

Universidade Federal de São Carlos - *Campus Sorocaba*
Programa de Pós-Graduação em Planejamento e Uso de Recursos
Renováveis



ADRIANA SHEYLA MOURA MURARI

**Avaliação da Influência de Diferentes Solos na
Degradação de Hidrogel de Amido Modificado
com EDTAD**

Prof. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte

Prof. Dr. Tiago Palladino Delforno

SOROCABA -SP

2024

ADRIANA SHEYLA MOURA MURARI

**Avaliação da Influência de Diferentes Solos na Degradação de Hidrogel
Produzido a Partir de Amido Modificado com EDTAD**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Planejamento e Uso de Recursos Renováveis da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de mestre em Ciências Ambientais.

Orientadores:

Prof. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte

Prof. Dr. Tiago Palladino Delforno

Sorocaba-SP

2024

Moura-Murari, Adriana Sheyla

Avaliação da Influência de Diferentes Solos na Degradação de Hidrogel Produzido a Partir de Amido Modificado com EDTAD / Adriana Sheyla Moura-Murari -- 2024.
68f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba
Orientador (a): Iolanda Cristina Silveira Duarte
Banca Examinadora: Iolanda Cristina Silveira Duarte, Luisa Helena dos Santos Oliveira,
Vitor Hugo Lima
Bibliografia

1. Biodegradação de polímeros naturais. 2. Microbiologia ambiental. I. Moura-Murari,
Adriana Sheyla. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano - CRB/8 6979



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências e Tecnologias Para a Sustentabilidade
Programa de Pós-Graduação em Planejamento e Uso de Recursos Renováveis

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Adriana Sheyla Moura Murari, realizada em 05/04/2024.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Iolanda Cristina Silveira Duarte (UFSCar)

Profa. Dra. Luísa Helena dos Santos Oliveira (UFABC)

Prof. Dr. Vitor Hugo de Lima (UFSCar)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Planejamento e Uso de Recursos Renováveis.

Dedicatória

À minha querida filha, que sempre acreditou em mim, mesmo quando eu não acreditei.

À minha mãe, cuja força e a fé sempre me inspiraram e completaram quando minha própria força e fé não foram suficientes.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por minha vida e por me permitir que eu pudesse chegar até aqui, dando-me capacidade e abrindo meus caminhos.

À minha família, meu marido Davi e minha filha Helena, por compreender minhas ausências, fazer o que precisava ser feito por mim

À minha querida orientadora Prof. Dra. Iolanda por aceitar me orientar e guiar academicamente, por ser sempre mais do que uma orientadora, mas uma grande amiga em momentos difíceis em tantos aspectos da minha vida.

Ao Tiago por me orientar, por me ensinar tanto e por ser tão paciente em todos os momentos.

Ao Professor Vagner Botaro por idealizar esse projeto junto comigo, a Iolanda, o Tiago e a Karina, e por fazer contribuições tão pertinentes durante o desenvolvimento deste trabalho, e por ceder-me o laboratório, equipamentos e reagentes.

À Karina, que, além de ceder-me seu hidrogel, caminhou comigo segurando-me pela mão nas primeiras etapas desse projeto.

Também à Joelen e ao Vitor, que foram parceiros incríveis de laboratório, ajudado sempre que precisei.

À Professora Luísa Oliveira ampliar minha visão em contribuições tão significativas.

A todos os colegas do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA), especialmente à Letícia, por ter me ajudado com a análise de matéria orgânica, a Gabi, por me ajudar tanto em tantos momentos, desde o início, na parte experimental, como na conclusão, orientando-me da parte escrita. Também a Mari, Ju, Amanda e Fran (*in memoriam*), que sempre estiveram dispostas a ajudar e ensinar.

À CAPES pela bolsa de mestrado.

Ao SENAI por apoiar minha pesquisa, permitindo fazer análises em suas dependências e utilizando seus equipamentos.

*"Você não pode passar por um único dia sem causar impacto no mundo à sua volta.
Aquilo que você faz causa a diferença, e você precisa decidir qual o tipo de diferença
você quer fazer."*

Jane Goodall

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar a influência da degradação de um novo hidrogel (produzido a partir de amido modificado com EDTAD) em dois diferentes solos e a comunidade bacteriana envolvida nesse processo. Os solos são um argissolo, o qual chamou-se “solo A”, e um latossolo vermelho, chamado de “solo B”. Ambos foram coletados em Araçoiaba da Serra, SP. Os solos foram caracterizados e o argissolo apresentou 12,4% de matéria orgânica e pH 5,1, e o latossolo vermelho, 11,6% de matéria orgânica e pH 4,6. O argissolo também apresenta mais umidade residual e quantidades maiores de micro e macronutrientes, como fósforo, cálcio, magnésio e outras características físico-químicas como capacidade de troca de cátions, enquanto o latossolo possui mais fosfato de cálcio e alumínio. O ensaio de biodegradação foi feito utilizando-se o método respirométrico de Bartha, aferindo-se a biodegradação através de titulação da solução de KOH que captou o CO₂ emitido pela microbiota presente nos respirômetros com solo e amostra de hidrogel. Observou-se que a biodegradação do hidrogel no argissolo foi mais eficiente, mas completa e linear. Após o fim dos experimentos de degradação o DNA do solo foi extraído e o sequenciamento para uma análise qualitativa dos microrganismos presentes. Foram encontrados de 340 a 480 perfis genéticos em cada uma das amostras, com a maior diversidade sendo na amostra de solo B pós-biodegradação, e a menor, no solo A pós-biodegradação. O fato de dois solos diferentes terem sido usados neste estudo, evidencia o quão importantes suas propriedades físico-químicas na atividade dos microrganismos presentes no processo de biodegradação, pois a amostra incubada no solo A, mais rico em matéria orgânica (ainda que com discreta diferença), micro e macronutrientes e maior acidez obteve uma biodegradação mais completa e uniforme, enquanto o solo B, com características opostas obteve uma biodegradação menor do hidrogel, mesmo tendo sido incubado por mais tempo, fato que pode ter sido influenciado por uma maior concentração de alumínio, que influencia para uma menor atividade bacteriana.

Palavras-chave: Hidrogel, Biodegradação, Microrganismos, Solos.

ABSTRACT

This study evaluated the influence of the degradation of a new hydrogel produced from EDTAD-modified starch in two different soils and the bacterial community involved in this process. The soils are an argisol, which was called "soil A", and a red oxisol, called "soil B". The soils were characterized and the argisol presented 12.4% of organic matter and pH 5.1, and the red oxisol, 11.6% of organic matter and pH 4.6. The argisol also has more residual soil moisture and higher amounts of micro and macronutrients, such as phosphorus, calcium, magnesium, and other physical characteristics such as cation exchange capacity, while the oxisol has more calcium phosphate and aluminum. The biodegradation test was performed using the Bartha respirometric method, measuring biodegradation by titrating the KOH solution that captured the CO_2 emitted by the microbiota present in the respirometers with soil and hydrogel sample. It was observed that the biodegradation of the hydrogel in the argisol was more efficient, but more thorough and linear. After the end of the degradation experiments, the soil DNA was extracted from the DNA and sequenced for a qualitative analysis of the existing microorganisms. 340 to 480 genetic profiles were found in each one of the samples, with the highest diversity being in the soil sample B with hydrogel post-biodegradation, and the lowest, in soil A post-biodegradation. The fact that two different soils were used in this study shows how important their physicochemical properties are in the activity of the microorganisms present in the biodegradation process, since the sample incubated in the soil, richer in organic matter (albeit with a slight difference), micro and macronutrients and higher acidity obtained a more complete and uniform biodegradation, while soil B, with opposite characteristics, obtained a lower biodegradation of the hydrogel, even though it was incubated for a longer time, a fact that may have been influenced by a higher concentration of aluminium, which influences a lower bacterial activity.

Keywords: Hydrogel. Biodegradation Microorganisms. Soils.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação teórica da estrutura química do hidrogel de amido. Fonte: Karina Palmezani do Carmo	19
Figura 3 – Esquema de fluxo de trabalho de Sequenciamento NGS. Autoria Própria.	25
Figura 4 - Esquema das etapas de desenvolvimento do ensaio de biodegradação, envolvendo o hidrogel sintetizado a partir de amido com dianidrido do ácido etilenodiaminotetracético, por meio de respirometria de Bartha. Elaborado pela autora com BioRender®.	27
Figura 5 – Hidrogel de amido de milho entrecruzado com EDTAD usado no ensaio de biodegradação. Fonte: Autoria própria	28
Figura 6 – Mapa de visualização do Argissolo e Latossolo na região de Araçoiaba da Serra, SP. Escala 1: 108.000. Fonte: DataGeo.	29
Figura 7 – Comparação visual dos solos A e B após a coleta e após a passagem por peneira de 2mm, antes de se adicionar a amostra. Fonte: Autoria própria.....	30
Figura 8 – Esquema de vista em corte de um respirômetro de Bartha. Elaborado pela autora com BioRender®.	34
Figura 9 – Comparação visual dos solos A e B, coletados na cidade de Araçoiaba da Serra, SP, na seguintes coordenadas: Solo A; 23°31'48.0"S 47°37'48.0" O; à profundidade de 1,50m; e Solo B; 23°29'24.0"S 47°36'36.0"O; à profundidade de 1,80 m. Fonte: Autoria própria	36
Figura 10 – Respirômetros preparados para a incubação com solo, com e sem (controle) amostras de hidrogel, e solução de KOH no braço lateral para a captação de CO ₂ . Fonte: Autoria própria	37
Figura 11 – Produção de CO ₂ no solo A. Fonte: A Autoria própria.	45
Figura 12 – Produção de CO ₂ no solo B nos respirômetros com amostra comparados aos respirômetros com solo sem amostras. Fonte: Autoria própria.....	46
Figura 13 – Comparação da emissão de CO ₂ entre os dois solos. Fonte: Autoria própria ...	47
Figura 14 – Comparação da emissão CO ₂ entre os dois solos sem amostra hidrogel.	47
Figura 15 – Respirômetro com solo A e amostra de hidrogel após 20 semanas de degradação no solo A. Fonte: Autoria própria	48
Figura 16 - Respirômetro com solo B e amostra de hidrogel após 20 semanas de degradação no solo B. Fonte: Autoria própria	49
Figura 17 – Gráfico com as curvas de rarefação das amostras iniciais e finais de cada solo. Fonte: Autoria própria	51
Figura 18 – Diversidade de gêneros de bactérias (25 mais relevantes) por cada amostra de solo.	52
Figura 19 – Diversidade Alfa. Chao1. Mostra a riqueza da diversidade em cada amostra: Solo A inicial sem amostra (laranja), solo A final, pós-biodegradação do hidrogel (roxo), solo B inicial (verde) e solo B final (rosa). Fonte: Autoria própria	53
Figura 20 – Análises de Coordenadas Principais (PCoA) da diversidade beta usando os índices Bray-Curtis (A) e Jaccard (B) das comunidades microbianas das amostras dos solos A inicial sem hidrogel (laranja), A final depois da biodegradação do hidrogel (roxo), B inicial (verde), e B final depois da biodegradação (rosa). Fonte: Autoria própria.....	54
Figura 21 - Diagrama de Venn com as relações das comunidades de cada amostra. Fonte: Autoria própria.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Identificação das amostras	35
Tabela 2. Identificação dos solos em que foi feita extração de DNA para sequenciamento e posterior identificação de bactérias através do Gene 16S	39
Tabela 3. Análise quantitativa de macronutrientes por extração com ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) e Determinação por espectrofotometria de absorção atômica	41
Tabela 4. Análise quantitativa de micronutrientes por extração com ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) e Determinação por espectrofotometria de absorção atômica	43
Tabela 5. Comparação do pH dos solos em diferentes momentos do processo de biodegradação	43
Tabela 6. Número de <i>reads</i> do sequenciamento das amostras dos solos A e B iniciais e finais	50
Tabela 7. 25 Gêneros mais abundantes distribuídos entre as quatro amostras analisadas	56
Tabela 8. Gêneros mencionados na literatura como degradadores de polímeros e/ou amilolíticos na proporção em que apareceram nas amostras	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
B	Boro
C¹⁴	Carbono 14
Ca₃(PO₄)₂	Fosfato de Cálcio
CaCl₂	Cloreto de Cálcio
CH₄	Metano
CO₂	Gás Carbônico
CTC	Capacidade de troca de cátions
Cu	Cobre
DBO	Demanda bioquímica de Oxigênio
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTPA	Ácido Dietilenotriaminopentacético
EDTAD	Dianidrido de Etilenodiaminotetracético
Fe	Ferro
H+Al SMP	Acidez Potencial
KCl	Cloreto de Potássio
KOH	Hidróxido de Potássio
m	Saturação por alumínio
mL	Mililitros
Mn	Manganês
M.O.	Matéria Orgânica
OH	Hidroxila
pH	Potencial Hidrogeniônico
S	Enxofre
SB	Soma de Bases
SAP	Polímeros Superabsorventes (<i>Superabsorbent Polymers</i>)
SO₃H	Ácido Sulfônico
SP	São Paulo
V	Saturação da Capacidade de Troca de Cátions por bases
Zn	Zinco

LISTA DE FÓRMULAS

1. Saturação por bases

$$V(\%) = 100 * SB / CTC \dots\dots\dots\mathbf{24}$$

2. Cálculo de Densidade Aparente

$$A = \frac{m6 - m4}{V_i} \dots\dots\dots\mathbf{31}$$

3. Cálculo de Umidade Residual

$$UR = \frac{m5 - m6}{m6 - m4} \times 100 \dots\dots\dots\mathbf{31}$$

4. Cálculo de Capacidade de Campo

$$CC = \frac{(m7 - m6) - (m3 - m4)}{m6 - m4} \dots\dots\dots\mathbf{32}$$

5. Cálculo da produção de CO₂

$$mol\ CO_2\ solo\ (res\acute{u}duo) = (A - B) \times 50 \times f_{HCl} \dots\dots\dots\mathbf{38}$$

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS GERAIS	16
2.1. Objetivos Específicos	16
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1. Hidrogel	17
3.1.1. <i>Hidrogel de Amido</i>	17
3.1.2. <i>Hidrogel de Amido de Milho Modificado com EDTAD</i>	18
3.2. Biodegradação de Hidrogéis	19
3.2.1. <i>Diversidade Bacteriana nos Processos de Biodegradação de Hidrogéis</i>	21
3.2.2. <i>Respirometria como método de mensurar a biodegradação</i>	22
3.3. Solos	23
3.3.1. <i>Latosolo</i>	23
3.3.2. <i>Argissolo</i>	24
3.4. Bioinformática na identificação de táxons	25
3.5. Gene rRNA 16S	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Hidrogel	27
4.2. Coleta E Caracterização Dos Solos	29
4.2.1. <i>Densidade Aparente</i>	30
4.2.2. <i>Umidade Residual</i>	30
4.2.3. <i>Capacidade de Campo</i>	32
4.2.4. <i>Determinação de pH</i>	32
4.2.4.1. <i>Método de Determinação do pH</i>	32
4.3. Ensaio de Biodegradação	34
4.3.1. <i>Respirômetro</i>	34
4.4. Titulação para medir a emissão de CO₂	37
4.5. Extração de DNA dos Solos	39
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1. Biodegradação do hidrogel nos solos	44
5.2. Comunidade Microbiana Presente nos Solos	49
5.3. Análise dos Dados de Sequenciamento	50
5.3.1. <i>Curva de Rarefação</i>	50
5.3.2. <i>Diversidade Alfa</i>	51
5.3.3. <i>Diversidade Beta</i>	53
5.3.4. <i>Discussão de Proporção</i>	55
5.4. Correlação das Características dos Solos com as Comunidades Microbianas	58
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	59
7. REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE A	67
APÊNDICE B	68

1. INTRODUÇÃO

Hidrogéis, ou Polímeros Superabsorventes (*Superabsorbent Polymers*, SAP, na sigla em inglês), são polímeros que possuem diversas aplicações e nos últimos anos, têm sido aplicados em diferentes áreas tais como: medicina (regeneração de tecidos, liberação controlada de medicamentos no organismo, lentes de contato); na agricultura (hidrogel para plantio que mantém solo úmido e melhoram a fixação de nitrogênio; cuidados e higiene pessoal (absorventes femininos, fraldas descartáveis); na indústria de alimentos (embalagens). Além disso, os hidrogéis têm uma grande capacidade de resposta a condições ambientais diversas, como mudança de temperatura, de pH, variações de campo magnético, e a alguns estímulos elétricos (QAMRUZZAMAN, 2022).

Contudo, a maior parte desses hidrogéis é produzida a partir de polímeros sintéticos como polietileno glicol (PEG), poliacrilamida (PAM), álcool polivinílico (PVA) e polimetilmetacrilato (PMMA), que são bastante utilizados por causa de suas propriedades mecânicas e estrutura moldável (DIMATTEO *et al*, 2018). Porém, é um fato já amplamente conhecido que estes materiais são produzidos a partir de petróleo, um combustível fóssil, de extração finita, além de ter uma longuíssima durabilidade, pois é de difícil degradação natural, o que gera poluição generalizada em ambientes mais variados, como solo, rios, oceanos e até em gelo polar (KANHAI *et al*, 2020).

No entanto, hidrogéis também podem ser produzidos por meio de materiais sintetizados a partir de fontes renováveis, como é o caso dos hidrogéis de polissacarídeos biodegradáveis, que têm se tornado cada vez mais interessantes, devido a suas características, como alta absorção de água, maleabilidade e alta resistência mecânica, por exemplo (LI *et al.*, 2017). Quando de origem sustentável, os hidrogéis são considerados como biomateriais inovadores porque possuem algumas propriedades únicas como: capacidade de biodegradação, arquitetura estável, biocompatibilidade e sustentabilidade, grande capacidade de absorção de metabólitos e nutrientes solúveis em água (BOTARO *et al*, 2020).

Os hidrogéis de polímeros naturais, podem ser de origem vegetal, como o de amido, celulose, lignina, alginato etc., ou também de origem animal, que é o caso da quitosana (BOTARO *et al*, 2020).

O hidrogel estudado nesta pesquisa foi sintetizado de forma experimental em laboratório, fruto de um trabalho de doutorado em processo de finalização no Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Materiais da UFOP. Ele é composto principalmente por amido de milho.

Amido é um carboidrato natural que consiste principalmente em dois componentes: amilose e amilopectina e as suas características biológicas e físico-químicas, oferecem grande aplicabilidade em sua utilização como hidrogel. Além de serem uma fonte alternativa limpa e barata em relação aos sintéticos (LI *et al*, 2017). Sua utilização em solos contaminados seria uma alternativa para a remoção de metais potencialmente tóxicos (LI *et al*, 2017).

Quando o hidrogel é incorporado ao solo é biotransformado em CO₂, água e biomassa microbiana (IMMIRZI, 2009). O processo de biodegradação pode ser monitorado pela formação de CO₂, pela demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e perda de massa do hidrogel (BASTIOLI, 2005).

Há muitas formas de se medir a biodegradabilidade de hidrogéis no solo: pode ser investigada através da quantificação da emissão de CO₂ proveniente da incubação do hidrogel no solo; medindo-se a matéria orgânica do solo modificado quando comparado ao solo natural; medindo-se a perda de massa através do método de aterramento em solo, em que se monitora o acúmulo de biomassa microbiana; monitoramento de mudanças nas propriedades físicas do hidrogel por tempo ou marcando o hidrogel com carbono-14 (C¹⁴) e rastrear o C¹⁴ ou o CH₄ liberado do metabolismo do polímero (ADJUIK *et al.*, 2023).

Conhecer o solo em que foi feito o ensaio de biodegradação, seus micro e macronutrientes, suas características físico-químicas, bem como os microrganismos presentes no processo através do sequenciamento do gene rRNA 16S, possibilita que se tenha um conhecimento mais amplo sobre os efeitos do hidrogel no solo e que ele possa ser sintetizado e utilizado, sabendo-se que se trata de um material seguro para o meio ambiente.

2. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a influência da comunidade bacteriana presente em dois diferentes solos (argissolo e latossolo vermelho) na degradação de um novo hidrogel produzido a partir de amido modificado com EDTAD.

2.1. Objetivos Específicos

- Comparar dois solos quanto ao processo de biodegradação do hidrogel de amido de milho;
- Identificar pelo sequenciamento do gene 16S do RNA ribossomal a microbiota bacteriana presente nos solos usados nos processos de biodegradação;
- Caracterizar os solos utilizados analisando o pH, micro e macronutrientes, capacidade de campo, densidade aparente, umidade residual e matéria orgânica;
- Avaliar a influência da composição da comunidade bacteriana presente nos solos na degradação do hidrogel.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Hidrogel

Hidrogéis, ou Polímeros Superabsorventes (SAP, na sigla em inglês), são polímeros que possuem aplicações em áreas diversas, como agricultura, área médica, farmacêutica e ambiental (LANTHONG *et al*, 2006; CHIRANI *et al*, 2015). Podem ser confeccionados de materiais de origem petroquímica, mas também de materiais de fontes renováveis, como é o caso do material estudado nesta pesquisa. O hidrogel alvo deste estudo é composto principalmente por amido de milho e de outros reagentes.

Esse material é comumente composto de grupos hidrofílicos como grupos -OH e -SO₃H, por exemplo. Podem também ser naturalmente neutros ou iônicos (PEPPAS & KHARE, 1993; CORREA *et al*, 2021). Essas características são o que fazem com que os hidrogéis tenham tanta versatilidade de aplicações.

Os hidrogéis podem ser neutros ou iônicos, a depender do intuito para sua aplicação. Os hidrogéis neutros não apresentam grupos ionizáveis na rede polimérica, o por isso tendem a não ter variações de pH. Quanto aos hidrogéis iônicos, eles podem ser aniônicos, catiônicos ou anfóteros, ou seja, que pode se comportar como base ou ácido.

3.1.1. Hidrogel de Amido

O amido é um polissacarídeo obtido de raízes, grãos e tubérculos. Tradicionalmente, o amido tem um papel importante na alimentação, mas tem passado a ter outras aplicações como na indústria têxtil, farmacêutica e de papel (LAYCOCK & HALLEY, 2014).

Hidrogéis à base de amido oferecem enormes vantagens: abundância na natureza a um baixo custo, que pode ser aplicado em uma escala industrial, sustentabilidade, alta biodegradabilidade.

O amido é a principal forma de armazenamento de carboidratos de plantas como arroz, trigo, milho, batata e mandioca. É composto pela mistura de dois polímeros: amilose e amilopectina (CORRADINI *et al*, 2007)

No entanto, desvantagens também precisam ser avaliadas, como propriedades mecânicas limitadas e problemas de processamento (XU *et al*, 2014). Entre as limitações mecânicas do amido nativo, podem-se destacar estabilidade térmica, integridade mecânica e absorção de umidade (TANG *et al*, 2008). Para combater essas limitações, é comum que o amido seja misturado a outros materiais, para poder melhorar essas propriedades (ENCALADA *et al*, 2018). Alguns desses materiais podem ser, glicerol, glicose, sorbitol, ureia, álcool polivinílico (PVOH) e etilenoglicol.

Um desses materiais pode ser o reagente bifuncional, Dianidrido de Ácido Etilenodiaminotetraácido (EDTAD). Este reagente, quando inter cruzado com outros materiais, pode ser capaz de adsorver metais como chumbo, cobre, Cádmiio, Cobalto, entre outros (YU *et al*, 2008) (WANG *et al*, 2022), contribuindo assim para a remediação de áreas contaminadas com esses elementos metálicos.

3.1.2. Hidrogel de Amido Modificado com EDTAD

O hidrogel estudado foi modificado com o reagente bifuncional dianidrido do ácido etilenodiaminotetraacético (EDTAD). O EDTAD é obtido através da reação de desidratação do EDTA ácido com anidrido acético e piridina, que, por sua vez, funciona como um agente de reticulação amplamente usado nas indústrias farmacêutica, química e alimentícia (CARMO, 2020).

Quando esse reagente é aplicado a um hidrogel, pode ser utilizado na agricultura como um agente para liberação controlada de micronutrientes no solo (SENNA e BOTARO, 2017); podendo ser uma ferramenta ambiental, contribuindo na remoção de metais potencialmente tóxicos em ambientes aquáticos contaminados (SENNA E BOTARO, 2019).

Na estrutura do hidrogel, além do EDTAD, identificam-se grupos de amilose, amilopectina e hidroxilas livres, conforme visto na figura 1.

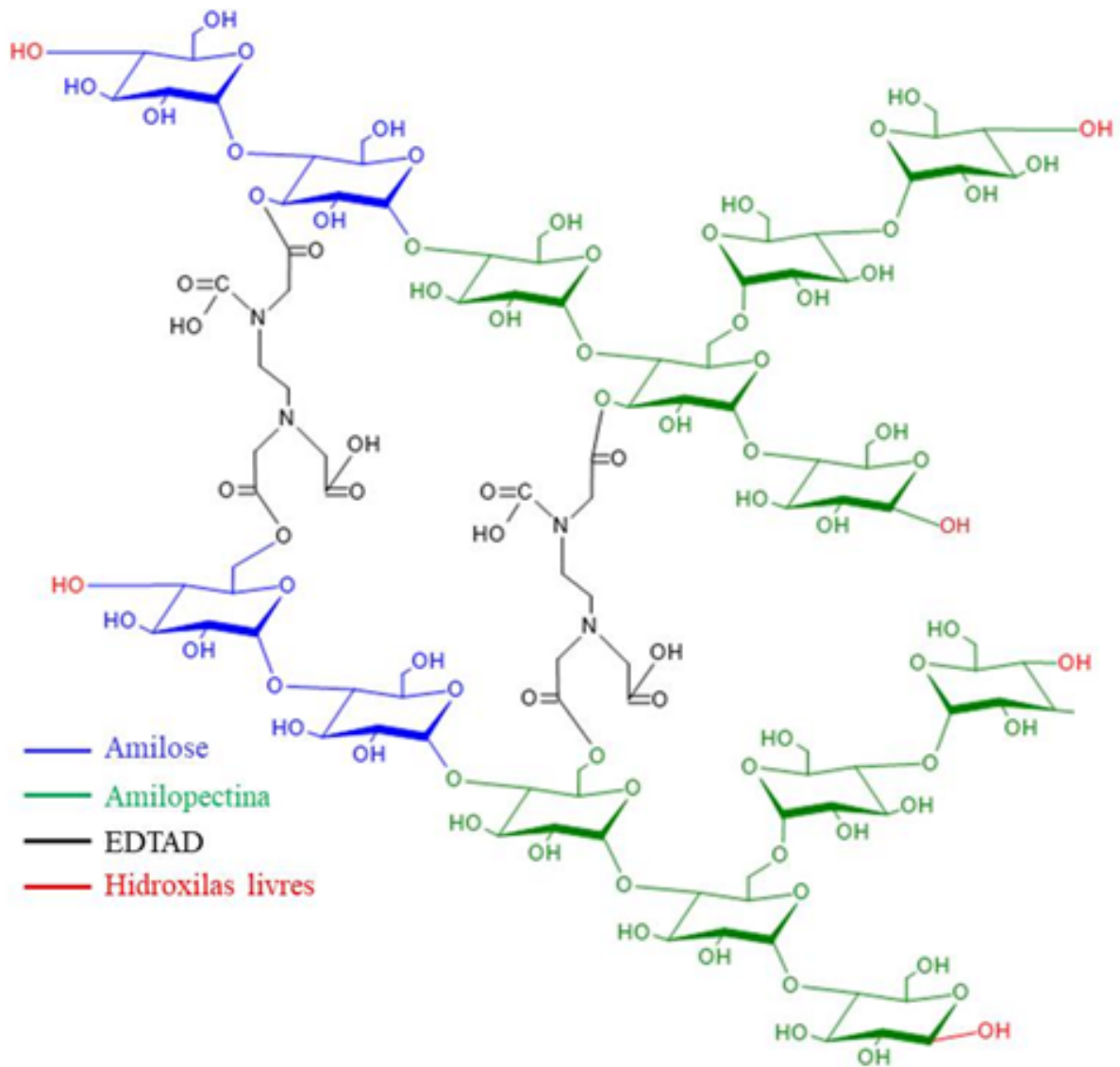


Figura 1 – Representação teórica da estrutura química do hidrogel de amido. Fonte: Karina Palmezani do Carmo

3.2. Biodegradação de Hidrogéis

É importante salientar que polímeros podem se ser transformados por fatores abióticos, que não os biológicos, como por reações oxidativas, química, mecânica, térmicas ou radiação (KRZAN *et al*, 2006), como temperatura, umidade, pH, disponibilidade de oxigênio e relação Carbono/Nitrogênio (KRZAN *et al*, 2006), sendo que a biodegradação consiste na quebra de ligações

poliméricas associada com a ação enzimática em organismos vivos. A forma como esse processo ocorre está diretamente ligada à disponibilidade de microrganismos e suas atividades, que são diretamente afetadas por fatores ambientais (físicos, químicos e biológicos), pois esses fatores estimulam a atividade bacteriana e a reação de hidrólise (KIJCHAVENGKUL *et al.*, 2010).

No caso dos polímeros, o processo de quebra enzimática é frequentemente seguido pela assimilação e mineralização dos fragmentos pelos microrganismos, e nesse processo de mineralização, pode-se obter CO₂, água, metano, biomassa e sais minerais (LV *et al.*, 2018).

Alguns gêneros de bactérias, como *Bacillus sp.* e *Pseudomonas sp.*, *Micrococcus sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Corynebacterium sp.*, demonstram potencial para biodegradar polímeros sintéticos à base de petróleo, como Polietileno de baixa densidade (PEBD) e poliuretano (PU), tanto quando inoculadas como em ambiente natural, mas a taxa de degradação é bem menor e bem mais lenta quando comparada com polímeros naturais (MEFO *et al.*, 2022) (NAKAJIMA-KAMBE *et al.*, 1999).

Polímeros biodegradáveis são definidos como polímeros que podem ser transformados em água, CO₂, metano e outros subprodutos de baixa massa molecular através do processo de biodegradação (ENCALADA *et al.*, 2018). Além disso, esses materiais têm propensão à cisão de suas cadeias poliméricas (LIM & THIAN, 2022). Ácido polilático (PLA), Ácido Poliglicólico (PGA) são alguns dos exemplos de polímeros biodegradáveis com propriedades hidrofílicas com aplicações farmacêuticas (ELVIRA *et al.*, 2002).

Hidrogéis biodegradáveis podem ser sintetizados a partir de diversas matérias-primas de origem natural, como celulose, quitina e amido, por exemplo. Dentre todos os biopolímeros, tem-se considerado o amido como um dos mais interessantes, por ter fácil disponibilidade, por ser muito biodegradável e um custo baixo.

Como citado anteriormente, os hidrogéis à base de amido possuem algumas limitações quando comparados a hidrogéis a base de petróleo e podem misturados a outros materiais para que se corrija limitações. Alguns desses materiais podem até retardar o processo de biodegradação, mas ainda é possível de ser biodegradados (TANG & ALAVI, 2011).

3.2.1. Diversidade Bacteriana nos Processos de Biodegradação de Hidrogéis

Estudos de avaliação de biodegradação de polímeros sintéticos foram feitos utilizando bactérias em culturas puras ou axênicas, como *Pseudomonas* e *Bacillus*, mas se mostraram menos eficientes (SHOVITRI *et al*, 2017). Um consórcio de bactérias, como o que se encontra naturalmente em ambientes como o solo, por exemplo, mostra-se mais eficiente.

Marcadores moleculares têm um papel essencial para pesquisa e classificação bacteriana. Esses marcadores estão intimamente conectados a variações de alelos e em suas características alvo, e podem ser isolados de acordo com essas características (LIU, 2012).

Diversos gêneros bacterianos já foram identificados como degradadores em diversos ambientes, alguns desses gêneros são *Bacillus sp.*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas sp.*, *Ochobactrum sp.*, *Mycobacterium*, *Parococcus* e *Sphingobacterium sp.* (Su *et al.*, 2021). Dentre estes, *Bacillus* é um gênero isolado com frequência em meios de degradação de amido (MEFO *et al*, 2022; MAWA *et al*, 2022).

Bacillus é um gênero caracteristicamente em formato de bastão, anaeróbico facultativo cujas espécies apresentam grande diversidade de habilidades fisiológica, permitindo que possam ser encontrados em todos os ambientes naturais (TURNBULL, 1996).

Bactérias do gênero *Bacillus* de diversas espécies já foram relatadas em processos de degradação materiais a base de amido (SAROJA *et al*, 2000). Alguns grupos de *Bacillus* e *Pseudomonas* utilizam hidrogéis como fonte de carbono e nitrogênio (JIMÉNEZ-TORRES *et al*, 2023)

3.2.2. *Respirometria como método de mensurar a biodegradação*

O método respirométrico é um dos mais utilizados para a análise de biodegradabilidade de polímeros. Esse método consiste em quantificar o CO₂ emitido pelos microrganismos durante o processo de mineralização do material estudado (FECHINE, 2012).

O material que se deseja analisar é enterrado para que os microrganismos degradem as moléculas de interesse, convertendo-as em CO₂ e água. Dessa forma, pode-se mensurar a biodegradação através no monitoramento da quantidade de CO₂ que provém das amostras (GHASEMLOU *et al*, 2022).

Este projeto seguiu as normas da NBR 14283/ 1999 da ABNT, que descreve o método respirométrico de Bartha (BARTHA & PRAMER, 1965) para a determinação do índice de biodegradação orgânica em resíduos enterrados em solos. Este índice de biodegradação é medido através da quantidade de gás carbônico (CO₂) produzida pelos microrganismos no solo ao degradar os materiais orgânicos (ANGELO *et al*, 2021) (CARRARA *et al*, 2011) (CORRÊA *et al*, 2022).

Neste método, o CO₂ emitido pelos microrganismos durante a biodegradação fica preso na solução de KOH, que é então misturada a uma solução de BaCl₂ e fenolftaleína, que funciona como um indicador, pois tem uma variação de transição alcalina e reage quando feita a titulação com HCl (DA SILVA *et al*, 2020) (MONTAGNOLLI *et al*, 2009).

Uma das primeiras vantagens a ser apontadas sobre o método respirométrico de Bartha são os baixos custos, pois, exceto pela vidraria especial utilizada (Respirômetro de Bartha), conta apenas com equipamentos e reagentes comuns na maior parte dos laboratórios de química minimamente equipados. Outra vantagem é que a quantificação de CO₂ é bem precisa e confiável (JAYASEKARA *et al*, 2005).

3.3. Solos

Latossolo e argissolo, usados neste projeto, são os solos mais abundantes encontrados no Estado de São Paulo (DATAGEO), os solos mais abundantes no território brasileiro. Ambos somam cerca de 58% dos solos nacionais (EMBRAPA).

As características físico-químicas do solo, como pH por exemplo, têm uma importante influência sobre a biodegradação, especialmente porque esses fatores podem alterar os processos metabólicos microbianos, como o crescimento microbiano e sua atividade enzimática. (TANG *et al*, 2020). Outros fatores são a própria diversidade microbiana, a quantidade de matéria orgânica presente, os micro e macronutrientes e condições para oxirredução (redox) (BRANCO, 2023).

3.3.1. Latossolo

Latossolo é um solo bem comum no território brasileiro, sendo usado na agricultura, em alguns tipos de culturas, pastagens, reflorestamento e na construção civil. Pode ser encontrado em quase todos os estados, cobrindo uma área de aproximadamente 39% do país (ESPIG *et al*, 2006).

Os latossolos têm a característica de ser profundos, bem drenados e porosos. Contém baixo teor de matéria orgânica e baixa reserva de nutrientes. Apresentam uma textura predominantemente argilosa e possuem baixa capacidade de troca de cátions (CTC). Predominantemente ácidos e pobres em nutrientes. (EMBRAPA, 2021).

Trata-se de um solo maduro, formado sob condições tropicais e sofre forte intemperismo e lixiviação, o que explica a ausência de minerais primários. No entanto, esse solo tem uma concentração de óxidos minerais, como óxido de alumínio (Al_2O_3) e óxido de ferro (Fe_2O_3) e hematita (Fe_2O_3), por exemplo (ESPIG, 2006).

3.3.2 Argissolo

O argissolo é um solo profundo, moderadamente drenado, e com textura argilosa a arenosa, dependendo da profundidade. Assim como o latossolo, também tem baixo teor de matéria orgânica, apresentando alta saturação por bases (complexo de adsorção por cátions alcalinos e alcalino-terrosos, expressa em porcentagem, em relação à capacidade de troca de cátions). (EMBRAPA, 2021).

Outras características importantes identificadas nesses solos são a capacidade de troca de cátions (CTC), soma de bases trocáveis (SB) e a saturação da CTC por bases (V).

O CTC é o valor que representa o valor total de cátion retido à superfície do solo em condição permutável ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} + \text{K}^{+} + \text{H}^{+} + \text{Al}^{3+}$), ou seja, a capacidade de troca iônica dos solos representa a graduação da capacidade de liberação de nutrientes. Na tabela 3, vê-se que ambos os solos apresentam valores altos (RONQUIM, 2010)

A SB de um solo representa a soma dos teores de cátions permutáveis, exceto H^{+} e Al^{3+} ($\text{SB} = \text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+} + \text{K}^{+}$) (RONQUIM, 2010).

Saturação por bases (V%) é a soma das bases trocáveis expressa em porcentagem de capacidade de troca de cátions:

$$V(\%) = 100 * SB / CTC$$

A saturação por bases é um indicativo das condições de fertilidade e tem um papel na classificação dos solos, que podem ser divididos de acordo com a saturação por bases: solos eutróficos = $V\% \geq 50\%$; solos distróficos = $V\% < 50\%$. Isso pode ser um indicativo de um baixo índice de Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^{+} , e um teor muito elevado de alumínio trocável (RONQUIM, 2010), o que pode afetar diretamente a atividade bacteriana do solo.

Microrganismos do solo podem ser negativamente afetados pela presença de alumínio trocável em quantidades altas, ou mesmo moderadas (FERREIRA *et al*, 2012). Altas concentrações de Al^{3+} podem ser prejudiciais para bactérias fixadoras de N_2 , quer seja no solo ou em meio de cultura (ARORA, 2010).

3.4. Bioinformática na Identificação de Táxons

A dinâmica e função da microbiota associada aos diferentes tipos de solos se expandiu drasticamente com o advento do sequenciamento de nova geração (NGS), sendo que a identificação do perfil das comunidades microbianas sempre foi um desafio antes do surgimento dessas tecnologias.

Uma dessas técnicas, a técnica Sanger apresenta resultados com alta qualidade, mas sequencia fragmentos curtos (MERO, 2021). Por isso, outras técnicas de sequenciamento surgiram, embora o método Sanger ainda seja usado para alguns casos específicos. Dentre sessas técnicas, tem-se a *Next Generation Sequencing* (NGS), a qual foi usada para o sequenciamento das amostras deste estudo.

Essa técnica primeiramente permitiu que fossem feitos sequenciamentos em larga escala e trouxesse uma redução significativa nos custos do processo. Ela faz a amplificação em massa de fragmentos de DNA, o que permite o sequenciamento em paralelo de milhões de fragmentos de DNA curtos em uma única corrida. Com isso, foi possível sequenciar genomas inteiros em questão de semanas (HARDWICK *et al*, 2017).

As principais diferenças entre o método Sanger e o NGS são a capacidade de geração de dados, ou seja, muito mais nucleotídeos são percorridos no NGS, e a forma como esses dados são gerados.



Figura 2 Esquema de fluxo de trabalho de Sequenciamento NGS, detalhando as etapas envolvidas nesta tecnologia. Autoria Própria.

No sequenciamento NGS, a primeira etapa é a preparação da biblioteca, ou seja, serão gerados fragmentos de tamanhos adequados para a tecnologia, utilizando os adaptadores (*primers*) para selecionar os fragmentos de interesse.

O próximo passo é a amplificação dos fragmentos-alvo através da PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Em seguida, é feito o sequenciamento e a leitura da sequência. Para essa etapa é utilizado um sequenciador

Por fim é feita a análise dos dados, seu alinhamento, quantificação, montagem, chamada de bases (determinação de cada base para um “cluster”) e chamada de variantes (identificação de trocas, deleções ou inserções).

As principais bactérias que degradam amido são as chamadas amilolíticas incluem *Streptococcus bovis*, *Ruminobacter amylophilus*, *Succinimonas amyolytica*, *Selenomonas ruminatum*, *Bifidocacterium spp* e *Bacteroides spp*. (HUA *et al*, 2022) (RUSSELL, 1988).

Alguns filos de bactérias como Proteobacteria, Bacteriodota, Actinobacteria e Myxococcota, bem como os gêneros *Bacillus sp.* e *Streptococcus* já foram identificados em outros trabalhos de biodegradação de materiais base de amido através de sequenciamento (WICAKSONO *et al*, 2022) (MAWA *et al*, 2022).

3.5. Gene rRNA 16S

Apenas dez anos após ter feito a descoberta do RNA ribossomal juntamente com George Fox, Carl Woese, em 1987, descreveu os RNA ribossomais como os melhores marcadores moleculares por sua estabilidade e por poderem ser sequenciados diretamente, o que tornaria o processo mais rápido. Woese descreveu os rRNA 16S e 23S como os marcadores mais precisos (WOESE, 1987).

O gene 16s é um importante marcador genético utilizado e o mais comum na identificação de espécies de bactérias. Trata-se de uma sequência de cerca de 1.500 pares de base, composta de algumas regiões variáveis e outras regiões conservadas (LIU, 2012). É composto por uma sequência de cerca de 1.550 pares de bases composta por oito regiões conservadas e nove variáveis. Dessas, as regiões variáveis V3-V4 e V4-V5 são as mais comumente usadas na identificação de bactérias (FADEEV, 2021).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi dividido em 3 partes: 1. Coleta e caracterização dos solos; 2. Ensaio de biodegradação e 3: Análises da diversidade microbiana por meio de sequenciamento massivo do gene rRNA 16S (Figura 1).



Figura 3 - Esquema das etapas de desenvolvimento do ensaio de biodegradação, envolvendo o hidrogel sintetizado a partir de amido com dianidrido do ácido etilendiaminotetracético, por meio de respirometria de Bartha. *Elaborado pela autora com BioRender®.*

4.1. Hidrogel

O hidrogel de amido de milho entrecruzado com EDTAD aqui avaliado (Figura 4) foi sintetizado conforme descrito abaixo:

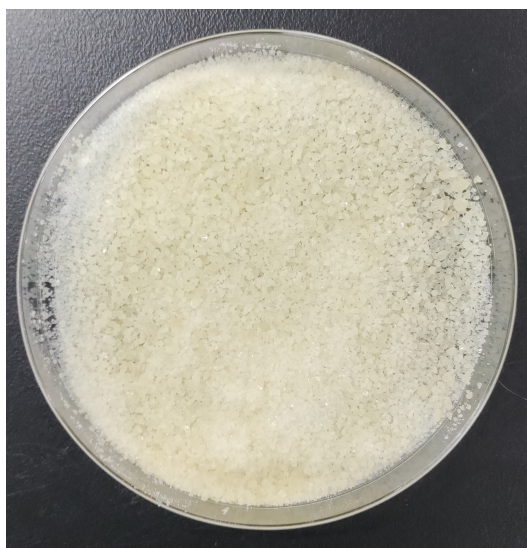


Figura 4 – Hidrogel de amido de milho entrecruzado com EDTAD usado no ensaio de biodegradação. Fonte: Aatoria própria

4.1.1. Síntese do hidrogel de amido de milho.

O hidrogel de amido foi sintetizado utilizando 10% de amido de milho (m/m), 4% de EDTAD (m/m) utilizado como agente reticulante, 86% de DMSO (m/m) como solvente e 6 mL de trietilamina como catalisador da reação.

O amido e o EDTAD foram solubilizados separadamente em DMSO em temperatura aproximada de 60°C sob agitação constante.

Após total solubilização do amido e do EDTAD, as duas soluções foram misturadas e a temperatura foi aumentada para aproximadamente 75°C ainda sob agitação. Assim que foi observado o ponto de gelatinização do amido, adicionou-se 6 mL de trietilamina como catalisador, atingindo assim o ponto de gel.

O hidrogel formado foi transferido para placas de petri e mantido em sistema fechado e sem iluminação por 7 dias, para cura/reticulação do hidrogel.

Após esse período, o hidrogel foi lavado com água deionizada por algumas vezes, para a retirada do excesso de DMSO, e em seguida foi neutralizado utilizando solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1mol.L⁻¹, sendo monitorado com a ajuda de um pHmetro até atingir o pH 7, na sequência foi filtrado, seco em estufa a 60°C e triturados.

O hidrogel antes de ser submetido à biodegradação, foi passado em peneira com malha de 2mm, para que sua granulometria se aproximasse a dos solos utilizados.

Cada respirômetro com amostra foi preparado com 50g de solo e 0,5g de amostra de hidrogel, totalizando 5 g de hidrogel, 250g de solo A, e 250g de solo B.

4.2. Coleta e Caracterização dos Solos

Dois solos diferentes foram utilizados neste trabalho. O solo A: um argissolo, e solo B, um latossolo (Figura 6). Eles foram doados por uma flora próxima ao *Campus* da UFSCar, sendo que ambos foram coletados na cidade de Araçoiaba da Serra, SP região cujo solo é composto principalmente por duas composições solísticas: argissolo e latossolo vermelho (Figura 5). O solo A apresentou cor mais amarronzada, no qual identificou-se uma quantidade significativa de ferro ($85,2 \text{ mg.dm}^{-3}$), especialmente se comparado ao solo B ($9,7 \text{ mg.dm}^{-3}$).

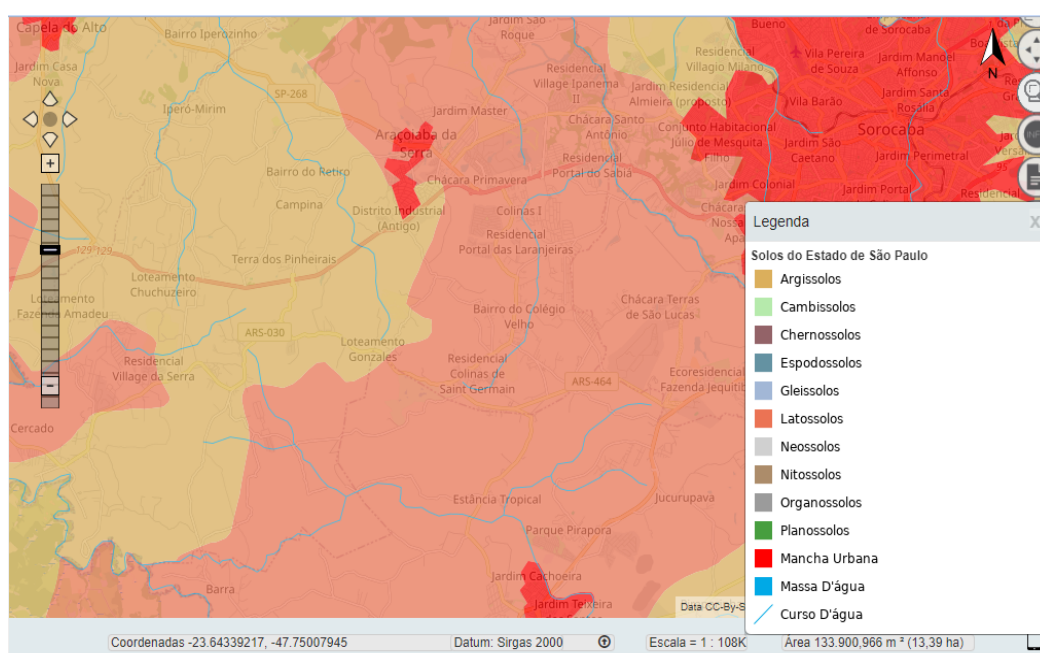


Figura 5 – Mapa de visualização do Argissolo e Latossolo na região de Araçoiaba da Serra, SP. Escala 1: 108.000. Fonte: DataGeo.



Figura 6 – Comparação visual dos solos A e B após a coleta e após a passagem por peneira de 2mm, antes de se adicionar a amostra. Fonte: Autoria própria

Após a coleta, o solo foi espalhado em uma bandeja descontaminada para secagem à temperatura ambiente por 48 horas. Após a secagem, foi peneirado em peneira de abertura 10 *mesh/ tyler* 9, conforme indicado no protocolo NBR NM-ISO 3310-1:1997

Na etapa seguinte, foi feita a caracterização para se determinar a densidade aparente, umidade residual, capacidade de campo e pH dos solos.

4.2.1. Densidade Aparente

Densidade aparente é a relação entre a massa de uma amostra de solo seca a 105°C e a soma dos volumes ocupados pelas partículas e pelos poros (OLIVEIRA *et al*, 2018).

4.2.1.1. Método de Análise da Densidade Aparente

Os filtros de papel foram colados ao fundo dos anéis volumétricos e, após a polimerização, os anéis com os filtros foram imersos cada em um recipiente com água destilada, o suficiente para saturar os filtros.

Após a saturação, retirou-se os conjuntos, e aguardou-se a drenagem do excesso de água, sendo estes pesados (m_3). Então, os conjuntos foram colocados em estufa a 105°C por 2 horas para que se obtivesse o peso constante (m_4).

Os conjuntos foram então preenchidos com o solo (três conjuntos com solo A e três com o solo B), compactados com 10 batidas, preenchidos, e o processo se repetiu até que os anéis estivessem totalmente preenchidos. O excesso de solo dos anéis foi, então, aparado com uma espátula e pesados (m_5).

Os anéis foram colocados em estufa a 105°C por 24 horas para secar. Após esse período, foram colocados em um dessecador para esfriar e, então, pesados (m_6).

Depois de pesados, os anéis foram imersos em água destilada até cerca da metade da altura do anel. Quando a amostra ficou saturada (umidade visível), foram colocadas no dessecador para a drenagem, então pesadas (m_7).

Para calcular a densidade aparente, usou-se a seguinte fórmula

$$A = \frac{m_6 - m_4}{V_2}$$

A = densidade aparente, em grama por centímetro cúbico;

m = massa, em grama

V_2 = volume do anel, em centímetro cúbico.

4.2.2. Umidade Residual

Representa o conteúdo de água presente na amostra, comparando a massa dessa amostra preparada e seca ao ar ou estufa a 40°C e a massa seca em estufa a 105°C, obtendo-se assim a massa residual de água pela diferença (TEIXEIRA *et al.*, 2017).

É calculada por:

$$UR = \frac{m_5 - m_6}{m_6 - m_4} \times 100$$

Onde:

U_R é a umidade residual em grama de água por 100g de solo seco;

m é a massa em grama

4.2.3. Capacidade de Campo

É o volume máximo aproximado da umidade que preenche todos os microporos do solo bem drenado (FABIAN, 2000).

É calculada por:

$$CC = \frac{(m7 - m6) - (m3 - m4)}{m6 - m4}$$

Onde:

CC é a capacidade de campo em grama de água por 100g de solo seco.

4.2.4. Determinação de pH

O potencial hidrogeniônico do solo é a medida que se usa para determinar a concentração de íons H^+ na solução, o que pode influenciar na disponibilidade de nutrientes (TEIXEIRA *et al.*, 2017).

4.2.4.1. Método da Determinação do pH

Pesou-se $10g \pm 0,1g$ de 3 amostras de cada solo, cada uma em um béquer de vidro de 50 mL. Adicionou-se 25 mL de água destilada e deionizada em cada béquer. Os seis béqueres foram então colocados em um agitador magnético de 10 posições, onde ficaram em agitação por 15 minutos. Após este tempo, ficaram em repouso por 1 h. O pH então foi medido usando-se um peagômetro, colocando-se o eletrodo de vidro em contato com o sedimento, e a medida foi então aferida antes do início do ensaio e após o fim.

Com essas informações, pôde-se acertar a umidade correta do solo, seguindo a norma técnica NBR 14283/1999.

4.2.5. Análise de Macro e Micronutrientes

O solo também foi analisado de forma quantitativa para macro e micronutrientes por extração com ácido dietilenotriaminopentacético (DTPA) e determinação por espectrofotometria de absorção atômica, pelo Departamento de Ciência do Solo, da Escola de Estudos Agrários “Luiz de Queiroz” (ESALQ), USP¹.

Os métodos para as análises foram os seguintes, segundo o laboratório que realizou as análises:

Boro (B) - extração com água quente e determinação por colorimetria;

Cobre (Cu), Zinco (Zn), Manganês (Mn) e ferro (Fe) - extração com DTPA e determinação por espectrofotometria de absorção atômica (Manual de análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. IAC, 2001);

Fósforo (P) - método colorimétrico extraído com resina trocadora de íons;

Enxofre (S) - determinação por turbidimetria e extração com fosfato de cálcio $0,01 \text{ mol L}^{-1}$;

Potássio (K) - extração de resina trocadora de íons e determinação em espectrofotômetro de emissão atômica;

Cálcio (Ca) e Magnésio (Mg) - Extração com cloreto de potássio e determinação em espectrofotômetro de absorção atômica;

Alumínio trocável (Al) - método titulométrico extraído com cloreto de potássio 1 mol L^{-1} ;

Acidez potencial (H+Al) - extraído com tampão SMP (Manual de análise química para avaliação da fertilidade de solos tropicais. IAC, 2001);

SB: Soma de bases trocáveis;

CTC: Capacidade de troca de cátions;

V: Saturação da CTC por bases;

m: Saturação por Alumínio.

¹ Departamento de Ciência do Solo - Laboratório de Análises Químicas do Solo
Escola Superior de Agricultura Luiz Queiroz - Universidade de São Paulo

4.3. Ensaio de Biodegradação

4.3.1. Respirômetro

Uma das principais ferramentas desse método de avaliar a biodegradação é o respirômetro de Bartha. Ele é composto de dois recipientes interligados por um tubo de vidro, como mostrado na figura 7. No recipiente maior coloca-se o solo e a amostra a ser analisada; o recipiente menor armazena a solução de KOH. Esta solução absorve o CO₂ emitido pelos microrganismos durante o processo de biodegradação da amostra contida no recipiente contíguo interligado pelo tubo de vidro.

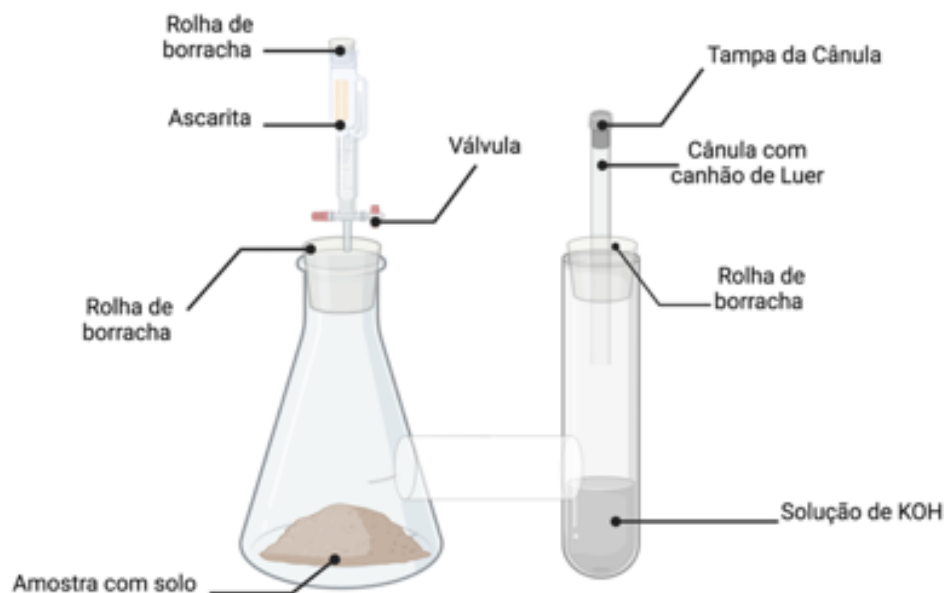


Figura 7 – Esquema de vista em corte de um respirômetro de Bartha. Elaborado pela autora com BioRender®.

Os respirômetros foram identificados e numerados de acordo com a origem do solo, contendo ou não amostra (Tabela 1).

Tabela 1. Identificação dos respirômetros utilizados nos ensaios de biodegradação do hidrogel de amido modificado com EDTAD.

Nome da amostra	Descrição
SA-C1	Solo A – Controle 1 (Sem Amostra)
SA-C2	Solo A – Controle 2 (Sem Amostra)
SA-C3	Solo A – Controle 3 (Sem Amostra)
SA-H1	Solo A Com Amostra de Hidrogel 1
SA-H2	Solo A Com Amostra de Hidrogel 2
SA-H3	Solo A Com Amostra de Hidrogel 3
SA-H4	Solo A Com Amostra de Hidrogel 4
SA-H5	Solo A Com Amostra de Hidrogel 5
SB-C1	Solo B – Controle 1 (Sem Amostra)
SB-C2	Solo B – Controle 2 (Sem Amostra)
SB-C3	Solo B – Controle 3 (Sem Amostra)
SB-H1	Solo B Com Amostra de Hidrogel 1
SB-H2	Solo B Com Amostra de Hidrogel 2
SB-H3	Solo B Com Amostra de Hidrogel 3
SB-H4	Solo B Com Amostra de Hidrogel 4
SB-H5	Solo B Com Amostra de Hidrogel 5

O ensaio de biodegradação de hidrogel foi realizado em microcosmo que contém os dois solos separadamente, preparado em Respirômetro de Bartha. Foram preparados 50g \pm 0,1g de solo com umidade residual de 11,34 g para o Solo A e 2,62 g para o Solo B. A este solo foram adicionados 0,5 g de hidrogel desidratado de amido de milho entrecruzado com EDTAD (Figura 6). Foram preparadas cinco misturas como a descrita com o Solo A e cinco misturas com o Solo B, cada uma para um respirômetro (Figura 7) com amostra, conforme descrito na tabela 1. Além disso, mais três respirômetros com 50 g de solo A, cada, e três com solo B também foram preparados para o controle.

Os solos com amostras de hidrogel foram misturados para homogeneizar. Em seguida, a mistura foi introduzida na parte maior de cada respirômetro.



Figura 8 – Comparação visual dos solos A e B, coletados na cidade de Araçoiaba da Serra, SP, na seguintes coordenadas: Solo A; 23°31'48.0"S 47°37'48.0" O; à profundidade de 1,50m; e Solo B; 23°29'24.0"S 47°36'36.0"O; à profundidade de 1,80 m. Fonte: Autoria própria

A partir dos valores conhecidos da capacidade de campo e da umidade residual, foi feito o ajuste de umidade. Foram acrescentados **15,84 g** de água destilada aos respirômetros contendo solo A (controle e amostra), e **20,11 g** aos respirômetros contendo solo B. Após, os respirômetros foram tampados com a respectiva rolha de borracha, contendo a cânula de vidro com ascarita e uma válvula, então a água destilada para correção de umidade foi acrescentada ao solo.

Finalizado o acondicionamento do solo e fechamento do compartimento, foram acrescentados 10 mL de solução de KOH ao braço lateral de cada um dos 16 respirômetros e depois fechados com a respectiva rolha do braço menor (Figura 8).



Figura 9 – Respirômetros preparados para a incubação com solo, com e sem (controle) amostras de hidrogel, e solução de KOH no braço lateral para a captação de CO₂. Fonte: Autoria própria

Os respirômetros foram acondicionados e mantidos em estufa a 28°C ± 2°C durante o período do ensaio.

Após 24 horas de incubação, realizou-se a primeira titulação para a quantificação do CO₂ capturado na solução de KOH.

4.4. Titulação para Medir a Emissão de CO₂

A aferição para a determinação da quantidade de CO₂ produzida foi realizada através da titulação da solução de hidróxido de potássio (KOH) 0,2 N, onde o CO₂ estava dissolvido, com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1 N.

Para cada respirômetro, foi preparado um frasco Erlenmeyer de 50 mL, com duas gotas de solução alcoólica de fenolftaleína e 1 mL de solução de cloreto de bário (BaCl₂) 0,1 N, a cada vez que se realizava a titulação, ou seja, a cada 24 horas no primeiro ciclo de sete dias. Depois que este primeiro ciclo foi encerrado, a

titulação era realizada uma vez por semana, a cada sete dias (NBR 14283:1999).

A pequena rolha de borracha do filtro de ascarita era retirada e a válvula, aberta. Então removia-se a tampa da cânula do braço lateral.

Com uma pipeta de 10 mL removia-se a solução de KOH contendo CO₂ era retirada e introduzida no Erlenmeyer contendo a solução de fenolftaleína e a solução de cloreto de bário. Foram realizadas três lavagens do braço lateral do respirômetro com 10 mL de água destilada isenta de CO₂ a cada lavagem. Imediatamente após estas lavagens, os respirômetros eram fechados e feita a titulação da solução de KOH com a de HCl (0,1 N).

A quantidade de solução ácida necessária para a viragem da coloração rosa para incolor era anotada e uma nova solução de KOH era repostada imediatamente no respirômetro de Bartha. Para cada ensaio, foi realizada a prova em branco em um Erlenmeyer contendo 10 mL de solução de KOH (0,1 M), 2 gotas de solução de fenolftaleína, 1 mL de solução de cloreto de bário (1 M) e 30 mL de água destilada isenta de CO₂. A produção de CO₂ no respirômetro foi calculada pela seguinte expressão:

$$\text{mol CO}_2 \text{ solo (resíduo)} = (A - B) \times 50 \times f_{HCl}$$

Onde:

A é o volume de HCl 0,1 N gasto para titular o branco, em mililitro;

B é o volume de HCl 0,1 N gasto para titular o tratamento, em mililitro;

50 é o fator para transformar equivalente em mol de gás carbônico;

f_{HCl} é o fator do HCl 0,1 N

4.5. Extração de DNA dos Solos

Primeiramente foi feita a extração do DNA das amostras principais: os solos A e B iniciais, antes do hidrogel ser acrescentado, e os solos A e B finais, após a finalização do ensaio de biodegradação, o que ocorreu após 27 semanas no solo A, e 33 semanas no solo B. Foram nomeados conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2. Identificação dos solos em que foi feita extração de DNA para sequenciamento e posterior identificação de bactérias através do Gene 16S.

Amostra	Descrição
SA-C0	Solo A – Inicial (Sem Amostra)
SB-C0	Solo B – Inicial (Sem Amostra)
SA-AF	Solo A – Final (Com Amostra)
SB-AF	Solo B – Final (Com Amostra)

O DNA total genômico foi extraído de quatro amostras (tabela 2): inicial e final de ambos os solos utilizados no estudo, os quais foram chamados “solo A” e “solo B” contendo hidrogel, sendo o solo A um argissolo caracterizado por uma coloração marrom, pH 5,11, 12,4% de matéria orgânica, e o solo B, um latossolo vermelho de pH 4,6 e 11,6% de matéria orgânica. Utilizou-se o kit comercial DNeasy® Power Soil®, e o protocolo foi seguido de acordo com as instruções do fabricante (QIAGEN GmbH). A integridade e concentração do DNA obtido foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com Sybr Safe, em combinação com o uso dos equipamentos Nanodrop e Qubit. Fragmentos do gene RNAr 16S foram amplificados pela técnica da reação da polimerase em cadeia (PCR) utilizando os oligonucleotídeos sintéticos 515F (5'-GTGCCAGCCCCGGGTAA-3') e 926R (5'-CCGYCAATTYMTTTRAGTTT-3'), para as regiões variáveis 4 e 5 do gene.

As amostras tiveram o DNA amplificado com primers para região de interesse 16S 515F-926R e em seguida foi feito o sequenciamento NGS na plataforma *Illumina*.

A empresa NGS² fez a amplificação do DNA com os primers citados, realizando a inclusão dos barcodes, pool das amostras, quantificação do pool e o sequenciamento, para o qual utilizou a tecnologia Illumina (Next Generation Sequencing).

O processo de análise dos táxons microbiológicos presentes nos solos estudados neste projeto ocorreu de acordo com o fluxo de trabalho contido na figura 2.

² NGS Soluções Genômicas EIRELI ME – CNPJ: 19.949.126/0001-35
Rua Ajudante Albano, 847
Piracicaba, SP, 13416-030

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O solo A apresentou maior conteúdo de matéria orgânica e umidade além de ser mais rico em cálcio, magnésio, potássio e fósforo, capacidade de troca de cátions, saturação da CTC por bases (soma de bases trocáveis e acidez potência) quando comparado com o solo B. Por outro lado, no solo B observa-se maior presença de fosfato de cálcio ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) e alumínio (tabela 3).

Tabela 3. Análise quantitativa de macronutrientes por extração com ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) e Determinação por espectrofotometria de absorção atômica.

Característica	Unidade	Solo A	Solo B
Coloração	–	amarronzada	avermelhada
pH médio	–	5,1	4,6
Capacidade de Campo	g	0,4	0,6
Umidade Residual	g	11,3	2,6
Densidade Aparente	g/cm^3	01,1	0,98
Matéria orgânica	%	12,4%	11,6%
pH CaCl_2	–	4,4	4,3
M.O. Colorimétrica	g.dm^{-3}	30,0	22,9
Fósforo Resina	mg.dm^{-3}	11,6	1,8
S Fosfato de cálcio 0,01 mol L ⁻¹	mg.dm^{-3}	12,3	25,9
Cálcio KCl 1 mol/L	mmolc.dm^{-3}	27,8	7,1
Magnésio KCl mol/L	mmolc.dm^{-3}	8,2	2,3
Potássio Resina	mmolc.dm^{-3}	3,0	0,6
Alumínio KCl 1 mol/L	mmolc.dm^{-3}	2,5	10,0
H+Al SMP	mmolc.dm^{-3}	52,1	19,1
SB	mmolc.dm^{-3}	39,1	10,0
CTC	mmolc.dm^{-3}	91,2	69,1
V	%	43,0	15,0
m	%	6,0	50,0

CTC= Capacidade de Troca de Cátions; V= Saturação da CTC por bases; SB = Soma de bases trocáveis; m = saturação por alumínio

O solo A apresentou as maiores concentrações de micronutrientes analisadas (Cu, Fe, Mn e Zn) quando comparado ao solo B (Tabela 4).

No solo B observou-se uma presença maior de alumínio trocável ($10,0 \text{ mmolc.dm}^{-3}$) em relação ao solo A ($2,5 \text{ mmolc.dm}^{-3}$). Uma maior concentração de alumínio trocável associada à maior acidificação, como a observada neste latossolo, e uma deficiência em nutrientes como também observado nas tabelas 3 e 4 já foram descritas como um inibidor da atividade bacteriana de uma forma geral (KUNITO, 2016).

A tabela 3 também apresenta valores altos de capacidade de troca de cátion (CTC total), mais soma de bases trocáveis (SB), que representa a soma dos teores de cátions permutáveis, excluindo-se H^+ e Al^{3+} , com valores mais baixos, especialmente no solo B, e com saturação por bases (m%) muito baixo no solo A e alto no solo B. Isso significa que ambos os solos, mas principalmente o solo B, não são muito ricos em Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^+ , sendo que o Solo B pode apresentar um teor de alumínio trocável bem elevado, o que é confirmado pela saturação por alumínio (m%), cujo valor foi de 50%. Outro valor que corrobora essa informação é o baixo índice da saturação da CTC por bases (V%), que significa que há pequenas quantidades de cátions saturando cargas negativas, e que a maior delas está sendo neutralizada por H^+ e Al^{3+} , o que também pode indicar um solo mais ácido e uma alta quantidade de alumínio (RONQUIM, 2010).

Tabela 4. Análise quantitativa de micronutrientes por extração com ácido dietilenotriaminopentaacético (DTPA) e Determinação por espectrofotometria de absorção atômica.

Determinações	Unidade	Solo A	Solo B
Extração de B (Boro) com água quente	mg.dm ⁻³	0,14	0,1

Análise DTPA e Determinação por espectrofotometria de absorção atômica.

Cu	mg.dm ⁻³	0,6	0,1
Fe	mg.dm ⁻³	85,2	9,7
Mn	mg.dm ⁻³	1,5	0,2
Zn	mg.dm ⁻³	1,5	0,2

Os solos A e B apresentaram pH ácido sendo de 5,11 e 4,84, respectivamente, antes do início do ensaio, aferidos em peagômetro de mesa. Após 24 semanas de ensaio, constatou-se que solo A chegou a pH 3,87, enquanto no solo B, pH 4,43. No final do experimento o solo A ficou mais ácido com pH de 4,0 (Tabela 5). Bactérias presentes no solo podem reduzir o pH no processo de degradação gerando ácidos a partir da matéria orgânica (ERBEKTAS, 2019).

Tabela 5. Comparação do pH dos solos em diferentes momentos do processo de biodegradação.

Tempo	Solo A	Solo B
Início (Semana 1)	5,11	4,84
24 semanas	3,87	4,43
Final (Semana 27 - Solo A Semana 33 - Solo B)	4,41	4,04

5.1. Biodegradação do Hidrogel nos Solos

Os ensaios controle (sem amostra) e os ensaios com solo A e B foram monitorados quanto a emissão de CO₂ por 190 dias para o solo A e de 231 dias para o solo B.

As maiores emissões de CO₂ observadas foram nos solos contendo as amostras do novo hidrogel quando comparado aos respectivos controles (Figura 08 e Figura 09).

Observou-se que o solo A controle emitiu em média 4,60 mg de CO₂ com desvio padrão de 1,25 mg durante todo o experimento, enquanto a emissão de CO₂ para o controle do ensaio B foi em média de 6,47 mg, com desvio de 2,17 mg.

As emissões de CO₂ do ensaio controle do solo A ficaram estáveis após 56 dias de experimento, enquanto no ensaio com hidrogel observou-se queda na emissão de CO₂. Provavelmente a presença do hidrogel tenha inibido a atividade microbiana.

Observou-se uma instabilidade nas emissões de CO₂ até o 21º dia (Figura 11). Após esse período, a produção de CO₂ teve um aumento acima do esperado, saturando a solução de KOH, impedindo assim que se obtivesse uma leitura da quantidade de CO₂ retido na solução. Dessa forma foi necessário aumentar em 100% a quantidade de solução KOH, passando de 10 mL para 20 mL, nas quatro semanas seguintes, com a intenção de capturar todo o CO₂ emitido. Quando se notou que as emissões voltaram aos valores iniciais, após cerca de quatro semanas, voltou-se a utilizar os 10mL, como indicado na norma.

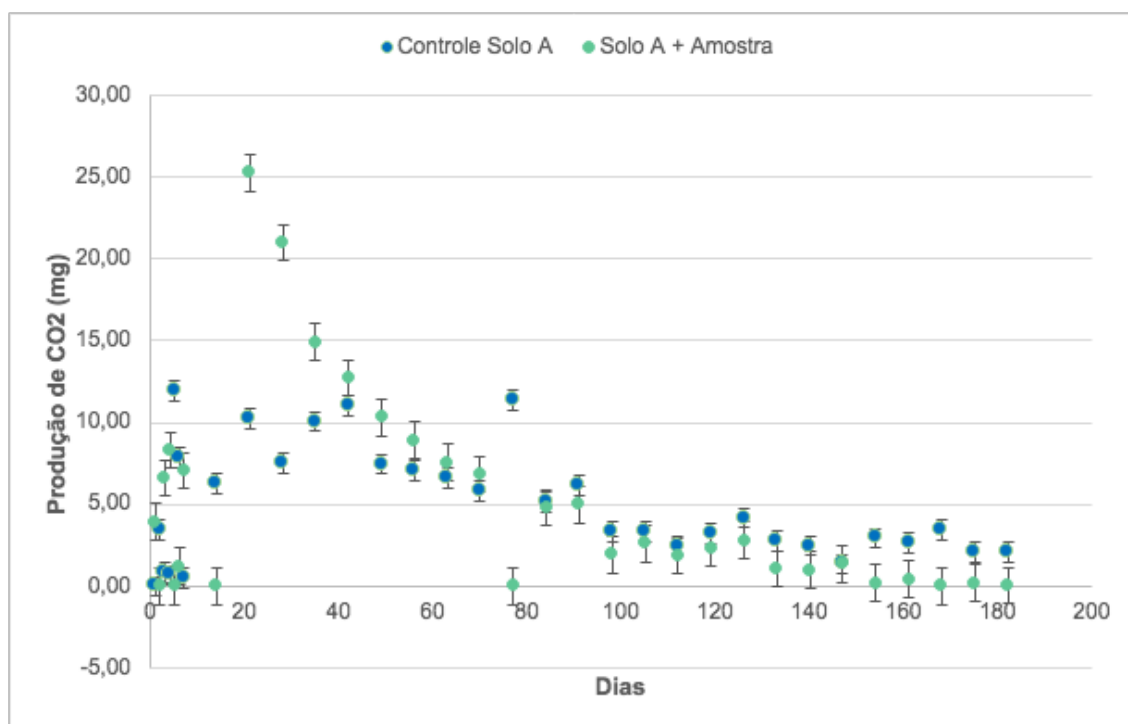


Figura 10 – Comparação da produção de CO₂ no solo A com e sem amostra. Fonte: Autoria própria.

O fim da biodegradação no Solo A (Figura 12), em aproximadamente 190 dias, após verificar-se que a quantidade de solução de HCl para titular a solução de KOH das amostras ficou muito próxima à quantidade de solução de HCl do controle pelo período de quatro semanas.

A degradação do Hidrogel no solo B, apresentou comportamento diferente quando comparado com o solo A. O máximo de emissão de CO₂ ocorreu aos 50 dias de experimento e o ensaio foi finalizado com 231 dias.

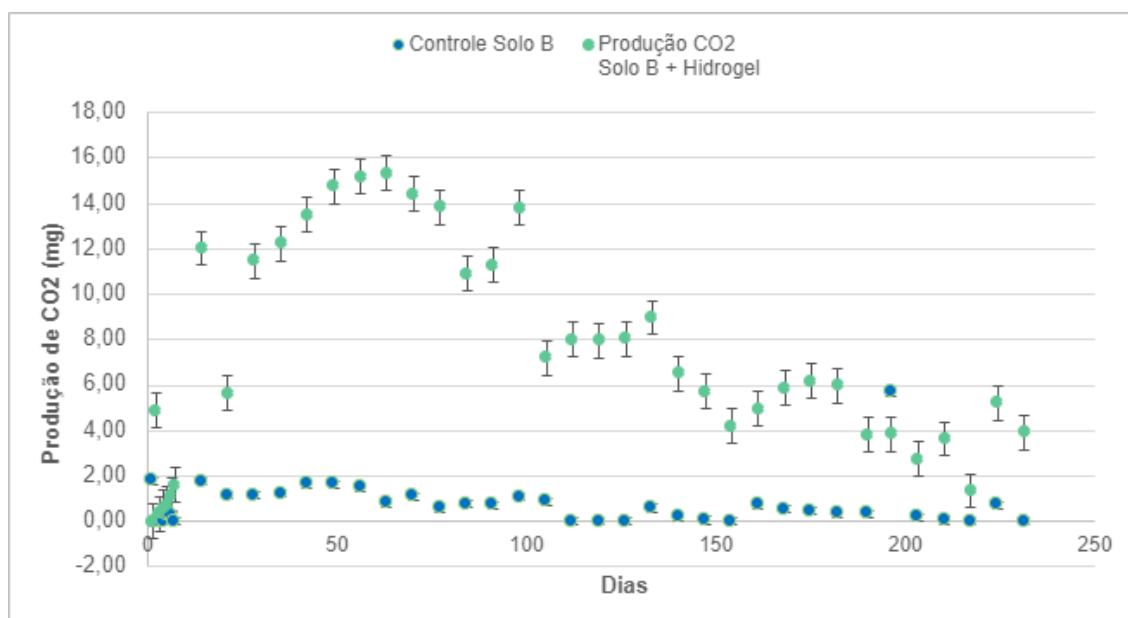


Figura 11 – Produção de CO₂ no solo B nos respirômetros com amostra comparados aos respirômetros com solo sem amostras. Fonte: Autoria própria

No solo B, as emissões de CO₂ no ensaio controle foram constantes e observou-se que as emissões de CO₂ no ensaio com hidrogel foram maiores do que no controle e, nesse solo, provavelmente, o hidrogel não foi prejudicial à microbiota.

As diferenças observadas nas emissões de CO₂ durante a biodegradação do hidrogel podem estar relacionadas às comunidades microbianas presentes em cada solo, juntamente com todos os nutrientes e características físico-químicas encontradas no solo A, que vão desde o pH mais ácido, maior umidade residual, maior presença ferro, cálcio, mais matéria orgânica, enquanto no solo B observou-se a maior presença de alumínio.

Na figura 13 pode-se comparar a emissão nos dois solos com os dados sobrepostos.

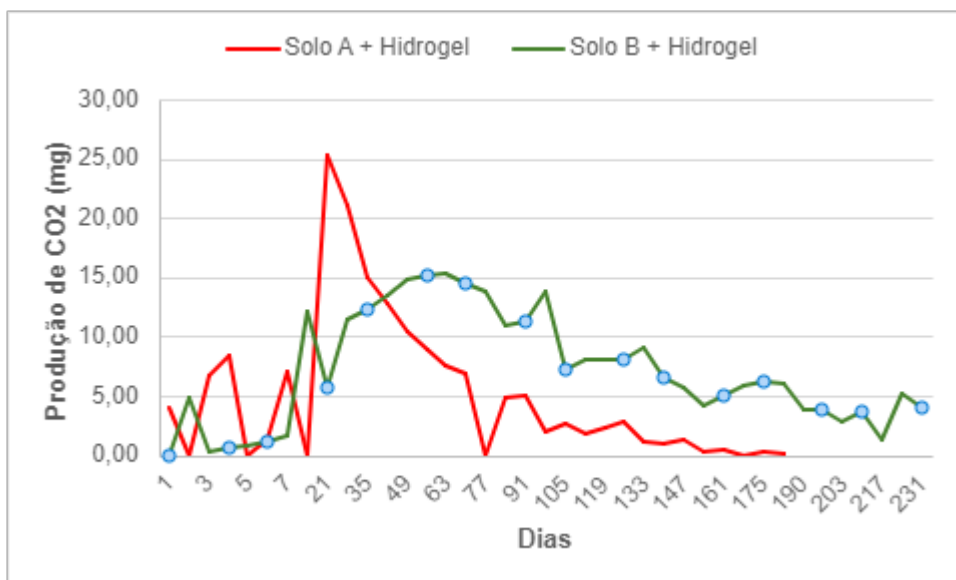


Figura 12 – Comparação da emissão de CO₂ entre os solos A e B com amostra. Fonte: Autoria própria

Os solos, quando comparados entre si, sem nenhuma amostra, demonstram uma diferença quanto à produção de CO₂, sendo que o solo A tem uma emissão maior do que o B (Figura 10), o que sugere uma baixa atividade microbiana, provavelmente inibida por uma maior presença de alumínio neste solo.

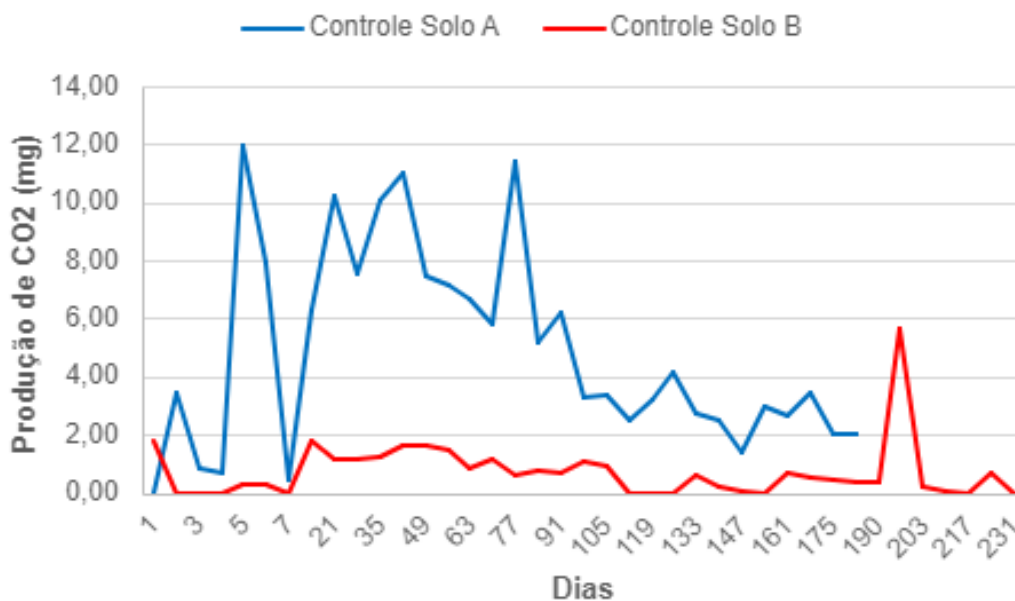


Figura 13 – Comparação da emissão CO₂ entre os dois solos sem amostra hidrogel. Fonte: Autoria própria

Tanto nos solos controle, como nos solos com hidrogel, pode-se observar pouca ou nenhuma emissão de CO₂ nos primeiros dias do ensaio, o que pode significar uma fase de latência de aproximadamente cinco dias para uma adaptação dos microrganismos às novas condições do ambiente, como descrito em outros trabalhos (LOTFABAD & GRAY, 2002; ROLFE *et al*, 2012; NICOLA & BÄÄTH, 2019).

A presença de maior concentração de alumínio (Tabela 3) pode ter um efeito inibitório (bacteriostático ou bactericida) (FOY *et al*, 1978) na microbiota presente neste solo.

Visualmente após 20 semanas de experimento, houve degradação do hidrogel em ambos os solos analisados (Figuras 14 e 15).

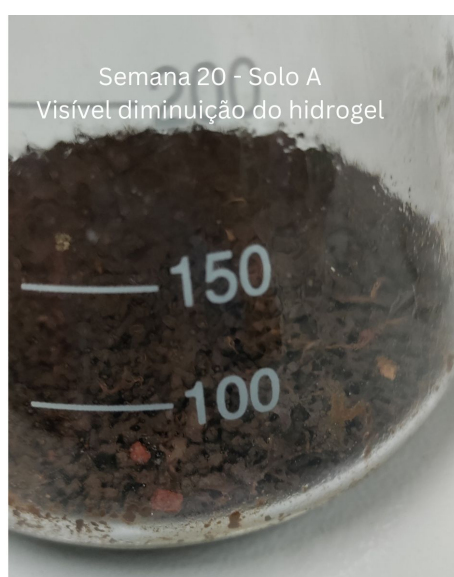


Figura 14 – Respirômetro com solo A e amostra de hidrogel após 20 semanas de degradação no solo A. Fonte: Autoria própria



Figura 15 - Respirômetro com solo B e amostra de hidrogel após 20 semanas de degradação no solo B. Fonte: Autoria própria

A biodegradação deste hidrogel pode ser realizada por bactérias que possuem enzimas capazes de quebrar as ligações de amido por hidrólise. Geralmente, as enzimas amilases são responsáveis pela degradação do amido em unidades menores, como açúcares simples.

É comum que microrganismos que sintetizam amilase participem da biodegradação do material que compõe o hidrogel, amido de milho (WIJBENGA, 1991). É a quebra desses polissacarídeos que possibilitam a utilização de seu carbono para a obtenção de energia.

Uma biodegradabilidade de 80% no período de 30 dias foi observada em um hidrogel de amido de mandioca utilizando a mesma metodologia de aterramento em solo (RIYAJAN, *et al.*, 2015).

5.2. Comunidade Microbiana presente nos solos

O sequenciamento foi analisado utilizando-se o software R, e o número de *reads* de cada amostra pode ser encontrado na tabela 6.

Tabela 6. Número de *reads* do sequenciamento das amostras dos solos A e B iniciais e finais (nomeadas como descrito na tabela 2). Fonte: Autoria própria.

Amostra	Reads
SA-C0	15344
SB-C0	16318
SA-AF	11933
SB-AF	19432

5.3. Análise dos Dados de Sequenciamento

Após o sequenciamento, foram feitas a leitura e as análises estatísticas dos dados obtidos. Para a análise dos dados, foram feitas curva de rarefação, diversidade alfa e diversidade beta, e a discussão da proporção.

5.3.1. Curva de Rarefação

Todas as amostras atingiram um *plateau*, como observa-se na figura 17, um indicativo de que o número de repetições foi o suficiente. Também é possível observar que há mais diversidade no solo B após a biodegradação, enquanto no solo A final encontra-se a menor diversidade.

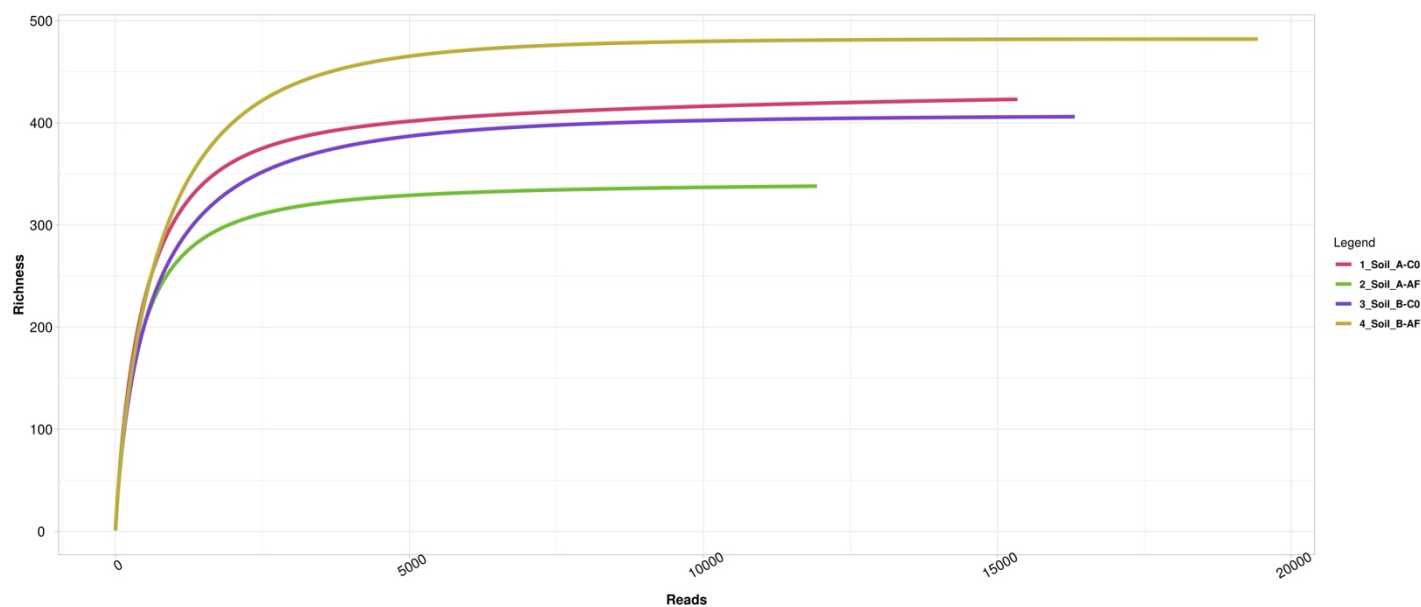


Figura 16 – Gráfico com as curvas de rarefação das amostras iniciais e finais de cada solo.
Fonte: Autoria própria

5.3.2. Diversidade Alfa

A diversidade de cada amostra pode ser vista na figura 18. Observa-se com maior destaque em todas as amostras os gêneros *Bacillus*, *Acidothermus*, *Conexibacter*, entre outros que apareceram com menor expressão.

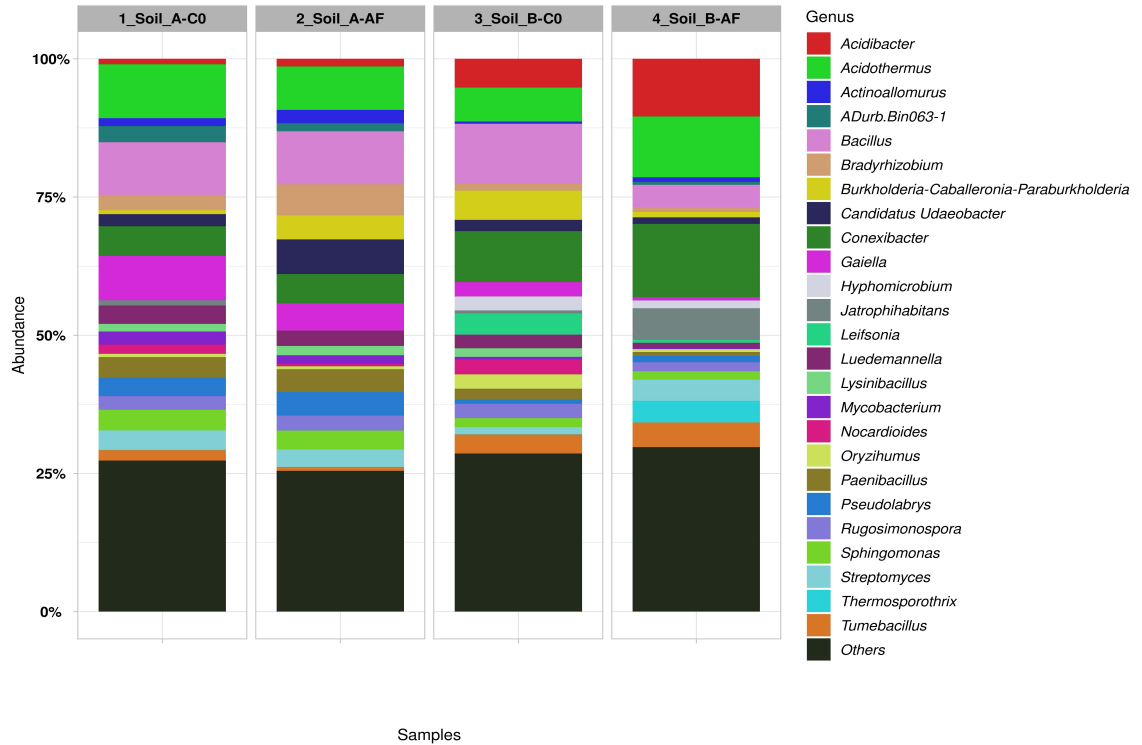


Figura 17 – Diversidade de gêneros de bactérias (25 mais relevantes) por cada amostra de solo.

Na figura 19 há um gráfico de riqueza de diversidade (Chao1), onde nota-se que ambos os solos iniciais (SA-C0; SB-C0) estavam bem próximos, com cerca de 400 gêneros observados. Isso levanta questionamentos quanto à discrepância acentuada entre ambos os solos após o ensaio. No **solo A** (SA-AF) houve um declínio (aproximadamente 340) proporcional quase inversamente proporcional à elevação percebida na diversidade do **solo B** (SB-AF), que chegou a praticamente 480 gêneros.

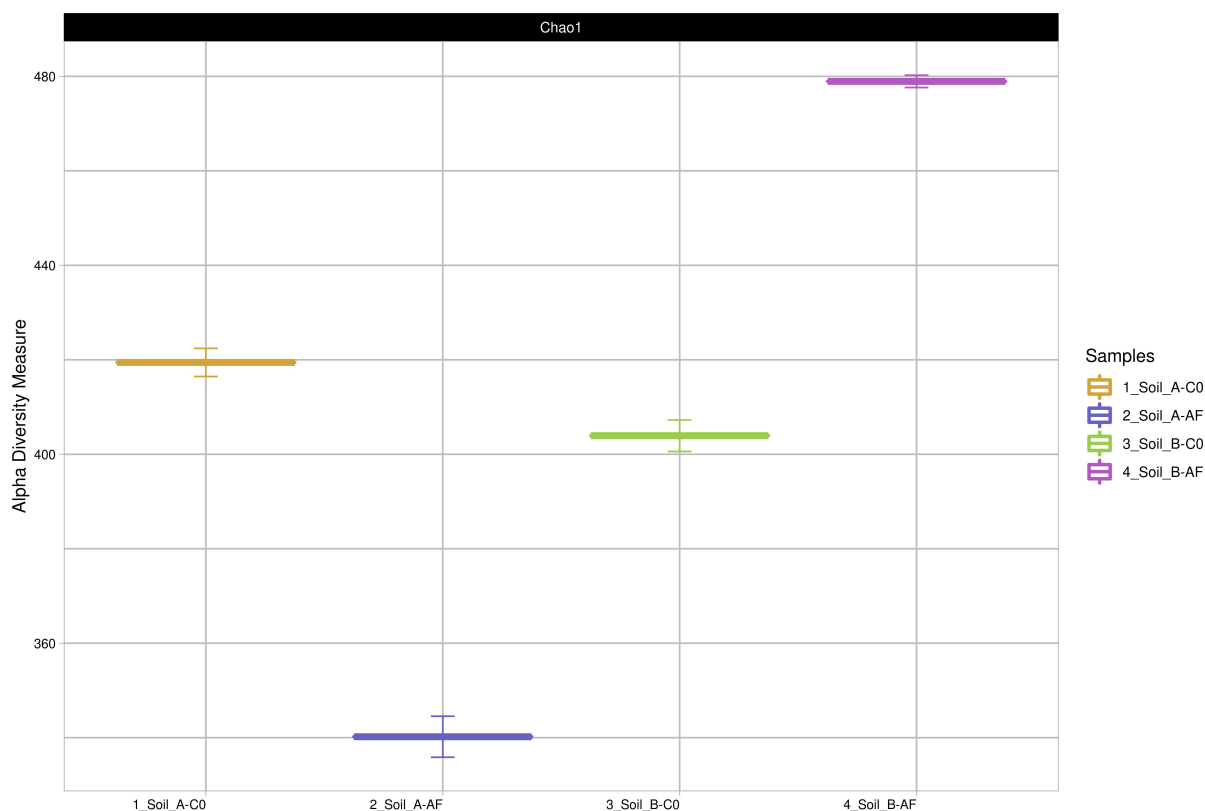


Figura 18 – Diversidade Alfa. Chao1. Mostra a riqueza da diversidade em cada amostra: Solo A inicial sem amostra (laranja), solo A final, pós-biodegradação do hidrogel (roxo), solo B inicial (verde) e solo B final (rosa). Fonte: Autoria própria

5.3.3. Diversidade Beta

Para que se pudesse observar as similaridades de composição taxonômica entre as amostras estudadas, foram feitos gráficos de Análises Coordenadas Principais (PCoA) das comunidades bacterianas das amostras. Na figura 20 observam-se os índices de similaridade de Bray-Curtis e de Jaccard.

No gráfico (figura 19) do índice de Bray-Curtis (A), observa-se grande proximidade entre as amostras iniciais dos dois solos (SA-C0 e SB-C0). Então, vê-se o solo A final (pós-biodegradação do hidrogel) um pouco mais afastado, mas ainda próximo dos dois solos iniciais. E, por fim, observa-se a amostra de solo B final (pós-biodegradação do hidrogel) bem mais afastado.

O índice de Jaccard de dissimilaridade indica a proporção de espécies compartilhadas nas quatro amostras em relação ao número total de espécies (ALBUQUERQUE *et al*, 2016).

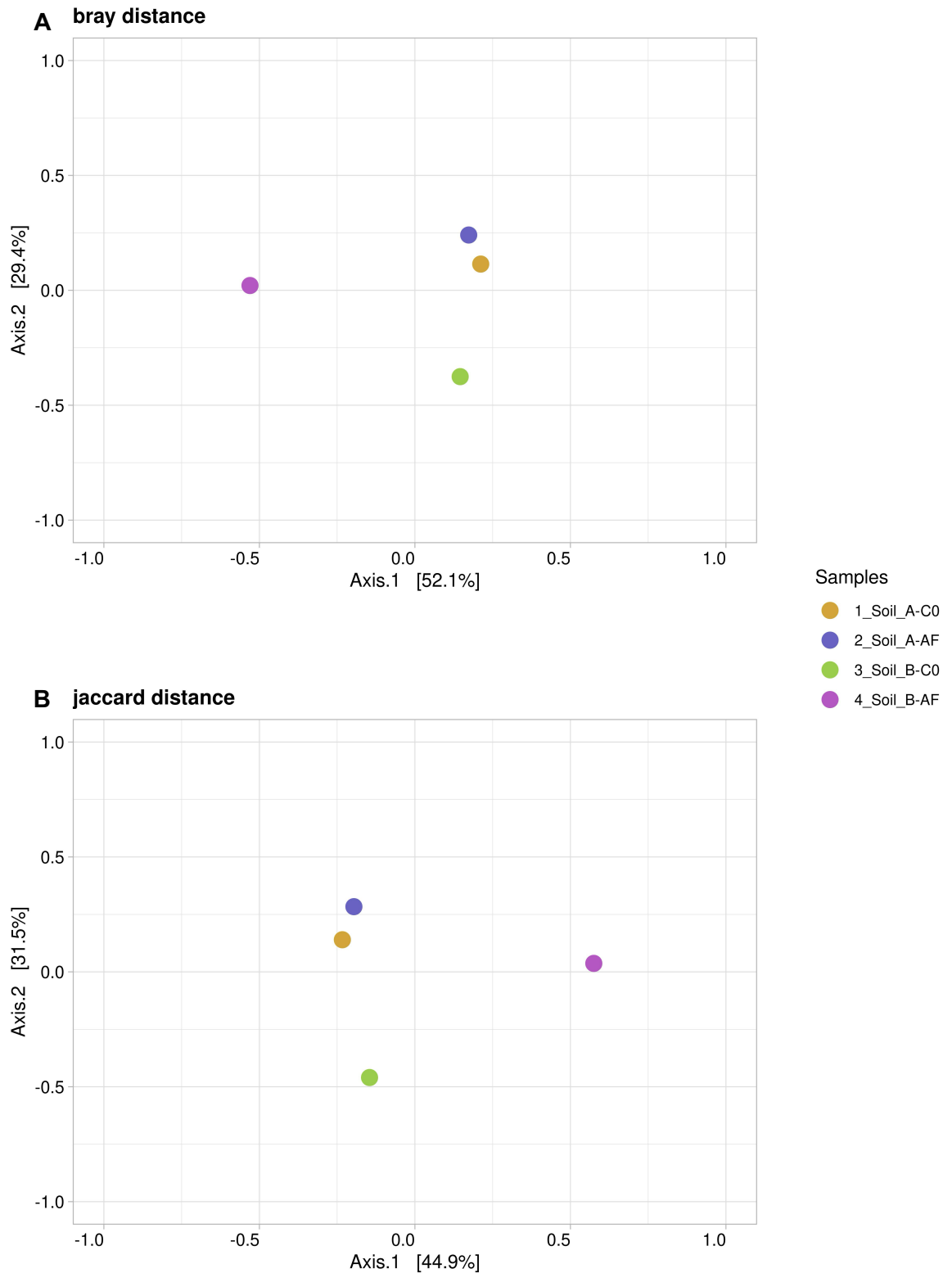


Figura 19 – Análises de Coordenadas Principais (PCoA) da diversidade beta usando os índices Bray-Curtis (A) e Jaccard (B) das comunidades microbianas das amostras dos solos

A inicial sem hidrogel (laranja), A final depois da biodegradação do hidrogel (roxo), B inicial (verde), e B final depois da biodegradação (rosa). Fonte: Autoria própria.

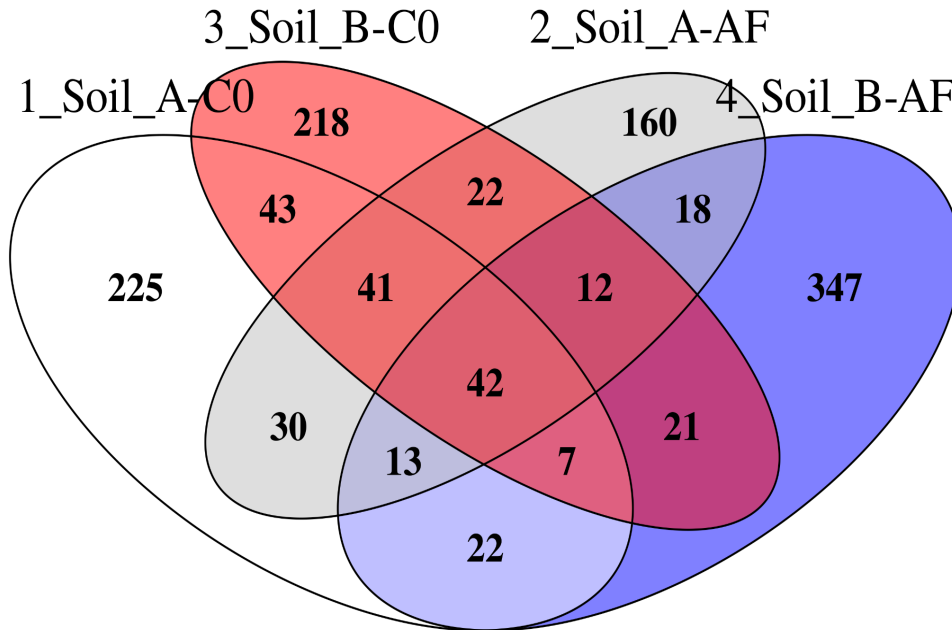


Figura 20- Diagrama de Venn com as relações das comunidades de cada amostra. Fonte: Autoria própria.

5.3.4. Discussão de proporção

A tabela 7 traz os 25 gêneros mais abundantes nas quatro amostras sequenciadas. Dentre estes, vê-se maior abundância de *Bacillus*, *Conexibacter*, *Acidothermus*, *Acidobacter* e *Gaiella*, que possuem uma presença mais expressiva em pelo menos uma das amostras, com destaca para o gênero *Bacillus* que tem presença em abundância em todas as amostras.

Tabela 7. 25 Gêneros mais abundantes distribuídos entre as quatro amostras de solo analisadas. Fonte: Autoria própria.

Gênero	SA-C0	SA-AF	SB-C0	SB-AF
<i>Acidobacter</i>	0,99%	1,40%	5,19%	10,43%
<i>Acidothermus</i>	9,75%	7,85%	6,17%	11,00%
<i>Actinollomurus</i>	1,42%	2,39%	0,37%	0,81%
<i>ADurb.Bin063-1</i>	2,93%	1,47%	0	0,54%
<i>Bacillus</i>	9,54%	9,59%	10,85%	4,06%
<i>Bradyrhizobium</i>	2,77%	5,60%	1,27%	0,86%
<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	0,72%	4,35%	5,29%	0,97%
<i>Candidatus Udaeobacter</i>	2,18%	6,29%	2,02%	1,19%
<i>Conexibacter</i>	5,36%	5,29%	9,23%	13,23%
<i>Gaiella</i>	8,03%	4,94%	2,58%	0,62%
<i>Hyphomicrobium</i>	0	0	2,55%	1,39%
<i>Jatrophihabitans</i>	0,95%	0	0,54%	5,74%
<i>Leifsonia</i>	0	0	3,83%	0,50%
<i>Luedemannella</i>	3,32%	2,76%	2,48%	0,95%
<i>Lysinibacillus</i>	1,38%	1,69%	1,55%	0
<i>Mycobacterium</i>	2,37%	1,60%	0,44%	0,24%
<i>Nocardioides</i>	1,69%	0,40%	2,73%	0
<i>Oryzihumus</i>	0,56%	0,52%	2,57%	0,50%
<i>Paenibacillus</i>	3,74%	4,15%	1,95%	0,73%
<i>Pseudolabrys</i>	3,34%	4,25%	0,80%	1,13%
<i>Rugosimonospora</i>	2,44%	2,73%	2,60%	1,60%
<i>Sphingomonas</i>	3,76%	3,40%	1,60%	1,57%
<i>Streptomyces</i>	3,48%	3,17%	1,26%	3,79%
<i>Thermosporothrix</i>	0,07%	0	0,10%	3,94%
<i>Tumebacillus</i>	1,90%	0,69%	3,44%	4,45%
Outros	27,33%	25,47%	28,60%	29,76%

Entres os gêneros das bactérias chamadas amilolíticas, foi encontrado apenas *Streptococcus sp.* (0,13%) na amostra de solo B pós-biodegradação (SB-AF). Além dessas, alguns gêneros mencionados na literatura (MARAN *et al*, 2014; NEVORALAVÁ *et al*, 2019; JAYASEKARA *et al*, 2005) também foram encontrados em pequena escala nas amostras, como demonstrado na tabela 8 (PENKHURE *et al*, 2015).

Gêneros mencionados na literatura como degradadores de polímeros (PATHAK & NAVNEET, 2017) foram encontrados em proporções pequenas, como exceção de *Bacillus*, que está entre os gêneros que apareceram com a maior proporção em todas as amostras sequenciadas (tabela 8).

Tabela 8. Gêneros degradadores de polímeros e/ou amilolíticos na proporção em que apareceram nas amostras. Fonte: Autoria Própria

Gênero	SA-C0	SA-AF	SB-C0	SB-AF
<i>Streptococcus*</i>	0	0	0	0,13%
<i>Staphylococcus</i>	0	0	0	1,48%
<i>Bacillus</i>	9,54%	9,59%	10,85%	4,06%
<i>Amycolatopsis</i>	0	0	0,10%	0,04%
<i>Streptomyces</i>	1,74%	1,58%	0,63%	2,23%
<i>Paenibacillus</i>	1,43%	1,73%	0,96%	0,41%
<i>Microbispora</i>	0,19%	0,32%	0,06%	0
<i>Comamonas</i>	0	0	0	0,04%
<i>Thermopolyspora</i>	0,07%	0	0,03%	0,06%
<i>Acinetobacter</i>	0	0	0	0,26%
<i>Corynebacterium</i>	0	0	0	0,11%
<i>Flavobacterium</i>	0,12%	0	0	0
<i>Lysinibacillus</i>	0,69%	0,84%	0,79%	0
<i>Staphylococcus</i>	0	0	0	1,48%
<i>Serratia</i>	0	0	0	0,50%
<i>Arthrobacter</i>	0,10%	0	0	0
<i>Burkholderia</i>	0,07%	1,57%	2,73%	0,57%

5.4. Correlação das Características dos Solos com as Comunidades Microbianas

Os solos iniciais diferem em muitos aspectos, especialmente quanto à presença de minerais com cargas positivas, neutras ou negativas. Essas características têm grande influência quanto a abundância e diversidade bacteriana nestes solos iniciais. Por exemplo, a presença de mais alumínio, como o que ocorre no Solo B, pode ser um fator inibitório para o desenvolvimento da microbiota do solo. Observa-se uma pequena diferença negativa quanto à diversidade e abundância no solo B inicial, quando se compara ao solo A inicial.

Outro fator que corrobora essa informação são os dados de emissão de CO₂ no ensaio de biodegradação. O controle do solo A apresentou uma emissão de CO₂ persistentemente mais alta que no solo B, demonstrando uma atividade microbiana eminentemente maior.

6. Considerações Finais

Os solos utilizados neste trabalho apresentam diferenças quanto a sua composição físico-química.

Como era esperado, as emissões de CO₂, tanto na leitura individual como na acumulada, foram maiores nos respirômetros contendo hidrogel, em ambos os solos.

Houve diferença na emissão de CO₂ e uma grande diferença visual no que tange a biodegradação final do hidrogel quando solos avaliados são comparados. No solo A, observou-se um pico na emissão do CO₂ nas primeiras semanas, com posterior curva descendente estável. Além disso, visualmente pode-se afirmar que houve uma completa biodegradação da amostra. No entanto, no solo B houve instabilidade nas emissões de CO₂, e não houve biodegradação das amostras mesmo permanecendo por mais tempo nos respirômetros.

Em relação aos solos utilizados, o solo mais rico em matéria orgânica e micronutrientes, favoreceu a degradação do hidrogel, fazendo com que ela fosse mais rápida e mais homogênea. O solo com menor conteúdo de matéria orgânica e micronutrientes apresentou maior acidificação e maior presença de alumínio trocável, podendo isso ter sido determinante para um desempenho menor da atividade dos microrganismos em relação à biodegradação.

Em relação a diversidade microbiana, nota-se equilíbrio na diversidade e abundância em ambos os solos iniciais, porém após a biodegradação, observou-se que houve queda na diversidade do solo A, enquanto o solo B obteve um aumento. Em todas as amostras houve a forte presença de alguns gêneros como *Bacillus*, *Acidothermus*, *Conexibacter*, *Acibacter*, e *Gaiella*, que são comumente encontrados na rizosfera de muitos solos (EZEOKOLI, 2020).

Concluiu-se que os solos com seus nutrientes e condições físico-químicas têm efeito na diversidade microbiológica e no processo de biodegradação do hidrogel de amido de milho inter cruzado com EDTAD.

O hidrogel pode ser completamente biodegradado se for exposto às condições ideais no solo.

Os gêneros mais prevalentes nas amostras sequenciadas, especialmente nas amostras pós-biodegradação, com exceção de *Bacillus*, não são os gêneros que

aparecem na literatura como gêneros responsáveis por processos de biodegradação de polímeros. Esses gêneros aparecem em proporção diminuta.

7. REFERÊNCIAS

1. ADJUIK, T. A.; NOKES, S. E.; MONTROSS, M. D. Biodegradability of bio-based and synthetic hydrogels as sustainable soil amendments: A review. **Journal of Applied Polymer Science**, 2023.
2. ALBUQUERQUE, M.A.; SILVA, E.L.; BARROS, K.N.N.O.; JUNIOR, S.F.A.X. Comparação entre coeficientes similaridade uma aplicação em ciências florestais. **Matemática Estatística Foco**. 2016, 4, 102–114.
3. ANGELO, L. M.; FRANÇA, D.; FAEZ, R. Biodegradation and viability of chitosan-based microencapsulated fertilizers. **Carbohydrate Polymers**, v. 257, n. 257, p. 117635, abr. 2021. Acesso em: 5 mar. 2024.
4. ARORA, N. K.; KHARE, E.; SINGH, S.; MAHESHWARI, D. K. Effect of Al and heavy metals on enzymes of nitrogen metabolism of fast and slow growing rhizobia under explanta conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26, n. 5, p. 811–816, 20 nov. 2009. Acesso em: 28 nov. 2023.
5. BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of a Flask and Method for Measuring the Persistence and Biological Effects of Pesticides in Soil. **Soil Science**, v. 100, n. 1, p. 68–70, jul. 1965. Acesso em: 18 abr. 2020.
6. BRANCO, R. H. R.; MEULEPAS, R. J. W.; VAN VEELLEN, H. P. J.; RIJNAARTS, H. H. M.; SUTTON, N. B. Influence of redox condition and inoculum on micropollutant biodegradation by soil and activated sludge communities. **Science of The Total Environment**, v. 897, n.https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.165233, p. 165233, 1 nov. 2023.
7. BOTARO, V. R.; RODRIGUES, J. S. **Hidrogéis Derivados de Polímeros naturais**. Sorocaba, SP: EdUFSCar, 2020.
8. CARMO, K. P.; LIMA, V. H.; FREITAS, R. R. M. Hidrogéis de amido. In BOTTARO, V. R.; RODRIGUES, J. S. **Hidrogéis Derivados de Polímeros Naturais**. [s.l.] EdUFSCar, 2020 cap. 4. p. 70-87.
9. CARRARA, S. M. C. de M.; MORITA, D. M.; BOSCOV, M. E. G. Biodegradation of di(2-ethylhexyl) phthalate in a typical tropical soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 197, n. 197, p. 40–48, 1 dez. 2011.
10. CHIRANI, N., YAHIA, L., GRITSCH, L., MOTTA, F. L., CHIRANI, S., FARÉ, S. History and Applications of Hydrogels. **Journal of Biomedical Sciences**, v. 04, n. 02:13, 2015.
11. CORRADINI, E.; TEIXEIRA, E. De M.; AGNELLI, J. A. M.; MATTOSO, L. H. C. Amido Termoplástico. In: **EMBRAPA Instrumentação Agropecuária**, 1., 2007, São Carlos. [...]. São Carlos: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2007. v. 300
12. CORRÊA, A. C.; CAMPOS, A. de; IVO, P.; FERNANDES, G.; LUIZ; MARCONCINI, J. M. Biodegradability and nutrients release of thermoplastic starch and poly (ϵ -caprolactone) blends for agricultural uses. **Carbohydrate Polymers**, v. 282, n. 119058, p. 119058–119058, 1 abr. 2022. Acesso em: 24 mar. 2024.
13. CORREA, S., GROSSKOPF, A. K., HERNANDEZ, H. L., CHAN, D., YU, A. C., STAPLETON, L. M., APPEL, E. A. Translational Applications of Hydrogels. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 18, p. 11385–11457, 3 maio 2021.
14. DA SILVA, S. A.; HINKEL, E. W.; LISBOA, T. C.; SELISTRE, V. V.; DA SILVA, A. J.; DA SILVA, L. O. F.; FACCIN, D. J. L.; CARDOZO, N. S. M. A biostimulation-

- based accelerated method for evaluating the biodegradability of polymers. **Polymer Testing**, v. 91, n. 91, p. 106732, nov. 2020.
15. DAVILA, R. B. *et al.* Heavy metals in iron ore tailings and floodplain soils affected by the Samarco dam collapse in Brazil. **The Science of the total environment**, v. 709, n. 136151, p. 136151, 2020.
 16. DA CUNHA, T. J. F. *et al.* **Embrapa: Solos**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/bioma-caatinga/solos/latossolos>>.
 17. DIMATTEO, R.; DARLING, N. J.; SEGURA, T. In situ forming injectable hydrogels for drug delivery and wound repair. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 127, n. 10.1016/j.addr.2018.03.007, p. 167–184, mar. 2018. Acesso em: 15 dezembro. 2023.
 18. ELVIRA, C.; MANO, J. F.; SAN ROMÁN, J.; REIS, R. L. Starch-based biodegradable hydrogels with potential biomedical applications as drug delivery systems. **Biomaterials**, v. 23, n. 9, p. 1955–1966, maio 2002. Acesso em: 10 out. 2023.
 19. ENCALADA, K.; ALDÁS, M. B.; ERICK, P.; VALLE, V. An overview of starch-based biopolymers and their biodegradability. **Ciencia e Ingeniería**, v. 39, n. 3, 2018. Disponível em: <www.redalyc.org/articulo.oa?id=50755760700>.
 20. ERBEKTAS, A. R.; ISGOR, O. B.; WEISS, W. J. Evaluating the efficacy of antimicrobial additives against biogenic acidification in simulated wastewater exposure solutions. **RILEM technical letters**, v. 4, p. 49–56, 2019.
 21. ESPIG, S. A.; REIS, I. A.; ARAÚJO, E. P.; FORMAGGIO, A. R. Relação Entre o Fator de Reflectância e o Teor de Óxido de Ferro em Latossolos Brasileiros. **Anais XII Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**. Goiânia, GO, Brasil. p. 16-21, 2006.
 22. EZEOKOLI, O. T.; BEZUIDENHOUT, C. C.; MABOETA, M. S.; KHASA, D. P.; ADELEKE, R. A. Structural and functional differentiation of bacterial communities in post-coal mining reclamation soils of South Africa: bioindicators of soil ecosystem restoration. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 4 fev. 2020. Acesso em: 13 maio. 2020.
 23. FABIAN, A. J.; OTTONI FILHO, T. B. Determinação de capacidade de campo in situ ou através de equações de regressão. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 1029–1036, 2000.
 24. FADEEV, E.; CARDOZO-MINO, M.G.; RAPP J. Z., BIENHOLDC; SALTER, I; SALMAN-CARVALHO, V.; MOLARI, M.; TEGETMEYER, H. E.; BUTTIGIEG, P. L. AND BOETIUS A. Comparison of Two 16S rRNA Primers (V3–V4 and V4–V5) for Studies of Arctic Microbial Communities. **Frontiers in Microbiology**. 12:637526, 2021.
 25. FECHINE, G. J. M., AMBRÓSIO, F. B., & ALVES, D. A. Estudo da biodegradabilidade de polímeros por meio do Respirômetro de Bartha. **Revista Mackenzie De Engenharia E Computação**, 11.
 26. FERREIRA, P. A. *et al.* Efficient Nitrogen-fixing Rhizobium Strains Isolated from Amazonian Soils are Highly Tolerant to Acidity and Aluminium. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 5, p. 1947–1959, 2012.
 27. FOY, C. D.; CHANEY, R. L.; WHITE, M. C. The physiology of metal toxicity in plants. **Annual review of plant physiology**, v. 29, n. 1, p. 511–566, 1978.

28. GHASEMLOU, M.; DAVER, F.; MURDOCH, B. J.; BALL, A. S.; IVANOVA, E. P.; ADHIKARI, B. Biodegradation of novel bioplastics made of starch, polyhydroxyurethanes and cellulose nanocrystals in soil environment. **Science of The Total Environment**, v. 815, n. 815, p. 152684, 1 abr. 2022.
29. GILBERT, W.; MAXAM, A. The Nucleotide Sequence of the lac Operator. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 12, p. 3581–3584, 1 dez. 1973.
30. HARDWICK, S. A.; DEVESON, I. W.; MERCER, T. R. Reference standards for next-generation sequencing. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 8, p. 473–484, 1 ago. 2017. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrg.2017.44.pdf?origin=ppub>. Acesso em: 3 fevereiro. 2024.
31. HUA, D.; HENDRIKS, W. H.; XIONG, B.; PELLIKAAN, W. F. Starch and Cellulose Degradation in the Rumen and Applications of Metagenomics on Ruminant Microorganisms. **Animals**, v. 12, n. 21, p. 3020, 3 nov. 2022. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9653558/>.
32. IMMIRZI, B. *et al.* Preparation, characterisation and field-testing of a biodegradable sodium alginate-based spray mulch. **Biosystems Engineering**, v. 102, n. 4, p. 461–472, 2009.
33. JAYASEKARA, R.; HARDING, I.; BOWATER, I.; LONERGAN, G. Biodegradability of a Selected Range of Polymers and Polymer Blends and Standard Methods for Assessment of Biodegradation. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 13, n. 3, p. 231–251, 1 jul. 2005. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10924-005-4758-2>.
34. JIMÉNEZ-TORRES, H. D.; HERNÁNDEZ-OLMOS, S. L.; REYNAGA-DELGADO, E.; OROZCO-GUAREÑO, E. Study on the Degradation of a Semi-Synthetic Lignin–Acrylic Acid Hydrogel with Common Bacteria Found in Natural Attenuation Processes. **Polymers**, v. 15, n. 12, p. 2588–2588, 6 jun. 2023. Acesso em: 24 mar. 2024
35. KANHAI, L. D. K. *et al.* Microplastics in sea ice and seawater beneath ice floes from the Arctic Ocean. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 19 mar. 2020.
36. KIJCHAVENGKUL, T.; AURAS, R.; RUBINO, M.; SELKE, S.; NGOUAJIO, M.; FERNANDEZ, R. T. Biodegradation and hydrolysis rate of aliphatic aromatic polyester. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 12, p. 2641–2647, dez. 2010. Acesso em: 7 jan. 2024.
37. KOBAYASHI, H. *et al.* Exploring a new approach for assessing the fate and behavior of the tailings released by the Brumadinho dam collapse (Minas Gerais, Brazil). **Journal of hazardous materials**, v. 448, n. 130828, p. 130828, 2023.
38. KRZAN, A.; HEMJINDA, S.; MIERTUS, S.; CORTI, A.; CHIellini, E. Standardization and certification in the area of environmentally degradable plastics. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, n. 12, p. 2819–2833, dez. 2006.
39. KUNITO, T. *et al.* Aluminum and acidity suppress microbial activity and biomass in acidic forest soils. **Soil biology & biochemistry**, v. 97, p. 23–30, 2016.
40. LOTFABAD, S.; GRAY, M. Kinetics of biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 60, n. 3, p. 361–366, 1 nov. 2002. Acesso em: 18 nov. 2023.
41. LI, Y. *et al.* A biodegradable starch hydrogel synthesized via thiol-ene click chemistry. **Polymer degradation and stability**, v. 137, p. 75–82, 2017.

42. LIM, B. K. H.; THIAN, E. S. Biodegradation of polymers in managing plastic waste — A review. **Science of The Total Environment**, v. 813, n. 25, p. 151880, nov. 2021.
43. LIU, W. *et al.* Popular Molecular Markers in Bacteria. **Molecular Genetics, Micro**, v. 27, n. 3, p. 103–107, jul. 2012.
44. LV, S.; ZHANG, Y.; GU, J.; TAN, H. Physicochemical evolutions of starch/poly (lactic acid) composite biodegraded in real soil. **Journal of Environmental Management**, v. 228, n. 228, p. 223–231, 15 set. 2018. Acesso em: 6 jan. 2024 2023.
45. MARAN, J. P.; SIVAKUMAR, V.; THIRUGNANASAMBANDHAM, K.; SRIDHAR, R. Degradation behavior of biocomposites based on cassava starch buried under indoor soil conditions. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, n. 1, p. 20–28, jan. 2014. Acesso em: 14 nov. 2019.
46. MAWA, J.; MOMO, M. F.; SULTANA, R.; ZERIN, T. Isolation of Starch Degrading Bacteria from Rhizospheric Soil of Mymensingh, Bangladesh. **Stamford journal of microbiology**, v. 12, n. 1, p. 21–24, 20 dez. 2022. Acesso em: 19 mar. 2024.
47. MEFO, C. N.; EZEONUEGBU, B. A.; AMEH, J. B.; ADO, S. A.; ISHIAKU, U. S. Biodegradation of cassava starch modified low density polyethylene by *Bacillus cereus* and *Pseudomonas aeruginosa* isolated from waste dumpsite. **GSC Biological and Pharmaceutical Sciences**, v. 19, n. 2, p. 149–157, 30 maio 2022. Disponível em: <<https://gsconlinepress.com/journals/gscbps/sites/default/files/GSCBPS-2022-0170.pdf>>. Acesso em: 2 ago. 2023.
48. MERO, V.; MACHUVE, D. The Usability Testing of SSAAT, a Bioinformatic Web Application for DNA Analysis. **Technology & Applied Science Research**, v. 11, n. 3, p. 7075–7078, 2021. Acesso em: 3 mar. 2024.
49. MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Applied models to biodegradation kinetics of lubricant and vegetable oils in wastewater. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, n. 3, p. 297–305, abr. 2009. Acesso em: 18 out. 2023.
50. NAKAJIMA-KAMBE, T.; SHIGENO-AKUTSU, Y.; NOMURA, N.; ONUMA, F.; NAKAHARA, T. Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, n. 2, p. 134–140, 25 fev. 1999.
51. **NBR NM 3310-1:1997** – Peneiras de ensaio – Requisitos técnicos e verificação - Parte 1: **Peneiras de ensaio com tela de tecido metálico**, 1997.
52. **NBR 14283:1999** – Resíduos em solos – Determinação da os em solos – Determinação da biodegradação pelo método respirométrico, 1999.
53. NEVORALOVÁ, M.; KOUTNÝ, M.; UJČÍČ, A.; HORÁK, P.; KREDATUSOVÁ, J.; ŠERÁ, J.; RŮŽEK, L.; RŮŽKOVÁ, M.; KREJČÍKOVÁ, S.; ŠLOUF, M.; KRULIŠ, Z. Controlled biodegradability of functionalized thermoplastic starch based materials. **Polymer Degradation and Stability**, v. 170, n. 25, p. 108995, 1 dez. 2019.
54. NICOLA, L.; BÅÅTH, E. The effect of temperature and moisture on lag phase length of bacterial growth in soil after substrate addition. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 137, n. 3, p. 107563, 1 out. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0038071719302275>>. Acesso em: 5 nov. 2020.

55. OLIVEIRA, G. C. *et al.* (EDS.). Densidade Aparente de Dois Solos do Instituto Federal de Minas Gerais - Campus Cambuí. 2018.
56. PATHAK; NAVNEET (2017) QAMRUZZAMAN, M.; AHMED, F.; MONDAL, M. I. H. An overview on starch-based sustainable hydrogels: Potential applications and aspects. **Journal of polymers and the environment**, v. 30, n. 1, p. 19–50, 2022.
57. RIYAJAN, S.-A.; SUKHLAAIED, W.; KEAWMANG, W. Preparation and properties of a hydrogel of maleated poly (vinyl alcohol) (PVAM) grafted with cassava starch. **Carbohydrate polymers**, v. 122, p. 301–307, 2015.
58. ROLFE, M. D.; RICE, C. J.; LUCCHINI, S.; PIN, C.; THOMPSON, A.; CAMERON, A. D. S.; ALSTON, M.; STRINGER, M. F.; BETTS, R. P.; BARANYI, J.; PECK, M. W.; HINTON, J. C. D. Lag Phase Is a Distinct Growth Phase That Prepares Bacteria for Exponential Growth and Involves Transient Metal Accumulation. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 3, p. 686–701, 2 dez. 2011.
59. RONQUIM, C. C. Conceitos de fertilidade do solo e manejo adequado para as regiões tropicais. **Boletim de Desenvolvimento de Pesquisa - Embrapa**, v. 1, n. 1, 1 jan. 2010. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/31004/1/BPD-8.pdf>>.
60. RUSSELL, J. B. Ecology of rumen microorganisms: energy use. **Aspect of digestive physiology of ruminants**, v. 1, n. 1, p. 74–98, 1988.
61. SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, vol. 74, no. 12, p. 5463-5467, 1 Dec. 1977. Available from: <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>. Acesso em 2 Mar. 2024.
62. SAROJA, N.; SHAMALA, T. R.; THARANATHAN, R. N. Biodegradation of starch-g-polyacrylonitrile, a packaging material, by *Bacillus cereus*. **Process Biochemistry**, v. 36, n. 1-2, p. 119–125, set. 2000. Acesso em 9 dez. 2023.
63. SENNA, A. M.; BOTARO, V. R. Biodegradable hydrogel derived from cellulose acetate and EDTA as a reduction substrate of leaching NPK compound fertilizer and water retention in soil. **Journal of Controlled Release**, v. 260, p. 194-201, 2017.
64. SENNA, A. M.; BOTARO, V.R. Hidrogéis derivados de celulose nativa e celulose modificada quimicamente. In: BOTARO, V.R.; RODRIGUES, J.S (Org.). **A desconstrução dos tecidos vegetais e possibilidades atuais de produção de novos materiais**. 1 ed. Goiânia: Editora Espaço Acadêmico p.47-67, 2019.
65. SHOVI TRI, M.; NAFI'AH, R.; ANTIKA, T. R.; ALAMI, N. H.; KUSWY TASARI, N. D.; ZULAIKHA, E. Soil burial method for plastic degradation performed by *Pseudomonas* PL-01, *Bacillus* PL-01, and indigenous bacteria. **AIP Publishing**, v. 10, n. 3, 2017.
66. Solos do Estado de São Paulo, escala 1:108.000 (Adaptado). **Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo**. Disponível em: <http://datageo.ambiente.sp.gov.br>
67. SONG, P. *et al.* Recent advances in soil remediation technology for heavy metal contaminated sites: A critical review. **The Science of the total environment**, v. 838, n. Pt 3, p. 156417, 2022.
68. SU, D.; PU, Y.; GONG, C.; HE, Z. Application of cold-adaptive *Pseudomonas* sp. SDR4 and *Mortierella alpina* JDR7 co-immobilized on maize cob in remediating PAH-contaminated freeze-thawed soil. **Environmental Advances**, v. 4, n. 6, p. 100063, jul. 2021. Acesso em: 22 ago. 2023.

69. TANG, J., RONG, X. DECAI, J., GU, C., ANWEI, C., LUO, S. Biodegradation of phthalate esters in four agricultural soils: Main influencing factors and mechanisms. **International Biodeterio**, v. 147, 2020.
70. TANG, X.; ALAVI, S. Recent advances in starch, polyvinyl alcohol-based polymer blends, nanocomposites and their biodegradability. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, n. 1, p. 7–16, abr. 2011.
71. TEIXEIRA, P. C.; DE CAMPOS, D. V. B.; SALDANHA, M. F. C. **Manual de Métodos de Análise de Solo**. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/172308/1/Pt-2-Cap-1-pH-do-solo.pdf>>.
72. TEIXEIRA, P. C.; DONAGEMMA, G. K. FONTANA, A. **Manual de Métodos de Análise de Solo**. [s.l: s.n.].
73. TURNBULL, P. C. B. Bacillus. *In*: **Medical Microbiology**. Galveston: University of Texas Medical Branch, 1996. p. Cap. 15.
74. WANG, F.; WU, P.; SHU, L.; HUANG, D.; LIU, H. High-efficiency adsorption of Cd(II) and Co(II) by ethylenediaminetetraacetic dianhydride-modified orange peel as a novel synthesized adsorbent. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 29, n. 17, p. 25748–25758, 30 nov. 2021. Acesso em: 23 fev. 2024.
75. WICAKSONO, J. W.; PURWADARIA, T.; YULANDI, A.; TAN, W. A. Bacterial dynamics during the burial of starch-based bioplastic and oxo-low-density-polyethylene in compost soil. **BMC Microbiology**, v. 22, n. 1, 20 dez. 2022. Acesso em: 3 maio. 2023.
76. WIJBENGA, D.-J. BELDMAN, G., VEEN, A., BINNEMA, D. J. Production of native-starch-degrading enzymes by a Bacillus firmus/lentus strain. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 35, n. 2, 1991.
77. WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Microbiological Reviews**, v. 51, n. 2, p. 221–271, 1987. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC373105/pdf/microrev00049-0051.pdf>>.
78. YU, J.; TONG, M.; SUN, X.; LI, B. Enhanced and selective adsorption of Pb²⁺ and Cu²⁺ by EDTAD-modified biomass of baker's yeast. **Bioresource Technology**, v. 99, n. 7, p. 2588–2593, maio 2008. Acesso em: 27 mar. 2024.

APÊNDICE A - Dados da Titulação do Solo A

Médias Consumo CO2 com controle - Solo A		
Médias		
Dias	Controle Solo A	Solo A + Hidrogel
1	17,37	3,95
2	14,40	-1,69
3	15,87	6,63
4	15,95	8,32
5	15,53	0,00
6	15,70	1,21
7	16,07	7,04
14	12,13	-3,12
21	12,77	25,25
28	28,37	20,98
35	29,90	14,91
42	28,45	12,71
49	27,90	10,31
56	12,10	8,91
63	12,30	7,54
70	12,57	6,85
77	13,03	0,00
84	13,23	4,80
91	13,40	4,99
98	12,83	1,92
105	14,47	2,61
112	14,43	1,84
119	14,93	2,29
126	14,50	2,80
133	13,97	1,04
140	14,77	0,98
147	14,93	1,35
154	15,57	0,21
161	14,67	0,41
168	14,83	-0,65
175	14,77	0,21
182	15,17	0,06
190	15,17	

APÊNDICE B - Dados da Titulação do Solo B

Médias Consumo CO ₂ com controle - Solo B		
Dias	Controle Solo B	Solo B + Hidrogel
1	1,78	0,00
2	-0,29	4,89
3	-0,18	0,32
4	-0,12	0,62
5	0,29	0,75
6	0,29	1,13
7	-0,23	1,58
14	1,76	12,03
21	1,14	5,64
28	1,14	11,46
35	1,23	12,25
42	1,64	13,48
49	1,64	14,75
56	1,47	15,17
63	0,82	15,32
70	1,11	14,40
77	0,59	13,83
84	0,76	10,91
91	0,70	11,28
98	1,06	13,79
105	0,88	7,19
112	-0,35	8,02
119	-0,65	7,96
126	-0,06	8,04
133	0,59	8,98
140	0,18	6,53
147	0,06	5,72
154	-0,35	4,19
161	0,70	4,94
168	0,53	5,87
175	0,47	6,16
182	0,35	5,98
190	0,35	3,81
196	5,66	3,84
203	0,18	2,76
210	0,06	3,64
217	-0,35	1,35
224	0,70	5,22
231	-0,12	3,93