrientes, são citados: ferro, cobre, manganês, zinco e molibdênio (PUTZKE; PUTZKE, 2002; QUEIROZ; SOUSA, 2020).

Os fungos apresentam grande importância ecológica devido a sua capacidade em secretar enzimas capazes de degradar e desestabilizar moléculas orgânicas persistentes. Para que ocorra o processo de degradação, os fungos assimilam os derivados de petróleo como única fonte de carbono e energia (SINGH, 2006). Para que os derivados de petróleo sejam utilizados como fonte de carbono e energia é importante que os microrganismos possuam enzimas específicas para transformar as moléculas complexas desses compostos em intermediários comuns das suas rotas metabólicas (JACQUES et al., 2007).

Os fungos lignolíticos compreendem espécies capazes de oxidar a lignina, que é um composto poliaromático natural presente na madeira e em outras matérias orgânicas, para isso os fungos produzem enzimas ligninolíticas extracelulares (BAMFORTH; SINGLETON, 2005). Desta forma, o mecanismo de degradação dos derivados de petróleo pelas enzimas ligninolíticas é semelhante ao da oxidação da lignina (PENG et al., 2008). Logo, foi assumido que esses organismos poderiam degradar os derivados de petróleo usando os mesmos sistemas enzimáticos (COHEN; PERSKY; HADAR, 2002).

Existem dois tipos de enzimas ligninolíticas: peroxidases e lacases. Essas enzimas são secretadas extracelularmente e oxidam a matéria orgânica por meio de uma reação não específica baseada em radicais. Existem dois tipos principais de enzima peroxidase, dependendo do tipo de substrato redutor, a lignina peroxidase (LiP) e a manganês peroxidase (MnP) (BAMFORTH; SINGLETON, 2005). Sendo assim, as enzimas ligninolíticas são capazes de degradar os derivados de petróleo.

Há um interesse significativo no uso de fungos ligninolíticos para degradar os derivados de petróleo, pois eles têm baixa especificidade de substrato e, portanto, são capazes de degradar até mesmo os compostos mais recalcitrantes. Portanto, a utilização

de fungos é uma alternativa biológica viável para a remediação de solos contaminados, devido ao seu alto potencial degradativo (BRITO et al., 2004).

2.4 Nanorremediação

A pesquisa e o desenvolvimento em nanotecnologia visam manipular a matéria em nível atômico e integrá-los para formar componentes e sistemas maiores, oferecendo uma perspectiva de grandes avanços que permitem melhorar a qualidade de vida e ajudar a preservar o meio ambiente. O termo nanotecnologia foi utilizado pela primeira vez em 1974, pelo professor Norio Taniguchi em um artigo que descrevia as tecnologias que permitiam a construção de objetos na escala de um nanômetro (TANIGUCHI, 1974).

As descobertas da nanotecnologia despertaram interesse econômico e político modificando a forma como os diversos tipos de materiais são utilizados. Embora composto do mesmo elemento químico que as moléculas maiores, quando em escala nanométrica, os materiais apresentam comportamento muito distinto de suas conhecidas propriedades físicas e químicas. Estas alterações modificam a natureza das interações das forças entre as moléculas do material, o que pode influenciar seu impacto sobre o ambiente, saúde humana e a sociedade (ALMEIDA, 2019).

A nanotecnologia expande a ciência de materiais para o domínio de partículas e interfaces com dimensões extremamente pequenas, de grandeza nanométrica (1-100 nm)⁵. Os materiais nanoestruturados apresentam pelo menos uma de suas dimensões em tamanho nanométrico.

As nanopartículas possuem propriedades físicas e químicas únicas e, portanto, têm recebido atenção por suas possíveis aplicações em muitos campos da ciência e da engenharia. Uma área de interesse crescente é a aplicação de nanopartículas na remediação de áreas contaminadas (SHIPLEY; ENGATES; GUETTNER, 2010).

O uso de nanopartículas para a remoção de contaminantes do solo tornou-se destaque devido ao seu tamanho, alta superfície específica, alta capacidade de absorção, fácil injeção no local de ação, flexibilidade para aplicação, entre outros fatores (SINGH; MISRA, 2014). Além disso, as nanopartículas apresentam grande capacidade adsorvente

⁵ Nano (do grego: “anão”) é um prefixo usado nas ciências para designar uma parte em um bilhão, dessa forma um nanômetro (1nm) corresponde a um bilionésimo de um metro.

proveniente de sua considerável superfície de contato, grande resistência mecânica, atividade catalítica e magnetismo (RODOVALHO, 2015).

As tecnologias de remediação que utilizam nanopartículas podem ser divididas em dois grupos com base na reação química envolvida. O primeiro grupo diz respeito às tecnologias redutivas que usam as nanopartículas como doadoras de elétrons para transformar ou converter o contaminante em uma forma menos tóxica e menos móvel. A segunda, é a tecnologia de estabilização e sorção usando nanopartículas como um agente de sorbente, coprecipitante ou imobilizante do contaminante (CUNDY; HOPKINSON; WHITBY, 2008).

Existem evidências comprovadas sobre a efetividade e eficácia da aplicação de nanopartículas em processos de remediação de solos contaminados por metais pesados, contaminantes inorgânicos, orgânicos e emergentes, sendo que se tem observado o uso predominante de nanopartículas à base de ferro (MANFRON et al., 2020).

2.4.1 Nanopartículas de óxidos de ferro

Os óxidos de ferro são compostos amplamente distribuídos na natureza formados pela combinação do elemento ferro (Fe) com o oxigênio (O) e/ou grupos hidroxilas (OH). Dentre os tipos de óxidos de ferro, os mais comuns são a magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma - Fe_2O_3$) e hematita ($\alpha - Fe_2O_3$) (WU et al., 2015).

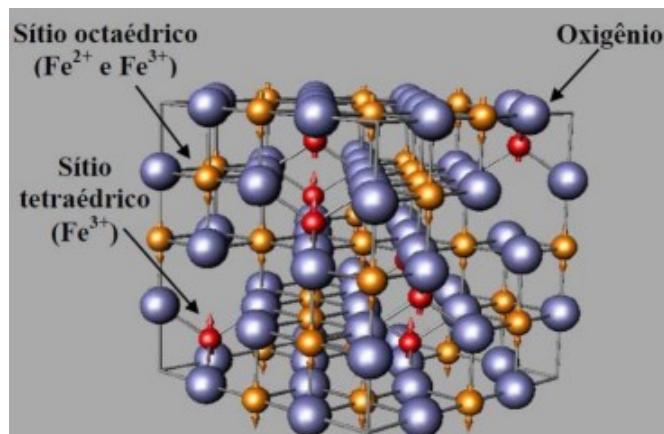
A magnetita é o mineral ferrimagnético ⁶ mais importante da natureza e está presente em rochas ígneas, sedimentares e metamórficas. A sua fórmula química é Fe_3O_4 , sendo dois íons de Fe^{3+} e um íon de Fe^{2+} . A magnetita apresenta estrutura espinélio inversa formando uma rede cúbica de face centrada (FILHO, 2020). Os íons Fe^{2+} ocupam sítios octaédricos, enquanto os íons Fe^{3+} dividem-se igualmente entre os sítios octaédricos e tetraédricos, como mostra a Figura 2.1.

A maghemita ($\gamma - Fe_2O_3$) possui propriedades físicas semelhantes à magnetita, ambas são ferrimagnéticas e possuem estrutura cúbica do tipo espinélio invertido. No entanto, na maghemita a estrutura tipo espinélio invertido é deficiente em Fe^{3+} , pois não há cátions suficientes para o preenchimento de todos os sítios de coordenação

⁶ Os materiais ferrimagnéticos possuem dois tipos de sítios diferentes na rede cristalina que se alinham de forma antiparalela. Os momentos magnéticos dos dois tipos de sítios têm módulos diferentes e consequentemente o acoplamento antiparalelo resulta numa magnetização espontânea como no material ferromagnético (MORAIS, 2018).

octaédricos. Desta forma, a maghemita pode ser considerada como magnetita totalmente oxidada (WU et al., 2015).

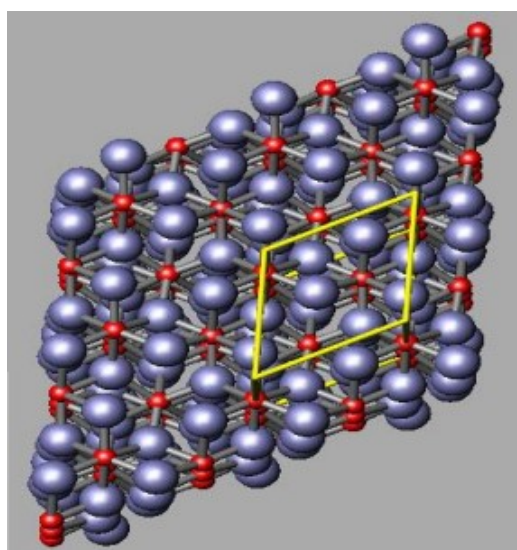
Figura 2.1 – Estrutura da magnetita



Legenda: Estrutura cristalina da magnetita (Fe_3O_4).
Fonte : (NETO, 2012)

A hematita ($\alpha - Fe_2O_3$) consiste em lâminas de octaedros compartilhando arestas, com dois terços dos sítios ocupados por Fe^{3+} e, o restante forma um arranjo regular com anéis hexagonais e octaedros, conforme apresentado na Figura 2.2. A hematita é um dos óxidos mais estáveis em condições ambientais e muitas vezes é a última etapa na transformação de outros óxidos (OLIVEIRA; FABRIS; PEREIRA, 2013).

Figura 2.2 – Estrutura da hematita



Legenda: Estrutura cristalina da hematita ($\alpha - Fe_2O_3$) .
Fonte : (CAZETTA, 2014)

As nanopartículas de óxidos de ferro são materiais que apresentam características importantes para aplicação em diversas áreas, apresentando vantagens em relação a outros óxidos, como facilidade de síntese, magnetismo, baixa toxicidade, biocompatibilidade e alta capacidade de adsorção (XU et al., 2012). Particularmente, as nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro apresentam baixo custo de produção, elevada estabilidade físico-química, possibilidade de funcionalização da superfície, além de facilidade de recuperação (LU; SALABAS; SCHUTH, 2007).

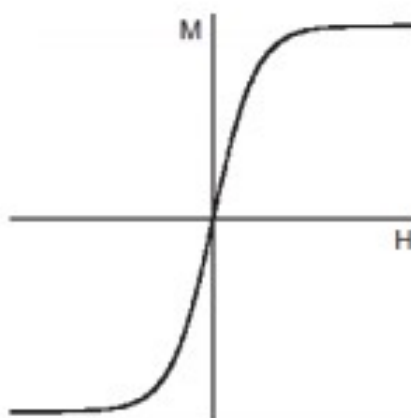
2.4.2 Propriedades magnéticas das nanopartículas

O magnetismo é uma propriedade fundamental da matéria, isso significa que todas as substâncias, independente do seu estado físico, apresentam características magnéticas em todas as temperaturas (STEIN, 2016). Esta é uma propriedade dos átomos que tem origem em sua estrutura atômica, sendo resultado da combinação do momento angular orbital e do momento angular de spin do elétron. A forma como ocorre a combinação entre esses momentos angulares determina como o material irá se comportar na presença de um campo magnético externo. De acordo com esse comportamento é possível definir as propriedades magnéticas dos materiais (HOLANDA et al., 2020).

As partículas magnéticas de dimensões nanométricas são caracterizadas por apresentarem o comportamento superparamagnético (LEITE, 2013). O superparamagnetismo é uma propriedade encontrada nas nanopartículas que faz com que estas sejam fortemente atraídas por um campo magnético externo, porém, assim que este campo é retirado, as partículas não apresentam mais magnetização. Ou seja, as partículas superparamagnéticas não apresentam magnetização remanescente (KNOBEL, 2000).

O material superparamagnético é caracterizado pela ausência de histerese e campo coercivo. Quando a nanopartícula encontra-se num estado superparamagnético, observa-se que sua histerese é fechada, as duas curvas estão superpostas (FIGURA 2.3). Dessa forma, é possível observar que o campo coercivo é zero, isto é, não é necessário aplicar campo magnético externo para desalinhar o momento magnético da partícula (BARBOSA, 2012).

Figura 2.3 – Curva de histerese

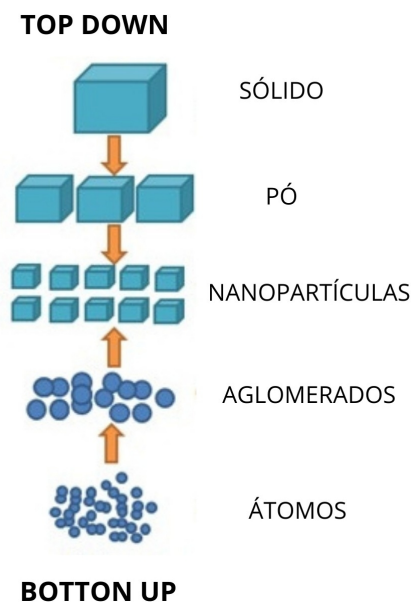


Legenda: Curva de histerese de materiais superparamagnéticos.
 Fonte : Adaptado de (PANKHURST et al., 2003)

2.5 Síntese de nanopartículas

A síntese de nanopartículas pode ser feita por meio de duas abordagens diferentes: *top-down* (de cima para baixo) e *bottom-up* (de baixo para cima). A Figura 2.4 mostra a ilustração esquemática das abordagens *top-down* e *bottom-up*.

Figura 2.4 – Esquema das abordagens de síntese de nanopartículas



Legenda: Esquema das abordagens *top-down* e *bottom-up* de síntese de nanopartículas.
 Fonte : Adaptado de (CONSOLINI, 2015)

A abordagem *top-down* consiste na produção de nanopartículas começando com tamanho grande de materiais e gerando nanopartículas por métodos físicos ou químicos.

A segunda abordagem, *bottom-up*, trata a produção de forma contrária, partindo de nanoestruturas e gerando estruturas maiores, por meio da síntese química, por exemplo (LI; ELLIOTT; ZHANG, 2006). Essa é a abordagem mais utilizada, pois permite controlar diversos parâmetros, como a distribuição de tamanho e forma das nanopartículas.

Os métodos de síntese de nanopartículas são: métodos químicos, físicos e biológicos. Na Figura 2.5, são apresentadas várias estratégias que são aplicadas para a síntese de nanopartículas.

Figura 2.5 – Métodos de síntese de nanopartículas



Legenda: Apresentação de diferentes métodos que são aplicadas na síntese de nanopartículas.

Fonte : Adaptada de (MAHGOUB, 2019)

Geralmente, os métodos químicos utilizam produtos nocivos ao ambiente, enquanto os métodos físicos são caros, possuem um alto consumo de energia e envolvem instrumentos experimentais complexos. Diante disso, devido à emergente necessidade de uma abordagem “verde” e sustentável, os métodos alternativos (verdes/biológicos) foram introduzidos e podem ser utilizados na produção de vários tipos de nanopartículas (GADE; DURAN; RAI, 2014).

A síntese verde de nanopartículas é uma abordagem *bottom-up* que utiliza produtos químicos relativamente atóxicos, biodegradáveis e de baixo custo para sintetizar nanomateriais, tendo como fonte organismos biológicos. Dentre os recursos biológicos disponíveis, estão os produtos vegetais e animais, algas, fungos e bactérias, que possuem potencial para utilização durante a síntese verde de nanopartículas (SILVA et al., 2017).

A síntese verde envolve três etapas principais, que devem ser avaliadas com base nas perspectivas da “química verde” (ALMEIDA, 2019):

- seleção do meio a ser utilizado como solvente;
- seleção de um agente redutor ecologicamente “correto”;
- seleção de substâncias não tóxicas que serão utilizadas na estabilização das nanopartículas sintetizadas.

A síntese verde de nanopartículas é um grande avanço em relação a outros métodos. Em contraste com os métodos químicos e físicos convencionais, esse é um método simples, consome menor energia e produz produtos e subprodutos mais seguros. Por isso, o método biológico é usado em diversas áreas, como produtos farmacêuticos, cosméticos, alimentos e aplicações médicas (YEW et al., 2020).

2.5.1 Miconanotecnologia: Síntese de nanopartículas por fungos

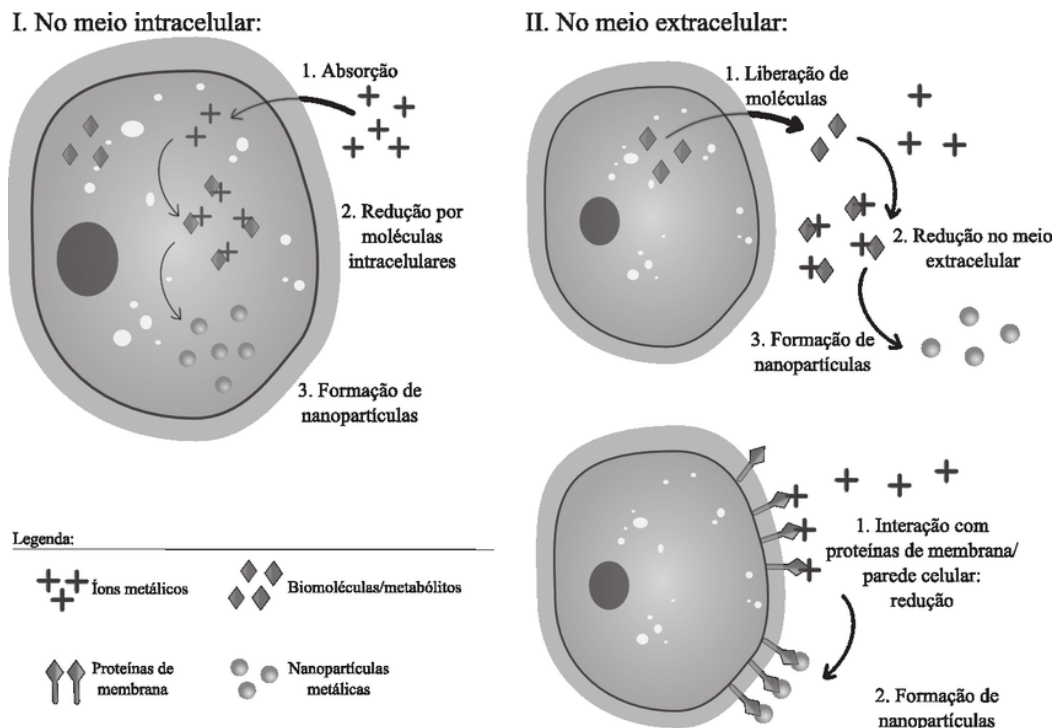
Miconanotecnologia (mico = fungos) é definida como a síntese de nanopartículas por fungos e sua posterior aplicação em determinada área. A miconanotecnologia possui um grande potencial devido à grande diversidade de fungos e a sua capacidade de produzir nanopartículas (RAI et al., 2009).

Os fungos apresentam inúmeras vantagens sobre outros organismos para sintetizar nanopartículas, pois são tolerantes a metais pesados, são relativamente fáceis de isolar e cultivar e, secretam grandes quantidades de enzimas intra ou extracelularmente, algumas das quais podem ser utilizadas para a síntese rápida e sustentável de nanopartículas (RAI et al., 2021). Geralmente, as nanopartículas são produzidas como resultado de reações entre a biomassa fúngica e as soluções aquosas de sais metálicos (ILLANA, 2015).

A síntese de nanopartículas por meio dos fungos pode ocorrer tanto intracelular quanto extracelularmente (FIGURA 2.6). A síntese intracelular de nanopartículas é iniciada com o aprisionamento de íons metálicos sobre a superfície da célula fúngica, provavelmente devido à interação eletrostática com as enzimas presentes na parede celular do fungo. Na próxima etapa, os íons metálicos são reduzidos pelas enzimas dentro da parede celular, o que leva à agregação de íons metálicos e formação de nanopartículas (MUKHERJEE et al., 2001). A síntese extracelular pode ocorrer por meio da interação dos íons metálicos com as moléculas liberadas pela célula fúngica ou com

as enzimas da parede celular, provocando a formação de nanopartículas na solução (KHAN et al., 2017).

Figura 2.6 – Mecanismos de síntese de nanopartículas por fungos



Legenda: Etapas da síntese de nanopartículas mediada por células fúngicas de forma intra e extracelular.

Fonte : (SILVA et al., 2017)

A utilização das enzimas específicas secretadas pelos fungos é fundamental para a síntese de nanopartículas de diferentes composições químicas, formas e tamanhos. Em todos os casos, os metabólitos dos fungos funcionam como *capping agent*, e de maneira apropriada quando se almeja a obtenção de uma suspensão coloidal, esses compostos formam uma camada estabilizante (cobertura) na superfície das nanopartículas, evitando que estas se agreguem ou cresçam desordenadamente durante sua produção (SILVA et al., 2017). Além disso, os parâmetros como temperatura, pH, tempo de exposição ao substrato, biomassa e concentração de substrato podem afetar o tamanho, a forma e a monodispersidade das nanopartículas (KASHYAP et al., 2012).

2.6 Nanobiorremediação: a combinação de nanomateriais e biorremediação

Para realizar a escolha do método mais adequado para a remediação de locais contaminados, vários aspectos como eficiência, rentabilidade, complexidade, riscos,

disponibilidade de recursos e tempo consumido devem ser cuidadosamente analisados e avaliados (PANDEY, 2018). A nanorremediação, ou seja, a utilização de nanopartículas para a remediação de áreas contaminadas, é considerada um processo tecnológico rápido e eficiente para o tratamento de altas concentrações de contaminantes presentes no solo, entretanto, o seu alto custo desfavorece a sua aplicação. Já a biorremediação tem um custo baixo, mas ocorre com taxas de velocidades menores (TESSARO, 2018).

Desta maneira, a integração entre estes métodos de remediação pode ser pensada como uma forma de amenizar os problemas de remediação, uma vez que as abordagens integradas podem superar as desvantagens das tecnologias individuais e fornecer melhores resultados de remediação.

Neste contexto, a nanobiorremediação é um dos métodos que tem recebido muita atenção nos últimos anos. Este método visa reduzir as concentrações de contaminantes e aliviar os impactos ambientais adicionais, trazendo a combinação dos benefícios da nanotecnologia e da biorremediação para alcançar um processo de remediação ambientalmente amigável e mais eficiente do que os processos individuais (SINGH; BEHERA; KUMAR, 2020).

Existem duas formas para a aplicação do processo de nanobiorremediação no sistema de tratamento. O primeiro é o método sequencial em que o contaminante é, primeiramente, submetido a nanopartículas e, posteriormente, é adicionado o bioagente para realizar o processo adicional. O segundo é o método concorrente ou combinado em que nanopartículas e o agente biológico são adicionados ao sistema simultaneamente (SINGH; BEHERA; KUMAR, 2020).

A aplicação da nanobiorremediação é uma alternativa sustentável, viável e barata comparada às tecnologias de remediação convencionais. Essa tecnologia tem demonstrado alta efetividade na degradação de contaminantes, o que abre novas possibilidades para o enfrentamento dos desafios ambientais (VÁZQUEZ-NÚÑEZ et al., 2020). No entanto, são necessários mais estudos e ações de desenvolvimento para a implementação dessa técnica em larga escala.

2.7 Nanofibras poliméricas

A aplicação da nanotecnologia, associada aos materiais compósitos, permite o desenvolvimento de novos materiais com melhores propriedades em relação aos

já existentes (FILHO, 2018). Desse modo, o processamento de materiais poliméricos em tamanhos nanométricos vêm se destacando em função das novas propriedades associadas (COSTA et al., 2012).

As nanofibras poliméricas surgiram como um nanomaterial fibroso com aplicações inovadoras em diferentes áreas do conhecimento. Entre seus diferenciais é possível destacar a alta relação superfície/volume e a presença de pequenos poros interfibras, que resulta em uma elevada porosidade (VILCHEZ et al., 2020). Seu potencial de aplicação inclui purificação e tratamento de efluentes, liberação de fármacos, filtração, eletrocatalise de oxigênio, embalagem de alimentos, entre outras (NAYL et al., 2022).

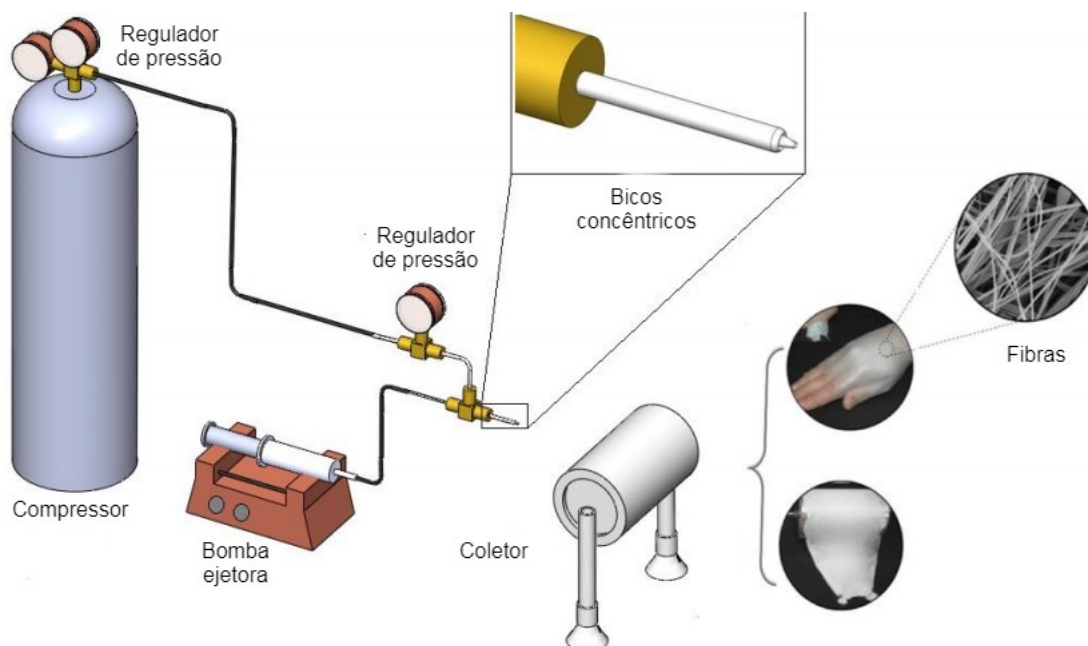
As nanofibras podem ser obtidas por diversos métodos como injeção, extrusão, termoformagem, polimerização interfacial, eletrofiação, fiação centrífuga e fiação por sopro em solução (SBS) (TANG et al., 2015; IROEGBU; RAY, 2022). Sabe-se que a estrutura e as propriedades das nanofibras são fortemente afetadas pelas condições de processamento (TIAN; HE, 2022). Assim, o entendimento da relação entre processamento, estrutura e propriedade é de suma importância para a produção de nanofibras poliméricas que cumpram as demandas da aplicação desejada (INAI; KOTAKI; RAMAKRISHNA, 2013; ANSTEY et al., 2021).

2.7.1 Técnica de fiação por sopro em solução (SBS)

A técnica de fiação por sopro em solução (SBS – *Solution Blow Spinning*), desenvolvido em 2009, é uma técnica alternativa para a obtenção de nanofibras poliméricas, sendo possível produzir nanofibras em maior escala, maiores taxas de fiação e custos reduzidos (MEDEIROS et al., 2009; BONAN et al., 2017). Essa técnica de fabricação de nanofibras requer um polímero dissolvido em um solvente que deve ser evaporado (volátil ou não) e um gás pressurizado que flui em torno da solução polimérica, criando nanofibras que podem ser depositadas em um coletor ou, diretamente em qualquer superfície (DARISTOTLE et al., 2016).

O SBS é constituído por uma fonte de gás comprimido, um regulador de pressão, uma bomba de injeção para controlar a taxa de ejeção das soluções, uma matriz de fiação de emissores (bicos) concêntricos e um coletor com velocidade de rotação controlável (FIGURA 3.1).

Figura 2.7 – Esquema do aparelho utilizado na técnica SBS



Legenda: Componentes do aparelho utilizado na técnica de fiação por sopro em solução.

Fonte : Adaptado de (SILVA; OLIVEIRA; MEDEIROS, 2015)

A técnica consiste em bombear uma solução polimérica através do bico interno ao mesmo tempo que um gás pressurizado passa pelo bico externo. Quando a tensão superficial gerada pela solução polimérica é superada pelas forças aerodinâmicas provenientes do gás pressurizado, fluxos da solução polimérica são lançados ao coletor. Durante o trajeto, o solvente da solução evapora formando nanofibras (OLIVEIRA et al., 2013).

A produção da nanofibra pelo SBS depende do peso molecular do polímero, solvente, concentração e viscosidade da solução polimérica. Também influenciam variáveis de processo, como pressão de gás, taxa de injeção, e a distância de trabalho. Outros fatores importantes são a distância entre bicos, a geometria do bico, umidade e a temperatura do ambiente (LEMOS, 2021).

Esses parâmetros influenciam diretamente no tamanho e na morfologia das nanofibras produzidas (OLIVEIRA et al., 2014; DARISTOTLE et al., 2016; DADOL et al., 2020). Na literatura, alguns autores afirmam que, em uma estrutura nanométrica, o tamanho médio não deve exceder 100 nm em pelo menos uma dimensão (FERREIRA; RANGEL, 2009). Por outro lado, existem áreas de pesquisas que consideram estruturas nanométricas com até 500 nm (MEDEIROS et al., 2009; BADGAR; PROKISCH, 2021).

Os polímeros utilizados no SBS podem ser sintéticos, naturais e também quimicamente modificados. Dentre os polímeros sintéticos podem ser citados o poli(álcool vinílico) (PVA), o poli(pirrolidona vinílica) (PVP), o poli(cloreto de vinila) (PVC), poli(ácido láctico) (PLA), entre outros (LIU et al., 2017).

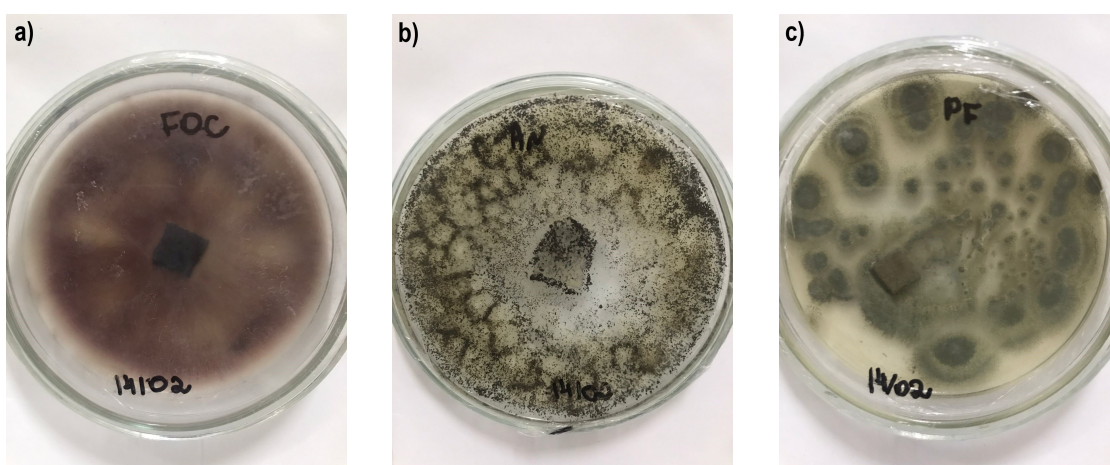
O poli(álcool vinílico) (PVA) é um polímero sintético com boa estabilidade química e térmica. É um polímero solúvel em água, biodegradável, biocompatível e não tóxico que apresenta boa capacidade de formação de filmes. Além disso, pode ser facilmente processado e possui alta permeabilidade à água (SINGBUMRUNG et al., 2018). Essas propriedades levaram o PVA a ser utilizado em um grande número de aplicações industriais (FARIA; VERCELHEZE; MALI, 2012). O PVA tem sido utilizado em fibras, adesivos, emulsificantes, assim como na indústria têxtil e de papel (BITTENCOURT, 2017).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismos

Neste projeto foram utilizados os fungos *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus Niger* e *Penicillium flavigenum*. Os fungos foram obtidos a partir da coleção de culturas de fungos do Laboratório de Cogumelos Comestíveis do Departamento de Biologia, do Instituto de Ciências Naturais, da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Figura 3.1 – Fungos crescidos em placas de Petri



Legenda: Fungos a) *Fusarium oxysporum*, b) *Aspergillus Niger* e c) *Penicillium flavigenum* crescidos em placas de Petri.

Fonte : Do autor (2022)

3.2 Processo de repicagem dos fungos

A repicagem é uma técnica tradicional de manutenção de culturas em laboratório, sendo bastante utilizada para se obter a viabilidade de microrganismos, principalmente de fungos. Essa técnica consiste na inoculação do microrganismo em meio adequado e na incubação em ambiente favorável à sua multiplicação.

Para isso, um meio de cultura sólido foi preparado com 16,55g de amido, 15g de glicose, 2g de extrato de levedura e 15g de ágar para 1L de água destilada. Para o preparo, os compostos foram pesados e adicionados à água destilada. Após isso, o meio de cultura foi dividido em frascos Erlenmeyer com capacidade de 500mL, adicionando-se 250mL de meio de cultura em cada recipiente. Para proteção do meio de cultura, os frascos foram fechados com tampões de algodão e chapéus feitos de papel (FIGURA

3.2). Em seguida, os frascos foram levados à autoclave a uma temperatura de 121°C e pressão de 1atm, por 15 min - tempo padrão para esterilização de meios de cultura.

Posteriormente, os meios de cultura foram deixados na bancada por um período de 24h, pois as contaminações em geral acontecem nas primeiras 24h depois da autoclavagem.

Figura 3.2 – Meio de cultura sólido



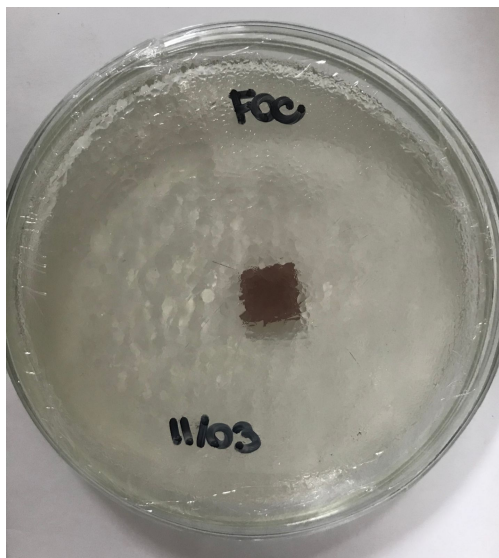
Legenda: Frascos Erlenmeyer contendo meio de cultura sólido autoclavado.

Fonte : Do autor (2022)

Para iniciar o processo de repicagem dos fungos, o meio de cultura sólido foi levado para a capela com exaustão e submetida à ação de uma luz ultravioleta (UV), eficiente para desinfecção de superfícies e na esterilização de certos materiais, durante 40min (MONDARDO, 2015). Em seguida, o meio de cultura foi vertido até metade da capacidade das placas de Petri esterilizadas.

A repicagem dos fungos foi feita a partir de uma placa completamente colonizada pelo fungo. Foi utilizada uma alça de platina, passada no álcool e flambada na chama do bico de Bunsen, para fazer pequenos cortes (quadrados) na placa de origem (placa tomada pelo fungo) e passar para a nova placa (placa contendo o meio de cultura) (FIGURA 3.3). Para evitar contaminações, todo o processo de repicagem foi feito atrás da chama do bico de Bunsen. A nova placa foi tampada, enrolada em um plástico filme e levada para a estufa, sendo mantida até que o fungo tenha crescido e tomado toda a placa.

Figura 3.3 – Fungo repicado em placa de Petri



Legenda: Fungo *Fusarium oxysporum* repicado em placa de Petri.

Fonte : Do autor (2022)

A existência de contaminações por bactérias ou até mesmo por outros fungos é comum, uma vez que, o meio de cultura é adequado para o crescimento de diferentes microrganismos. Geralmente, as bactérias tendem a contaminar as placas nos primeiros dias, por isso o monitoramento dos fungos nesse período torna-se importante.

3.3 Determinação da atividade das enzimas ligninolíticas

3.3.1 Cultivo dos fungos para produção de enzimas ligninolíticas

Para a produção de enzimas ligninolíticas, os fungos foram crescidos em meio Bushnell Haas (BH) composto por 1g de KH_2PO_4 ; 1g de K_2HPO_4 ; 1g de NH_4NO_3 ; 0,2g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0,08g de FeCl_3 e 0,02g de CaCl_2 para 1L de água ultrapura, acrescido de duas diferentes fontes de carbono: glicose e diesel. Para a inoculação, foram utilizados frascos Erlenmeyer de 250mL contendo 150mL de meio líquido autoclavados. Adicionou-se, em cada frasco, 10 discos de 10mm contendo o micélio do fungo, esses frascos foram mantidos em uma incubadora *shaker* por 15 dias, a uma velocidade de rotação de 160rpm e temperatura de 25°C. Para os ensaios enzimáticos, retirou-se 10mL de cada amostra a cada 3 dias, durante todo o período de incubação.

3.3.2 Atividade enzimática da lacase

A atividade de lacase foi medida empregando-se o ABTS (2,2'-azino-bis (3-ácido etilbenzothiazoline-6-ácido sulfônico)) como substrato enzimático. A mistura da reação foi composta de 0,1mL de ABTS 1mM L^{-1} (em água); 0,3mL de tampão acetato de sódio 1mM L^{-1} (pH 5) e 0,6mL da fonte enzimática, obtendo um volume final de 1mL. A mistura de reação foi incubada por 10min a 37°C e a oxidação do substrato foi monitorada pelo aumento da banda de absorção em 420nm. O branco foi feito com todos os componentes da mistura de reação, substituindo-se a fonte enzimática pelo meio de cultivo. Os valores de absorbância obtidos nas amostras foram utilizados para estimar a atividade enzimática. A unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μ mol de ABTS por minuto por mg de proteína.

3.3.3 Atividade enzimática da lignina peroxidase

Esta atividade foi determinada mediante a oxidação do álcool veratrílico. A mistura de reação de oxidação foi composta de 0,2mL de H_2O_2 2mM L^{-1} ; 0,5mL de álcool veratrílico 10mM L^{-1} ; 1mL de tampão tartarato de sódio 0,125mol L^{-1} (pH 3) e 0,5mL da fonte enzimática, obtendo um volume final de 2,5mL. A mistura de reação foi incubada por 10min a 37°C. A reação foi iniciada pela adição de H_2O_2 e o aparecimento do aldeído veratrílico foi determinado fazendo-se a leitura de absorbância a 310nm. O branco foi feito com todos os componentes da mistura de reação, substituindo-se a amostra pelo meio de cultivo. A unidade enzimática foi definida como a quantidade de enzima capaz de oxidar 1 μ mol de álcool veratrílico por minuto por mg de proteína.

3.3.4 Atividade enzimática da manganês peroxidase

A atividade desta enzima foi determinada avaliando-se a oxidação do vermelho de fenol. A reação foi obtida mediante a mistura de 0,1mL de vermelho de fenol (1g L^{-1}); 0,1mL de lactato de sódio 250mM L^{-1} (pH 4,5); 0,2mL de albumina bovina (0,5%); 0,05mL de sulfato de manganês (2mM L^{-1}); 0,05mL de H_2O_2 2mM L^{-1} em tampão succinato de sódio 2mM L^{-1} (pH 4,5). A mistura foi incubada por 10min a 37°C e a reação interrompida pela adição de 0,04mL de NaOH 2M L^{-1} . O branco foi feito com todos os componentes da mistura de reação, substituindo-se a amostra pelo meio de cultivo. A absorbância foi lida a 610nm e a unidade enzimática foi definida como a

quantidade de enzima capaz de oxidar $1\mu\text{mol}$ de vermelho de fenol por minuto por mg de proteína.

3.4 Avaliação do potencial de degradação dos derivados de petróleo

Para realizar a seleção de microrganismos com capacidade de degradar o petróleo e seus derivados foram propostos vários métodos que se tornaram fundamentais para qualquer proposta de biorremediação eficaz. Entre estes, o método que utiliza um indicador redox 2,4 diclorofenol-indofenol (DCPIP) como receptor de elétrons, oferece um estudo rápido e simples para medir o potencial degradador dos derivados de petróleo (HANSON; DESAI; DESAI, 1993).

Desta forma, a análise do potencial de degradação dos fungos consiste em adicionar o indicador DCPIP ao meio de cultura. Para esse teste, foram preparados frascos contendo 5mL do meio BH líquido autoclavado. Logo após, foi adicionado em cada frasco 50 μL de óleo diesel comercial e 125 μL do indicador DCPIP (0,12 mg/mL). Em seguida, foi adicionado em cada frasco um disco de aproximadamente 5mm de diâmetro do micélio do fungo crescido no meio BH sólido (sem fonte de carbono).

Além disso, foram utilizados um controle abiótico, ou seja, sem o fungo, um controle biótico, sem o óleo diesel e um controle contendo apenas o meio de cultura e o DCPIP. Os frascos foram incubados e a mudança de cor no meio de cultura foi monitorada diariamente, por um período de 7 dias.

3.5 Preparação dos nanobiorremediadores

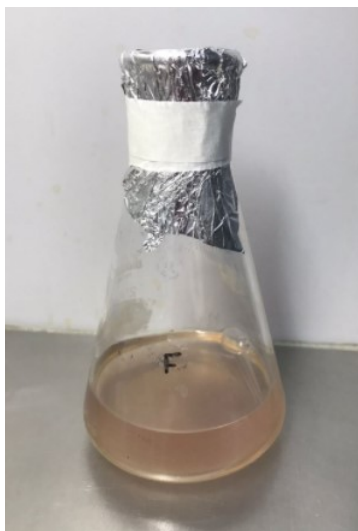
3.5.1 Síntese de nanopartículas de óxidos de ferro

Para a síntese das nanopartículas de óxidos de ferro foi utilizada uma abordagem que oferece uma estratégia de bom rendimento, boa reprodutividade e baixo custo (ZAKARIYA; MAJEED; JUSOF, 2022). Para isso, os fungos foram cultivados em meio de cultura *Sabouraud* líquido (pH $5,6 \pm 0,2$) composto de 20g/L de glicose e 10g/L de peptona, sendo mantidos em uma incubadora *shaker* por 7 dias, a uma velocidade de rotação de 160rpm e temperatura de 25°C.

Logo depois, os fungos crescidos no meio líquido foram filtrados utilizando papel filtro qualitativo e lavados com água ultrapura para remoção completa do meio

de cultura residual. Após, a massa de 10g de micélio foi suspenso em 100mL de água ultrapura esterilizada e incubado a uma velocidade de rotação de 160rpm e temperatura de 25°C. Depois de 3 dias de incubação, a biomassa fúngica foi novamente filtrada usando papel de filtro Whatman nº 1 e o extrato livre de células foi coletado.

Figura 3.4 – Extrato livre de células fúngicas



Legenda: Frasco Erlenmeyer contendo o extrato livre de células fúngicas.

Fonte : Do autor (2022)

Em seguida, foi adicionado cloreto de ferro (III) ($FeCl_3 \cdot 6H_2O$) no frasco contendo 100mL de extrato livre de células fúngicas, obtendo uma concentração final de 3mM. Esses frascos foram fechados e mantidos a uma velocidade de rotação de 160rpm e temperatura de 25°C por 4 dias, em condições escuras. Após isso, as soluções foram centrifugadas a 12000rpm por 30min. Os precipitados foram coletados e lavados com água ultrapura. Por fim, os precipitados foram ressuspensos em água e armazenados.

Os controles contendo o extrato livre de células sem a adição do cloreto de ferro (III) e a solução de cloreto de ferro (III) também foram incluídos junto com os frascos experimentais.

3.6 Síntese de nanofibras por meio do método de fiação por sopro em solução (SBS)

3.6.1 Preparação das soluções

Para a síntese das nanofibras pelo método de SBS, foram preparadas três soluções poliméricas diferentes:

Solução 1

Adicionou-se em um recipiente hermeticamente fechado 2,4g de PVA granulado (POVAL 32-97KL), fornecido pela empresa Kuraray America Inc. (Houston, USA), juntamente com 20mL de água ultrapura. O PVA foi dissolvido, sob agitação mecânica e temperatura de 80-90°C, mantendo uma concentração de 12% m/v.

Figura 3.5 – Solução polimérica 1



Legenda: Solução de PVA puro.
Fonte : Do autor (2022)

Solução 2

Adicionou-se em um recipiente hermeticamente fechado 2,4g de PVA granulado juntamente com 20mL do extrato livre de células fúngicas. O PVA foi dissolvido, sob agitação mecânica e temperatura de 40°C, mantendo uma concentração de 12% m/v.

Figura 3.6 – Solução polimérica 2



Legenda: Solução de PVA com filtrado fúngico.
Fonte : Do autor (2022)

Solução 3

Adicionou-se em um recipiente hermeticamente fechado 2,4g de PVA granulado juntamente com 20mL do extrato livre de células fúngicas. O PVA foi dissolvido, sob agitação mecânica e temperatura de 40°C, mantendo uma concentração de 12% m/v. Em seguida, uma concentração de 15% m/m de nanopartículas de óxidos de ferro foi dispersa na solução de PVA. A solução foi sonicada por 1h para reduzir a aglomeração de nanopartículas.

Figura 3.7 – Solução polimérica 3



Legenda: Solução de PVA com filtrado fúngico e nanopartículas de óxidos de ferro.
Fonte : Do autor (2022)

3.6.2 Fiação por SBS

A produção das nanofibras foram realizadas pela técnica de SBS, o aparato utilizado está mostrado na Figura 3.8.

Figura 3.8 – Visão geral - SBS



Legenda: Visão geral do aparato utilizado na técnica de SBS.
Fonte : Do autor (2022)

Os parâmetros de processamento para a obtenção das nanofibras seguem descritos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Parâmetros utilizados para obtenção das nanofibras.

Temperatura ambiente	37 $\pm$ 1°C
Temperatura do ar comprimido	30 $\pm$ 2°C
Umidade	41 $\pm$ 1%
Protusão	1,5cm
Pressão do ar	75 psi
Vazão	5mL/h
Distância do coletor	$\pm$ 45cm

Fonte : Do autor (2022)

O coletor foi revestido com papel alumínio para facilitar a retirada do material depositado. O período de fiação foi de aproximadamente quatro horas.

3.7 Caracterização dos nanobiorremediadores

As amostras obtidas nesse estudo foram caracterizadas através das técnicas descritas abaixo.

3.7.1 Espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis)

A espectroscopia na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) é uma técnica utilizada para identificar e caracterizar bandas de absorção das amostras. Nessa técnica são medidas a absorbância, propriedade que representa a fração de luz absorvida pela amostra, ou transmitância que é a fração de luz que atravessa a amostra. Tanto absorbância como transmitância estão relacionadas com a absorção de energia eletromagnética pelo composto a ser analisado (ARAÚJO, 2016).

Para tal, a radiação eletromagnética na região entre 190–1100nm é incidida na amostra sendo possível selecionar os comprimentos de onda específicos dentro dessa faixa. Através de fenômenos de absorção promovidos por transições eletrônicas das moléculas, há uma atenuação desta radiação incidente. O resultado da análise é apresentado na forma de um gráfico que relaciona o comprimento de onda em função da intensidade da luz absorvida pela amostra analisada, com isso é possível realizar um estudo qualitativo e quantitativo da amostra.

Para confirmar a síntese das nanopartículas de óxidos de ferro, os espectros de absorção UV-Vis foram medidos usando um espectrofotômetro da marca Ajmicronal,

modelo AJX-3000PC. O espectrofotômetro utilizado está instalado no Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Lavras, no Laboratório de Química Inorgânica. Para a realização das medidas, as amostras foram diluídas em água ultrapura e colocadas em cubetas de quartzo. Os espectros UV-Vis das nanopartículas de óxidos de ferro foram registrados na faixa de 200 a 600 nm.

3.7.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um dos instrumentos mais utilizados para observação e análises das características microestruturais de materiais. Trata-se de um tipo de microscópio utilizado para a caracterização e análise da microestrutura de amostras. Além disso, permite a identificação da estrutura, da morfologia, dos elementos químicos e da topografia da superfície da amostra (DEDAVID; GOMES; MACHADO, 2007).

O princípio de funcionamento do MEV consiste na utilização de um feixe fino de elétrons de alta energia que incide na superfície da amostra na qual, ocorrendo uma interação, parte do feixe é refletida e coletada por um detector que converte este sinal em imagem de elétrons retroespalhados ou, nesta interação a amostra emite elétrons produzindo a chamada imagem de elétrons secundários (SOUZA, 2011).

As amostras foram analisadas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura do modelo TESCAN CLARA. O microscópio utilizado está instalado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), situado no Departamento de Fitopatologia (ESAL) da Universidade Federal de Lavras. O preparo consistiu em fixar as amostras em suportes (stubs) utilizando uma fita de carbono. Em seguida, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro. Os diâmetros médios das nanofibras foram medidos utilizando o *software ImageJ*, a partir de 100 medições aleatórias. Após a medição, foi aplicada a análise de variância (ANOVA) e a diferença entre os valores médios foi avaliada pelo teste t de *Student* bilateral, com 95% de significância.

3.7.3 Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS)

A espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) é a técnica de caracterização onde se utiliza o espectro de raios X emitido pela amostra para obter a

análise química local. O microscópio eletrônico de varredura (MEV) coleta imagens da amostra, mapeando pontualmente a região por elementos quando há um espectrômetro de raios X acoplado (VIEIRA et al., 2021).

A composição química das nanopartículas e das nanofibras foi analisada por espectroscopia de raios X por dispersão de energia. Para isso, utilizou-se um microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40 XVP (Carl Zeiss) com sistema de microanálise de raios X da Bruker (Quantax EDS). O microscópio utilizado está instalado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), situado no Departamento de Fitopatologia (ESAL) da Universidade Federal de Lavras. O preparo consistiu em fixar as amostras em suportes (stubs) utilizando uma fita de carbono. Em seguida, as amostras foram recobertas com uma fina camada de carbono.

3.7.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) é uma técnica de caracterização de materiais em que um feixe de elétrons é transmitido através de uma amostra, interagindo com a mesma durante seu caminho. Nesta técnica, um feixe de elétrons é emitido por uma fonte de alta voltagem e focalizado na amostra através de bobinas que atuam como lentes para o feixe. Devido a interação do feixe com a amostra, que deve ter uma espessura fina ($\leq 100\text{nm}$), uma imagem de projeção ampliada é gerada (MENDONÇA, 2018).

O tamanho das nanopartículas foi caracterizado por microscopia eletrônica de transmissão. Para isso, foi utilizado um microscópio eletrônico de transmissão do modelo TESCAN CLARA com canhão de emissão de campo cuja resolução é de 0,9nm a 20kV. O microscópio utilizado está instalado no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME), situado no Departamento de Fitopatologia (ESAL) da Universidade Federal de Lavras.

As amostras foram previamente agitadas em um agitador de tubos do tipo vortex do modelo QL-901 por 3 minutos. Para o preparo, uma gota de cada amostra foi colocada em uma grade de cobre de 300 mesh revestida de carbono. Após isso, os grids foram deixados em um recipiente contendo sílica gel para secagem completa. O tamanho médio das nanopartículas foi medido utilizando o *software ImageJ*, a partir de 150 medições aleatórias.

3.7.5 Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR)

A espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) baseia-se em incidir radiação infravermelha sobre a amostra e a partir do sinal emitido, analisar quais energias de radiação foram absorvidas ou transmitidas. Os dados coletados são convertidos por uma transformada de Fourier e o resultado é um espectro com bandas das energias absorvidas pela amostra, onde cada banda é associada à frequência do modo vibracional presente na estrutura. As frequências de vibração são características para cada tipo de ligação química e elementos envolvidos na ligação. Assim, a partir da análise do espectro de infravermelho é possível identificar os modos vibracionais das amostras (FIGUEIREDO, 2018).

Nessa técnica, foi empregado um espectrômetro FT-IR Varian 600-IR com transformada de Fourier (FTIR), com acessório GladiATR da Pike Technologies acoplado para medidas por reflectância total atenuada (ATR) a 45° com cristal de seleneto de zinco. A análise foi realizada na Central de Análise e Prospecção Química (CAPQ) do Departamento de Química (DQI) da Universidade Federal de Lavras. Os espectros foram registrados na faixa espectral de 400 a 4000 cm^{-1} . A resolução dos espectros foi de 4 cm^{-1} com um intervalo de 32 varreduras.

3.8 Avaliação do potencial de degradação dos derivados de petróleo pelas nanofibras

Para avaliar o potencial de degradação dos derivados de petróleo pelas nanofibras, foi testado óleo diesel comercial. Os ensaios foram conduzidos em frascos de vidro estéreis e compostos por 5mL de água ultrapura, 7,5 μL de óleo diesel e 50mg de nanofibras. Além disso, foram realizados ensaios controle, preparados da mesma forma dos demais, porém sem a adição das nanofibras, permitindo diferenciar perdas por volatilização, da degradação pelas nanopartículas de óxidos de ferro e enzimas fúngicas incorporadas nas nanofibras.

Figura 3.9 – Ensaios de avaliação do potencial de degradação dos derivados de petróleo pelas nanofibras



Legenda: Frascos contendo água ultrapura, óleo diesel e nanofibras de PVA com filtrado fúngico e nanopartículas de óxidos de ferro.

Fonte : Do autor (2022)

Após a montagem dos ensaios, os frascos foram hermeticamente fechados, conforme mostra a Figura 3.9, com o intuito de evitar ao máximo a perda dos compostos por volatilização. Os frascos foram mantidos na ausência de luz à temperatura ambiente por um período de 15 dias. Os ensaios foram realizados em triplicata.

As concentrações dos compostos antes e após a degradação, foram determinadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS). Para isso, utilizou-se um equipamento de cromatografia gasosa (CG) Agilent 7890A com analisador de massas (MS) do tipo quadrupolo Agilent 5975C do Laboratório Multiusuário de Análises Instrumentais (LAMAI) da Escola de Engenharia (EENG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA).

Após o período de tratamento, os ensaios foram colocados em um banho Maria a 60°C, mantidos por 15min. Para a análise CG/MS, foram recolhidos 5 μ L da fase vapor a meia altura entre a tampa do frasco e a superfície do líquido e injetado diretamente no GC/MS. As condições das análises cromatográficas do óleo diesel estão descritas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Condições utilizadas na cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa para biodegradação do óleo diesel.

Coluna	HP-5MS
Dimensões da coluna	30m x 0,25mm x 0,25 μ m
Modo de injeção	Splitless
Temperatura do injetor	250°C
Volume injetado	5 μ L
Fase móvel	Hélio
Vazão da fase móvel	3mL/min
Programa de temperatura	34 °C (7 min) 8 °C/min – 200 °C (1 min) 10 °C/min – 250 °C (5 min)
Tempo de corrida	38,75min
Temperatura do detector	150°C
Temperatura do capilar de transferência	280°C

Fonte : Do autor (2022)

Os cromatogramas obtidos foram avaliados e os espectros de massa gerados em cada pico dos cromatogramas foram comparados com os espectros de massa da biblioteca NIST versão 2.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

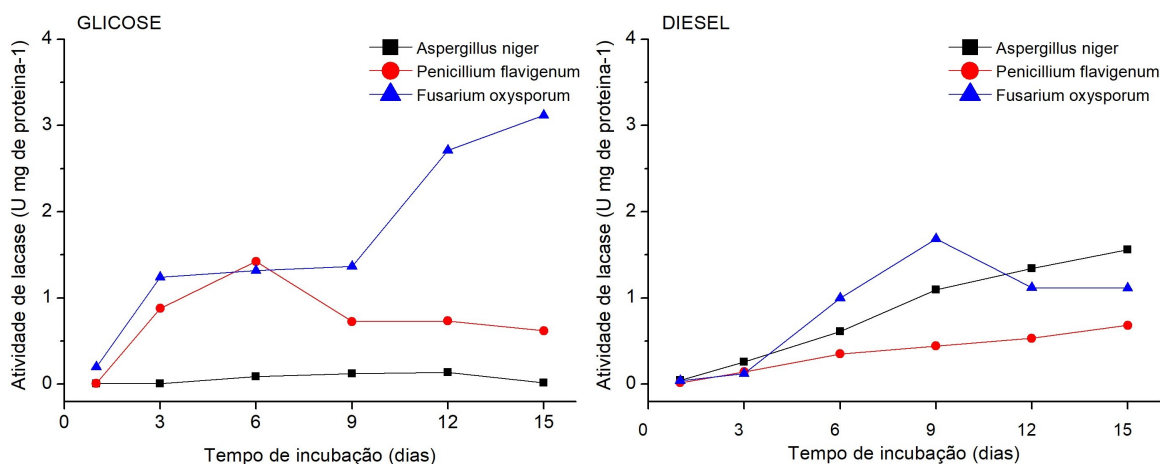
Neste capítulo são apresentados os resultados e discussões obtidos no desenvolvimento do projeto de pesquisa.

4.1 Avaliação quantitativa da produção de enzimas ligninolíticas

A avaliação quantitativa da produção de enzimas ligninolíticas foi realizada com o objetivo de avaliar a produção das enzimas lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase pelos fungos *Aspergillus Niger*, *Penicillium flavigenum* e *Fusarium oxysporum* ao utilizar glicose e diesel como fonte de carbono.

A Figura 4.1 mostra as curvas de produção de lacase para os três fungos. Foi possível verificar que a atividade enzimática de lacase foi maior para o fungo *Fusarium oxysporum* ao utilizar a glicose como fonte de carbono, no período de 15 dias, comparado aos demais fungos. Inicialmente, esse fungo apresentou uma atividade de 0,2 U mg de proteína⁻¹ e, com 15 dias de incubação, essa atividade foi elevada para 3,2 U mg de proteína⁻¹.

Figura 4.1 – Curvas de produção de lacase pelos fungos ao utilizar glicose e diesel como fonte de carbono



Legenda: Curvas de produção de lacase pelos fungos *Aspergillus Niger*, *Penicillium flavigenum* e *Fusarium oxysporum* ao utilizar glicose e diesel como fonte de carbono.

Fonte : Do autor (2022)

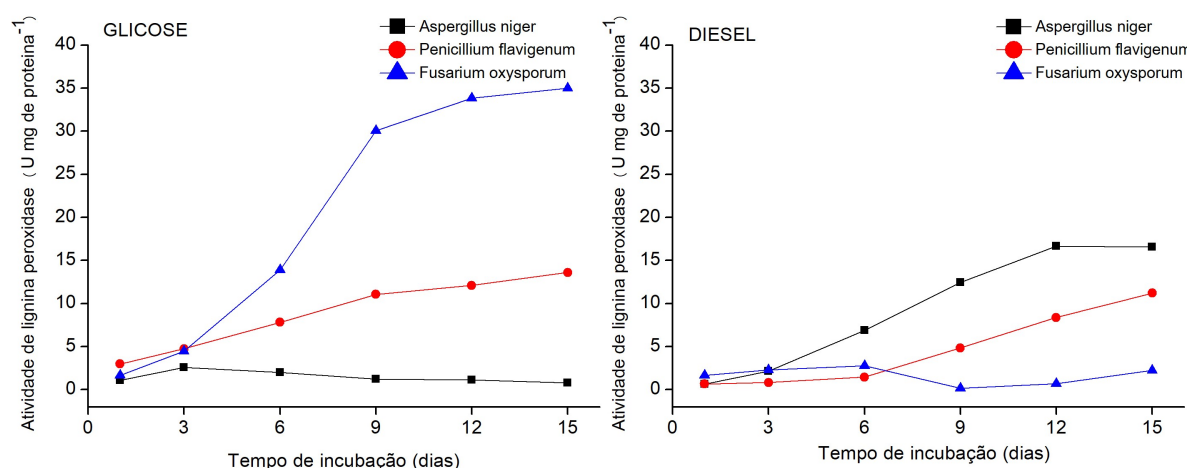
A atividade de lacase para o fungo *Aspergillus Niger* foi maior ao utilizar o diesel como fonte de carbono, apresentando um valor crescente com atividade máxima de 1,56 U mg de proteína⁻¹ aos 15 dias de incubação. O fungo *Penicillium flavigenum* apresentou uma atividade máxima de 1,42 U mg de proteína⁻¹ aos 6 dias de incubação utilizando a

glicose como fonte de carbono e, ao utilizar o diesel apresentou uma atividade enzimática crescente.

A produção da enzima lacase pode ser aumentada através da variação de diferentes parâmetros tais como, meio rico em carbono e com substratos específicos (SILVA, 2012). Além disso, foi relatado que o *Aspergillus Niger* apresentou uma melhor produção de lacase utilizando o óleo diesel como única fonte de carbono (ARRUDA et al., 2015). A atividade de lacase tem sido demonstrada em várias espécies de fungos, como dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*. No entanto, não deve ser generalizada, pois há vários grupos de fungos que, aparentemente, não produzem lacase (MACIEL et al., 2010).

A Figura 4.2 apresenta as curvas de produção de lignina peroxidase para os três fungos. Foi possível verificar que todos os fungos apresentaram uma atividade enzimática no primeiro dia de incubação ao utilizar glicose como fonte de carbono. A atividade enzimática de lignina peroxidase foi maior para o fungo *Fusarium oxysporum*, no período de 15 dias, ao utilizar a glicose como fonte de carbono. Por outro lado, esse fungo apresentou uma baixa atividade enzimática nesse intervalo de tempo ao utilizar o diesel como fonte de carbono.

Figura 4.2 – Curvas de produção de lignina peroxidase pelos fungos ao utilizar glicose e diesel como fonte de carbono



Legenda: Curvas de produção de lignina peroxidase pelos fungos *Aspergillus Niger*, *Penicillium flavigenum* e *Fusarium oxysporum* ao utilizar glicose e diesel como fonte de carbono.

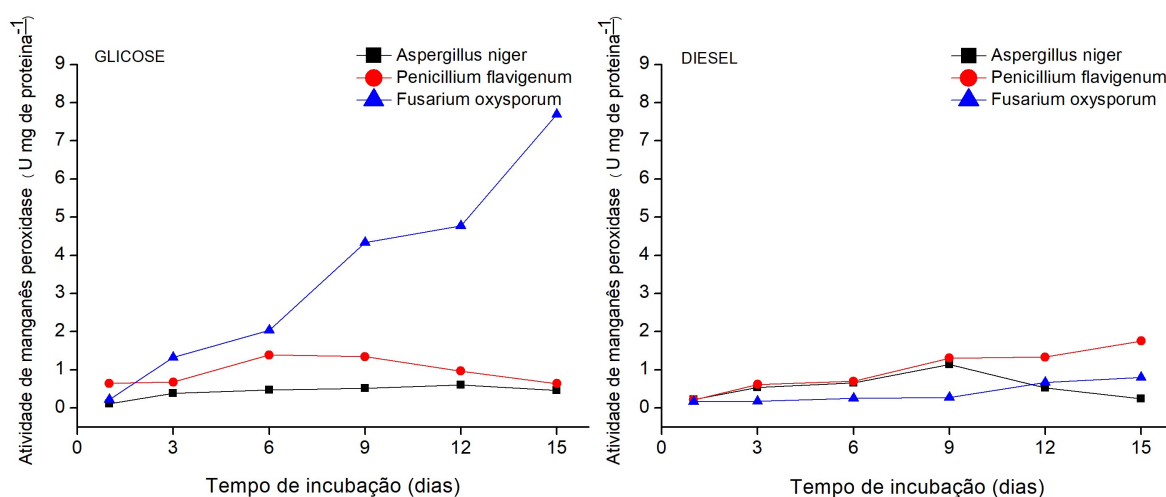
Fonte : Do autor (2022)

O fungo *Aspergillus Niger* apresentou uma maior atividade ao utilizar o diesel como fonte de carbono, apresentando um valor máximo de 16,6 U mg de proteína⁻¹ aos

12 dias de incubação. O fungo *Penicillium flavigenum* apresentou uma atividade máxima de $11,2 \text{ U mg de proteína}^{-1}$, aos 15 dias de incubação, utilizando o diesel como fonte de carbono. A produção da enzima lignina peroxidase foi constatada em um fungo do gênero *Aspergillus*, sendo identificado que as enzimas lignolíticas são induzíveis em determinados isolados fúngicos, uma vez que a escolha de uma fonte de carbono apropriada para o crescimento do fungo é importante para a produção dessas enzimas (HASANIN et al., 2019; SIJINAMANOJ et al., 2021).

A Figura 4.3 mostra as curvas de produção de manganês peroxidase para os três fungos. Foi possível verificar que a atividade enzimática de manganês peroxidase foi maior para o fungo *Fusarium oxysporum*, no período de 15 dias, ao utilizar glicose como fonte de carbono. No entanto, apresentou baixa atividade utilizando o diesel como fonte de carbono. A atividade de manganês peroxidase foi maior para o fungo *Aspergillus Niger* ao utilizar o diesel como fonte de carbono, apresentando um valor crescente com atividade máxima de $1,13 \text{ U mg de proteína}^{-1}$ aos 9 dias de incubação. O fungo *Penicillium flavigenum* foi o maior produtor de manganês peroxidase utilizando o diesel como fonte de carbono, apresentando uma atividade máxima de $1,75 \text{ U mg de proteína}^{-1}$ aos 15 dias de incubação.

Figura 4.3 – Curvas de produção de manganês peroxidase pelos fungos ao utilizar glicose e diesel como fonte de carbono



Legenda: Curvas de produção de manganês peroxidase pelos fungos *Aspergillus Niger*, *Penicillium flavigenum* e *Fusarium oxysporum* ao utilizar glicose e diesel como fonte de carbono.
Fonte : Do autor (2022)

No que se refere à produção de manganês peroxidase, entre os fungos testados em um estudo, o fungo do gênero *Penicillium* apresentou o melhor valor de produção da

enzima manganês peroxidase (LIRA, 2019). O fungo do gênero *Fusarium* demonstrou atividade para a enzima manganês peroxidase em diferentes substratos (SILVA, 2012). Adicionalmente, os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Fusarium* demonstraram capacidade de produção de enzimas degradadoras da lignina (??).

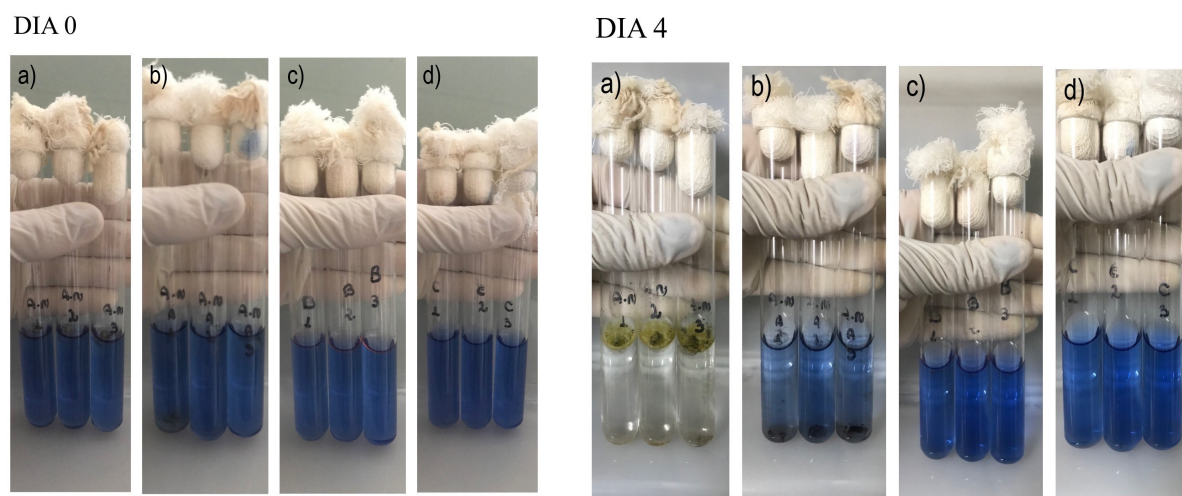
A análise da atividade enzimática pelos fungos *Aspergillus Niger*, *Penicillium flavigenum* e *Fusarium oxysporum* permitiu observar a degradação das diferentes fontes de carbono ao longo do período de incubação. Os resultados obtidos no presente estudo, mostram que a produção de enzimas ligninolíticas varia com o tempo de incubação do fungo. Segundo estudo realizado por Pinheiro (2018), a disponibilidade de fontes de carbono interferem diretamente na produção de enzimas ligninolíticas. Também observou que um aumento na concentração de glicose influenciou na melhor atividade enzimática (PINHEIRO, 2018).

4.2 Avaliação do potencial de degradação dos derivados de petróleo

O teste de biodegradação do óleo diesel foi realizado com a finalidade de avaliar a capacidade dos fungos em biodegradar a principal fonte de contaminação estudada neste trabalho. Para tal, foi utilizado o indicador redox DCPIP em meio mineral BH. Esse teste é fundamentado pelo princípio de que, durante a oxidação dos contaminantes pelos microrganismos, os elétrons são transferidos até receptores como oxigênio, nitrato e sulfato. No momento que se tem a incorporação de um receptor de elétron como o DCPIP ao meio de cultura, é possível verificar a capacidade dos microrganismos em utilizar os derivados de petróleo como substrato pela observação da mudança de cor do corante de azul (oxidado) para incolor (reduzido) (HANSON; DESAI; DESAI, 1993).

A oxidação biológica do indicador DCPIP, ocorreu em tempos diferentes para cada um dos fungos testados, evidenciada através da descoloração do meio de cultivo. O fungo *Aspergillus Niger* destacou-se por promover a oxidação biológica do indicador DCPIP após 4 dias em contato com o óleo diesel, apresentando a mudança da coloração do meio de azul para incolor. Já os fungos *Fusarium oxysporum* e *Penicillium flavigenum* promoveram a oxidação biológica do indicador DCPIP após 7 dias. Como mostrado na Figura 4.4, os tratamentos de controle permaneceram com a coloração azul durante todo o período do teste.

Figura 4.4 – Teste de degradação do óleo diesel pelo fungo *Aspergillus Niger*



Legenda: Teste de degradação do óleo diesel pelo fungo *Aspergillus Niger* no dia 0 e no dia 4. a) Amostra, b) controle abiótico, c) controle biótico e d) controle contendo apenas o meio de cultura e o DCPIP.

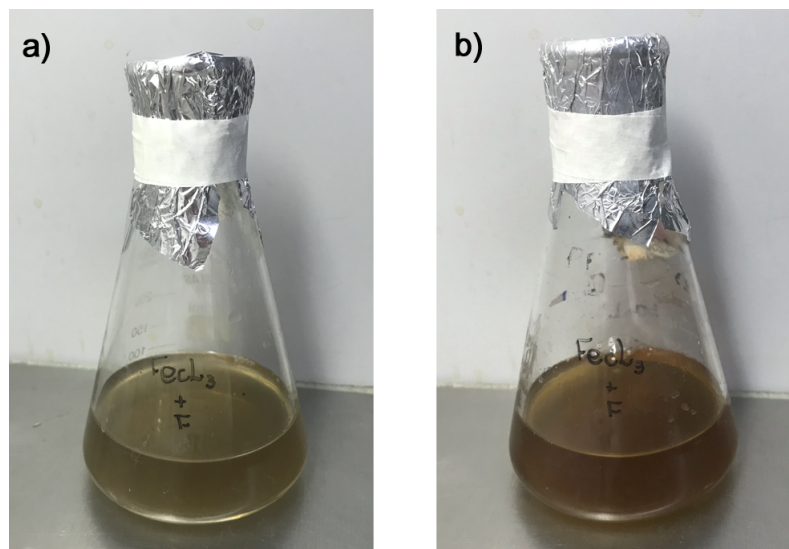
Fonte : Do autor (2022)

4.3 Síntese de nanopartículas de óxidos de ferro

A síntese das nanopartículas de óxidos de ferro foi realizada adicionando cloreto de ferro (III) ao filtrado resultante do cultivo do fungo *Fusarium oxysporum* em meio líquido. O fungo *Fusarium oxysporum* foi escolhido para a síntese de nanopartículas de óxidos de ferro por destacar-se como um bom produtor de lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase utilizando a glicose como fonte de carbono.

A mudança de cor de marrom claro para marrom escuro após quatro dias de mistura do filtrado fúngico com o cloreto de ferro indica a formação de nanopartículas na solução precursora (FIGURA 4.5) (RAJENDRAN et al., 2015). Além disso, mostrou que as enzimas extracelulares secretadas durante o processo de cultivo do fungo biorreduzem os íons de ferro formando as nanopartículas de óxidos de ferro (ZAKARIYA; MAJEED; JUSOF, 2022). As enzimas nitrato redutase no filtrado fúngico são responsáveis pela redução de íons de ferro, sendo essencial na formação das nanopartículas de óxidos de ferro (OTTOW; KLOPOTEK, 1969; ABDEEN et al., 2016).

Figura 4.5 – Mudança de cor da solução

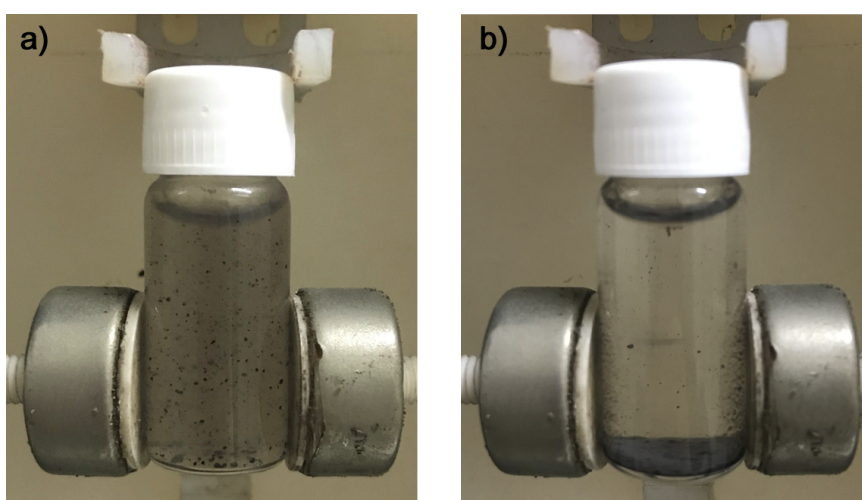


Legenda: Mudança de cor da solução a) antes e b) após a síntese de nanopartículas de óxidos de ferro.

Fonte : Do autor (2022)

As nanopartículas apresentaram propriedades magnéticas ao serem colocadas em contato com o ímã, ou seja, quando um campo magnético externo foi aplicado. As propriedades magnéticas induzem as nanopartículas dispersas em meio aquoso a serem acumuladas pela aplicação de um campo magnético externo. Esse fenômeno foi confirmado como mostra a Figura 4.6.

Figura 4.6 – Solução contendo as nanopartículas de óxidos de ferro



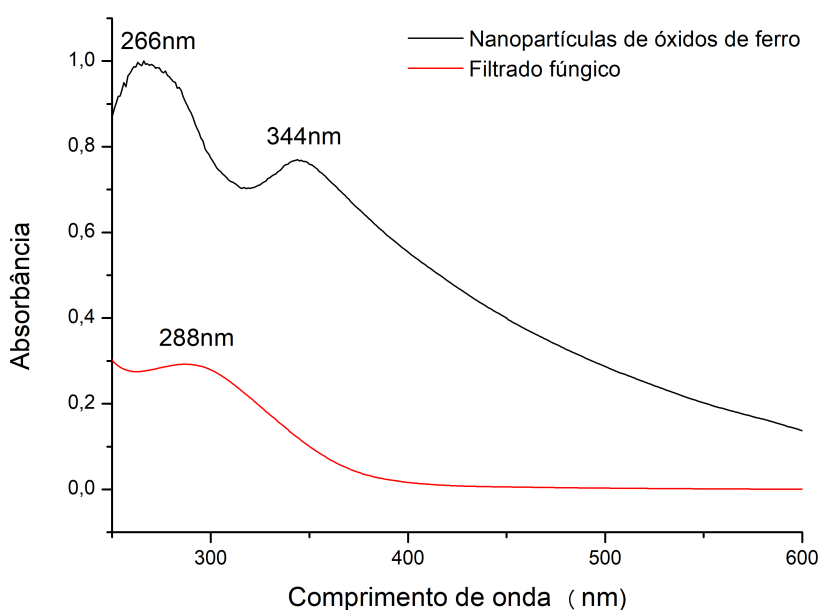
Legenda: Solução contendo as nanopartículas de óxidos de ferro a) antes e b) após a aplicação de um campo magnético externo.

Fonte : Do autor (2022)

Os espectros de absorção do filtrado fúngico e das nanopartículas sintetizadas pelo fungo *Fusarium oxysporum* foram analisados por espectroscopia UV-Vis em faixas de comprimento de onda de 200 a 600 nm, conforme mostrado na Figura 4.7. As bandas de absorção identificadas em torno de $\lambda = 266\text{nm}$ e $\lambda = 288\text{nm}$, representam a presença de aminoácidos aromáticos, responsáveis pela formação de proteínas. Esta observação indica a liberação de proteínas pelo fungo *Fusarium oxysporum*, sugerindo um possível mecanismo para a redução dos íons de ferro presentes na solução (DURÁN et al., 2005; ABDULLAH et al., 2020).

Ainda foi observado uma banda de absorção em $\lambda = 344\text{nm}$, indicando a formação das nanopartículas de óxidos de ferro pelo filtrado fúngico (BALAMURUGHAN et al., 2014; DEVI et al., 2019). Este pico foi observado devido à ressonância plasmônica de superfície dos elétrons presentes na superfície das nanopartículas de óxidos de ferro (SHAHVERDI et al., 2007). Embora esse espectro seja semelhante aos observados na literatura, houve uma pequena diferença na banda de absorção. Supostamente, isso se deve a variações no estado de agregação e valência das nanopartículas de ferro produzidas nos diferentes estudos (MAKAROV et al., 2014).

Figura 4.7 – Espectros de absorção do filtrado fúngico e das nanopartículas de óxidos de ferro

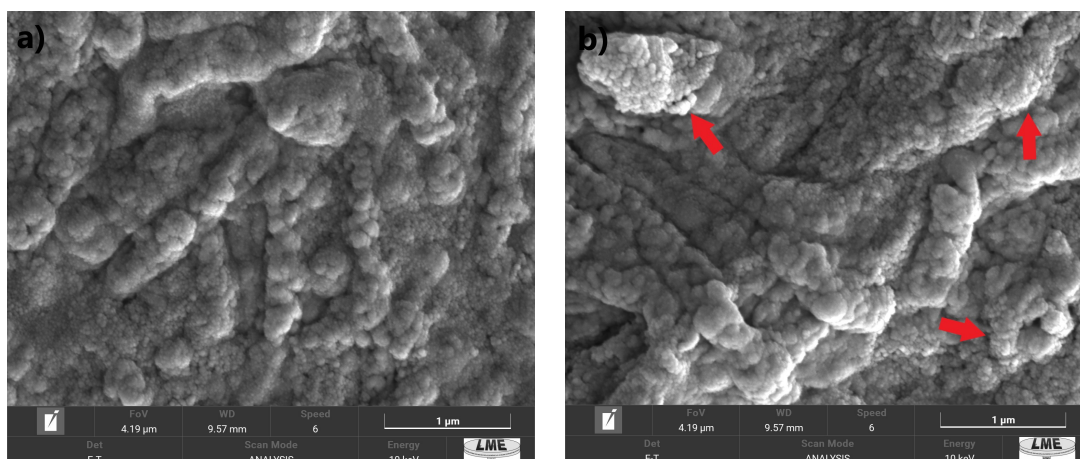


Legenda: Espectros de absorção do filtrado fúngico e das nanopartículas de óxidos de ferro sintetizadas pelo fungo *Fusarium oxysporum*.

Fonte : Do autor (2022)

A morfologia das nanopartículas de óxidos de ferro foi observada por microscopia eletrônica de varredura, como mostrado na Figura 4.8.

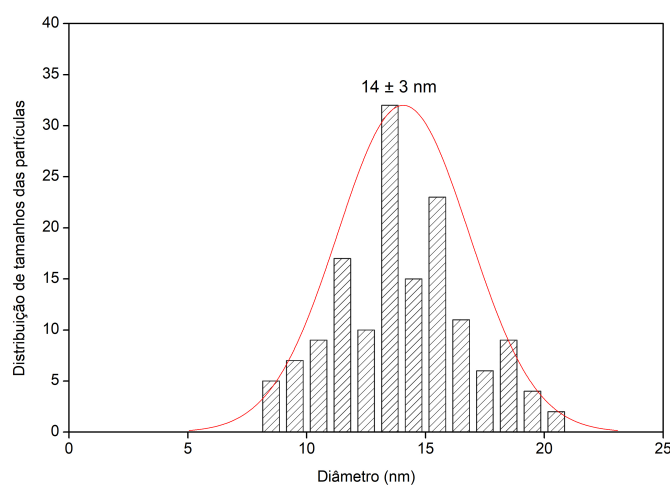
Figura 4.8 – Micrografias das nanopartículas de óxidos de ferro. Magnificação de 100kx.



Legenda: Micrografias das nanopartículas de óxidos de ferro sintetizadas pelo fungo *Fusarium oxysporum*. As setas mostram agregados de nanopartículas de óxidos de ferro.

Fonte : Do autor (2022)

Figura 4.9 – Distribuição de tamanhos das nanopartículas de óxidos de ferro



Legenda: Distribuição de tamanhos das nanopartículas de óxidos de ferro sintetizadas pelo fungo *Fusarium oxysporum*. A medida foi realizada em 150 nanopartículas.

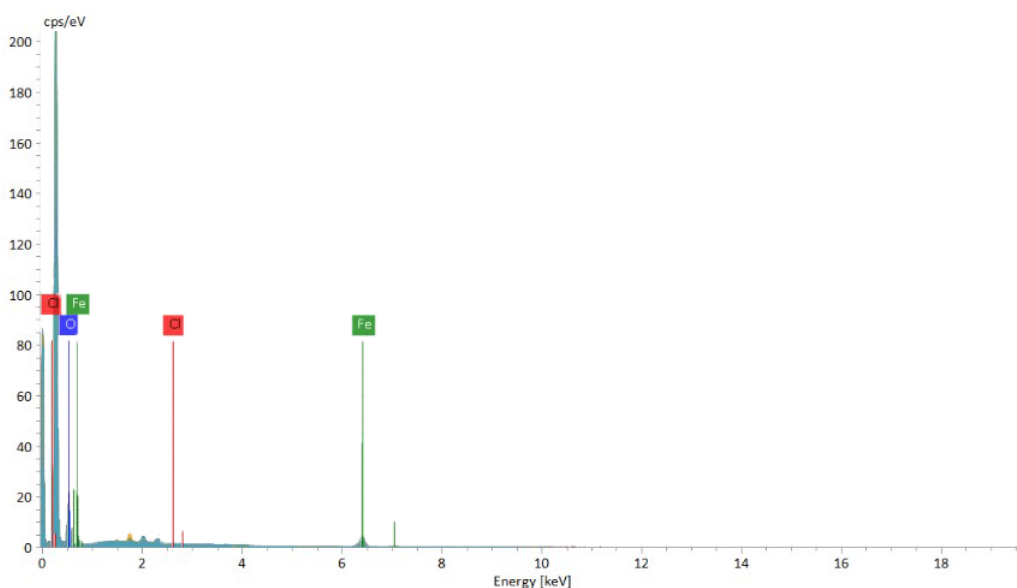
Fonte : Do autor (2022)

As micrografias registradas mostram agregados de nanopartículas de óxidos de ferro, como indicam as setas de cor vermelha (FIGURA 4.8 b)). As nanopartículas não estavam em contato direto mesmo dentro dos agregados, indicando sua estabilização por um agente de capeamento. O tamanho das nanopartículas sintetizadas pelo fungo

Fusarium oxysporum foi caracterizado por microscopia eletrônica de transmissão, sendo observadas nanopartículas esféricas na faixa de tamanho de 8 a 20nm. O diâmetro médio das nanopartículas de óxidos de ferro foi de cerca de 14 ± 3 nm, como pode ser observado na Figura 4.9.

A composição elementar das nanopartículas sintetizadas foi analisada por espectroscopia de raios X por dispersão de energia.

Figura 4.10 – Composição elementar das nanopartículas de óxidos de ferro



Legenda: Composição elementar das nanopartículas de óxidos de ferro sintetizadas pelo fungo *Fusarium oxysporum*.

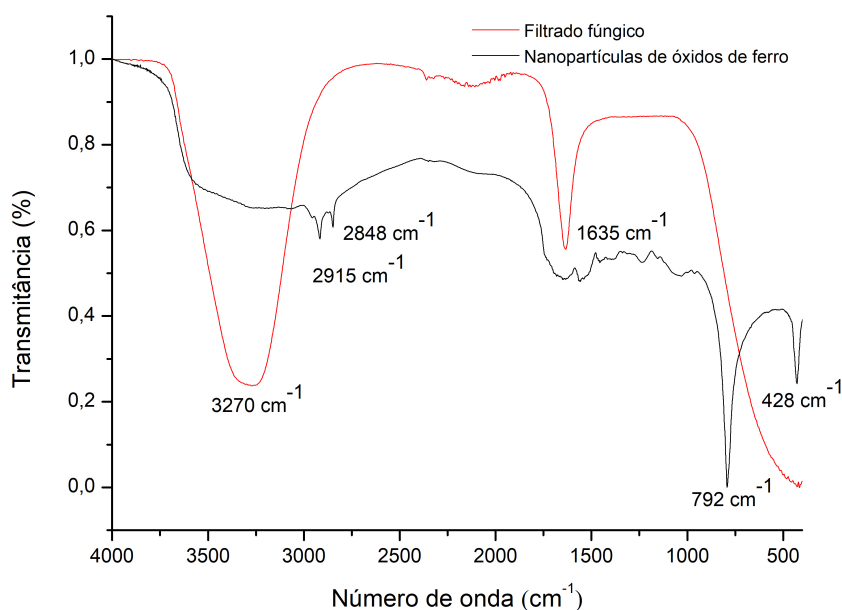
Fonte : Do autor (2022)

A análise confirma a presença de picos de ferro em três regiões diferentes (0,7; 6,4 e 7,0 keV), como mostra na Figura 4.10. Foi determinado que a porcentagem de oxigênio (O) e ferro (Fe) era de 65,1% e 34,74%, respectivamente. A presença de picos predominantes para ferro e oxigênio indicam a formação de nanopartículas de óxidos de ferro (AHMED; AHMARUZZAMAN; BORDOLOI, 2015). Registrou-se uma pequena porcentagem de cloro (Cl) (0,39%), a presença desse elemento deve-se a solução precursora da síntese das nanopartículas de óxidos de ferro.

A espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) foi usada para identificar os grupos funcionais responsáveis pela síntese das nanopartículas. A Figura 4.11 compara a análise FTIR entre o filtrado fúngico e as nanopartículas de óxidos de ferro sintetizadas pelo fungo *Fusarium oxysporum*. O espectro do filtrado fúngico apresentou bandas de absorção em 3270cm^{-1} que corresponde à vibração de alongamento da ligação O-H

do grupo fenólico e da ligação N-H do grupo amina, e 1635cm^{-1} que corresponde à vibração de alongamento da ligação N-H do grupo amida I. As bandas nas regiões amida I e amida II são características de proteínas/enzimas que foram secretadas pela biomassa fúngica durante o período de incubação e podem ser consideradas responsáveis pela redução de íons de ferro (BHARGAVA et al., 2013; LIANG et al., 2017).

Figura 4.11 – Espectros de FTIR das nanopartículas de óxidos de ferro



Legenda: Espectros de FTIR do filtrado fúngico e das nanopartículas de óxidos de ferro sintetizadas pelo fungo *Fusarium oxysporum*.

Fonte : Do autor (2022)

O espectro das nanopartículas exibiram uma banda de absorção em 2915cm^{-1} e 2848cm^{-1} atribuída a presença de grupos de alongamento CH. A banda de absorção em 792cm^{-1} e 428cm^{-1} correspondem a ligação simples de Fe-O, confirmando a síntese das nanopartículas de óxidos de ferro (LUNGE; SINGH; SINHA, 2013; KANAGASUBBULAKSHMI; KADIRVELU, 2017; PAREKH; NAIR; BHARDWAJ, 2020; ABDULLAH et al., 2020).

4.4 Síntese de nanofibras por meio do método de fiação por sopro em solução (SBS)

As nanofibras obtidas pela técnica de SBS podem ser visualizadas na Figura 4.12. Os aspectos macroscópicos não são suficientes para uma caracterização efetiva das

nanofibras. Assim, a partir das micrografias, é possível avaliar a morfologia e calcular o diâmetro médio das nanofibras.

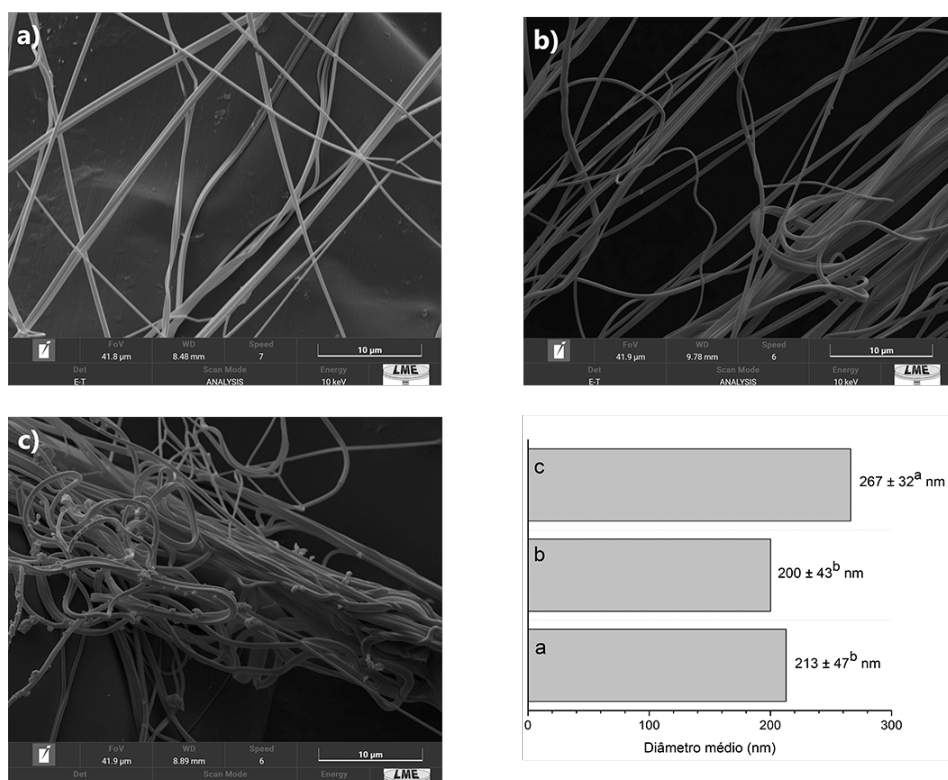
Figura 4.12 – Nanofibras obtidas pela técnica de SBS.



Legenda: Nanofibras obtidas pela técnica de SBS a partir da solução polimérica de PVA.

Fonte : Do autor (2022)

Figura 4.13 – Micrografias e diâmetro médio das nanofibras. Magnificação de 10kx.



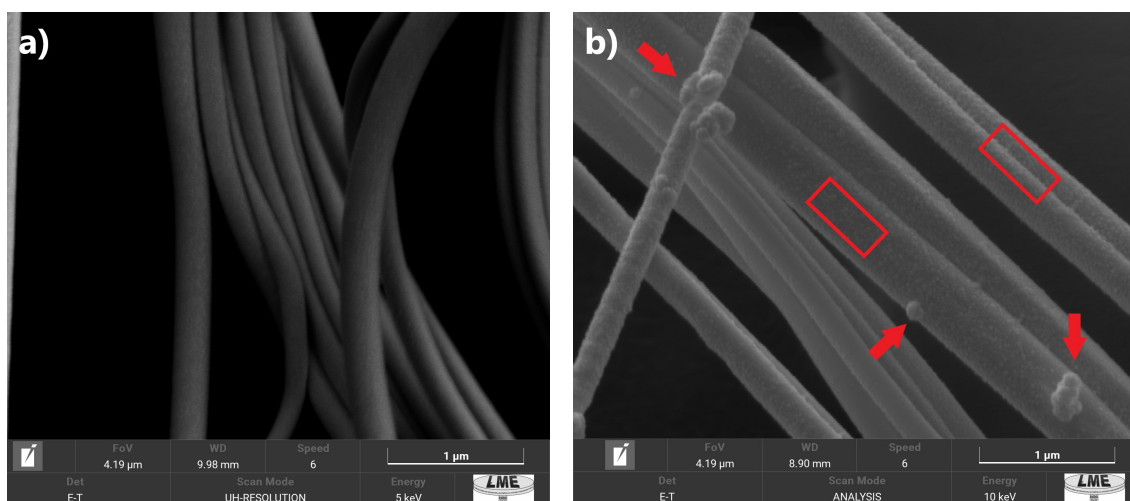
Legenda: Micrografias das nanofibras (a) de PVA puro, (b) PVA com filtrado fúngico e (c) PVA com filtrado fúngico e nanopartículas de óxidos de ferro. O diâmetro médio das nanofibras foi obtido medindo 100 nanofibras.

Fonte : Do autor (2022)

Na Figura 4.13 são mostradas as micrografias das nanofibras de PVA puro, PVA com filtrado fúngico, PVA com filtrado fúngico e nanopartículas de óxidos de ferro e o diâmetro médio de cada amostra. Pelas micrografias, fica evidente a obtenção de nanofibras pelo método SBS. Observou-se que o diâmetro médio medido para as nanofibras de PVA com filtrado fúngico e nanopartículas de óxidos de ferro foi o maior, esse efeito pode estar relacionado à incorporação das nanopartículas de óxidos de ferro. Além disso, o diâmetro médio medido apresentou diferença significativa ($p \geq 0,05$) com a incorporação das nanopartículas de óxidos de ferro.

Pode-se observar a partir da Figura 4.14 b), que as nanofibras apresentaram as nanopartículas de óxidos de ferro de forma dispersa. A presença de pequenos aglomerados nas nanofibras mostra que o tempo em que a solução permaneceu no sonicador não foi suficiente para dispersar todas as nanopartículas. A micrografia sugere que a maior parte das nanopartículas de óxidos de ferro foram incorporadas no interior das nanofibras.

Figura 4.14 – Micrografias das nanofibras. Magnificação de 100kx.

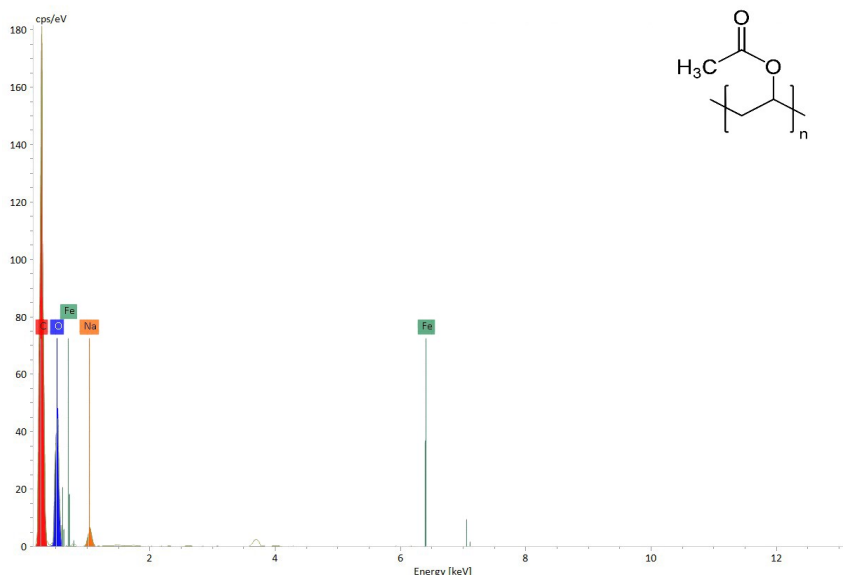


Legenda: Micrografias das nanofibras (a) de PVA puro e (b) PVA com filtrado fúngico e nanopartículas de óxidos de ferro. As setas mostram aglomerados de nanopartículas de óxidos de ferro.

Fonte : Do autor (2022)

Os resultados da análise da composição elementar das nanofibras corroboram para confirmar que as nanopartículas de óxidos de ferro foram incorporadas às nanofibras produzidas, como mostra a Figura 4.15. A presença de sódio deve-se à composição do polímero utilizado no preparo da solução polimérica.

Figura 4.15 – Composição elemental das nanofibras



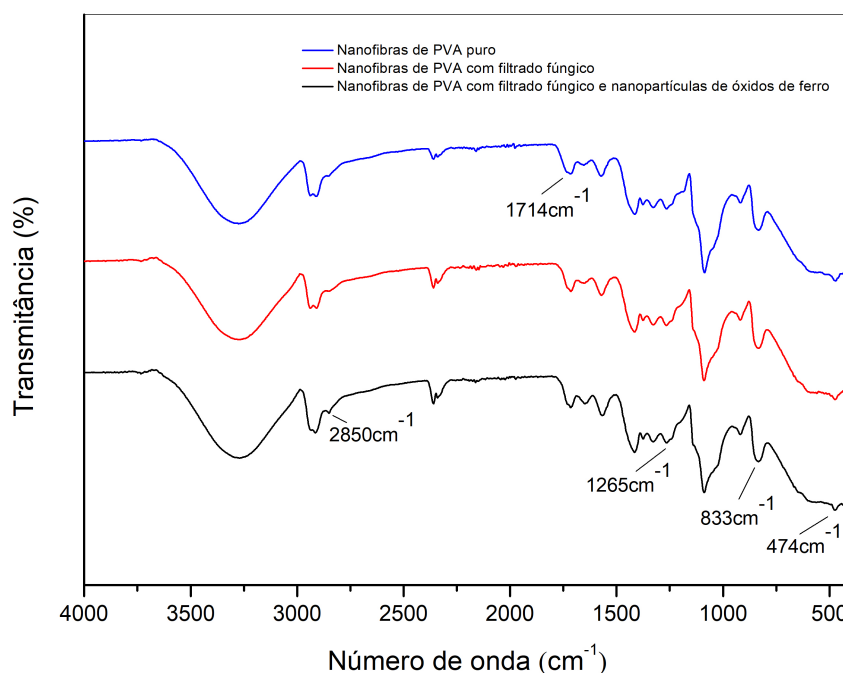
Legenda: Composição elemental das nanofibras incorporadas com nanopartículas de óxidos de ferro. A figura apresenta a estrutura química do poli(álcool vinílico).

Fonte : Do autor (2022)

Na Figura 4.16 são apresentados os espectros de FTIR para o PVA puro, onde são mostradas as bandas características para este polímero, assim como, o comparativo com as amostras contendo o filtrado fúngico e as nanopartículas de óxidos de ferro.

Observa-se bandas localizadas em 2915cm^{-1} , 2913cm^{-1} e 2950cm^{-1} que são atribuídas à presença de grupos de alongamento CH. A banda observada em 1714cm^{-1} refere-se à carbonila (C=O) do grupo acetil do PVA (CHAUDHURI et al., 2022). As bandas em 1415cm^{-1} e 1374cm^{-1} caracterizam o estiramento COO^- e à deformação $-\text{CH}_2$, respectivamente. As bandas em 1265cm^{-1} e 1087cm^{-1} referem-se a vibração de estiramento C-O. A banda observada em 833cm^{-1} está atribuída à deformação vibracional dos grupos C-H. Por fim, as bandas observadas em 474cm^{-1} e 416cm^{-1} correspondem a ligação Fe-O, confirmando a incorporação das nanopartículas de óxidos de ferro nas nanofibras.

Figura 4.16 – Espectros de FTIR das nanofibras obtidas pelo método SBS



Legenda: Espectros de FTIR das nanofibras de PVA puro, PVA com filtrado fúngico, PVA com filtrado fúngico e nanopartículas de óxidos de ferro.

Fonte : Do autor (2022)

A avaliação da atividade enzimática foi realizada seguindo o protocolo descrito na sessão 3.3, com o intuito de verificar se as enzimas ligninolíticas foram imobilizadas nas nanofibras poliméricas. A Tabela 4.1 mostra que a enzima manganês peroxidase exibiu maior atividade, apresentando um valor de $1.33 \text{ U mg de proteína}^{-1}$. Por outro lado, a menor atividade foi apresentada pela enzima lacase com um valor de $0.07 \text{ U mg de proteína}^{-1}$. Com base nestes resultados, pode-se verificar que a metodologia proposta foi eficiente para a imobilização das enzimas ligninolíticas nas nanofibras poliméricas.

Tabela 4.1 – Avaliação da imobilização das enzimas ligninolítica nas nanofibras poliméricas.

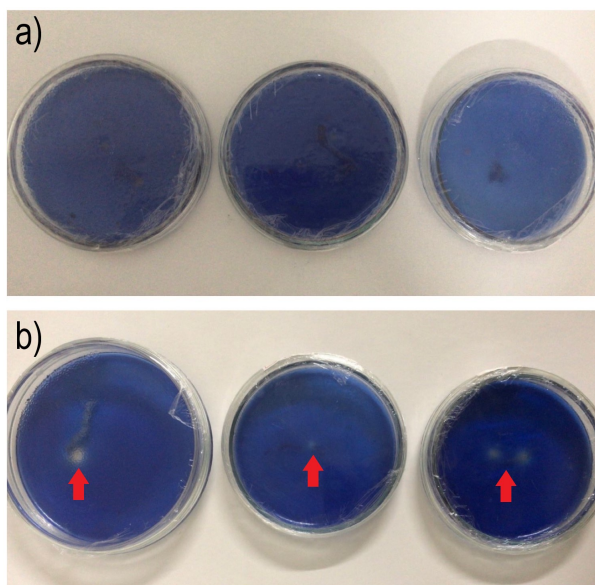
Enzima	Atividade enzimática ($\text{U mg de proteína}^{-1}$)
Lacase	0.07
Lignina peroxidase	0.59
Manganês peroxidase	1.33

Fonte : Do autor (2022)

4.5 Avaliação do potencial de degradação dos derivados de petróleo pelas nanofibras

Para a avaliação do potencial de degradação de derivados de petróleo após a síntese das nanofibras pelo método de SBS foi realizado um teste qualitativo. Para isso, as nanofibras foram colocadas em placas de Petri contendo um meio sólido composto por água, óleo diesel e o indicador DCPIP. Na Figura 4.17, observa-se que após 5 dias houve a descoloração do meio, como mostram as setas de cor vermelha, indicando a degradação do óleo diesel pelas nanofibras de PVA com filtrado fúngico e nanopartículas de óxidos de ferro.

Figura 4.17 – Teste de degradação do óleo diesel pelas nanofibras

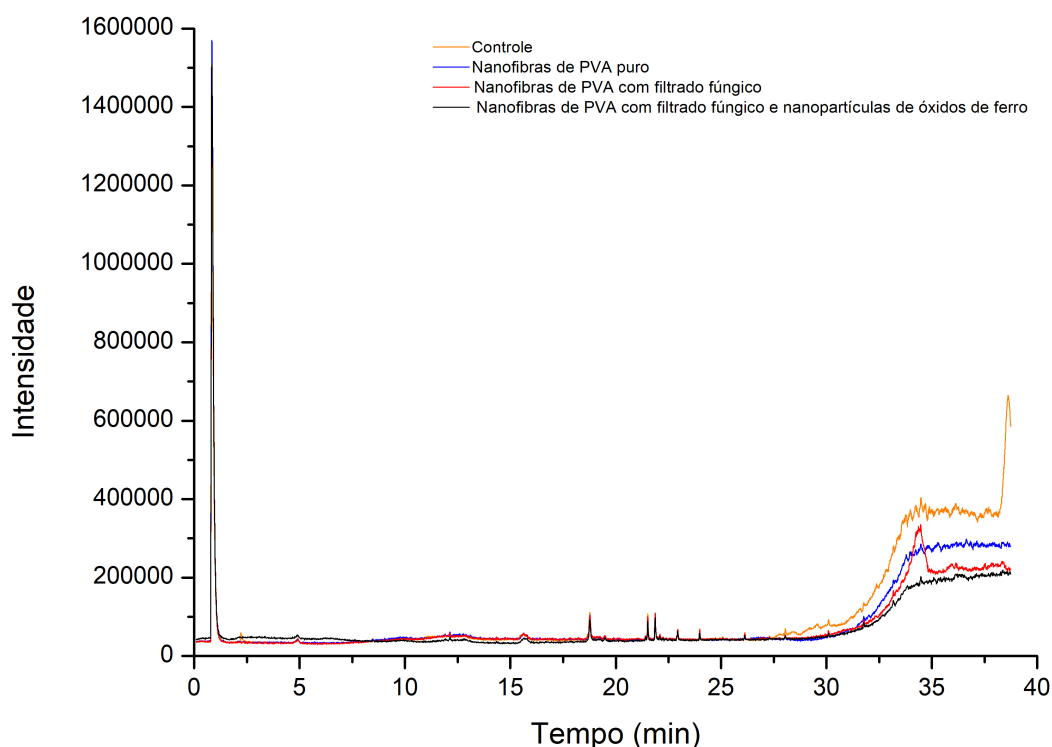


Legenda: Teste de degradação do óleo diesel pelas nanofibras (a) de PVA puro e (b) PVA com filtrado fúngico e nanopartículas de óxidos de ferro. As setas indicam os pontos em que houve a descoloração do meio sólido.

Fonte : Autora (2022)

Os ensaios de avaliação do comportamento da degradação do óleo diesel pelas nanofibras sintetizadas foram submetidos às análises por GC-MS (FIGURA 4.18). Observou-se a presença de uma Mistura Complexa Não Resolvida (Unresolved Complex Mixture – UCM) localizada na proximidade da região de 0 a 5 minutos. A existência da UCM corresponde a uma fração mais pesada do óleo diesel constituída por hidrocarbonetos ramificados e cíclicos, que nem sempre são resolvidos em coluna capilar (ALMUTAIRI, 2021). Alguns autores, descrevem a UCM como uma mistura de compostos orgânicos que não pode ser caracterizada por cromatografia gasosa (LÓPEZ; ROMERO; MÓNACO, 2022).

Figura 4.18 – Cromatogramas do óleo diesel após 15 dias de degradação.



Legenda: Cromatogramas do óleo diesel após 15 dias em contato com as nanofibras de PVA puro, PVA com filtrado fúngico, PVA com filtrado fúngico e nanopartículas de óxidos de ferro.

Fonte : Do autor (2022)

Os dados das análises cromatográficas mostram picos de intensidade significativa dos compostos do óleo diesel nos tempos de retenção entre 15 e 30 minutos (VAISHNAVI et al., 2021). Os compostos de baixo peso molecular foram volatilizados em temperaturas mais baixas e detectados em tempos de retenção menores durante a análise (ELUMALAIA et al., 2021).

Ao analisar os cromatogramas de degradação do óleo diesel, verificou-se uma diferença no comportamento de degradação do óleo diesel em relação ao ensaio controle, indicando que ocorreu a degradação deste derivado de petróleo. Percebe-se que houve uma diminuição significativa na intensidade dos picos referentes aos ensaios contendo as nanofibras de PVA com filtrado fúngico e de PVA com filtrado fúngico e nanopartículas de óxidos de ferro quando comparado com o ensaio controle (PALANISAMY et al., 2014; DIXIT et al., 2018; ZHAO et al., 2021).

A eficiência de biodegradação do óleo diesel foi de aproximadamente 40% e 50% para os ensaios contendo as nanofibras de PVA com filtrado fúngico e de PVA com filtrado fúngico e nanopartículas de óxidos de ferro, respectivamente. Verifica-se que, com a incorporação das nanopartículas de óxidos de ferro nas nanofibras, o processo de degradação tornou-se mais eficiente, confirmando a viabilidade do método de nanobiorremediação (YADAV et al., 2017; NASSAR et al., 2022). Estes resultados caracterizam a degradação dos compostos presentes na composição do óleo diesel, confirmando o que foi obtido no teste qualitativo com o indicador DCPIP. No entanto, o estudo realizado mostrou que as nanofibras produzidas são eficientes na redução da concentração do óleo diesel.

5 CONCLUSÃO

A avaliação qualitativa da produção de enzimas ligninolíticas mostrou que o fungo *Fusarium oxysporum* se destacou na produção de lacase, lignina peroxidase e manganês peroxidase ao usar a glicose como fonte de carbono. No entanto, esse fungo apresentou baixa atividade enzimática ao utilizar o diesel como fonte de carbono. Por outro lado, o fungo *Aspergillus Niger* apresentou maior atividade enzimática ao usar o diesel como fonte de carbono.

A técnica do indicador DCPIP foi eficiente para a seleção de microrganismos que apresentam capacidade de degradar óleo diesel. O tempo necessário para a mudança de cor do meio depende da habilidade dos microrganismos utilizados em atuar nesse processo, com uma variação de aproximadamente 55%. Assim, o método descrito é simples, rápido e eficiente para selecionar os fungos com potencial capacidade de degradação dos derivados de petróleo.

O fungo *Fusarium oxysporum* apresentou um potencial para a síntese extracelular de nanopartículas de óxidos de ferro. Neste caso, as enzimas extracelulares secretadas durante o processo de cultivo do fungo são fundamentais para a redução, capeamento e estabilização das nanopartículas biossintetizadas. Além disso, as nanopartículas apresentaram um comportamento magnético ao serem colocadas em contato com o ímã.

Os resultados demonstram que foi possível produzir fibras em escala nanométrica pela técnica de fiação por sopro em solução. A análise da composição elementar e as micrografias indicaram que as nanopartículas de óxidos de ferro foram incorporadas no interior das nanofibras. As caracterizações realizadas mostraram que o biomaterial obtido apresenta um desempenho satisfatório para aplicação na remediação de solos contaminados com derivados de petróleo.

6 PERSPECTIVAS FUTURAS

O presente trabalho teve como objetivo sintetizar nanofibras de poli(álcool vinílico) incorporadas com nanopartículas de óxidos de ferro e enzimas biossintetizadas por fungos para a nanobiorremediação de solos contaminados com derivados de petróleo. No entanto, ainda é necessário concluir a caracterização das nanopartículas de óxidos de ferro biosintetizadas e das nanofibras produzidas pela técnica de SBS. Para análise das características magnéticas das nanopartículas de óxidos de ferro, serão feitas medidas da magnetização em função do campo magnético aplicado, utilizando-se um magnetômetro de amostra vibrante acoplado a um eletroímã. A difração de raios-X (XRD) será usada para determinar a estrutura, os domínios cristalinos e as fases presentes nas amostras. Além disso, as nanofibras produzidas serão caracterizadas através de análises térmicas como análise termogravimétrica (TG/DTG) e análise calorimétrica exploratória diferencial (DSC).

Este estudo teve como resultado um biomaterial avançado com desempenho satisfatório para aplicação na remediação de solos contaminados com derivados de petróleo. Tais resultados determinam sua viabilidade técnica, motivando o depósito de patente.

Contudo, existe a possibilidade de produzir um metamaterial com propriedades que dependem da aplicação de um campo magnético. Os metamateriais pertencem a uma nova classe de materiais artificiais compostos de pequenas estruturas periódicas formadas de dielétricos e condutores. Essas estruturas formam um material único com as propriedades constitutivas - permeabilidade magnética e permissividade elétrica - efetivas próximas à zero ou até mesmo menores que a unidade (MIRANDA; LOFRANO; JUNIOR, 2022). Esse tipo de material pode ser usado como fibras e tecidos para roupas de proteção para militares, na área da saúde, filtros magnéticos, sensores e futuras gerações de dispositivos eletrônicos, magnéticos e/ou fotônicos usados para armazenamento de informações, imagens magnéticas, blindagem magnética estática e de baixa frequência e indução magnética (WANG et al., 2004; YIFAN et al., 2021).

REFERÊNCIAS

- ABDEEN, M. et al. Microbial-physical synthesis of Fe and Fe₃O₄ magnetic nanoparticles using *Aspergillus niger* yesm1 and supercritical condition of ethanol. **Journal of Nanomaterials**, p. 2, 2016.
- ABDULLAH, J. A. A. et al. Green synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles by *Phoenix dactylifera* leaf extract and evaluation of their antioxidant activity. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 17, 2020.
- ADAMU, B. F. et al. A review of medicinal plant-based bioactive electrospun nano fibrous wound dressings. **Materials Design**, v. 209, 2021.
- AHMED, M. J. K.; AHMARUZZAMAN, M.; BORDOLOI, M. H. Novel avertin extract stabilized magnetite nanoparticles: a green synthesis route for the removal of chlorazol black E from wastewater. **Royal society of chemistry**, v. 5, 2015.
- ALMEIDA, A. F. de. **Síntese de nanopartículas de prata por fungos endofíticos isolados de guaranazeiro e o seu efeito contra fitopatógenos**. Dissertação (Mestrado), Manaus, 2019.
- ALMUTAIRI, M. S. Determination of total petroleum hydrocarbons (TPHs) in weathered oil contaminated soil. **Environmental Engineering Research**, v. 27, 2021.
- ALVES, M. C. Recuperação dos solos degradados pela agricultura. **Encontro Nacional sobre educação ambiental na agricultura**, Campinas, 2006.
- ANDRADE, J. de A.; AUGUSTO, F.; JARDIM, I. C. S. F. Biorremediação de solos contaminados por petróleo e seus derivados. **Eclética química**, Campinas/SP, v. 35, p. 19, 2010.
- ANSTEY, A. et al. Nanofibrillated polymer systems: Design, application, and current state of the art. **Progress in Polymer Science**, v. 113, 2021.
- ARAÚJO, A. M. U. de. **Síntese e caracterização de complexos Co(II) e Ni(II) com l-dopa, carbidopa e benzimidazol**. Dissertação (Mestrado), Natal, 2016.
- ARRUDA, F. V. F. et al. Diversity of culturable aquatic filamentous fungi from littoral south (PE, Brazil) and enzymatic potential. 2015.
- BADGAR, K.; PROKISCH, J. Elemental selenium enriched nanofiber production. **Molecules**, v. 26, 2021.
- BALAMURUGHAN, M. G. et al. Ocimum sanctum leaf extract mediated green synthesis of iron oxide nanoparticles: spectroscopic and microscopic studies. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences**, p. 201–204, 2014.
- BAMFORTH, S. M.; SINGLETON, I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: current knowledge and future directions. **Journal of Chemical Technology Biotechnology**, v. 80, p. 723–736, 2005.
- BARBOSA, M. B. **Superparamagnetismo em jacobsitas sintéticas**. Dissertação (Mestrado), Natal, 2012.

BARROS, C. A. Um estudo sobre biorremediação: uma proposta de ciência a ser levada à sala de aula. Rio de Janeiro, p. 33, 2007.

BENEVIDES, J. A. J.; MARINHO, G. M. Degradação de pesticidas por fungos - uma revisão. **Holos**, v. 2, p. 110–129, 2015.

BENTO, F. et al. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, São Paulo, v. 96, p. 1049–1055, 2005.

BHARGAVA, A. et al. Synthesis, characterization and mechanistic insights of mycogenic iron oxide nanoparticles. **J Nanopart Res**, v. 15, 2013.

BITTENCOURT, J. C. **Fabricação e Caracterização de nanofibras condutoras de Poli(álcool vinílico) com Polianilina (PVA/PANI) para a utilização em sensores de gás amônia**. Dissertação (Mestrado), Presidente Prudente, 2017.

BONAN, R. F. et al. Poly(lactic acid)/poly(vinyl pyrrolidone) membranes produced by solution blow spinning: Structure, thermal, spectroscopic, and microbial barrier properties. **Applied Polymer Science**, v. 134, 2017.

BRAGA, B. et al. **Introdução à engenharia ambiental**. 1. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2002. 305 p.

BRITO, N. N. et al. Utilização de fungos na remediação de efluentes industriais. **IV Fórum de Estudos Contábeis, Faculdade Integradas Claretianas**, São Paulo, 2004.

CAZETTA, A. L. **Síntese e caracterização de carvões ativados magnéticos (CAMs) da casca do coco (Cocos nucifera): Estudos de adsorção do corante Amarelo Crepúsculo**. 18 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Maringá, 2014.

CETESB. **Qualidade do solo**. 2020. Disponível em: <<https://cetesb.sp.gov.br/solo/propriedades/>>.

CHAUDHURI, B. et al. Preparation and characterization of carbon fibre powder (cfp)-polyvinyl alcohol (pva) composite films showing percolation threshold behaviour. **Materials Science and Engineering: B**, v. 275, 2022.

COHEN, R.; PERSKY, L.; HADAR, Y. Biotechnological applications and potential of wood-degrading mushrooms of the genus pleurotus. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 58, p. 582–594, 2002.

CONSOLINI, G. **Síntese e atividade microbiana de nanopartículas metálicas**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Alfenas, nov. 2015.

COSTA, R. G. F. et al. Eletrofiação de polímeros em solução. parte i: Fundamentação teórica. v. 22, n. 2, p. 170–177, 2012.

CUNDY, A. B.; HOPKINSON, L.; WHITBY, R. L. D. Use of iron-based technologies in contaminated land and groundwater remediation: A review. **Science of the Total Environment**, v. 400, p. 42– 51, 2008.

DADOL, G. C. et al. Solution blow spinning (sbs) and sbs-spun nanofibers: Materials, methods, and applications. **Materials Today Communications**, v. 25, 2020.

- DARISTOTLE, J. L. et al. A review of the fundamental principles and applications of solution blow spinning. **ACS Applied Materials Interfaces**, v. 8, p. 3495134963, 2016.
- DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. **Microscopia eletrônica de varredura : aplicações e preparação de amostras : materiais poliméricos, metálicos e semicondutores**. Dissertação (Mestrado), Porto Alegre, 2007.
- DEVI, H. S. et al. Green synthesis of iron oxide nanoparticles using platanus orientalis leaf extract for antifungal activity. **Green Processing and Synthesis**, v. 8, p. 38–45, 2019.
- DIAS, A. E. X. O. Biorremediação de áreas afetadas por resíduos sólidos tóxicos. p. 142, 2000.
- DIXIT, H. et al. Growth optimization and comparative analysis of diesel oil degradation potential of bacillus sp. isolated from petroleum contaminated soil of barmer, rajasthan. **International Journal of Recent Scientific Research**, v. 9, n. 3, p. 24730–24737, 2018.
- DRES, F.; LA, D. F. D.; MACI, M. J. Avaliação das comunidades fúngicas encontradas em amostras de solo: uma revisão sistemática da literatura. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 10, n. 6, 2019.
- DURÁN, N. et al. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several fusarium oxysporum strains. **Journal of Nanobiotechnology volume**, v. 3, n. 8, 2005.
- ELUMALAIA, P. et al. Enhanced biodegradation of hydrophobic organic pollutants by the bacterial consortium: Impact of enzymes and biosurfactants. **Environmental Pollution**, v. 289, 2021.
- FARIA, F. de O.; VERCELHEZE, A. E. S.; MALI, S. Propriedades físicas de filmes biodegradáveis à base de amido de mandioca, álcool polivinílico e montmorilonita. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 487–492, 2012.
- FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. do C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química nova**, v. 32, n. 7, 2009.
- FIGUEIREDO, J. A. P. de. **Síntese e caracterização de nanocompósitos constituídos por nanopartículas de ferrita de cobalto e polianilina**. Dissertação (Mestrado), Lavras, 2018.
- FILHO, M. S. D. **Minerais Magnéticos**. 2020. Disponível em: <https://www.iag.usp.br/~eder/minerais_magneticos.pdf>.
- FILHO, P. F. M. et al. Evaluating the potential of forest species under microbial management of the restoration of degraded mining areas. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 208, n. 1/4, p. 79–89, 2010.
- FILHO, R. P. Z. **Seleção e produção de exo e/ou polissacarídeos de origem microbiana da Amazônia para o uso em odontologia**. Dissertação (Mestrado), Manaus, 2018.
- FRANCISCO, W. C.; QUEIROZ, T. M. de. Biorremediação. **Nucleus**, v. 15, n. 1, p. 249–256, 2018.
- GADE, A.; DURAN, S. G. N.; RAI, M. Green synthesis of silver nanoparticles by phoma glomerata. **Micron**, v. 59, p. 52–59, 2014.

- GALDAMES, A. et al. Zero-valent iron nanoparticles for soil and groundwater remediation. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, 2020.
- GIL-DÍAZ, M. et al. Iron nanoparticles to recover a co-contaminated soil with cr and pcbs. **Scientific Reports**, v. 12, 2022.
- GONZAGA, L. V. **Surfactina desidratada como agente potencializador da biorremediação de solos contaminados com petróleo**. Dissertação (Mestrado), Viçosa, 2013.
- GUERRA, F. et al. Nanotechnology for environmental remediation: materials and applications. **Molecules**, v. 3, p. 1760, 2018.
- GUL, M. Z.; RUPULA, K.; RAO, B. S. Nanobioremediation: a novel application of green-nanotechnology in environmental cleanup. **Microbes and Microbial Biotechnology for Green Remediation**, p. 823–841, 2022.
- HANSON, K. G.; DESAI, J. D.; DESAI, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v. 7, p. 745–748,, 1993.
- HASANIN, M. S. et al. Isolation and characterization of non-cellulolytic aspergillus flavus egypta5. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 160–167, 2019.
- HOLANDA, L. M. et al. Comportamento magnético de materiais por meio da mecânica estatística. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 42, 2020.
- ILLANA, C. Miconanotecnología. **Boletín de la Sociedad Micológica de Madrid**, v. 39, p. 287–293, 2015.
- INAI, R.; KOTAKI, M.; RAMAKRISHNA, S. Structure and properties of electrospun plla single nanofibres. **Nanotechnology**, v. 16, p. 208–213, 2013.
- IORIO, E. D. et al. Characterization of magnetite nanoparticles synthesized from fe(ii)/nitrate solutions for arsenic removal from water. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 2, 2019.
- IROEGBU, A. O. C.; RAY, S. S. Recent developments and future perspectives of biorenewable nanocomposites for advanced applications. **Nanotechnology Reviews**, v. 11, p. 1696–1721, 2022.
- JACQUES, R. J. S. et al. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 4, p. 1192, 2007.
- KANAGASUBBULAKSHMI, S.; KADIRVELU, K. Green synthesis of iron oxide nanoparticles using lagenaria siceraria and evaluation of its antimicrobial activity. **Defence Life Science Journal**, v. 2, n. 4, p. 422–427, 2017.
- KARN, B.; KUIKEN, T.; OTTO, M. Nanotechnology and in situ remediation: A review of the benefits and potential risks. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 12, p. 1823–183, 2009.

KASHYAP, P. L. et al. Myconanotechnology in agriculture: a perspective. **World Journal Microbiology Biotechnology**, v. 29, n. 2, p. 191–207, 2012.

KHAN, A. U. et al. Fungi-assisted silver nanoparticle synthesis and their applications. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 41, p. 1–20, 2017.

KNOBEL, M. Partículas finas: Superparamagnetismo e magnetoresistência gigante. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22, n. 3, p. 387–395, 2000.

LEITE, E. S. **Estudo das propriedades magnéticas de nanopartículas de maghemita dispersas em óleos magnéticos isolantes**. Dissertação (Mestrado), Brasília, 2013.

LE MOS, A. C. C. **Nanofibras ecofriendly de poli(butileno adipato co-tereftalato/polivinilpirrolidona por solution blow spinning com potencial uso na agricultura 4.0**. Dissertação (Mestrado), 2021.

LI, X. qin; ELLIOTT, D. W.; ZHANG, W. xian. Zero-valent iron nanoparticles for abatement of environmental pollutants: Materials and engineering aspects. **Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences**, Pennsylvania, v. 31, n. 4, 2006.

LIANG, M. et al. Optimization for extracellular biosynthesis of silver nanoparticles by penicillium aculeatum su1 and their antimicrobial activity and cytotoxic effect compared with silver ions. **Materials Science and Engineering**, v. 77, p. 963–971, 2017.

LIRA, D. D. de. **Biodegradação de efluentes por fungos filamentosos**. Dissertação (Mestrado), 2019.

LIU, B.; ZHANG, J.; GUO, H. Research progress of polyvinyl alcohol water-resistant film materials. **Membranes**, v. 12, 2022.

LIU, F. et al. Nanotechnology solution blow spinning of food-grade gelatin nanofibers. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 6, 2017.

LÓPEZ, L.; ROMERO, J. A.; MÓNACO, S. L. Severe biodegradation of crude oils from the quiriquire field, eastern venezuelan basin. **Journal of Petroleum Geology**, v. 45, p. 79–94, 2022.

LU, A.-H.; SALABAS, E.; SCHUTH, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1222–1244, 2007.

LUNGE, S.; SINGH, S.; SINHA, A. Magnetic iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles from tea waste for arsenic removal. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 356, p. 21–31, 2013.

MACIEL, C. C. S. et al. Produção de enzimas do complexo lignolítico por fungos filamentosos isolados de locais impactados por petroderivados. **Exacta**, v. 8, n. 3, p. 299–305, 2010.

MAGALHÃES, V. M. de A. **Ensaio de tratabilidade empregando catalisador sintetizado à base de argila em processo oxidativo avançado para remediação de solo com HPAs**. Dissertação (Mestrado), Natal, 2020.

- MAHGOUB, H. A. Nanoparticles used for extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Chemistry**, Saudi Arabia, 2019.
- MAKAROV, V. V. et al. Biosynthesis of stable iron oxide nanoparticles in aqueous extracts of hordeum vulgare and rumex acetosa plants. **Langmuir**, v. 30, p. 5982–5988, 2014.
- MANFRON, S. et al. Aplicação de nanopartículas de ferro zero-valente (nfez) na remediação de solos e águas subterrâneas contaminadas: uma revisão. **Química Nova**, v. 43, n. 5, 2020.
- MARTINS, A. et al. Biorremediação. **III Fórum de Estudos Contábeis, Faculdades Integradas Claretianas**, São Paulo, 2003.
- MARTINS, S. S. S. et al. Produção de petróleo e impactos ambientais: algumas considerações. **HOLOS**, v. 6, n. 31, 2015.
- MEDEIROS, E. S. et al. Solution blow spinning: A new method to produce micro- and nanofibers from polymer solutions. **Applied Polymer Science**, 2009.
- MENDONÇA, D. C. **Automontagem de filamentos de septinas estudada por microscopia eletrônica de transmissão**. Dissertação (Mestrado), São Carlos, 2018.
- MIRANDA, L. A. P.; LOFRANO, R. C. Z.; JUNIOR, M. de S. Avaliação da potencialidade do emprego do polímero pet como lentes eletromagnéticas. **Acta Ambiental Catarinense - Unochapecó**, v. 19, n. 1, 2022.
- MONDARDO, A. A. **Estudo dos efeitos da luz ultravioleta para redução microbiológica em amido de mandioca**. Dissertação (Mestrado), Paraná, 2015.
- MORAIS, A. de. **Desenvolvimento de semicondutores magnéticos diluídos à base de ZnO dopado com Ni obtidos por reação de combustão como materiais de Spintrônica**. Dissertação (Mestrado), João Pessoa, 2018.
- MORAIS, E. B. de. **Biodegradação de resíduos oleosos provenientes de petróleo através do sistema de biopilhas**. Dissertação (Mestrado), Rio Claro, 2005.
- MUKHERJEE, P. et al. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: A novel biological approach to nanoparticle synthesis. **Nano Letters**, v. 1, n. 10, p. 515–519, 2001.
- NASSAR, H. N. et al. Kinetic and statistical perspectives on the interactive effects of recalcitrant polyaromatic and sulfur heterocyclic compounds and in-vitro nanobioremediation of oily marine sediment at microcosm level. **Environmental Research**, v. 209, 2022.
- NAYL, A. A. et al. Review of the recent advances in electrospun nanofibers applications in water purification. **Polymers**, v. 14, 2022.
- NETO, F. N. S. **Preparação e caracterização de óxidos de ferro magnéticos revestidos com polidimetilsiloxano**. 111 p. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual de Goiás, 2012.

NIRANJAN, R. et al. Enhanced wound healing by pva/chitosan/curcumin patches: In vitro and in vivo study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 182, 2019.

OLIVEIRA, J. et al. Effect of solvent on the physical and morphological properties of poly(lactic acid) nanofibers obtained by solution blow spinning. **Journal of Engineered Fibers and Fabrics**, v. 9, n. 4, 2014.

OLIVEIRA, J. E. et al. Properties of poly(lactic acid) and poly(ethylene oxide) solvent polymer mixtures and nanofibers made by solution blow spinning. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 129, p. 3672–3681, 2013.

OLIVEIRA, L. C. A.; FABRIS, J. D.; PEREIRA, M. C. Óxidos de ferro e suas aplicações em processos catalíticos: uma revisão. **Química nova**, v. 36, n. 1, p. 123–130, 2013.

OTTOW, J.; KLOPOTEK, A. V. Enzymatic reduction of iron oxide by fungi. **Applied Microbiology**, v. 18, n. 1, p. 41–43, 1969.

PALANISAMY, N. et al. Diesel biodegradation capacities of indigenous bacterial species isolated from diesel contaminated soil. **Journal of Environmental Health Science and Engineering**, v. 12, n. 142, 2014.

PANAHI, Y. et al. Biotechnological applications of nanomaterials for air pollution and water/wastewater treatment. **Materialstoday: proceedings**, v. 5, n. 7, p. 15550–15558, 2018.

PANDEY, G. Prospects of nanobioremediation in environmental cleanup. **Oriental Journal of Chemistry**, p. 2838–2850, 2018.

PANKHURST, Q. A. et al. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of physics D: Applied physics**, v. 36, 2003.

PAREKH, K.; NAIR, J.; BHARDWAJ, A. Biosynthesis of magnetite nanoparticles: an eco-friendly and scalable approach. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 11, 2020.

PASSARINI, M. R. Z. et al. Induction, expression and characterisation of laccase genes from the marine-derived fungal strains nigrospora sp. cbmai 1328 and arthopyrenia sp. cbmai 1330. **AMB express**, v. 5, 2015.

PEDRON, F. de A. et al. Solos urbanos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 5, p. 1647–1653, 2004.

PENG, R.-H. et al. Microbial biodegradation of polyaromatic hydrocarbons. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 927–955, 2008.

PINHEIRO, M. A. de M. **Produção, caracterização e aplicação do extrato bruto de L. crinitus na descoloração in vitro do corante vermelho congo**. Dissertação (Mestrado), 2018.

PREVEDELLO, C. L.; ARMINDO, R. A. **Física do Solo com Problemas Resolvidos**. 2ª edição revisada e ampliada. ed. Curitiba: [s.n.], 2015. 474 p.

PUTZKE, J.; PUTZKE, M. T. L. **Os Reinos Dos Fungos**. 2. ed. anta Cruz do Sul: EDUNISC, 2002.

- QUEIROZ, C.; SOUSA, A. C. B. de. Production of hydrolytic enzymes by filament fungi in different solid substrates. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 51849–51860, 2020.
- QUINTELLA, C. M.; MATA, A. M.; LIMA, L. C. Overview of bioremediation with technology assessment and emphasis on fungal bioremediation of oil contaminated soils. **Journal of Environmental Management**, v. 241, p. 156–166, 2019.
- RAI, M. et al. Fusarium as a novel fungus for the synthesis of nanoparticles: Mechanism and applications. **Journal of fungi**, v. 139, n. 7, 2021.
- RAI, M. et al. Myconanotechnology: A new and emerging science. **Applied Mycology**, p. 258–267, 2009.
- RAJENDRAN, K. et al. Biosynthesis of hematite nanoparticles and its cytotoxic effect on hep2 cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 74, p. 376–381, 2015.
- RAJPUT, V. D. et al. A review on nanobioremediation approaches for restoration of contaminated soil. **Eurasian Journal of Soil Science**, v. 11, 2022.
- ROBINSON, M. R. et al. As(v) and as(iii) sequestration by starch functionalized magnetite nanoparticles: influence of the synthesis route onto the trapping efficiency. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 21, 2020.
- RODOVALHO, F. L. **Elaboração de nanosorbentes magnéticos à base nanopartículas de Co_{0,5}Mn_{0,5}Fe₂O₄ funcionalizadas com polidimetilsiloxano como protótipos para remediação de águas contaminadas com derivados de combustíveis fósseis.** Dissertação (Mestrado), Brasília, 2015.
- RODRIGUES, E. M. **Prospecção de bactérias degradadoras de petróleo e avaliação de potenciais estratégias de biorremediação para a degradação de hidrocarbonetos na Ilha da Trindade.** Dissertação (Mestrado), Viçosa, 2014.
- RODRIGUES, S.; DUARTE, A. C. Poluição do solo: revisão generalista dos principais problemas. **O Ambiente e a Saúde**, Lisboa, Instituto Piaget, p. 136–176, 2003.
- SANCHES, V. L. Remediação de solos da formação são paulo contaminados por vapores de gasolina. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, p. 32, 2009.
- SANTANA, J. S. et al. Avaliação da viabilidade de aplicação da técnica de atenuação natural monitorada em solos contaminados por óleo diesel. **Revista Gestão Sustentabilidade Ambiental**, v. 9, n. 3, p. 150–172, 2020.
- SHAHVERDI, A. R. et al. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against staphylococcus aureus and escherichia coli. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, p. 168–171, 2007.
- SHIPLEY, H. J.; ENGATES, K. E.; GUETTNER, A. M. Study of iron oxide nanoparticles in soil for remediation of arsenic. **Journal of nanoparticle research**, v. 13, p. 2387–2397, 2010.

SIJINAMANOJ, V. et al. Ligninolytic valorization of agricultural residues by aspergillus nomius and trichoderma harzianum isolated from gut and comb of odontotermes obesus (termitidae). **Chemosphere**, v. 284, 2021.

SILVA, L. P. et al. Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas. **Biotecnologia Aplicada à AgroIndústria**, Blucher, v. 4, 2017.

SILVA, N. C. **Biodegradação de hidrocarbonetos derivados de petróleo em solos contaminados por combustíveis**. Dissertação (Mestrado), 2021.

SILVA, P. da. **Reino Fungi**. 2012. Disponível em: <<https://www.infoescola.com/biologia/reino-fungi/>>.

SILVA, T. H.; OLIVEIRA, J. E. de; MEDEIROS, E. S. de. Obtenção de micro e nanofibras de pvc pela técnica de fiação por sopro em solução. **Polímeros**, v. 25, n. 2, p. 229–235, 2015.

SILVEIRA, V. D. Micologia. **Âmbito Cultural Edições**, Rio de Janeiro, p. 332, 1995.

SINGBUMRUNG, K. et al. Preparation of cu-btc/pva fibers with antibacterial applications. **Fibers and Polymers**, v. 19, n. 7, p. 1373–1378, 2018.

SINGH, H. Mycoremediation: fungal bioremediation. **John Wiley Sons**, New Jersey, p. 617, 2006.

SINGH, R.; BEHERA, M.; KUMAR, S. Nano-bioremediation: An innovative remediation technology for treatment and management of contaminated sites. **Bioremediation of Industrial Waste for Environmental Safety**, Singapore, p. 165–182, 2020.

SINGH, R.; MISRA, V. Application of zero-valent iron nanoparticles for environmental clean up. **Advanced materials for agriculture, food and environmental safety**, p. 385–420, 2014.

SOARES, I. et al. Fungos na biorremediação de áreas degradadas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 78, n. 2, p. 341–350, 2011.

SOUSA, K. C. de; JÚNIOR, J. E. dos S.; SANTOS, V. M. L. dos. Estudo prospectivo sobre o uso da técnica de biorremediação para a recuperação de solos contaminados por derivados do petróleo. **Cadernos de Prospecção**, v. 13, n. 3, p. 795–804, 2020.

SOUZA, A. T. de. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para aplicações biomédicas – um estudo citotóxico em linhagem celular de carcinoma cervical humano (células HeLa)**. Dissertação (Mestrado), São José do Rio Preto, 2011.

STEIN, C. R. **Tratamento hidrotermal de nanopartículas de ferrita de cobalto: Propriedades morfológicas, estruturais e magnéticas**. Dissertação (Mestrado), Brasília, 2016.

TANG, D. et al. Generation of nanofibers via electrostatic-induction-assisted solutionblow spinning. **Applied Polymer Science**, v. 132, 2015.

TANIGUCHI, N. On the basic concept of nanotechnology. **Proceedings of the International Conference on Production Engineering**, Tokyo, p. 18–23, 1974.

- TESSARO, E. F. **Nanobiorremediação de solo contaminado com pentaclorofenol**. Dissertação (Mestrado), Passo Fundo, 2018.
- TIAN, D.; HE, J. H. Macromolecular-scale electrospinning: Controlling inner topologic structure through a blowing air. **Thermal science**, v. 26, p. 2663–2665, 2022.
- VAISHNAVI, J. et al. Biosurfactant mediated bioelectrokinetic remediation of diesel contaminated environment. **Chemosphere**, v. 264, 2021.
- VÁZQUEZ-NÚÑEZ, E. et al. Use of nanotechnology for the bioremediation of contaminants: A review. **Processes**, v. 8, n. 826, 2020.
- VIEIRA, M. E. M. et al. X-ray energy dispersive spectroscopy (eds) coupled with scanning electron microscope (sem): fundamentals and applications in dairy products. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, 2021.
- VIEIRA, R. F.; SILVA, A. A. da. Aplicação de defensivos via Água de irrigação por aspersão. **Feijão**, Viçosa/MG, v. 45, p. 267, 2006.
- VILCHEZ, A. et al. Applications of electrospun nanofibers with antioxidant properties: A review. **Nanomaterials**, v. 10, 2020.
- WANG, M. et al. Field-responsive superparamagnetic composite nanofibers by electrospinning. **Polymer**, v. 45, p. 5505–5514, 2004.
- WU, G. et al. A critical review on the bio-removal of hazardous heavy metals from contaminated soils: Issues, progress, eco-environmental concerns and opportunities. **Journal of Hazardous Materials**, p. 1–8, 2010.
- WU, M. et al. Bioaugmentation and biostimulation of hydrocarbon degradation and the microbial community in a petroleum-contaminated soil. **International Biodeterioration Biodegradation**, v. 107, p. 158–164, 2016.
- WU, W. et al. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 16, n. 2, p. 1, 2015.
- XU, P. et al. Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: A review. **Science of the Total Environment**, v. 424, p. 1–10, 2012.
- YADAV, K. et al. A review of nanobioremediation technologies for environmental cleanup: A novel biological approach. **Journal of Materials and Environmental Sciences**, v. 8, n. 2, p. 740–757, 2017.
- YEW, Y. P. et al. Green biosynthesis of superparamagnetic magnetite Fe_3O_4 nanoparticles and biomedical applications in targeted anticancer drug delivery system: A review. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 13, n. 1, p. 2287–2308, 2020.
- YIFAN, J. et al. A review on electrospun magnetic nanomaterials: methods, properties and applications. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 9, p. 9042–9082, 2021.
- ZAKARIYA, N. A.; MAJEED, S.; JUSOF, W. H. W. Investigation of antioxidant and antibacterial activity of iron oxide nanoparticles (ionps) synthesized from the aqueous extract of penicillium spp. **Sensors International**, v. 3, 2022.

ZHAO, J. et al. Remediation of diesel fuel polluted soil using dielectric barrier discharge plasma. **Chemical Engineering Journal**, v. 417, 2021.