

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

MARIANA ROMERO BORGES

**ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE POLÍMEROS EM
FLUIDOS DE PERFURAÇÃO E AVALIAÇÃO DO USO DE NANOCOMPÓSITOS
DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E ÓXIDO DE GRAFENO (AgNPs-OG) COMO
AGENTE ANTIMICROBIANO**

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2025

MARIANA ROMERO BORGES

**ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE POLÍMEROS EM
FLUIDOS DE PERFURAÇÃO E AVALIAÇÃO DO USO DE NANOCOMPÓSITOS
DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E ÓXIDO DE GRAFENO (AgNPs-OG) COMO
AGENTE ANTIMICROBIANO**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas para obtenção do título de bacharel.

Orientador: Marcos Rogério Tótola

Coorientadores: Alex Gazolla de Castro

Amanda Tristão Santini

VIÇOSA - MINAS GERAIS

2025


MARIANA ROMERO BORGES

ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE POLÍMEROS EM FLUIDOS DE PERFURAÇÃO E AVALIAÇÃO DO USO DE NANOCOMPÓSITOS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E ÓXIDO DE GRAFENO (AgNPs-OG) COMO AGENTE ANTIMICROBIANO

Monografia apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas para obtenção do título de bacharel.


APROVADA: 28 de novembro de 2025.

Assentimento:

Documento assinado digitalmente
 **MARIANA ROMERO BORGES**
Data: 01/12/2025 18:32:19-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Mariana Romero Borges

Autora

Documento assinado digitalmente
 **MARCOS ROGERIO TOTOLA**
Data: 01/12/2025 18:16:39-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Marcos Rogério Tótola


Orientador

MARIANA ROMERO BORGES


ISOLAMENTO DE MICRORGANISMOS DEGRADADORES DE POLÍMEROS EM FLUIDOS DE PERFURAÇÃO E AVALIAÇÃO DO USO DE NANOCOMPÓSITOS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E ÓXIDO DE GRAFENO (AgNPs-OG) COMO AGENTE ANTIMICROBIANO

Monografia apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Curso de Ciências Biológicas para obtenção do título de bacharel.


APROVADA: 28 de novembro de 2025.

Documento assinado digitalmente
 **MARCOS ROGERIO TOTOLA**
Data: 01/12/2025 18:17:37-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Marcos Rogério Tótola
(UFV)

Documento assinado digitalmente
 **AMANDA TRISTAO SANTINI**
Data: 01/12/2025 20:32:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Amanda Tristão Santini
(UFV)

Documento assinado digitalmente
 **THAYS VIEIRA BUENO**
Data: 01/12/2025 20:40:00-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Thays Vieira Bueno
(UFV)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo o amor, por sempre me incentivarem a seguir meus sonhos e por me propiciarem tudo que tenho hoje.

Ao meu irmão César, por sempre estar do meu lado.

Ao meu namorado Arthur, pelo carinho, apoio e por ser meu porto seguro.

Ao Murillo, por ser minha companhia desde o início da graduação.

Aos meus amigos de longa data que me acompanham até hoje e sempre se fazem presentes.

À UFV e à Viçosa, por me permitirem ter todas as experiências que tive e terem se tornado lar.

Ao meu professor e orientador Marcos Rogério Tótola, por ter abertos as portas de seu laboratório e me dado oportunidade de me tornar a cientista que sou hoje.

À minha coorientadora Amanda Tristão Santini, por sempre estar à disposição e por toda ajuda ao me orientar.

Ao técnico Alex Gazolla de Castro, por assegurar a qualidade do meu projeto e sempre me auxiliar nos experimentos e análises.

Aos meus colegas de laboratório, que me ajudaram e fizeram a experiência de estágio ser muito mais leve.

À técnica Patrícia Pereira Fontes, por disponibilizar os equipamentos necessários para o desenvolvimento do projeto e pela ajuda nas análises.

À Petrobras, pelo suporte financeiro e por fornecer o material necessário para que o projeto saísse do papel.

A todos que fizeram parte da minha jornada, que me fazem quem sou hoje.

RESUMO

Fluidos de perfuração fazem parte dos componentes essenciais para uma produção de petróleo de sucesso. Os fluidos à base de água utilizam polímeros como goma xantana e hidroxipropilamido (HPA) para assegurar viscosidade, estabilidade reológica e adequada suspensão de cascalhos durante as operações de perfuração. Entretanto, esses polímeros são suscetíveis à biodegradação por microrganismos presentes no ambiente de perfuração, o que pode levar à perda de viscosidade, aumento de custos operacionais e comprometimento da eficiência do processo. Diante desse cenário, este trabalho teve como objetivo caracterizar a microbiota associada a fluidos de perfuração e desenvolver nanocompósitos com potencial ação biocida capazes de reduzir a degradação microbiana desses polímeros. Foram isolados microrganismos de diferentes amostras de fluidos, revelando uma comunidade microbiana diversa. A identificação dos isolados foi conduzida por meio da análise dos perfis de ácidos graxos (MIDI), amplificação do gene 16S rRNA e sequenciamento Sanger, permitindo a determinação taxonômica de uma ampla variedade de bactérias, com clara predominância de espécies do gênero *Bacillus*. Para avaliar o potencial degradador dos isolados, foram realizados ensaios de triagem para degradação de HPA e goma xantana empregando colorações como lugol e vermelho congo, possibilitando a identificação dos microrganismos mais ativos na utilização desses polímeros como fonte de carbono. Paralelamente, foram sintetizados nanocompósitos formados por nanopartículas de prata associadas a óxido de grafeno, funcionalizados com polietilenoimina (PEI), visando à obtenção de um material estável com propriedades antimicrobianas. Esses nanocompósitos foram caracterizados por espectroscopia UV-Vis, espectroscopia de fluorescência, espalhamento dinâmico de luz (DLS) e análise de potencial zeta, apresentando perfis ópticos e coloidais consistentes com aqueles descritos na literatura para sistemas similares. Por fim, os materiais foram avaliados quanto à sua atividade biocida em fluidos de perfuração, demonstrando capacidade de inibir o crescimento microbiano associado à degradação dos polímeros, o que contribui para a preservação das propriedades reológicas do fluido. Os resultados obtidos demonstraram que o monitoramento microbiológico, aliado ao uso de nanomateriais com propriedades antimicrobianas, representa uma estratégia promissora para mitigar problemas de

biodegradação em fluidos de perfuração, podendo otimizar a eficiência e a estabilidade desses sistemas em operações de perfuração.

Palavras-chave: fluidos de perfuração; biodegradação; polímeros; goma xantana; hidroxipropilamido (HPA); nanopartículas de prata; óxido de grafeno; biocida.

ABSTRACT

Drilling fluids are essential components for a successful petroleum production. Water-based drilling fluids rely on polymers such as xanthan gum and hydroxypropyl starch (HPS) to ensure adequate viscosity, rheological stability, and cuttings suspension during drilling operations. However, these polymers are susceptible to microbial biodegradation, which can lead to loss of viscosity, increased operational costs, and reduced process efficiency. In this context, the present study aimed to characterize the microbiota associated with drilling fluids and to develop nanocomposites with biocidal potential capable of mitigating polymer degradation. Microorganisms were isolated from different drilling fluid samples, revealing a diverse microbial community. The isolates were identified using fatty acid methyl ester profiling (MIDI), 16S rRNA gene amplification, and Sanger sequencing, which allowed taxonomic classification of a wide range of bacteria, with a clear predominance of *Bacillus* species. To assess their degradative potential, the isolates were screened for the ability to degrade HPA and xanthan gum using Lugol and Congo Red staining assays, enabling the identification of microorganisms most active in polymer breakdown. In parallel, nanocomposites composed of silver nanoparticles and graphene oxide were synthesized to obtain stable materials with enhanced antimicrobial properties. These nanocomposites were characterized by UV-Vis spectroscopy, fluorescence, dynamic light scattering (DLS), and zeta potential analysis, presenting optical and colloidal features consistent with those described in the literature for similar systems. Finally, the materials were evaluated for their biocidal activity in drilling fluids, demonstrating the ability to inhibit microbial growth associated with polymer degradation and contributing to the preservation of the rheological properties of the fluid. Overall, the results indicate that combining microbiological monitoring with the use of antimicrobial nanomaterials have shown a promising strategy to mitigate biodegradation issues in drilling fluids, potentially improving the stability and operational efficiency of drilling systems.

Key words: drilling fluids; biodegradation; polymers; xanthan gum; hydroxypropyl starch; silver nanoparticles; graphene oxide; biocide.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1. FLUIDOS DE PERFURAÇÃO	3
2.2. GOMA XANTANA.....	5
2.3. HIDROXIPROPILAMIDO	10
2.4. NANOMATERIAIS	12
2.5. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS.....	14
2.6. GRAFENO	15
2.7. NANOCOMPÓSITOS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E ÓXIDO DE GRAFENO	20
3. OBJETIVOS	21
3.1. OBJETIVOS GERAIS:.....	21
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	21
4. METODOLOGIA.....	22
4.1. ISOLAMENTO E TRIAGEM DOS MICRORGANISMOS	22
4.1.1. ISOLAMENTO.....	24
4.1.2. TRIAGEM DOS ISOLADOS.....	25
4.1.2.1. TESTE COM LUGOL.....	25
4.1.2.2. TESTE COM VERMELHO CONGO	26
4.2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	26
4.2.1. ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS (MIDI).....	26
4.2.2. PCR E SEQUENCIAMENTO.....	29
4.3. SÍNTESE DOS NANOCOMPÓSITOS	30
4.3.1. PROTOCOLO SILVA.....	30
4.3.2. PROTOCOLO SILVA ALTERADO	30
4.4. CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS.....	33
4.4.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORVÂNCIA NA REGIÃO UV-Vis	33
4.4.3. DIFUSÃO DINÂMICA DE LUZ (DLS)	33
4.4.4. POTENCIAL ZETA.....	34
4.5. AVALIAÇÃO DE POTENCIAL ANTIMICROBIANO.....	34
4.5.1. MONTAGEM DAS PLACAS	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1. ISOLAMENTO E TRIAGEM DOS MICRORGANISMOS.....	39

5.2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS.....	41
5.2.1. ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS (MIDI).....	41
5.2.2. PCR E SEQUENCIAMENTO DE SANGER	45
5.3. SÍNTESE DOS NANOCOMPÓSITOS	49
5.3.1. PROTOCOLO SILVA	49
5.3.2. PROTOCOLO SILVA ALTERADO	50
5.4. CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS.....	54
5.4.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORVÂNCIA NA REGIÃO UV-Vis.....	54
5.4.2. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA.....	57
5.5. DIFUSÃO DINÂMICA DE LUZ (DLS) E POTENCIAL ZETA	57
5.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO	60
6. CONCLUSÃO.....	66
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
APÊNDICE.....	80

1. INTRODUÇÃO

O mundo que conhecemos hoje em dia seria completamente diferente sem a descoberta do petróleo. Atualmente a indústria petrolífera atende diversas demandas, servindo de matriz energética a fonte de matéria-prima para produtos químicos e/ou sintéticos, sendo estes obtidos através das reservas de gás e óleo. Entretanto, o setor não se limita apenas aos combustíveis ou seus derivados. Além dos produtos finais, também é importante entender os processos e os insumos necessários para obtê-los.

A perfuração dos poços de petróleo é o principal passo no sucesso da sua obtenção, é uma operação de grande complexidade, alto custo e demanda de pessoal especializado. Existem dois tipos de perfuração: as exploratórias e as explotatórias (ou de produção). A primeira tem como objetivo estudo das formações geológicas e avaliação da presença de hidrocarbonetos e viabilidade comercial da área. Enquanto isso, a segunda ocorre quando confirmado o potencial de exploração da bacia sedimentar e tem como finalidade a extração de petróleo e gás (INEEP, 2024).

O sucesso desta etapa de perfuração depende de uma série de fatores, entre eles a composição de fluidos de perfuração (FPs), cujas funções principais são: limpar os cascalhos gerados pela broca, assegurar estabilidade mecânica do poço a partir de pressão hidrostática sobre as formações e resfriar e lubrificar a coluna de perfuração e a broca. Os FPs podem ser classificados como base água, base óleo e base ar. Os fluidos de base água são geralmente associados a aditivos como argila, polímeros, viscosificantes, redutores de filtrado, agentes densificantes e biocidas (Thomas *et al.*, 2001).

Um problema relevante no processo de perfuração de poços é referente à biodegradação dos polímeros que compõem os fluidos, alterando as propriedades reológicas dos mesmos e impossibilitando sua reutilização. Nesse caso, o custo operacional de uma perfuração aumenta drasticamente, uma vez que é preciso tratar esses resíduos e produzir mais fluidos a cada operação realizada. Além disso, o aumento da geração de descarte agrava o impacto ambiental da produção de petróleo.

Neste contexto, o seguinte trabalho visa isolar e caracterizar as comunidades microbianas presentes nas amostras de FPs fornecidas pela Petrobras, bem como triar os principais responsáveis pela degradação dos polímeros de interesse (goma xantana e hidroxipropilamido). A partir disso, foram também sintetizados nanocompósitos a partir de

nanopartículas de prata e óxido de grafeno, dois nanomateriais que já são conhecidos pelo seu potencial antimicrobiano, caracterizados e tiveram sua capacidade biocida testada contra isolados selecionados.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. FLUIDOS DE PERFURAÇÃO

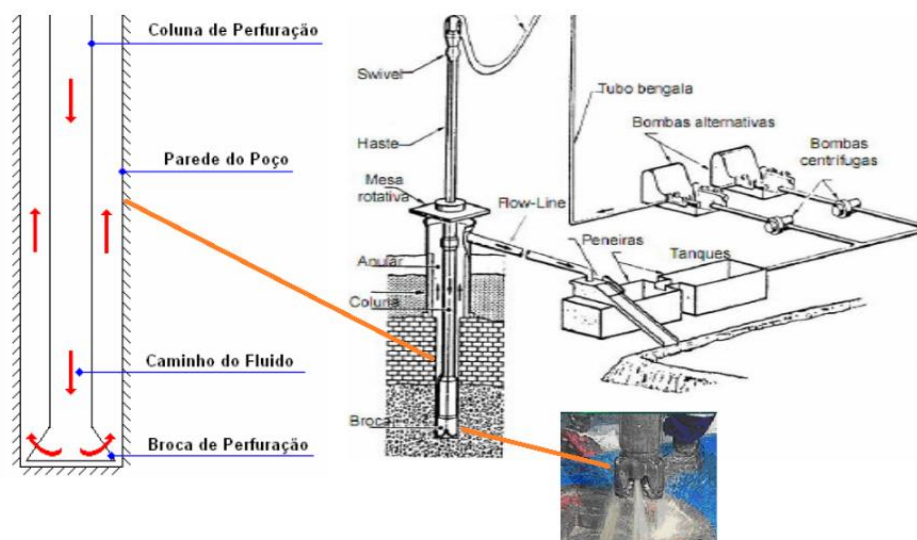
Os fluidos de perfuração (FPs), também chamados de lama de perfuração, podem ser definidos como toda composição utilizada para auxiliar na remoção de detrito de uma perfuração segundo a Society of Petroleum Engineers (2012). Do ponto de vista químico, eles podem assumir aspectos de suspensão, dispersão coloidal ou emulsão, dependendo do estado físico dos componentes (Thomas *et al.* 2001). Do ponto de vista físico, os fluidos de perfuração assumem comportamentos de fluidos não-newtonianos, ou seja, a relação entre a tensão de cisalhamento - força por unidade de área exigida para sustentar um determinado tipo de fluxo de fluido - e a taxa de deformação velocidade com que um material se deforma – não é linear (Machado, 2002). Eles são compostos por sistemas multifásicos, que podem conter água, material orgânico, sais dissolvidos e sólidos em suspensão nas mais diversas proporções (Serra, 2003) e são indispensáveis na segurança e eficiência do processo. Suas funções foram descritas por Thomas *et al.* (2001) como: limpar o fundo do poço dos cascalhos gerados pela broca e transportá-los até a superfície; exercer pressão hidrostática sobre as formações, de modo a evitar o influxo de fluidos indesejáveis (*kick*) e estabilizar as paredes do poço; resfriar e lubrificar a coluna de perfuração e a broca. Além disso, ele precisa ser estável quimicamente, facilitar a separação dos cascalhos e mantê-los em suspensão quando estiver em repouso, aceitar tratamento físico ou químico, ser bombeável, apresentar baixo grau de corrosão em relação aos equipamentos e facilitar interpretações geológicas do material retirado do poço.

Os FPs são classificados de acordo com a composição da sua fase contínua (componente em maior proporção), eles podem ser a base de água - utilizados em plataformas *offshore* -, óleo - utilizados em plataformas *onshore* - ou ar - utilizados em regiões de escassez de água ou com formações muito duras como basalto ou com camadas espessas de gelo. A grande maioria das perfurações é feita utilizando lamas à base de água (podendo ser doce, dura ou salgada) por terem menor impacto ambiental e serem de fácil descarte, com adição de sólidos dispersos no meio como: argilas (principalmente bentonita), polímeros, densificantes, bactericidas, floculantes,

alcalinizantes e controladores de pH, anticorrosivos e antiespumantes (Thomas *et al.*, 2001), a depender do tipo de formação rochosa a ser perfurada e do custo.

Em um sistema de circulação comum (**Figura 1**), o FP é bombeado através da coluna de perfuração até a broca, retornando pelo espaço anular até a superfície, carregando juntamente os cascalhos liberados pela broca. Ao chegar na superfície, o fluido permanece dentro de tanques, sob agitação, após receber o tratamento adequado (Thomas *et al.*, 2001). Na maior parte das vezes são reutilizados.

Figura 1. Esquema geral do sistema de circulação dos fluidos de perfuração (FPs).



Fonte: Pereira, 2019

Do ponto de vista ambiental e operacional, é esperado que seus componentes sejam de baixa toxicidade e biodegradáveis, favorecendo o uso e o descarte mais seguros dos resíduos de perfuração. Paradoxalmente, essas mesmas características tornam os FPs mais suscetíveis à ação de microrganismos degradadores ainda durante a operação, comprometendo seu desempenho e reduzindo a possibilidade de reuso em múltiplos ciclos, uma vez que sua degradação causa perda de suas características reológicas (Al-Humam *et al.*, 2021).

2.2. GOMA XANTANA

As gomas são substâncias poliméricas que, mesmo em baixas concentrações, são capazes de formar soluções aquosas altamente viscosas. Industrialmente classificam-se em três grupos: naturais, modificadas ou semi-sintéticas e sintéticas (**Tabela 1**) (GLICKSMAN, 1979; FENTANES, 1985).

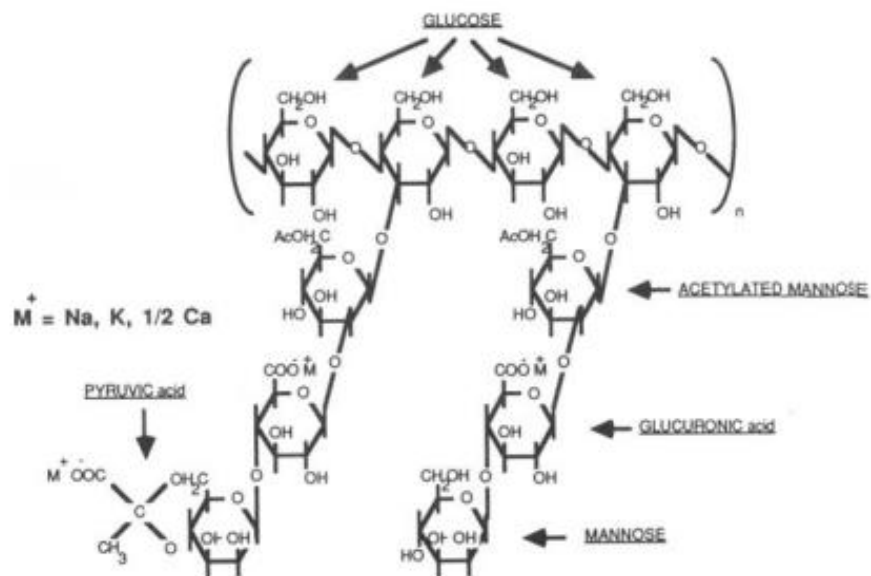
Tabela 1. Classificação das gomas industriais quanto ao tipo e origem.

Tipo	Origem	Gomas (Exemplos)
Naturais	Exsudato de plantas	Arábica, alcatira, karaya
	Extrato de plantas	Pectina
	Sementes	Guar, alfarroba, tamarindo
	Algas marinhas	Ágar, alginato, carragena
	Tubérculos	Amidos
	Gomas microbianas	Xantana, dextrana, gelana
Modificadas ou semi-sintéticas	Celulose	Carboximetilcelulose, metilcelulose e hidroxietilcelulose
	Extrato (animal)	Derivado hidrossolúvel de quitina
	Amido	Dextrina e hidroxipropilamido
Sintéticas	Derivados da petroquímica	Álcool polivinílico, sal de ácido poliacrílico, policarboxivinil

Fonte: adaptado de GLICKSMAN (1979); FENTANES (1985)

A Goma Xantana é um biopolímero extraído a partir do processo de fermentação aeróbica realizado por bactérias do gênero *Xanthomonas*, sendo *Xanthomonas campestris* a mais comum. Esse exopolissacarídeo tem alto peso molecular e se apresenta como uma estrutura primária composta por repetidas unidades pentassacarídicas, sendo duas unidades de glicose, três unidades de manose e duas unidades de ácido glicurônico. A cadeia principal consiste de unidades de b-D-glicose ligadas na posição 1 e 4. A estrutura química da cadeia principal é idêntica à da celulose. Os trissacarídeos ligados lateralmente à cadeia principal são compostos por uma unidade de ácido D-glicurônico (β 1-2) e duas unidades de manose ligadas na posição do O-3 e por resíduos de glicose ligados (α 1-3) à cadeia principal (Jansson; Kenne; Lindberg, 1975). As ramificações laterais de trissacarídeos compõem a maior parte da molécula e dão à goma suas principais propriedades como rigidez, viscosidade e solubilidade em meio aquoso. A estrutura primária da goma xantana é demonstrada na **Figura 2**.

Figura 2. Estrutura primária da Goma Xantana.

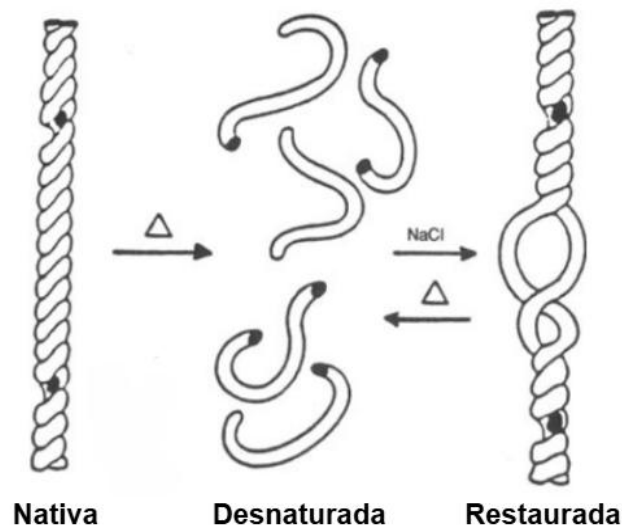


Fonte: Jansson; Kenne; Lindberg (1975)

A goma xantana, em solução, pode passar por uma mudança de conformação a depender da temperatura, transicionando de um estado rígido e ordenado para um estado mais flexível e desordenado. A goma xantana pode ter duas conformações

ordenadas: nativa e restaurada (ou renaturada) – passando por mudança de temperatura e adição de NaCl -, ambas tendo mesmo peso molecular, porém a última apresentando viscosidade mais alta na mesma concentração. A transição da conformação nativa para desnaturada é irreversível, enquanto a transição da conformação restaurada para desnaturada é reversível. A temperatura de transição depende de diferentes fatores, como a concentração da goma e a força iônica. A temperatura de transição em baixas concentrações (0,1-0,3%) em água destilada é geralmente próxima de 40°C, enquanto presença de uma pequena quantidade de sal e em concentrações geralmente usadas em aplicações alimentares, a temperatura de transição é muito mais alta, geralmente acima de 90°C. (Urlacher; Dalbe, 1992; Milas; Rinaudo, 1986). Na **Figura 3** tem-se um esquema da transição de conformação da xantana em soluções.

Figura 3. Transição de conformação da xantana em soluções.



Fonte: Adaptado de Urlacher; Dalbe (1992)

Soluções aquosas de goma xantana possuem ótimas propriedades reológicas, devido ao seu caráter altamente pseudoplástico (*shear-thinning*) – a viscosidade diminui imediatamente com o aumento da taxa de deformação do fluido devido à desarticulação da rede de polímero e ao alinhamento parcial das macromoléculas na direção do fluxo de cisalhamento (Ki-Won; Yong-Seok; Gap-Shik, 2006). – ou tixotrópico – a viscosidade diminui gradualmente com o aumento da tensão de

cisalhamento e apresenta recuperação da espessura após de um certo tempo parado, formando um “gel” (Ghannam *et al.*, 2019) -, isso permite que o fluido escoe com facilidade durante o bombeamento, mas, ao retornar ao aspecto mais viscoso quando o bombeamento é interrompido, consiga manter bem os cascalhos em suspensão. Também possui estabilidade em um grande intervalo de temperatura, níveis de pH e concentrações de sais. Essas características e seu status GRAS (*Generally Recognized As Safe*), traduzido como “Geralmente Reconhecido Como Seguro”, torna a GX amplamente utilizável na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética como estabilizante, emulsificante e espessante (Ostrowski *et al.*, 2022; Patel *et al.*, 2020). Além disso, é utilizada como viscosificante nos fluidos de perfuração a base de água, uma vez que possui a capacidade de alterar as propriedades básicas da água, conferindo a ela melhor espessamento, estabilização, emulsificação, suspensão e gelificação, aspectos importantes para os fluidos de perfuração (Silva, 2018).

Apesar de ser um polímero estável, é de conhecimento que existem microrganismos que causam a degradação da goma xantana tanto em ambientes naturais quanto industriais. Os isolados mais comuns são: *Bacillus* sp. GL1 (solo), *Paenibacillus alginolyticus* XL-1, *Microbacterium* sp. XT11 e, mais recentemente, *Cohnella* sp.; há ainda relato de planctomicetos termofílicos (*Thermogutta terrifontis*) com atividade relevante (Han *et al.*, 2024; Ostrowski *et al.*, 2022). De acordo com Riaz *et al.* (2021) e Han *et al.* (2020), a degradação tipicamente envolve a cooperação de enzimas extracelulares como as xantana-liases, que são responsáveis pela modificação e degradação da goma xantana, modificando as cadeias laterais da molécula – uma vez que o manosil terminal piruvilado das cadeias laterais protegem a cadeia principal -, ou como as xantanases que clivam as ligações centrais, assim como enzimas intracelulares que desacetilam e quebram oligossacarídeos derivados da quebra prévia da xantana em moléculas menores. Outros exemplos citados de enzima são celulase, manosidase, acetil-esterase, glucosidase e glucuronil-hidrolase (**Tabela 2**).

Tabela 2. Modificações enzimáticas e degradação da Goma Xantana.

Enzimas envolvidas	Modificação da estrutura	Efeitos nas características
Acetil-esterase	Desacetilação dos resíduos manosil internos (Desordem da cadeia de dupla-hélice)	Aumento da viscosidade e facilidade de associação e formação de compostos com outros biopolímeros
Xantana-liase	Remoção dos manosil terminais piruvilados	Perda parcial da viscosidade e dificuldade de associação e formação de compostos com outros biopolímeros
Hidrolase de glucuronil insaturado	Remoção de resíduos glucuronil	Aumento da viscosidade
Xantanase	Hidrólise da cadeia principal da xantana	Perda significativa da viscosidade
β -Glucosidase, α -Mannosidase	Hidrólise das ligações internas dos oligossacarídeos derivados da xantana (XTOS)	Sacarificação (quebra) completa da estrutura da xantana.

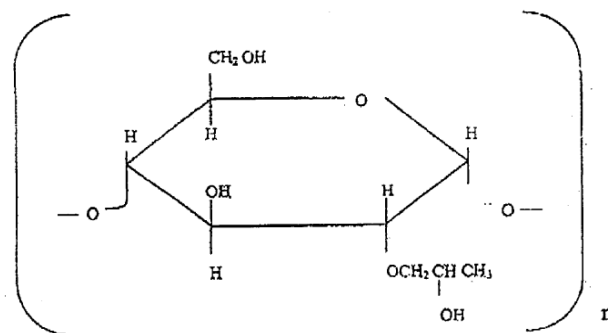
Fonte: Adaptado de Berezina *et al.* (2024)

2.3. HIDROXIPROPILAMIDO

O amido em sua forma natural é composto por 20-30% de amilose, um polímero relativamente linear composto por cadeias longas de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4. Outros 70-80% são constituídos pela amilopectina, um polímero altamente ramificado, formado por cadeias curtas de glicose unidas por ligações glicosídicas α -1,4 e α -1,6 (BEMILLER, 2019; DAMODARAN; PARKIN, 2019; DONMEZ *et al.*, 2021). Sua estrutura pode ser modificada quimicamente por esterificação, eterificação e oxidação (Kim, 2003).

O Hidroxipropilamido (HPA), também chamado de Amido Hidroxipropil (HPS), é um amido quimicamente modificado pela substituição das hidroxilas do seu grupo funcional por hidroxipropil, resultando em uma ligação éter (**Figura 4**). Como resultado, o HPA perde sua cristalinidade, aumenta sua estabilidade térmica, sua propriedade hidrofílica, sua “*swellability*” - capacidade de absorver um solvente e aumentar de tamanho - e sua viscosidade (Masina *et al.*, 2016).

Figura 4. Estrutura do hidroxipropilamido (HPA).



Fonte: Thormann, 2007

Os amidos modificados são comumente usados em formulações alimentícias e farmacêuticas (Borba *et al.*, 2021; Masina *et al.*, 2016), assim como a goma xantana, além da sua atuação na indústria de gás e petróleo. Além do aumento da viscosidade dos FPs, o HPA é principalmente usado nas formulações como redutor de filtrado, evitando a perda de fluidos aquosos para as formações rochosas (porosas e permeáveis) durante a filtração, formando um “reboco” (também chamado de *filter*

cake) nas paredes da perfuração. O controle ineficiente desse filtrado pode acarretar em dano à formação e maiores custos para a produção (Silva *et al.*, 2019).

Embora a modificação hidroxipropil confira uma maior resistência à degradação enzimática em comparação com o amido comum (Bemiller *et al.*, 2009), a atividade microbiana nos poços de petróleo pode levar à perda de suas propriedades reológicas, exigindo o uso de biocidas para preservar a integridade do fluido.

A **Tabela 3**, mostra uma visão geral de enzimas relacionadas à degradação de amido.

Tabela 3. Enzimas frequentemente relacionadas como degradadoras de amido.

Enzyme type	Organism	PDB	Ligand (s) bound
α -amylase (GH13_5)	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	4UZU	None
α -amylase I-1 (GH13_6)	<i>Oryza sativa Japonica gr.</i> , rice	3WN6	None
Isoamylase (GH13_11)	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	4J7R 4OKD	None Maltoheptaose
Limit dextrinase (GH13_13)	<i>Hordeum vulgare</i> , barley	4CVW 4J3S 4J3T 4J3U 4J3V 4J3W 4J3X	Proteinaceous inhibitor Maltotriose+maltotetraose Maltotetraose Maltosyl-S- β -cyclodextrin Branched thio-linked hexasaccharide Amylopectin fragment Pullulan fragment
Pullulanase type 1 (GH13_14)	<i>Anoxybacillus sp.</i> LM18-11	3WDH 3WDI 3WDJ	None Maltotriose Maltotetraose
α -glucosidase (GH13_23)	<i>Halomonas sp.</i> H11	3WY1 3WY2 3WY3 3WY4	None Glucose Glucose and glycerol Maltose
α -amylase (GH13_no subfam)	<i>Anoxybacillus sp.</i> SK3-4	5A2A 5A2B 5A2C	None Maltose Maltotriose
α -glucosidase (GH31)	<i>Beta vulgaris</i> , sugar beet	3W38 3W37 3WEL 3WEM 3WEN 3WEO	None Acarbose Acarviosyl-maltotriose Acarviosyl-maltotetraose Acarviosyl-maltopentaose Acarviosyl-maltohexaose
Maltose-forming α -amylase (GH57)	<i>Pyrococcus sp.</i> ST04	4CMR	None
Disproportionating enzyme I (GH77)	<i>Arabidopsis</i>	5CPQ 5CPS 5CPT 5CQ1 5CSU 5CSY	None Maltotriose+maltotetraose β -cyclodextrin Cycloamylose Ascarviostatin Acarbose
α -1,4-glucan phosphorylase (GT35)	<i>Arabidopsis</i>	4BQE 4BQF 4BQI	None Acarbose Maltotriose
Lytic polysaccharide monoxygenase (AA13)	<i>Aspergillus oryzae</i>	4OPB	None

Fonte: Møller *et al.* (2016).

Não há citações específicas sobre a degradação do HPA. A revisão de literatura indica que há degradação similar àquela observada em amidos não modificados, não

havendo mecanismos específicos atuantes sobre as porções de hidroxipropil. Enzimas amilolíticas extracelulares (α -amilase endo-atuante em ligações α -1,4), seguidas por glucoamilase/ β -amilase e por enzimas *debranching* (pululanase/isoamilase) para pontos α -1,6, liberam maltodextrinas e glicose, que são então metabolizadas por microrganismos heterotróficos em diferentes ambientes (solo, lodos ativados, biofilmes industriais). (Wang *et al.*, 2022; Xia; Kong; Nielsen, 2008).

2.4. NANOMATERIAIS

De acordo com a normativa ISO TS 27687 (2008), nanomateriais (**Tabela 4**) são aqueles que possuem pelo menos uma de suas dimensões na escala nanométrica (10^{-9}). Tendo isso em vista, a nanociência é o estudo de materiais na escala nanométrica enquanto a nanotecnologia refere-se ao emprego tecnológico destes materiais (Sanfelice; Pavinatto; Correa, 2022).

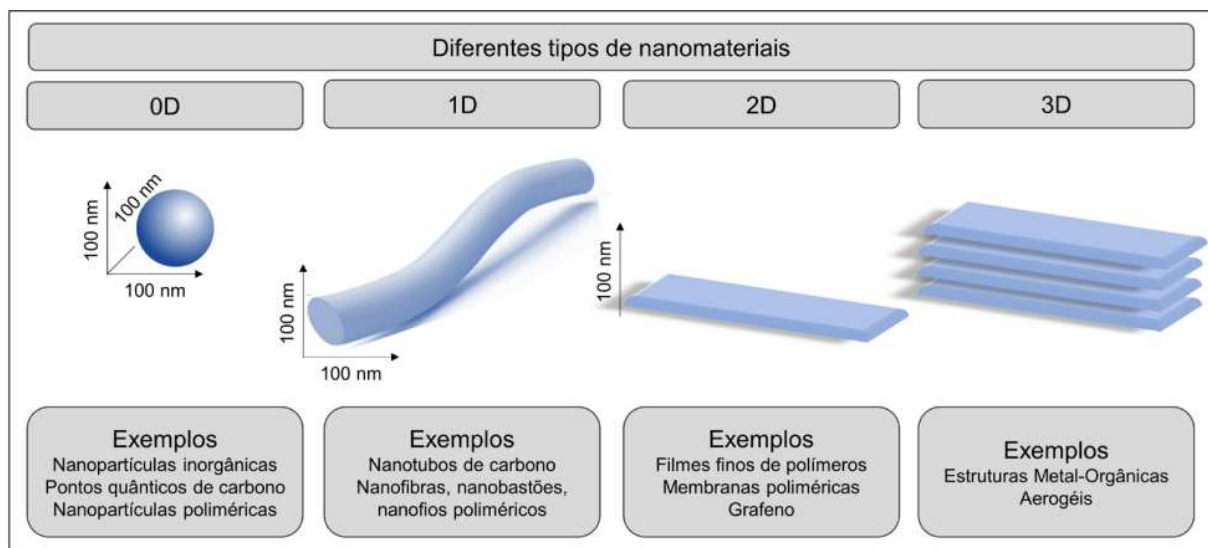
Tabela 4. Nanomateriais típicos.

Nanomateriais	Tamanho (aproximado)	Materiais
Nanocristais e pontos quânticos	Diâmetro de 1 a 10 nm	Metais, semicondutores, materiais magnéticos
Nanopartículas	Diâmetro de 1 a 100 nm	Óxidos cerâmicos
Nanofios	Diâmetro de 1 a 100 nm	Metais, semicondutores, materiais magnéticos
Nanotubos	Diâmetro de 1 a 100 nm	Carbono, metais calcogênios em camadas
Arranjos bidimensionais (de nanopartículas)	Diversos nm^2 – μm^2	Metais, semicondutores, materiais magnéticos
Superfícies e filmes finos	Espessura de 1 a 1000 nm	Vários metais
Superfícies tridimensionais	Diversos nm em todas as três dimensões	Metais, semicondutores, materiais magnéticos

Fonte: Adaptado de Rao *et al.* (2001).

A classificação dos nanomateriais pode ser feita com base nas dimensões do material que não se encontram na escala nanométrica: 0D - nanomateriais que possuem todas as suas dimensões (altura, largura e profundidade) em escala nanométrica, como por exemplo as nanopartículas, os fulerenos ou pontos quânticos; 1D - nanomateriais que possuem uma dimensão fora da escala nanométrica, como as nanofibras e os nanotubos; 2D - nanomateriais que possuem duas de suas dimensões fora da escala nanométrica, como filmes finos e o grafeno; 3D - formados pelo arranjo de nanomateriais 0D, 1D e 2D, ou estruturas porosas 3D, como dispersões de nanopartículas, feixes de nanotubos ou o grafite (**Figura 5**) (Sanfelice; Pavinatto; Correa, 2022).

Figura 5. Representação de nanomateriais e suas classificações.



Fonte: Sanfelice; Pavinatto; Correa (2022).

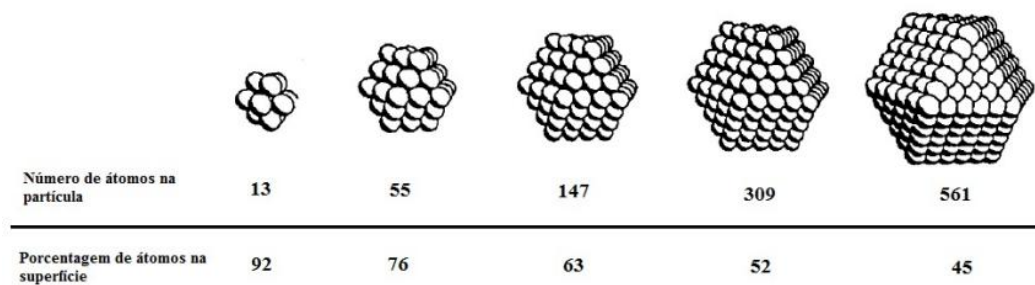
As propriedades físicas (como propriedades ópticas, elétricas ou magnéticas) e químicas (como propriedades catalíticas) dos materiais, são alteradas a partir de um determinado tamanho, chamado de tamanho crítico (característico de cada material) e, quando suas partículas ultrapassam este tamanho crítico, estas propriedades se tornam diferentes das observáveis em materiais de dimensões micro ou macroscópicas. Essas mudanças ocorrem, principalmente, ao aumento da razão da área de superfície do material em relação ao seu volume (Sanfelice; Pavinatto; Correa, 2022; Zarbin, 2007; Rao *et al.*, 2001).

A nanotecnologia vem sendo amplamente utilizada em várias áreas como: saúde e medicina, energia, eletrônica e informática, setor nutricional, indústria têxtil e meio ambiente. Alguns de seus exemplos de aplicações são *drug delivery*, células solares e baterias, além da produção de biocidas (Abdullah *et al.*, 2025).

2.5. NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

Assim como todo nanomaterial, nanopartículas metálicas apresentam propriedades físico-químicas diferentes daquelas observadas ao metal em *bulk* (sólidos/minérios), como por exemplo, atividade fotoquímica aumentada, causada pela grande razão superfície/volume (quando uma partícula possui dimensões nanométricas, a maior parte dos seus átomos está presente na sua superfície) e diferentes propriedades eletrônicas (Mehl, 2015; Kamat, 2002). Na **Figura 6**, é possível ver a porcentagem de átomos na superfície da partícula em relação ao tamanho.

Figura 6. Representação da porcentagem de átomos na superfície da partícula em relação ao seu tamanho.



Fonte: Adaptado de Xia *et al.* (2009).

Dentre as nanopartículas metálicas, a de prata é uma das mais estudadas e utilizadas na preparação de novos compósitos (material formado por dois ou mais compostos com suas propriedades finais alteradas), uma vez que apresenta excelente condutividade, estabilidade, atividade catalítica e potencial bactericida (Mehl, 2015), sendo este último o utilizado no presente trabalho.

A prata, já vem sendo utilizada há tempos como tratamento contra diferentes patologias, como úlceras, queimaduras, feridas e infecções, devido a sua propriedade

antimicrobiana (Singh *et al.*, 2015). Em cada um dos casos, sua ação antibiótica depende da liberação de íons ativos de prata (Ag^+) da prata metálica, nitrato de prata ou de outros compostos, variando de acordo com o patógeno de interesse e sua ação letal sobre ele. A prata em sua forma natural, tem citotoxicidade muito alta, sendo uma limitação, uma vez que é pouco seletiva e pode atacar além das bactérias. Enquanto isso, as nanopartículas de prata (AgNPs) têm essa limitação eliminada com a escala nanométrica, concentrando os íons Ag^+ no revestimento de sua superfície, interagindo por contato direto com a bactéria, de forma menos tóxica para humanos (Duran, 2019).

Os íons de prata são os componentes essenciais das AgNPs, uma vez que são eles que vão se ligar às células de fungos e bactérias e causar sua morte celular. Suas ações se dão de diferentes maneiras: as AgNPs conseguem se fixar e adentrar nas paredes celulares, alterando a sua estrutura e permeabilidade, causando morte celular; formam radicais livres, responsáveis por tornar as paredes bacterianas porosas, causando morte celular; e causam deformação na estrutura do DNA bacteriano, gerando problemas em sua replicação (Araujo, 2021).

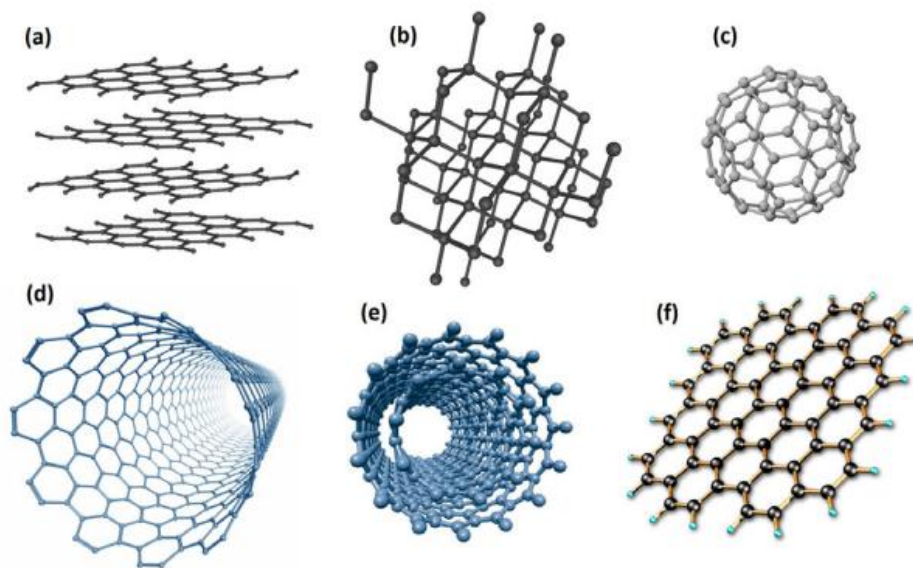
Além das propriedades antimicrobianas, as AgNPs possuem ação em um amplo espectro de microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos e vírus, sendo citadas em diversos estudos como potentes agentes antimicrobianos contra microrganismos resistentes a múltiplos antibióticos (Brito *et al.*, 2022). Sua utilização é vista em produtos de higiene, curativos e dispositivos médicos como cateteres, cimentos ósseos, válvulas cardíacas, pinos e próteses ortopédicas e também dispositivos odontológicos, tratamentos de membranas mucosas infectadas e rinite infecciosa (Araujo, 2021, Lansdown, 2007).

2.6. GRAFENO

Dentre os nanomateriais mais abordados na nanociência e nanotecnologia atualmente estão os conhecidos genericamente como nanomateriais de carbono, compreendendo por exemplo os nanotubos de carbono (NTC) e o grafeno. Materiais constituídos somente por carbono, como o grafite e o diamante, apresentam diferentes estruturas a depender da natureza de ligação entre os átomos de carbono adjacentes, gerando estruturas com uma grande variedade de propriedades. No primeiro material, ocorre uma hibridização sp^2 no átomo do carbono, formando folhas bidimensionais

(estas folhas são denominadas folhas de grafeno que, ao serem empilhadas por interações de van der Waals, conferem a estrutura tridimensional do grafite), configurando maciez, coloração cinza, boa condução de calor e eletricidade; enquanto no segundo, o átomo tem hibridização sp^3 , formando uma estrutura tridimensional, que configura dureza, transparência e isolamento elétrico e térmico. Outros exemplos de carbono amorfo são os fulerenos (Mehl, 2015; Zarbin *et al.*, 2013). Na **Figura 7**, tem-se a representação dos alótropos de carbono.

Figura 7. Representação esquemática de diferentes alótropos de carbono: a) grafite; b) diamante; c) fulereno; d) nanotubo de carbono de parede simples; e) nanotubo de carbono de parede múltipla; f) grafeno.

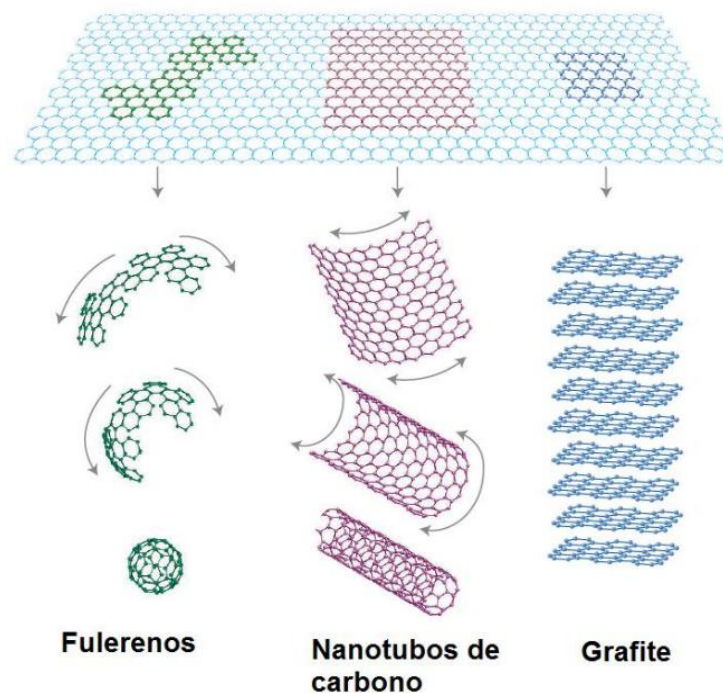


Fonte: Zarbin *et al.* (2013).

O alótropo utilizado neste estudo foi o grafeno, formado por uma folha bidimensional, com aparência de favos de mel (anéis hexagonais), de átomos de carbono com hibridização sp^2 . Podemos dizer que o grafeno foi o primeiro cristal atômico 2D conhecido. Dentro de suas propriedades únicas pode-se destacar a fina espessura (espessura de um átomo de carbono), baixa densidade, alta mobilidade de cargas, alta condutividade térmica (10x maior que o cobre), alta resistência mecânica (100x maior que uma folha de aço), transmitância extremamente elevada (absorve 2,3% da luz), grande elasticidade e impermeabilidade a gases (Mehl, 2015; Novoselov, 2011; Bunch *et al.*, 2008).

Por ser um material planar, o grafeno pode ser considerado a “matriz de construção” (**Figura 8**) para outros alótropos de carbono, uma vez que pode ser embrulhado - formando a estrutura esférica dos fulerenos -, enrolado - formando os nanotubos de carbono - ou, como dito anteriormente, empilhado com outras folhas - formando a estrutura do grafite (Mehl, 2015; Geim *et al.*, 2007).

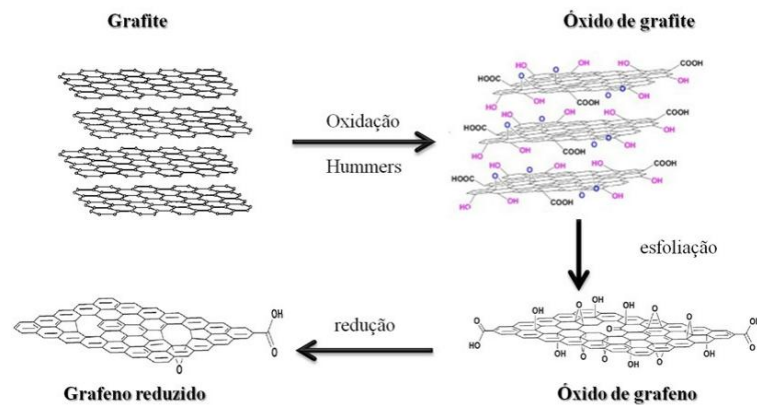
Figura 8: Esquema de uma folha de grafeno dando origem a outros alótropos do carbono.



Fonte: Adaptado de Geim *et al.* (2007).

O grafeno foi isolado pela primeira vez em 2004 por dois cientistas: Andre Geim e Konstantin Novoselov, pelo método da fita adesiva (ou microesfoliação mecânica), rendendo a eles um prêmio Nobel (Geim; Novoselov, 2007) de física em 2010. Atualmente a forma mais utilizada é a de esfoliação química do grafite (**Figura 9**), onde o grafite é oxidado a óxido de grafite, que é esfoliado, produzindo folhas individuais de óxido de grafeno (composto utilizado no nosso protocolo de síntese dos nanocompósitos), que é por último reduzido a grafeno (Zarbin *et al.*, 2013).

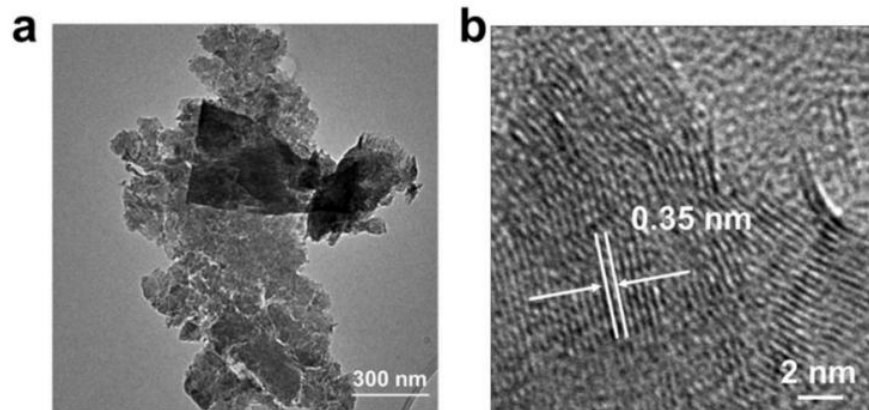
Figura 9. Esquema do processo de obtenção do grafeno a partir da esfoliação de grafite.



Fonte: Zabin *et al.* (2013).

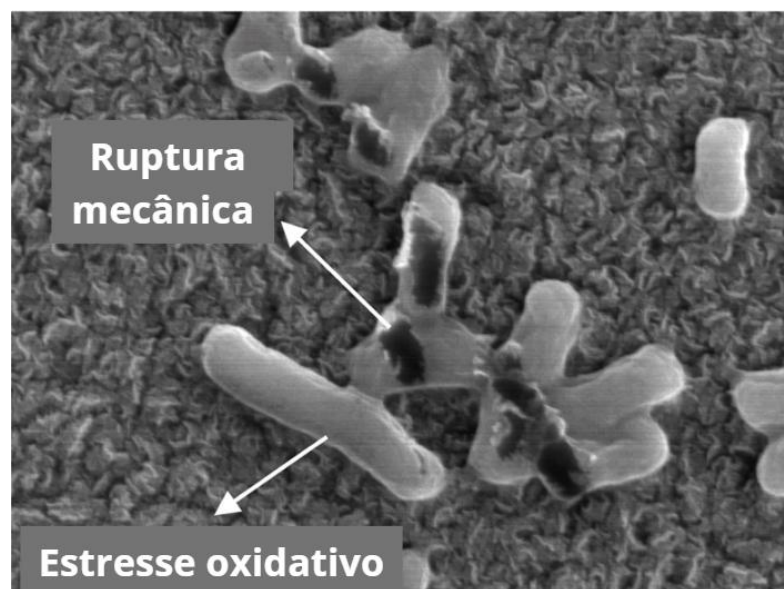
O grafeno tem suas propriedades muitas vezes associadas à indústria de eletrônicos e de informática, mas também vem sendo usado como um material promissor para o preparo de nanocompósitos, uma vez que é sabido que o óxido de grafeno (OG) e seus compósitos possuem propriedades antibacterianas e antifúngicas (Al-Thani *et al.*, 2014). Muitos estudos, como os de Al-Thani *et al.* (2014) e Karahan *et al.* (2018), indicam a eficácia do grafeno contra bactérias tanto Gram-negativas quanto Gram-positivas - a depender de características específicas do organismo e do nanomaterial utilizado - causando morte celular induzida por estresse oxidativo a partir da alta produção de EROs (Espécies Reativas de Oxigênio), destruição total do envelope celular e inibição de crescimento. Sua propriedade antibacteriana também é associada com danos físicos causados diretamente nas membranas bacterianas pelas pontas afiadas das folhas de grafeno (mecanismo “*nanoknife*” ou de “*nanolâminas*”), como é possível observar na **Figura 10** e na **Figura 11** (Mohammed *et al.*, 2020; Karahan *et al.* (2018); Vinothini; Rajan, 2017; Al-Thani *et al.*, 2014).

Figura 10. Caracterização das estruturas de “nanolâminas” no grafeno. A: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) do grafeno raspadas do substrato. B: MET de alta resolução da estrutura atômica dessas “nanolâminas”.



Fonte: Chen *et al.* (2023)

Figura 11. MET demonstrando os principais efeitos antibacterianos do grafeno sobre um isolado de *Escherichia coli*.

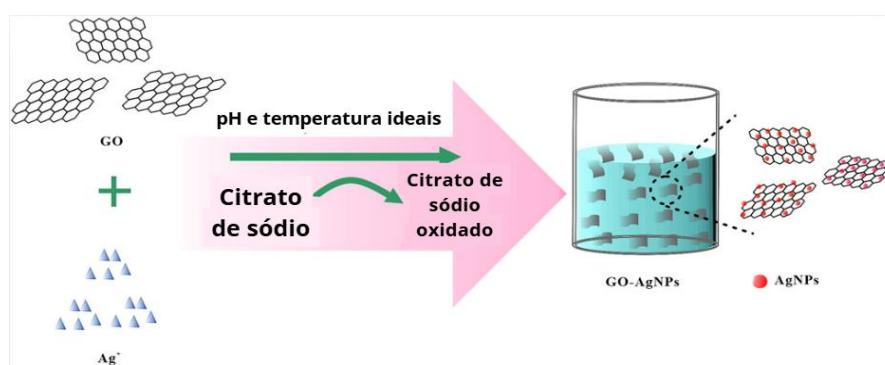


Fonte: adaptado de Chen *et al.* (2023).

2.7. NANOCOMPÓSITOS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA E ÓXIDO DE GRAFENO

Visando juntar e otimizar as propriedades apresentadas de ambos os nanomateriais, o presente projeto se dispôs a sintetizar um nanocompósito de nanopartículas de prata e óxido de grafeno (AgNPs-OG). Como um composto derivado de nanopartículas de prata, ele apresenta excelente caráter antibacteriano, antifúngico, catalítico, elétrico e sensorial, sendo usado no controle de poluentes biológicos, biossensores, entre outros. Além disso, a hidrofiliabilidade e estabilidade do OG inibem a agregação e dissociação característica das AgNPs em soluções aquosas, que podem diminuir o potencial antimicrobiano das mesmas, permitindo uma liberação mais controlada dos íons Ag^+ e garantindo uma maior eficiência como biocida (Bao *et al.*, 2022; Moraes *et al.*, 2015).

Figura 12. Diagrama esquemático da síntese do nanocompósito AgNPs-OG.



Fonte: Adaptado de Bao *et al.* (2022)

As novas propriedades do nanocompósito são obtidas com a interação entre o óxido de grafeno e as nanopartículas de prata (**Figura 12**) e, para melhor interação, alguns autores optam por funcionalizar sua superfície com diferentes estabilizantes como o PEI (polietilenoimina) - um polímero sintético, de caráter básico, alifático e não tóxico -, que também reduz a citotoxicidade da prata (Azevedo *et al.*, 2014; Cai *et al.*, 2012). Essa potente atividade antimicrobiana torna os AgNPs-OG candidatos ideais para aplicações em fluidos de perfuração, onde o controle de microrganismos degradadores é fundamental.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS:

Avaliar a comunidade microbiana presente em fluídos de perfuração com o intuito de inibir ou diminuir a biodegradação dos polímeros (goma xantana e hidroxipropilamido) presentes nestes fluídos, mantendo suas propriedades reológicas, permitindo o armazenamento seguro e a sua reutilização.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Isolar os microrganismos presentes nos fluidos de perfuração, identificá-los e fazer uma triagem inicial para definir os principais responsáveis pela degradação da goma xantana, do hidroxipropilamido ou ambos;
- Sintetizar nanocompósitos a partir de nanopartículas de prata e óxido de grafeno e caracterizá-las;
- Testar o potencial antimicrobiano desses nanocompósitos com os isolados selecionados.

4. METODOLOGIA

4.1. ISOLAMENTO E TRIAGEM DOS MICRORGANISMOS

As amostras (**Quadro 1**) utilizadas para o isolamento dos microrganismos foram fornecidas pela Petrobras para o Laboratório de Biotecnologia e Biodiversidade para o Meio Ambiente (LBBMA) e armazenadas em geladeira a aproximadamente 8 °C.

Quadro 1. Amostras de fluidos de perfuração enviadas pela Petrobras em Abril/2025.

(continua)

Código LBBMA	Fluido	Formulação
BR-25	FPBA (Drill in BR-CARB) Laboratório - virgem	Água industrial
		Cloreto de sódio (NaCl)
		Anti-espumante
		Goma xantana
		Amido HP
		Óxido de Magnésio
		Lubrificante
		Bactericida
TOT-20	FPBA Inibido Tot - 3P Laboratório (virgem)	Água industrial
		Goma xantana
		Amido HP
		KCl
		Inibidor de Argila (GEM GP)
		Polímero Anfótero (BDF-995)
		Lubrificante (CFS-935)
		MgO
		Calcário 2-44

(continua)

Código LBBMA	Fluido	Formulação
TOT-20	FPBA Inibido Tot - 3P Laboratório (virgem)	Glutaraldeído
		Antiespumante
		NaCl
BUZ-23	FPBA Polimerico glicerinado (barita) Poço BUZ-66	Água industrial
		NaCl
		Agema 1751 C (catiônico)
		KCl Tipo II
		Goma xantana
		FLO - TROL (HPA)
		Denver PAC – LV
		Soda cáustica
		Óxido de Magnésio
		Baritina
		Bicarbonato de sódio
		Triazina
		Antiespumante
MRL-24	FPBA polimérico + GX + HPA 7-MRL-240-RJS (calcário 2-44)	Salmoura de NaCl
		Cloreto de Potássio
		Bicarbonato de sódio
		HPA
		Barazan D
		BDF-995
		Clay Inibidor 375
		Gem GP
		Óxido de Magnésio

(continua)

Código LBBMA	Fluido	Formulação
MRL-24	FPBA polimérico + GX + HPA 7-MRL-240-RJS (calcário 2-44)	Glutaraldeído
		Calcário 2-44
		Prima NOFOAM
CRT-25	FPBA polimérico + GX + HPA CRT-54H (calcário 2-44)	Solução saturada de NaCl
		Cloreto de Potássio
		Bicarbonato de sódio
		Goma xantana
		Filter Chek
		Óxido de Magnésio
		Glutaraldeído
		HPA
		Calcário
		Prima NOFOAM
		BDF-995
		Clay Inibidor
		Gem GP

Fonte: Petrobras (2025)

4.1.1. ISOLAMENTO

Para garantir maior variedade de microrganismos possível, foram utilizados os meios de cultura no plaqueamento: TSA (*Tryptic Soy Agar*) e R2A (*Reasoner's 2A Agar*), para o isolamento de bactérias e BDA (Batata Dextrose Ágar) e Ágar Sabouraud, testados com e sem a suplementação de ampicilina ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$), para o isolamento de fungos e leveduras.

Cada fluído foi diluído serialmente e $100 \mu\text{L}$ das diluições 10^{-3} e 10^{-4} foram plaqueados por espalhamento em superfície (*spread plate*) em placas de Petri descartáveis contendo um dos quatro meios de cultivo citados anteriormente.

Também foi utilizada a mesma técnica em placas de petri de vidro adaptadas para o crescimento microbiano em microaerofilia, utilizando apenas o meio TSA. As placas foram incubadas a 35 °C e o crescimento foi monitorado por 72 horas. Colônias com morfologias distintas foram repicadas duas vezes no meio correspondente, para a obtenção de isolados puros.

Os isolados foram fotografados, nomeados e descritos de acordo com suas características visíveis a olho nu, como: tamanho, forma, textura, coloração e elevação (Caprette, 2016). Após a coleta dos dados, os mesmos foram então cultivados em meio líquido TSB (*Tryptic Soy Broth*) a 35 °C, 150 rpm, por 48 horas e criopreservados em glicerol 25% (v/v) a -80 °C e -20 °C para uso futuro.

4.1.2. TRIAGEM DOS ISOLADOS

Para realizar a triagem dos isolados, os microrganismos foram inoculados em meio mineral modificado (g L⁻¹: 13,9 de K₂HPO₄; 2,7 de KH₂PO₄; 0,05 de Extrato de levedura; 4,24 de NaNO₃; 29 NaCl e 50 mL de solução de micronutrientes composta por 0,5 de EDTA; 3 de MgSO₄.7H₂O; 0,5 de MnSO₄.4H₂O; 1 de NaCl; 0,1 de CaCl₂.2H₂O; 0,1 de CoCl₂.6H₂O; 0,1 de ZnSO₄.7H₂O; 0,01 de FeSO₄.7H₂O; 0,01 de CuSO₄.5H₂O; 0,01 de Na₂MoO₄.2H₂O; 0,01 de Na₂O₄Se; 0,01 de Na₂WO₄.2H₂O e 0,02 de NiCl₂.6H₂O) com a adição de HPA (17 g L⁻¹) ou Xantana (2,85 g L⁻¹), a 35 °C, 150 rpm, por 48 horas. Após o crescimento, foi feito o plaqueamento em meio mineral com xantana a 1% (10 g L⁻¹) ou meio mineral com HPA (mesma medida anterior), ambos solidificados com ágar (15 g L⁻¹), adicionando-se 10 µL do cultivo no centro da placa, para então incubar a 35 °C por 48 horas.

4.1.2.1. TESTE COM LUGOL

O lugol, ou tintura de iodo, é utilizado para identificar se há ou não presença de amido na amostra. A estrutura molecular do amido é fruto da combinação de dois polissacarídeos, a amilose e a amilopectina. A solução, ao se misturar com uma amostra contendo amido (no nosso caso, o HPA), se liga à amilose, formando um complexo de inclusão (a molécula de iodo fica presa na estrutura de dupla hélice da amilose) que apresenta cor azul-escura (Bemiller *et al.*, 2009). Caso apresente cor amarelo-claro/transparente, indica que não há mais a presença de amido no meio, ou seja, o HPA foi consumido.

A solução de lugol foi preparada com a mistura de KI (15 g L^{-1}) e I_2 (3 g L^{-1}). A mistura é feita em cerca de 800 mL de água destilada, aquecendo para facilitar a solubilização, e o volume é completado até 1000 mL utilizando um balão volumétrico. O corante é aplicado sobre a placa, de forma a cobri-la por inteiro e é dado um tempo de reação de 5 minutos. Após o tempo, caso haja a formação de uma área clara ao redor da colônia, sabemos que a bactéria é responsável pela degradação do HPA.

4.1.2.2. TESTE COM VERMELHO CONGO

O vermelho congo é um corante utilizado para identificar a atividade hidrolítica das enzimas, se ligando aos polissacarídeos formados pela degradação da goma xantana causada pelos microrganismos.

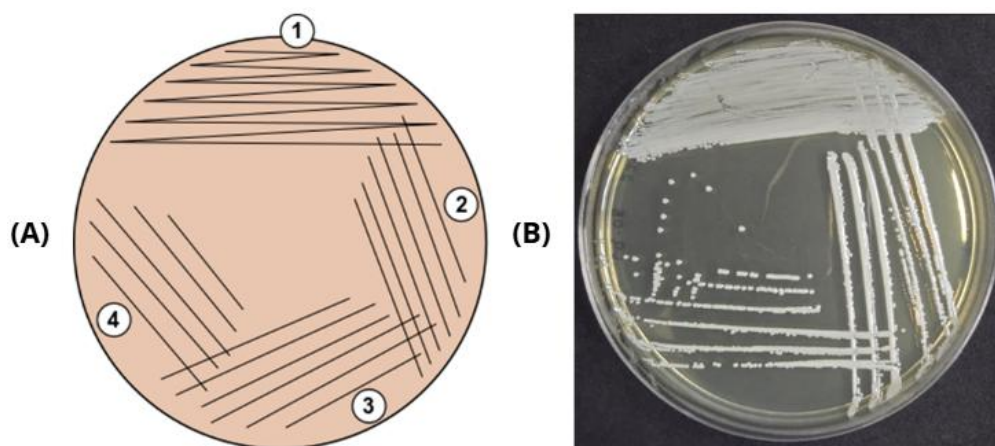
A solução corante foi preparada adicionando-se 10 mL de solução de vermelho congo (10 g L^{-1}) a 90 mL de etanol, que foi posteriormente aplicada sobre a placa, até cobri-la por inteiro. Após 10 minutos, descartou-se o líquido e foram feitas duas lavagens com solução de NaCl 1M, também deixando reagir por 10 minutos por vez. Caso a bactéria tenha degradado a goma xantana, a formação de um halo translúcido ao redor da colônia é observada (Han *et al.*, 2024).

4.2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

4.2.1. ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS (MIDI)

Os isolados obtidos foram submetidos à análise de FAMES (*Fatty Acid Methyl-Ester*) para identificação, utilizando o software Sherlock Microbial Identification System (MIDI Inc., Newark, Delaware, USA). Para isso, as culturas do estoque foram reativadas em meio TSA (estrias compostas, **Figura 13**) com a ajuda de uma alça de inoculação e incubadas a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ até a observação de crescimento. Posteriormente, uma colônia de cada isolado foi transferida para uma nova placa de TSA, seguida de incubação a $28 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24-48 horas, até a observação de crescimento confluyente em pelo menos um quadrante. Este processo foi repetido e esta última placa obtida foi utilizada para a identificação dos isolados. A massa celular utilizada para a extração dos ácidos graxos foi retirada do quadrante onde há a observação de colônias isoladas.

Figura 13. Técnica de estriagem de células para análise no sistema MIDI. O quadrante 1 apresenta um esgotamento seguido de espalhamento simples. Os demais quadrantes são constituídos de linhas retas paralelas, que se sobrepõem parcialmente ao quadrante anterior. O número de estrias nos quadrantes de 2 a 4 varia de 5 a 7 linhas. **A:** Esquema de estrias compostas, de acordo com instruções do fabricante (MIDI Inc., Newark, Delaware, USA). **B:** Estrias compostas realizadas utilizando o isolado CR-08.

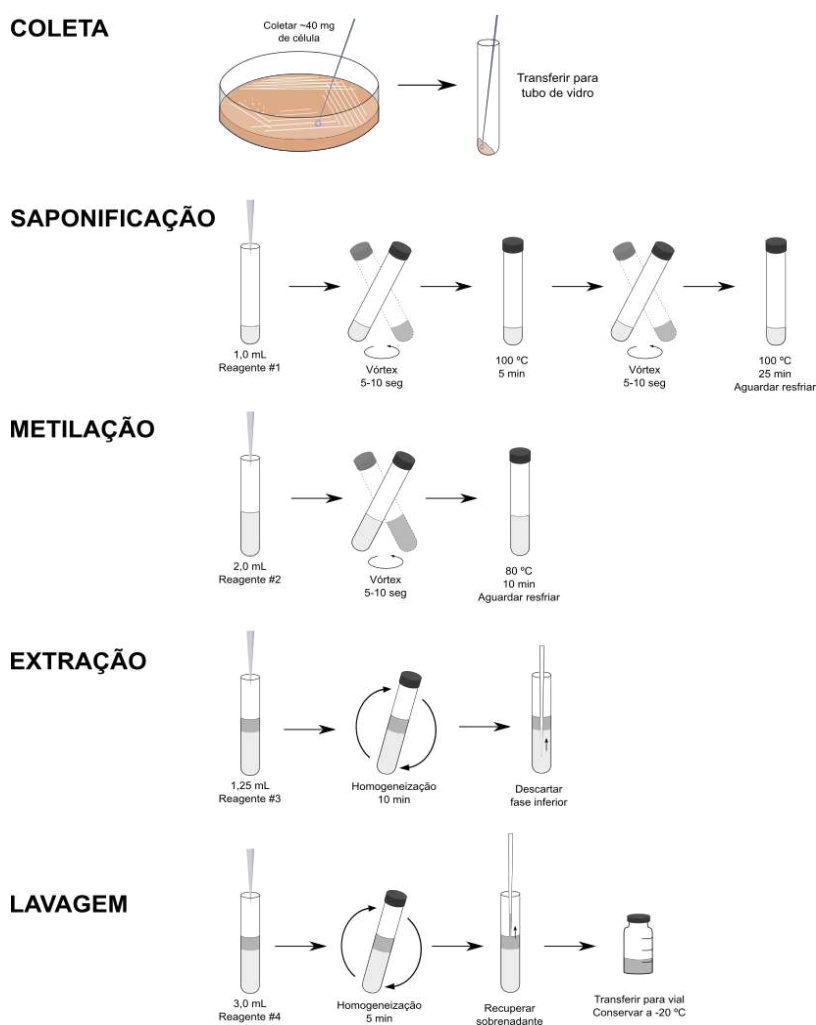


Fonte: **A:** MIDI Inc., Newark, Delaware, USA. **B:** Este trabalho.

Para a obtenção de FAMEs, foram realizadas as etapas de saponificação, derivatização/metilação e extração, de acordo com o manual do fabricante (MIDI Inc., Newark, Delaware, USA) (**Figura 14**). Inicialmente, foram transferidos aproximadamente 40 mg da cultura para um tubo de ensaio com tampa rosqueável (13 x 100 mm). Em seguida, foi adicionado 1 mL do reagente #1 (150 mL de água deionizada; 150 mL de metanol 99,9%; e 45 g de NaOH) em cada amostra. As amostras foram homogeneizadas em vórtex (velocidade máxima por 10 segundos) e incubadas em banho-maria a 95 °C por 5 minutos. Após esse período, o conteúdo dos tubos foi homogeneizado em vórtex (velocidade máxima por 5 segundos) e novamente incubado em banho-maria a 95 °C por 25 minutos. As amostras foram retiradas do banho-maria e resfriadas. Depois, foram adicionados 2 mL do reagente #2 (275 mL de metanol; e 325 mL de HCl 6,0 M) e as amostras foram homogeneizadas em vórtex (velocidade máxima por 10 segundos), seguido de incubação em banho-maria a 80 °C por 10 min para a derivatização das amostras.

Para a recuperação de FAMES, foi adicionado 1,25 mL do reagente #3 (200 mL de hexano 99,9%; e 200 mL de éter metil-(terc)-butílico) às amostras previamente resfriadas e estas foram homogeneizadas (homogeneizador tridimensional) por 10 minutos. Após esse período, os tubos foram transferidos para uma grade e, após a separação de fases, foi descartada toda a fase aquosa (inferior). Finalmente, foram adicionados 3 mL do reagente #4 (12,0 g L⁻¹ de hidróxido de sódio) aos tubos, seguido de homogeneização (homogeneizador tridimensional por 5 minutos), separação de fases e transferência da fase orgânica (superior) para *vials* (2 mL). Os *vials* foram devidamente fechados e acondicionados em freezer a -20 °C.

Figura 14. Etapas para obtenção dos FAMES para análise no Sistema MIDI.



Fonte: MIDI Inc., Newark, Delaware, USA

A análise de FAMES foi realizada em um cromatógrafo a gás modelo 7890A (Agilent), utilizando-se uma coluna capilar HP-ULTRA (2–25 m × 0.2 mm × 0.33 μm). A identificação e quantificação da abundância relativa dos FAMES, bem como a identificação putativa dos isolados, foram obtidas utilizando-se o software Sherlock Microbial Identification System (MIDI Inc., Newark, Delaware, USA) e o método RTSBA6, segundo as recomendações do fabricante. Após a obtenção dos resultados para todos os isolados, os perfis de FAMES foram comparados e um modelo de similaridade foi estabelecido (dendrograma baseado em Distância Euclidiana), utilizando-se o mesmo software.

4.2.2. PCR E SEQUENCIAMENTO

Para a identificação molecular dos isolados, estes foram cultivados em meio TSB e tiveram o DNA genômico extraído utilizando o kit Biospin Bacterial Genomic DNA (Bioer, Hangzhou, CH), conforme instruções do fabricante. A região 16S rRNA foi amplificada com os primers universais 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') e 1492R (5'-TACGGT-TACCTTGTACGACTT-3'). As reações de PCR (25 μL) continham (2,5 μL) tampão 10×, (2,5 μL) MgCl₂ (10 mM), (1 μL) dNTPs (10 mM), (1 μL) cada primer (10 mM), (0,2 μL) Taq DNA polimerase (5 U μL⁻¹) e água ultrapura. O protocolo de amplificação consistiu em desnaturação inicial a 95 °C (2 min), seguida de 35 ciclos a 95 °C (1 min), 52 °C (1 min) e 72 °C (1 min), com extensão final a 72 °C (5 min). Os amplicons foram avaliados em gel de agarose 0,8% e purificados com o kit Biospin Gel and PCR Purification, quantificados em Qubit e enviados para sequenciamento por eletroforese capilar no Instituto René Rachou (Belo Horizonte, Brasil).

As sequências obtidas foram avaliadas e montadas no DNA Baser Sequence Assembler, e posteriormente comparadas via BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para identificação preliminar. As sequências de referência foram baixadas e o alinhamento foi realizado no MEGA 12 com ClustalW. As análises filogenéticas foram conduzidas pelo método de máxima verossimilhança com 10.000 repetições de *bootstrap*.

4.3. SÍNTESE DOS NANOCOMPÓSITOS

A produção dos nanocompósitos foi realizada com variações de dois protocolos, baseados no trabalho de Silva *et al.* (2022), utilizando $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ como redutor, com adaptações para a estabilidade em fluidos de perfuração salina, e com força centrífuga expressa em gravidade relativa (xg) para padronização técnica.

4.3.1. PROTOCOLO SILVA

O protocolo se iniciou com a preparação da solução de óxido de grafeno (OG). Foram dispersados 100 mg de OG em 100 mL de água ultrapura, levados para banho ultrassônico por 30 minutos a 25 °C (40 kHz, 330 W). A solução passou por centrifugação para remover agregados grandes (500 xg por 10 minutos) e o sobrenadante foi coletado.

Para a formação do nanocompósito AgNPs-OG, foram adicionados 15,75 mg de AgNO_3 e 23,6 mg de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na dispersão de OG, sob agitação magnética. Após ajustar o pH para 10,0 com NaOH 1M, a agitação foi mantida por 2 horas enquanto era aquecida a 90 °C. Passado o tempo, a solução foi resfriada até temperatura ambiente.

A fim de purificar a amostra, foram feitos 4 ciclos de centrifugação (10.000 xg por 20 minutos) e lavagem, fazendo o descarte do sobrenadante e dispersando o pellet em 50 mL de solução de etanol:água (3:1). A última dispersão é feita em 100 mL de água.

Na última etapa adicionou-se 100 mg de PEI (2000 g mol^{-1}) e levou-se a solução ao banho ultrassônico por 15 minutos. A amostra final foi armazenada em geladeira (4 °C).

4.3.2. PROTOCOLO SILVA ALTERADO

Diferentemente do primeiro protocolo, este foi iniciado pela síntese das nanopartículas de prata (AgNPs). Sua preparação aconteceu com a dissolução de 15,75 mg de AgNO_3 e 23,6 mg de $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ em 50 mL de água ultrapura, sob agitação magnética por 10 minutos. A solução então foi aquecida sob agitação constante, adquirindo uma cor amarelo-intensa/marrom, e resfriada à temperatura ambiente. Esta etapa foi realizada de duas maneiras diferentes: utilizando agitador de

placa aquecedora imerso em banho termostático. As temperaturas testadas no aquecimento foram 83 °C, 85 °C e 90 °C.

A dispersão de OG foi preparada de maneira semelhante ao primeiro protocolo, alterando apenas a quantidade de OG para 50 mg e de água ultrapura para 50 mL. A ancoragem das AgNPs no OG foi realizada adicionando a solução de AgNPs – neste caso, o protocolo foi continuado com a amostra aquecida a 85 °C, visto que apresentou maior pico de absorvância na leitura UV-Vis -, na solução de OG, lentamente, sob agitação vigorosa. Nesta etapa, outra mudança foi realizada. Durante a etapa de ancoragem das AgNPs na dispersão de OG, as soluções foram divididas para testar diferentes proporções (**Quadro 2**), uma vez que também havia sido observada a suspensão de partículas de OG na mistura, indicando possível dificuldade de diluição na solução de AgNPs.

Quadro 2. Amostras de nanocompósitos AgNPs-OG e suas proporções.

Nome	Proporção de AgNPs (mL)	Proporção de OG (mL)	Volume total
A1	1 (5)	1 (5)	10 mL
A2	2 (6,67)	1 (3,33)	10 mL
A3	3 (7,5)	1 (2,5)	10 mL
A4	4 (8)	1 (2)	10 mL
A5	5 (8,33)	1 (1,67)	10 mL
G2	1 (2,5)	2 (5)	7,5 mL
G3	1 (1,67)	3 (5)	6,67 mL
G4	1 (1,25)	4 (5)	6,25 mL

Fonte: Elaborado pela própria autora.

A purificação ocorreu por 4 ciclos de centrifugação (8.000 xg por 30 minutos), descarte do sobrenadante e ressuspensão dos *pellets* em metade do volume total

inicialmente colocado no tubo da centrífuga de solução etanol:água (3:1). A última suspensão foi feita em água ultrapura (mesmo volume da solução de etanol e água).

Foi feita uma repetição com os nanocompósitos que apresentaram potencial antibacteriano no primeiro teste de MIC, sendo eles A1, A2 e A4. Desta vez, o protocolo foi realizado até a última etapa, incluindo a funcionalização com PEI (2000 g mol⁻¹). Para a funcionalização, o PEI foi dissolvido em água ultrapura, teve seu pH ajustado (**Quadro 3**) foi adicionado lentamente à mistura AgNPs-OG sob agitação magnética a uma concentração final de 0,25 g L⁻¹. A solução foi levada ao banho ultrassônico por 20 minutos e passou por centrifugação a 8000 xg por 20 min, porém não houve descarte de sobrenadante e dispersão em água ultrapura, uma vez que o *pellet* formado foi bem reduzido.

Quadro 3. Relação dos pHs esperados em cada etapa do protocolo.

ETAPA	pH IDEAL
AgNP após síntese	entre 7,0 e 8,0
Dispersão OG	entre 3,5 e 5,0
OG após ajuste	entre 9,0 e 10,0
Mistura OG-Ag	entre 8,5 e 9,5
Amostra pré PEI	entre 8,0 e 9,0
Solução de PEI	entre 10,0 e 12,0
Amostra pós PEI	entre 8,0 e 9,5
Produtos finais	entre 7,5 e 8,5

Fonte: Silva *et al.* (2022)

As amostras funcionalizadas com PEI tiveram seu rendimento medido. Para isso, 1 mL de nanopartícula foi secada em concentrador de vácuo rotativo RVC 2-33 Cdplus (CHRIST) em um ciclo de 6 horas a 35 °C por 1500 xg. O rendimento foi

calculado pela diferença de peso do microtubo de 1,5 mL vazio (pesado antes da secagem das amostras) menos o peso do microtubo com amostra concentrada.

4.4. CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS

Foram coletadas amostras durante as diferentes etapas do protocolo de síntese para que fosse possível fazer uma comparação dos dados à medida que se obtivesse o produto final, por exemplo: nanopartícula de prata antes da ancoragem do óxido de grafeno; nanocompósitos antes e depois do processo de purificação; com e sem adição do PEI.

4.4.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORVÂNCIA NA REGIÃO UV-Vis

Para realizar a medição da UV-Vis das alíquotas coletadas durante o protocolo, foi utilizado o espectrofotômetro Genesys™ 10S UV-Vis (Thermo Scientific), seguindo o manual do usuário. As cubetas escolhidas foram as de quartzo, uma vez que as cubetas de plástico (poliestireno) apresentam interferência na leitura no espectro UV, enquanto as de quartzo têm alta transmissão UV. A leitura foi realizada adicionando 1 mL de cada amostra na cubeta e o *scan* foi realizado de 190 - 900 nm, com intervalo de 1 nm (software Visionlite).

4.4.2. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Foi realizada a leitura da fluorescência utilizando o espectrofotômetro *Cary Eclipse Fluorescence Spectrometer* (Agilent Technologies), segundo o manual do usuário, com cubetas de quartzo para fluorimetria contendo 3 mL de cada amostra. As amostras foram analisadas no modo *scan*, com definição de valores de excitação (200 - 600 nm, em intervalos de 25 nm) e avaliação de emissão (faixa de λ_{exc+20} - 1000 nm). Os filtros de excitação e emissão foram definidos para a posição “auto” e as demais configurações foram mantidas em *default*.

4.4.3. DIFUSÃO DINÂMICA DE LUZ (DLS)

O teste de difusão dinâmica de luz (DLS) é realizado para caracterizar os compósitos em relação ao tamanho hidrodinâmico das partículas da amostra, ou seja, não mede exatamente o tamanho físico da partícula, mas seu diâmetro somado à sua

camada de solvatação ou qualquer outro componente que influencie no seu arrasto hidrodinâmico (Bhattacharjee, 2016).

A leitura foi realizada em instrumento de espalhamento dinâmico de luz Litesizer DLS 500 (Anton Paar), seguindo o manual do usuário. A análise das amostras foi conduzida em cubetas de poliestireno e o solvente utilizado para estimativa de tamanho hidrodinâmico foi água. As amostras foram equilibradas (25 °C, 1 min) antes da leitura de dados e foram realizadas três medidas de cada amostra.

4.4.4. POTENCIAL ZETA

O teste de Potencial Zeta, ou potencial eletro cinético, é utilizado para a medição da carga superficial das partículas dispersas em amostras líquidas e seu grau de repulsão eletrostático, indicando a estabilidade coloidal da solução (Bhattacharjee, 2016).

A leitura foi realizada utilizando o instrumento de espalhamento dinâmico de luz Litesizer DLS 500 (Anton Paar), mesmo do teste DLS, seguindo o manual do usuário. Como célula de medição, foi utilizada a cubeta ômega (nº 225288, Anton Paar) contendo cerca de 800 µL de amostra. As amostras foram equilibradas (25 °C, 1 min) antes da leitura de dados e foram realizadas três medidas de cada amostra.

4.5. AVALIAÇÃO DE POTENCIAL ANTIMICROBIANO

Para conferir o potencial antibacteriano dos nanocompósitos produzidos e definir sua concentração inibitória mínima (MIC), foi utilizada a técnica de micro diluição em placas de 96 poços com a adição de resazurina como um indicador redox. Células bacterianas ativas reduzem a resazurina (azul) não fluorescente para resorufina (rosa) fluorescente (O'Brien *et al.* 2000). Com isso, é possível mensurar a atividade microbiana por fluorescência.

4.5.1. MONTAGEM DAS PLACAS

Primeiro, os dois isolados selecionados (CR-08 e BU-07) foram cultivados em meio TSB a 35 °C, 150 rpm por 24h. Foi feita uma triagem inicial com todas as amostras de AgNPs-OG purificadas e as AgNPs sozinhas. Após isso, o teste foi refeito

com as amostras que apresentaram resultados prévios positivos, sendo refeitos e passando pela etapa de funcionalização.

Para a triagem inicial (**Figura 15**), as amostras foram avaliadas como diluições (2X, 4X, 8X e 16X). Para isso, foram adicionados 50 μ L de TSB em todos os pocinhos das linhas B a D e de F a H. Em seguida, adicionou-se 100 μ L dos nanocompósitos nos pocinhos das linhas A, nas colunas de 1 a 6 e E nas colunas de 1 a 3. Na linha E, colunas de 4 a 6, adicionou-se 100 μ L das nanopartículas de prata. Foi então realizada a diluição seriada com a transferência de 50 μ L de A para B, de B para C, de C para D, descartando-se os 50 μ L restantes no final. O mesmo procedimento foi repetido nas linhas de E a H.

Figura 15: Mapas da placa de 96 poços utilizada no Primeiro Teste, demonstrando o posicionamento de cada amostra e suas respectivas microdiluições.

	A1			A4			Glutaraldeído (mg L ⁻¹)			Controle		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A1 2X	A1 2X	A1 2X	A4 2X	A4 2X	A4 2X	6250	6250	6250	A1	A1	A1
B	A1 4X	A1 4X	A1 4X	A4 4X	A4 4X	A4 4X	3125	3125	3125	A2	A2	A2
C	A1 8X	A1 8X	A1 8X	A4 8X	A4 8X	A4 8X	1562,5	1562,5	1562,5	A4	A4	A4
D	A1 16X	A1 16X	A1 16X	A4 16X	A4 16X	A4 16X	781	781	781	AgNP	AgNP	AgNP
E	A2 2X	A2 2X	A2 2X	AgNP 2x	AgNP 2x	AgNP 2x	390	390	390	MO	MO	MO
F	A2 4X	A2 4X	A2 4X	AgNP 4x	AgNP 4x	AgNP 4x	97	97	97	MO	MO	MO
G	A2 8X	A2 8X	A2 8X	AgNP 8x	AgNP 8x	AgNP 8x	48	48	48	BRANCO	BRANCO	BRANCO
H	A2 16X	A2 16X	A2 16X	AgNP 16x	AgNP 16x	AgNP 16x	24	24	24	BRANCO	BRANCO	BRANCO
	A2			AgNP			Glutaraldeído (mg L ⁻¹)			Controle		

Fonte: Elaborado pela própria autora.

A absorvância dos cultivos bacterianos foi medida em uma DO₆₀₀ e o inóculo foi padronizado para uma absorvância final de 0,05 em cada pocinho da placa. Por fim, adicionou-se a quantidade necessária de meio para completar o volume total de 100 μ L em cada pocinho.

Nas colunas de 10 a 12, nas linhas de A a D, foram adicionados 50 μ L de TSB e 50 μ L dos nanocompósitos ou da nanopartícula de prata, sem adição dos isolados, para servir como controle das soluções. As linhas E e F foram utilizadas como controle de

crescimento dos microrganismos (MO) e as linhas G e H foram utilizadas como branco do meio. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão das diluições.

Após a triagem do potencial antibacteriano das nanopartículas sintetizadas, escolheu-se as nanopartículas A1, A2 e A4 para a funcionalização. O potencial antibacteriano dessas nanopartículas funcionalizadas seguiu o protocolo descrito anteriormente.

Para identificar a concentração inibitória mínima (CIM) das nanopartículas funcionalizadas, o protocolo de micro diluição foi realizado nas seguintes concentrações: 200 mg L⁻¹, 100 mg L⁻¹, 50 mg L⁻¹, 25 mg L⁻¹, 12,5 mg L⁻¹, 6,5 mg L⁻¹, 3,125 mg L⁻¹ e 1,56 mg L⁻¹. Para isso, a montagem das placas seguiu a **Figura 16**. *Mapa da placa 1 utilizada no segundo teste, demonstrando o posicionamento de cada amostra e suas respectivas microdiluições.*

Figura 16. Mapa da placa 1 utilizada no segundo teste, demonstrando o posicionamento de cada amostra e suas respectivas microdiluições.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A1 0.2	A1 0.2	A1 0.2	A1 0.2	A1 0.2	A2 0.2	A2 0.2	A2 0.2	A2 0.2	A2 0.2	A4 0.2	A4 0.2
B	A1 0.1	A1 0.1	A1 0.1	A1 0.1	A1 0.1	A2 0.1	A2 0.1	A2 0.1	A2 0.1	A2 0.1	A4 0.1	A4 0.1
C	A1 0.05	A1 0.05	A1 0.05	A1 0.05	A1 0.05	A2 0.05	A2 0.05	A2 0.05	A2 0.05	A2 0.05	A4 0.05	A4 0.05
D	A1 0.025	A1 0.025	A1 0.025	A1 0.025	A1 0.025	A2 0.025	A2 0.025	A2 0.025	A2 0.025	A2 0.025	A4 0.025	A4 0.025
E	A1 0.0125	A1 0.0125	A1 0.0125	A1 0.0125	A1 0.0125	A1 0.0125	A2 0.0125	A2 0.0125	A2 0.0125	A2 0.0125	A4 0.0125	A4 0.0125
F	A1 0.00625	A1 0.00625	A1 0.00625	A1 0.00625	A1 0.00625	A2 0.00625	A2 0.00625	A2 0.00625	A2 0.00625	A2 0.00625	A4 0.00625	A4 0.00625
G	A1 0.0031	A1 0.0031	A1 0.0031	A1 0.0031	A1 0.0031	A2 0.0031	A2 0.0031	A2 0.0031	A2 0.0031	A2 0.0031	A4 0.0031	A4 0.0031
H	A1 0.0015	A1 0.0015	A1 0.0015	A1 0.0015	A1 0.0015	A2 0.0015	A2 0.0015	A2 0.0015	A2 0.0015	A2 0.0015	A4 0.0015	A4 0.0015

Fonte: Elaborada pela própria autora.

Foram adicionados 50 µL de TSB em todos os pocinhos das linhas B a H e, em seguida, adicionou-se 100 µL dos nanocompósitos nos pocinhos das linhas A. Foi então realizada a diluição seriada com a transferência de 50 µL de A para B, de B para C, de C para D, e assim por diante, até a linha H, descartando-se os 50 µL

restantes no final. Nas colunas 7, 8 e 9 foram feitas diluições seriadas do glutaraldeído partindo-se da concentração de 6250 mg L⁻¹, uma vez que este é o biocida utilizado atualmente nos fluidos de perfuração.

A DO₆₀₀ das bactérias foi padronizada para uma absorvância final de 0,05. Por fim, adicionou-se o inóculo e a quantidade necessária de meio para completar o volume total de 100 µL em cada pocinho.

Para avaliar a atividade antibacteriana do PEI, o mesmo foi utilizado sozinho no teste de CIM, iniciando em uma concentração de 200 mg L⁻¹, seguindo a mesma diluição seriada e protocolo previamente exposto. Além disso, os controles de crescimento bacteriano e de esterilidade do meio foram adicionados às colunas 9 a 12 (**Figura 16**).

Figura 17. Mapa da placa 2 utilizada no segundo teste, demonstrando o posicionamento de cada amostra e suas respectivas micro diluições.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	A4 0.2	A4 0.2	A4 0.2	PEI 0.2	PEI 0.2	PEI 0.2	PEI 0.2	PEI 0.2	MO	MO	MO	MO
B	A4 0.1	A4 0.1	A4 0.1	PEI 0.1	PEI 0.1	PEI 0.1	PEI 0.1	PEI 0.1	MO	MO	MO	MO
C	A4 0.05	A4 0.05	A4 0.05	PEI 0.05	PEI 0.05	PEI 0.05	PEI 0.05	PEI 0.05	BRAN CO	BRAN CO	BRAN CO	BRAN CO
D	A4 0.025	A4 0.025	A4 0.025	PEI 0.025	PEI 0.025	PEI 0.025	PEI 0.025	PEI 0.025	BRAN CO	BRAN CO	BRAN CO	BRAN CO
E	A4 0.0125	A4 0.0125	A4 0.0125	PEI 0.0125	PEI 0.0125	PEI 0.0125	PEI 0.0125	PEI 0.0125	BRAN CO	BRAN CO	BRAN CO	BRAN CO
F	A4 0.00625	A4 0.00625	A4 0.00625	PEI 0.00625	PEI 0.00625	PEI 0.00625	PEI 0.00625	PEI 0.00625				
G	A4 0.0031	A4 0.0031	A4 0.0031	PEI 0.0031	PEI 0.0031	PEI 0.0031	PEI 0.0031	PEI 0.0031				
H	A4 0.0015	A4 0.0015	A4 0.0015	PEI 0.0015	PEI 0.0015	PEI 0.0015	PEI 0.0015	PEI 0.0015				

Fonte: Elaborado pela própria autora.

Em ambas as triagens e o teste, as placas foram incubadas por 24 horas a 35°C. O resultado foi avaliado aplicando-se 10 µL de uma solução de resazurina a 15 mg mL⁻¹, com posterior incubação por 2 horas a 35°C. Posteriormente, foi realizada a leitura da fluorescência das placas utilizando o Varioskan™ LUX Multimode Microplate

Reader (Thermo Scientific), seguindo o manual do usuário, com excitação a 535 nm e emissão a 595 nm (Sorkhabi *et al.*, 2025).

Os resultados foram expressos em média e desvio padrão. O cálculo de inibição foi feito pela fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = 100 - 100 \left(\frac{T_{535/595}}{C_{535/595}} \right)$$

onde:

T = fluorescência do tratamento;

C = fluorescência do controle de crescimento.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

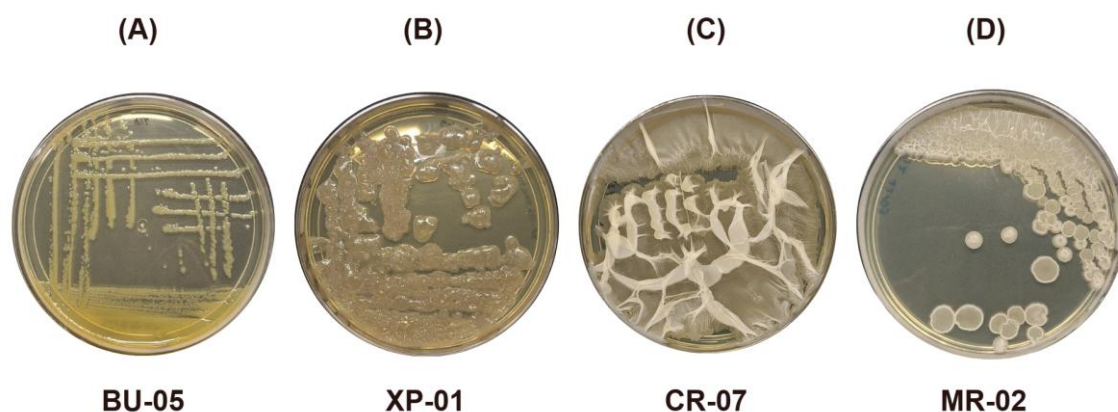
5.1. ISOLAMENTO E TRIAGEM DOS MICRORGANISMOS

A partir do isolamento, foram obtidos 43 isolados bacterianos, 1 levedura e 1 fungo. Os isolados de fungo e levedura foram obtidos tardiamente, apenas nas placas contendo ágar Sabouraud com suplementação de ampicilina, e ainda não foram caracterizados ou triados. Apesar de criopreservados em glicerol, os isolados MR-04 e TO-03 pararam de apresentar crescimento.

Os FPs “virgens” (BR-25 e TOT-20) apresentaram menor variedade de colônias, conseqüentemente, foram os que resultaram no menor número de isolados. O fluido de código BUZ-23 apresentou crescimento de colônias apenas nas placas contendo ágar R2A, meio comumente empregado para microrganismos aquáticos. Os fluidos que apresentaram maior variedade de colônias foram os de código CRT-25 e MRL-24. Também foram isoladas bactérias contaminantes da própria goma xantana recebida, indicando que os microrganismos isolados não estão relacionados apenas com os ambientes aos quais os fluidos foram expostos, sendo o próprio poço ou os tanques de armazenamento, mas também com sua própria matéria-prima.

Observando todos os isolados, percebe-se a grande diversidade e complexidade da microbiota dos fluidos, sendo possível destacar alguns exemplos de características bem distintas (**Figura 18**).

Figura 18. Quatro dos 43 isolados obtidos no projeto, representando a diversidade da microbiota encontrada.

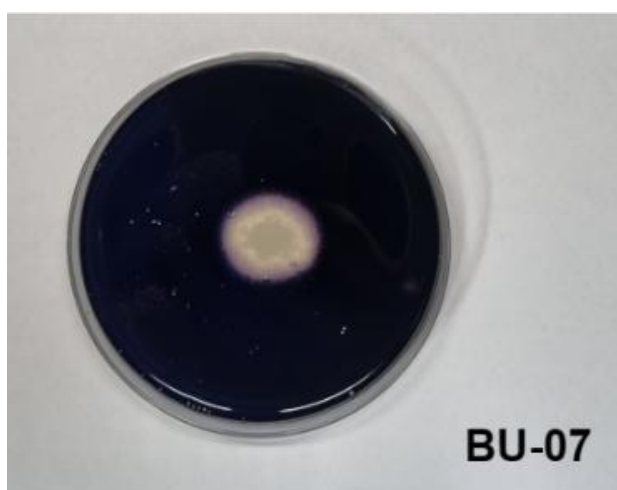


Fonte: Este trabalho.

Todos os 43 isolados bacterianos passaram pelos testes de degradação de HPA com a solução de lugol e de degradação de goma xantana com solução de vermelho congo.

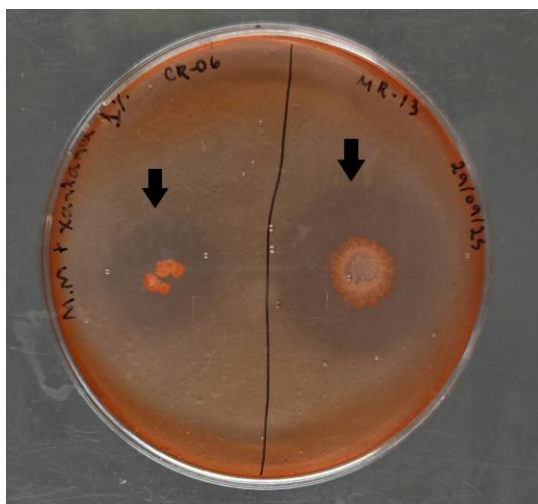
No primeiro teste, 18 isolados (MR-01, MR-02, MR-05, MR-07, MR-10, MR-13, CR-07, CR-08, CR-09, BU-05, BU-06, BU-07, BR-01, XP-01, XL-01, XL-02, BD-01 e BD-02) apresentaram formação de um círculo claro/amarelado onde se encontrava a colônia (**Figura 19**) após aplicação da solução de lugol, o que indica degradação de HPA. Já no segundo, 20 isolados (MR-02, MR-03, MR-08, MR-12, MR-13, CR-01, CR-02, CR-06, CR-07, CR-08, CR-09, CR-10, BU-07, BR-01, XP-01, XL-01, XL-02, MO-01, BD-01 e BD-02) apresentaram formação de halo translúcido ao redor da colônia (**Figura 20**) após a aplicação do vermelho congo, o que indica degradação de goma xantana. Entre estes citados, 12 isolados (MR-02, MR-13, CR-07, CR-08, CR-09, BU-07, BR-01, XP-01, XL-01, XL-02, BD-01 e BD-02) apresentaram degradação dos polímeros analisados em ambos os testes.

Figura 19. Teste de degradação de HPA com solução de lugol no isolado de código BU-07.



Fonte: Este trabalho.

Figura 20. Teste de degradação de goma xantana com solução de vermelho congo nos isolados de código CR-06 e MR-13.



Fonte: Este trabalho.

5.2. IDENTIFICAÇÃO DOS ISOLADOS

5.2.1. ANÁLISE DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS (MIDI)

Para identificação preliminar feita pelo sistema MIDI, um índice de similaridade (SI, *Similarity Index*), em uma escala de 0,000 – 1,000, é gerado com base em um banco de dados do sistema: quanto mais próximo do limite superior, mais confiável é a identificação. Dos 43 isolados obtidos, apenas 31 apresentaram crescimento suficiente para a análise do perfil de ácidos graxos e identificação preliminar pelo sistema MIDI (**Quadro 4**).

Quadro 4. Identificação preliminar dos isolados bacterianos provenientes dos fluidos de perfuração pelo Sistema MIDI.

(continua)

Fonte/Fluido	Código	Identificação – MIDI	SI
Xantana Petrobras	XP01	<i>Bacillus subtilis</i>	0,398
		<i>Bacillus atrophaeus</i>	0,312
		<i>Paenibacillus macerans</i> (<i>Bacillus</i>)	0,284
		<i>Virgibacillus pantothenicus</i> (<i>Bacillus</i>)	0,283

(continua)

Fonte/Fluido	Código	Identificação – MIDI	SI
Xantana LBBMA	XL01	Nenhuma correspondência	---
	XL02	<i>Virgibacillus pantothenicus (Bacillus)</i>	0,591
		<i>Bacillus atrophaeus</i> <i>Bacillus oleronius</i>	0,525 0,439
MRL-24	MR-02	<i>Virgibacillus pantothenicus (Bacillus)</i>	0,594
		<i>Cellulomonas fimi</i>	0,562
		<i>Bacillus atrophaeus</i>	0,507
	MR-03	<i>Grimontia hollisae</i>	0,481
	MR-05	<i>Bacillus cereus</i>	0,790
	MR-06	<i>Brevibacillus centrosporus (Bacillus)</i>	0,172
	MR-07	<i>Bacillus megaterium</i>	0,740
	MR-08	<i>Bacillus viscosus</i> <i>Brevibacillus reuszeri</i>	0,307 0,268
		MR-09	Nenhuma correspondência
MR-10	<i>Bacillus megaterium</i>	0,701	
BR-25	BR-01	<i>Paenibacillus polymyxa (Bacillus)</i>	0,466
		<i>Virgibacillus pantothenicus (Bacillus)</i>	0,321
		<i>Paenibacillus thiaminolyticus (Bacillus)</i>	0,309
		<i>Paenibacillus alvei (Bacillus)</i>	0,304
CRT-25	CR-01	<i>Bacillus cereus</i>	0,563
	CR-02	<i>Bacillus cereus</i>	0,815
		<i>Bacillus thuringiensis kurstakii</i> <i>Bacillus thuringiensis israelensis</i>	0,771 0,737
	CR-03	<i>Bacillus cereus</i>	0,598
	CR-04	<i>Bacillus cereus</i>	0,552
	CR-05	<i>Bacillus cereus</i>	0,812
	CR-06	<i>Bacillus thuringiensis kurstakii</i>	0,865
CR-07	<i>Virgibacillus pantothenicus (Bacillus)</i>	0,577	
	<i>Cellulomonas fimi</i>	0,550	
	<i>Paenibacillus alvei (Bacillus)</i>	0,542	

(continua)

Fonte/Fluido	Código	Identificação – MIDI	SI
CRT-25	CR-08	<i>Bacillus cereus</i>	0,601
	CR-09	<i>Bacillus cereus</i>	0,831
	CR-10	<i>Brevibacillus parabrevis</i>	0,625
		<i>Paenibacillus validus (Bacillus)</i>	0,545
		<i>Bacillus megaterium</i>	0,455
CR-11	<i>Brevibacillus parabrevis</i> <i>Bacillus megaterium</i>	0,826 0,551	
TOT-20	TO-01	<i>Bacillus circulans</i>	0,107
	TO-02	<i>Microbacterium flavescens</i>	0,343
BUZ-23	BU-01	<i>Staphylococcus hominis hominis</i>	0,775
	BU-02	<i>Staphylococcus hominis hominis</i>	0,619
	BU-03	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	0,402
		<i>Staphylococcus aureus</i>	0,346
	BU-05	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0,138
		<i>Pseudomonas oryzae</i>	0,136
	BU-06	<i>Microbacterium flavescens</i>	0,464
BU-07	<i>Bacillus atrophaeus</i> <i>Bacillus subtilis</i>	0,732 0,571	

Nota: Foram incluídos apenas os isolados que apresentaram crescimento suficiente para a análise.

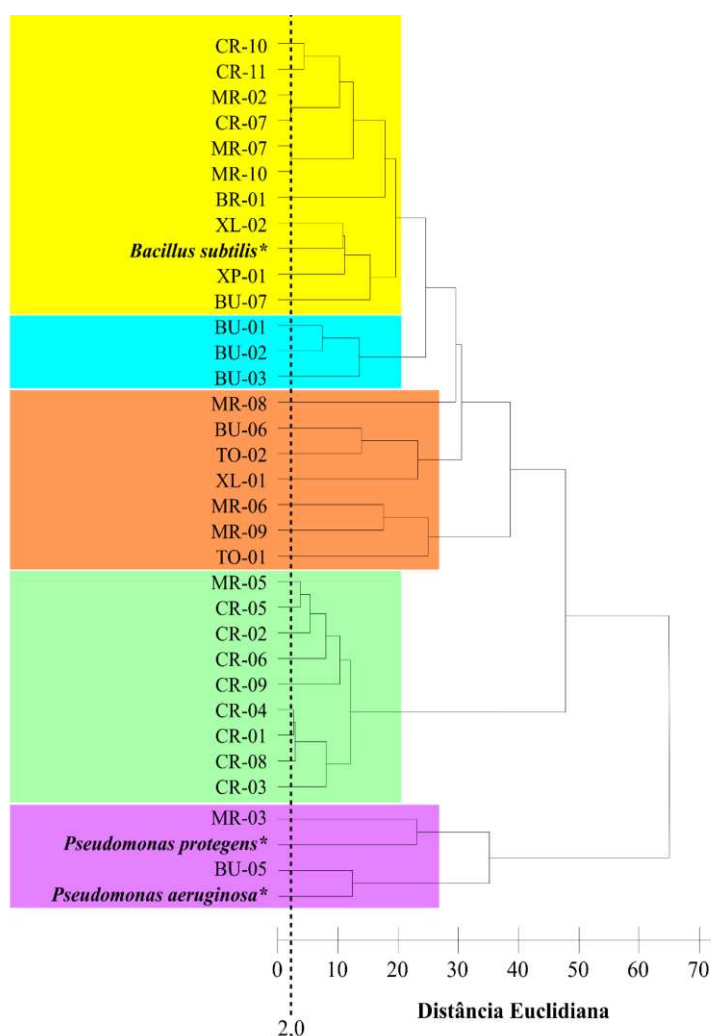
Fonte: Este trabalho.

De forma sintética, 17 isolados (XL-02, MR-02, MR-05, CR-01, CR-02, CR-03, CR-04, MR-07, MR-10, CR-05, CR-06, CR-07, CR-08, CR-10, CR-11, BU-07 e CR-09) foram identificados como *Bacillus* sp., *Virgibacillus* sp. ou *Brevibacillus* sp., apresentando índices de similaridade superiores a 0,500 (**Figura 21** - Clado Verde). Além destes, alguns isolados foram identificados com menor índice de similaridade (entre 0,300 e 0,500), indicando um resultado menos confiável, mas ainda possível de ser levado em consideração. Entre estas amostras, foram presumidamente identificados *Bacillus* sp. (XP-01, BR-01 e MR-08) (**Figura 21** – Clado verde), *Microbacterium* sp. (TO-02 e BU-06) e *Grimontia* sp. (MR-03) (**Figura 21** – Clado

roxo). Algumas amostras não apresentaram correspondência com o banco de dados do sistema Sherlock-MIDI (XL-01 e MR-09) ou apresentaram índices de similaridade muito baixos (abaixo de 0,300) (MR-06, TO-01 e BU-05), não sendo possível atribuir algum gênero aos isolados (**Figura 21** – Clado laranja).

Por fim, três isolados foram identificados como pertencentes ao gênero *Staphylococcus* (BU-01, BU-02 e BU-03) (**Figura 21** - Clado azul).

Figura 21. Análise de similaridade entre perfis de ácidos graxos (FAMEs) por meio de estimativa de Distância Euclidiana (amostras cuja distância mensurada é inferior ou equivalente a 2,0 representam indivíduos de uma mesma linhagem bacteriana).



Nota: Negrito e asterisco: linhagens previamente identificadas, respectivamente, como: *Bacillus subtilis* RI4914, *Pseudomonas protegens* e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Fonte: Este trabalho.

Por meio da análise de similaridade entre amostras utilizando a distância euclidiana, é possível inferir que amostras que apresentam distância inferior ou equivalente a 2,0 representam a mesma linhagem de determinada espécie bacteriana (Sasser, 1990). Essa observação foi realizada para os microrganismos MR-02 e CR-07 e MR-07 e MR-10.

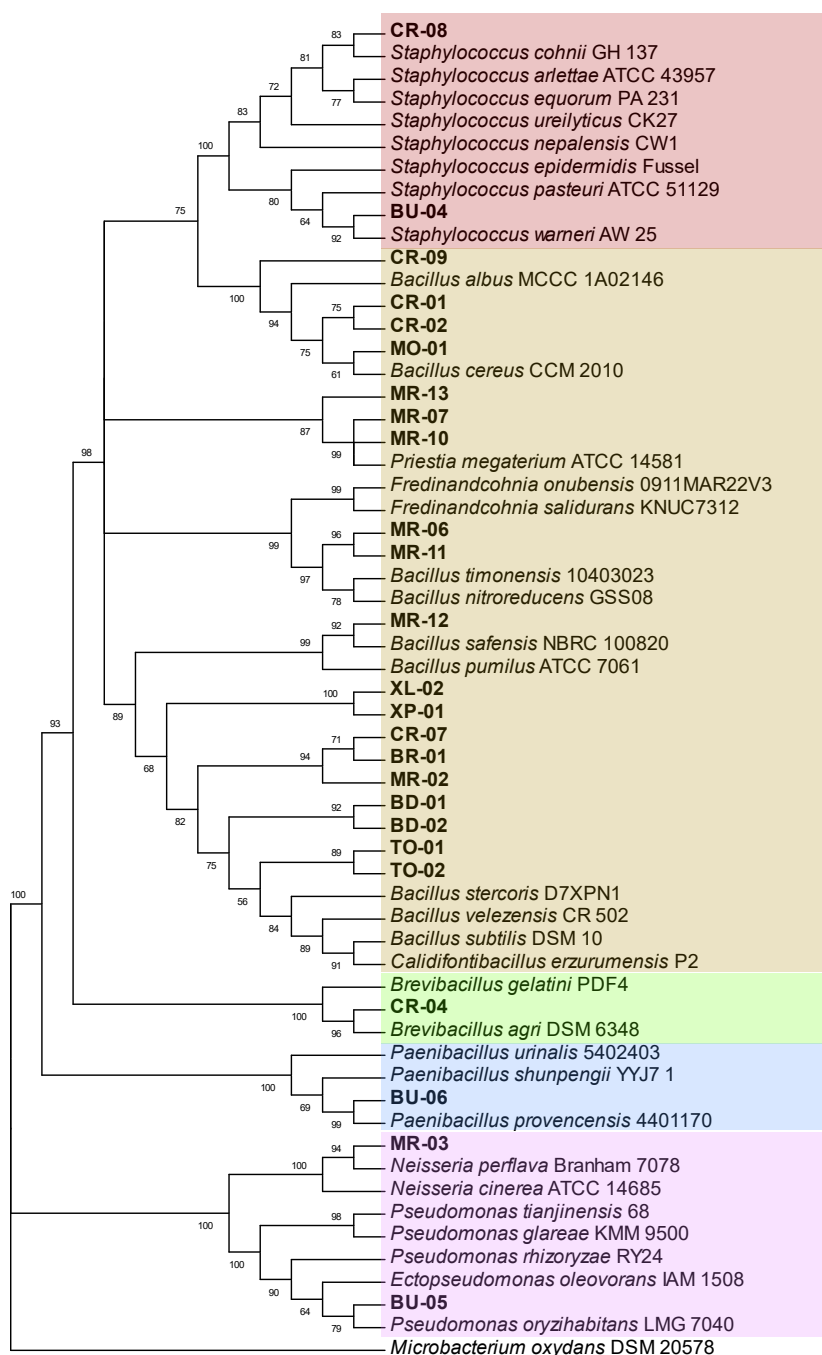
5.2.2. PCR E SEQUENCIAMENTO DE SANGER

Do total de 43 isolados bacterianos obtidos, 25 deles tiveram a região 16S rRNA amplificadas e sequenciadas com sucesso, sendo organizado filogeneticamente em uma inferência demonstrada na **Figura 22**. Os outros 18 foram sequenciados, mas as sequências obtidas não tiveram qualidade suficiente para serem enviadas para análise.

Os resultados da filogenia e do MIDI apresentaram certa similaridade, incluindo isolados identificados como *Bacillus* sp., *Brevibacillus* sp., *Paenibacillus* sp., *Pseudomonas* sp. e *Staphylococcus* sp., mas também possuem divergências como o isolado CR-08, que foi identificado como *Bacillus* sp. pelo MIDI e agrupado com espécies do gênero *Staphylococcus* pelo sequenciamento. Além disso, alguns isolados passaram apenas por um processo de identificação, não possibilitando comparação.

Dos 31 isolados analisados pelo MIDI, 19 foram previamente identificados sendo do gênero *Bacillus*. Já dos 25 isolados sequenciados, 21 foram agrupados como *Bacillus* sp. (**Figura 22** – Clado laranja), *Paenibacillus* sp. (**Figura 22** – Clado azul) e *Brevibacillus* sp. (**Figura 22** – Clado verde). Em teor de comparação, na triagem de degradação, 8 (MR-02, MR-13, CR-07, CR-08, CR-09, BU-07, BR-01, XP-01, XL-01, XL-02, BD-01 e BD-02) de 12 isolados que degradam ambos os polímeros utilizados no projeto foram considerados sendo do gênero *Bacillus* em pelo menos uma das identificações, incluindo os 3 isolados provenientes da própria matéria prima da goma xantana (XP-01, XL-01 e XL-02).

Figura 22. Inferência filogenética de Máxima Verossimilhança dos isolados em contraste com sequências tipo do marcador 16S rRNA.



Fonte: Este trabalho.

Esses resultados eram esperados, uma vez que as diversas espécies pertencentes ao gênero possuem uma diversidade de habilidades fisiológicas, permitindo sua existência nos mais diversos ambientes naturais. No ambiente marinho, são praticamente onipresentes, uma vez que conseguem tolerar condições

adversas como alta pressão, salinidade e diferença de pH. Além disso, *Bacillus* são bactérias capazes de formar esporos altamente resistentes à temperaturas altas e baixas, radiação, dessecação e desinfetantes (Mondol; Shin; Islam, 2013; Turnbull, 1996) - o que pode explicar a presença de contaminantes na goma xantana mesmo após processamento industrial e armazenamento em geladeira, voltando a crescer rapidamente quando colocado em meio líquido novamente.

O gênero *Bacillus* apresenta versatilidade metabólica, secretando uma grande variedade de enzimas extracelulares, neste caso, incluindo as responsáveis pela degradação de xantana e amido. Um estudo de 2022, realizado por Ren *et al.*, analisou 193 espécies de do gênero e 188 apresentaram a capacidade de produzir mais de uma enzima funcional.

Os resultados do sequenciamento foram analisados conforme o indicado pelo NCBI (**Tabela 5**): identidades com porcentagem maior que 99% indicam que o isolado é da mesma espécie que a indicada pelo banco de dados, enquanto identidades entre 95% e 99% podem indicar mesmo gênero, mas nem sempre é o caso (NCBI, 2009).

Tabela 5. Dados obtidos a partir da análise do sequenciamento 16S rRNA no BLAST. BLAST.

(continua)

Isolado	Cobertura (%)	Identidade (%)	Espécie
BD-01	100	99,31	<i>Bacillus subtilis</i> 168
BD-02	100	98,44	<i>Bacillus subtilis</i> 168
BR-01	100	99,09	<i>Bacillus siamensis</i> KCTC 13613
BU-04	100	97,19	<i>Staphylococcus warneri</i> DSM 20316
BU-05	100	99,32	<i>Pseudomonas oryzihabitans</i> NBR 102199
BU-06	100	98,50	<i>Paenibacillus provencensis</i> 4401170
CR-01	100	99,85	<i>Bacillus albus</i> N35-10-2

(continua)

CR-02	100	99,40	<i>Bacillus albus</i> N35-10-2
CR-04	100	99,04	<i>Brevibacillus agri</i> DSM 6348
CR-07	100	98,87	<i>Bacillus velezensis</i> CR-502
CR-08	100	97,32	<i>Staphylococcus cohnii</i> ATCC 29974
CR-09	100	95,50	<i>Bacillus albus</i> MCCC 1A02146
MO-01	100	99,12	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579
MR-02	100	99,71	<i>Bacillus velezensis</i> CR-502
MR-03	100	99,70	<i>Neisseria sicca</i> ATCC 29256
MR-06	100	98,31	<i>Bacillus timonensis</i> 10403023T
MR-07	100	99,93	<i>Priestia megaterium</i> ATCC 14581
MR-10	100	99,32	<i>Priestia megaterium</i> DSM 32
MR-11	100	99,37	<i>Bacillus timonensis</i> 10403023T
MR-12	100	99,53	<i>Bacillus pumilus</i> ATCC 7061
MR-13	100	96,93	<i>Neobacillus drentensis</i> IDA1967
TO-01	100	97,62	<i>Bacillus subtilis</i> 168
TO-02	100	97,60	<i>Bacillus subtilis</i> 168
XL-02	100	98,53	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13
XP-01	100	98,40	<i>Bacillus licheniformis</i> DSM 13

Fonte: Este trabalho.

Dos 25 isolados sequenciados, 12 (BD-02, BU-04, BU-06, CR-07, CR-08, CR-09, MR-06, MR-13, TO-01, TO-02, XL-02 e XP-01) não apresentaram identidade acima de 99%, não sendo possível identificar suas espécies. Nesse caso, para

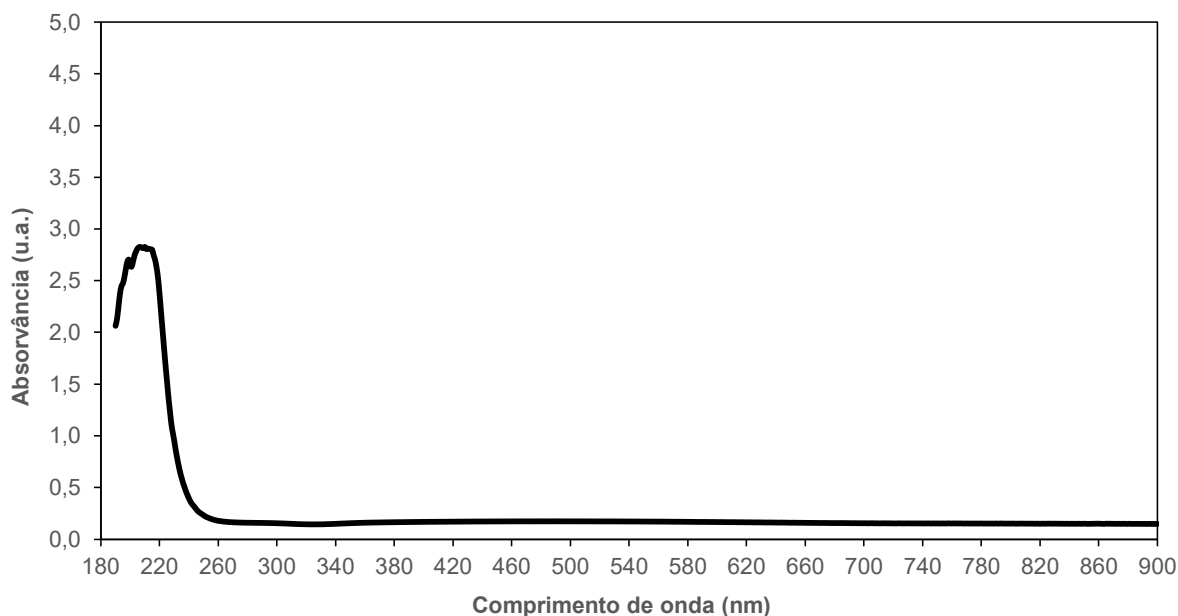
garantir uma identificação mais segura e confiável, uma vez que o gene 16S rRNA sozinho pode não ter resolução suficiente a nível de espécie (Glaeser; Kampfer, 2015), seria necessário sequenciar outras regiões de genes bacterianos de manutenção, ou *housekeeping*, (como: *gyrA*, *gyrB*, *infB*, *recN*, *rpoA*, *rpoB* and *topA*) e concatenar as sequências utilizando métodos de análise como MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*) e MLST (*Multilocus Sequence Typing*) (Fang *et al.*, 2019; Margos *et al.*, 2008).

5.3. SÍNTESE DOS NANOCOMPÓSITOS

5.3.1. PROTOCOLO SILVA

A solução de AgNPs-OG não apresentou o pico esperado na região de 400 nm no espectro UV-Vis (**Figura 23**), característico das nanopartículas de prata (Azwatul *et al.*, 2023). Sendo assim, foi descartado logo após o primeiro teste.

Figura 23. Espectros UV-Vis da solução de AgNPs-OG sintetizada a partir do protocolo Silva sem alterações.



Fonte: Este trabalho.

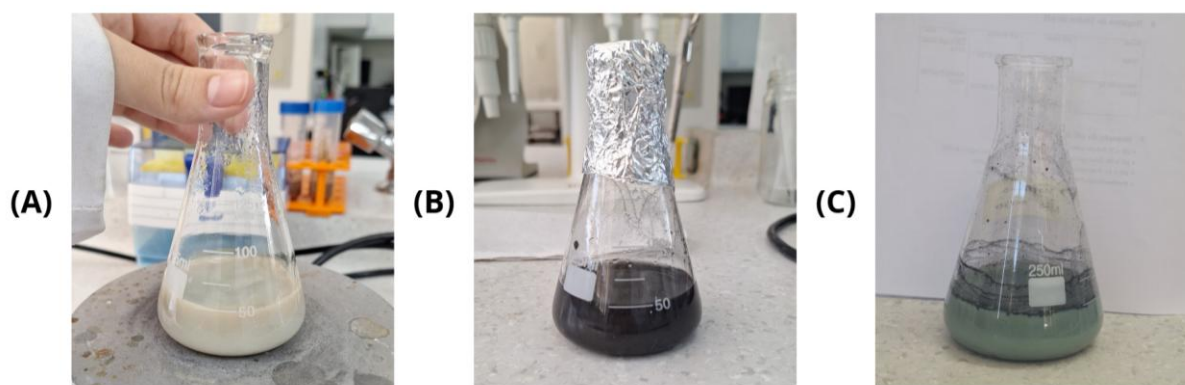
Uma hipótese para a não formação de pico de absorvância esperado na região de 400 nm é que, ao corrigir o pH da amostra para 10,0 utilizando NaOH antes de

realizar o aquecimento para o AgNO_3 reagir com o $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ para a formação das AgNPs, a velocidade de redução foi aumentada, causando uma formação rápida e descontrolada de partículas, com crescimento assimétrico. Tudo isso leva à formação de partículas de tamanhos muito diferentes, que conseqüentemente absorvem a luz em diferentes comprimentos de onda, causando alargamento de um possível pico ou nenhum pico na leitura de UV-Vis (Singh; Sinha; Mandal, 2009).

5.3.2. PROTOCOLO SILVA ALTERADO

Na primeira realização do protocolo alterado, a síntese foi interrompida após a etapa de ancoragem das AgNPs na dispersão de OG, uma vez que a cor das soluções obtidas não foi a esperada (amarelo-intenso após aquecimento das AgNPs e cinza-escuro após ancoragem), como possível observar na **Figura 24**.

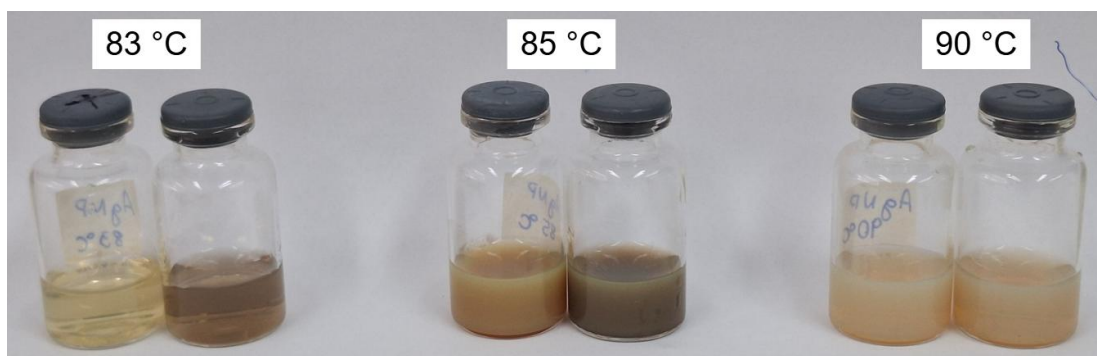
Figura 24. Registro das colorações das soluções ao longo do protocolo. A: Solução de AgNP após aquecimento a $90\text{ }^\circ\text{C}$ por 1h (coloração esperada era amarelo-intenso/marrom). B: Solução de óxido de grafeno. C: Solução após a ancoragem das AgNPs na dispersão de OG (coloração esperada era cinza-escuro/preto)



Fonte: Este trabalho.

Para tentar obter outro resultado, mudamos a forma de aquecimento para banho-maria e retiramos as amostras em 3 temperaturas diferentes: $83\text{ }^\circ\text{C}$, $85\text{ }^\circ\text{C}$ e $90\text{ }^\circ\text{C}$ (**Figura 25**), este último tendo ficado sob agitação por 1h após o banho ter atingido a temperatura esperada.

Figura 25. Amostras de AgNPs após o aquecimento em banho-maria.



Nota: Estão dispostas em ordem de temperatura: 83 °C, 85 °C e 90 °C, respectivamente, antes e após ajuste de pH.

Fonte: Este trabalho.

No Erlenmeyer contendo a amostra de 90 °C, observou-se a formação de uma crosta metálica após o aquecimento (**Figura 26**). Provavelmente a prata presente no nitrato (AgNO_3) tornou-se prata metálica (Ag) ao invés de formar nanopartículas, nesse caso, diminuindo o seu potencial biocida e inviabilizando seu uso no decorrer do protocolo.

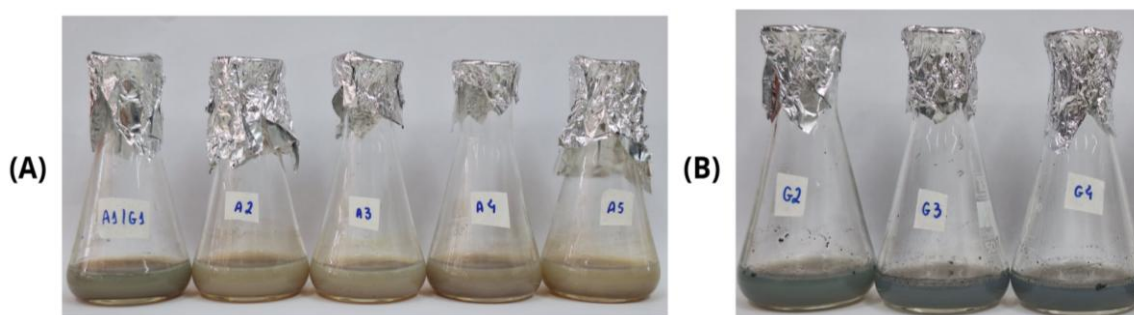
Figura 26. Erlenmeyer com formação de crosta de prata e vidro de penicilina contendo alíquota da amostra de AgNP aquecida a 90 °C.



Fonte: Este trabalho.

Seguindo as proporções propostas na etapa de ancoragem (**Quadro 2**), foram obtidas 9 amostras de nanocompósitos AgNPs-OG utilizando a amostra AgNP 85 °C (**Figura 27**).

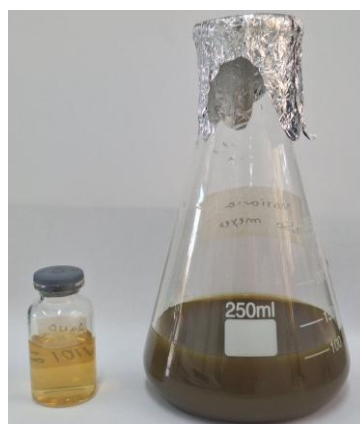
Figura 27. Amostras de AgNPs-OG nas diferentes proporções. **A:** Amostras nas quais foram aumentadas a proporção de AgNPs e mantida a proporção de OG. **B:** Amostras nas quais foram aumentadas a proporção de OG e mantida a proporção de AgNPs.



Fonte: Este trabalho.

Na repetição do protocolo para a obtenção das amostras A1, A2 e A4, as AgNPs apresentaram a coloração esperada inicialmente (amarelo-intenso/marrom) quando realizado o ajuste de pH antes do aquecimento a 85 °C, como observado na **Figura 28**.

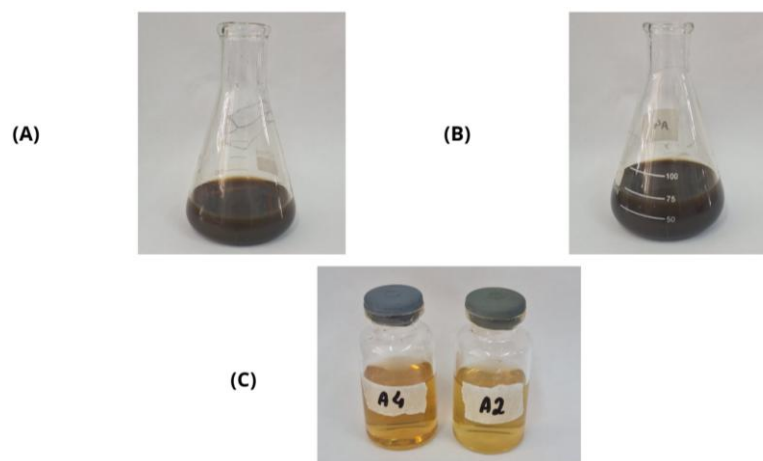
Figura 28. Amostra de AgNPs com pH ajustado antes do aquecimento a 85 °C. Erlenmeyer contendo a amostra concentrada, enquanto o vidro de penicilina contém a amostra diluída em 10x.



Fonte: Este trabalho.

Ao realizar a ancoragem das AgNPs na dispersão de OG, a coloração se manteve amarelo-intenso/marrom, como é possível observar na *Erro! Autoreferência de indicador não válida..*

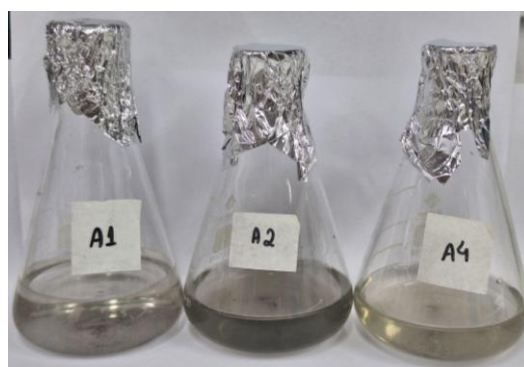
Figura 29. Amostras de AgNPs-OG após a etapa de ancoragem. **A:** Amostra A2 concentrada. **B:** Amostra A4 concentrada. **C:** Amostras A4 e A2 diluídas em água destilada (10x).



Fonte: Este trabalho.

Em todas as repetições do protocolo, a etapa de purificação apresentou dificuldades, visto que a sedimentação era difícil. Os *pellets* formados pela centrifugação não estavam firmemente aderidos à parede do tubo e acabavam se soltando e se ressuspendendo acidentalmente, perdendo muito conteúdo ao descartar o sobrenadante. As amostras finais perderam coloração (**Figura 30**).

Figura 30. AgNPs-OG após purificação e funcionalização.



Fonte: Este trabalho.

Ao final da síntese, o nanocompósito A1 sem PEI rendeu $0,1 \text{ g L}^{-1}$, enquanto com PEI rendeu $0,4 \text{ g L}^{-1}$. Já o nanocompósito A2 sem PEI rendeu $0,6 \text{ g L}^{-1}$ e com PEI, 1 g L^{-1} . E o nanocompósito A4 sem PEI apresentou rendimento de $0,2 \text{ g L}^{-1}$ e com PEI de $0,6 \text{ g L}^{-1}$. Esses valores foram utilizados para o cálculo da concentração mínima inibitória.

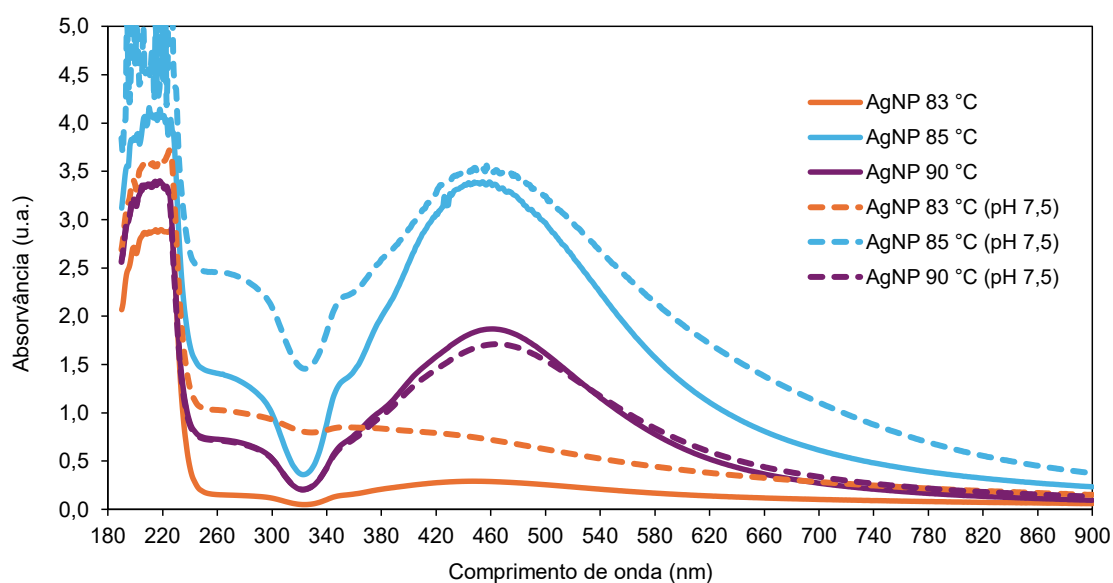
5.4. CARACTERIZAÇÃO DOS NANOCOMPÓSITOS

5.4.1. ESPECTROSCOPIA DE ABSORVÂNCIA NA REGIÃO UV-Vis

A leitura de UV-Vis foi realizada não só com as amostras finais, mas também durante todo o protocolo. Deste modo, foi possível observar, por exemplo, como o pH influencia significativamente nos resultados das sínteses. De acordo com Singh *et al.* (2009), AgNPs com diferentes valores de pH apresentam diferença de distribuição de tamanho das partículas, alterando os valores de absorção na UV-Vis.

Os resultados abaixo (**Figura 31**) demonstram o motivo do ajuste de pH e o principal motivo da escolha da amostra aquecida a $85 \text{ }^\circ\text{C}$ (com pH ideal) para a continuação do protocolo: pico de absorvância de maior intensidade.

Figura 31. Espectros UV-Vis das soluções de AgNPs aquecidas no banho-maria a diferentes temperaturas, com e sem ajuste de pH.

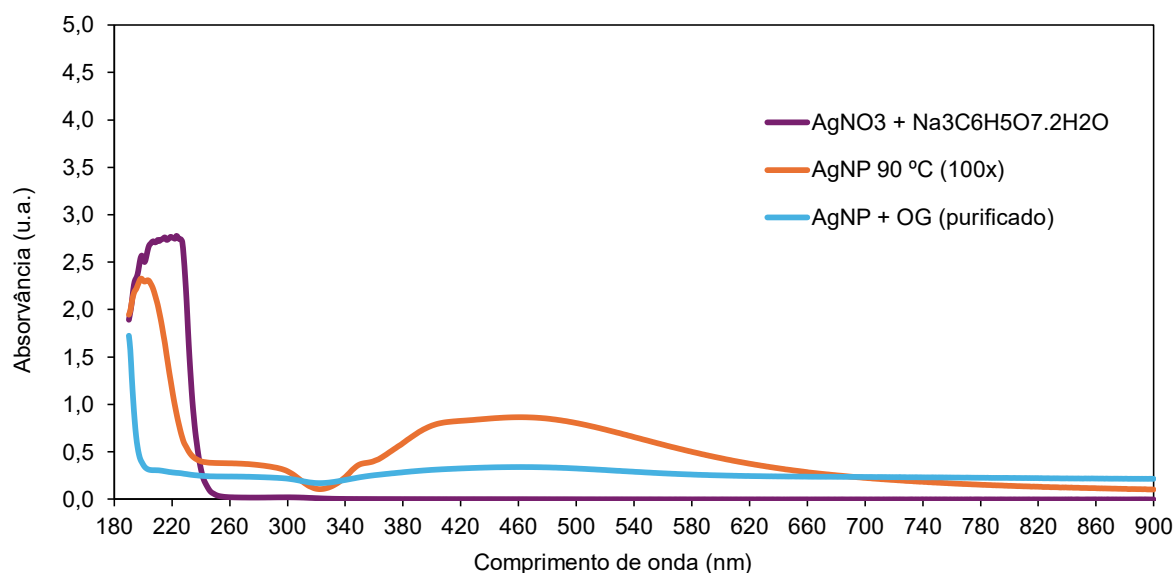


Fonte: Este trabalho.

Todas amostras de nanopartículas e nanocompósitos apresentaram pico de absorvância na região esperada (400 nm), porém perderam intensidade após a etapa de purificação (**Figura 32**, **Figura 33**, **Figura 34** e **Figura 35**), provavelmente por perda de material ao descartar pellet dispersado no sobrenadante.

A etapa da purificação é essencial para melhor caracterização e funcionamento adequado dos nanocompósitos, retirando impurezas e os compostos em excesso que não reagiram (Ahmad *et al.*, 2020), por isso, deve ser mantida no protocolo, porém, em sínteses futuras, talvez seja importante considerar o aumento da força G da centrifugação, ou talvez diminuir a quantidade de rodadas de lavagem.

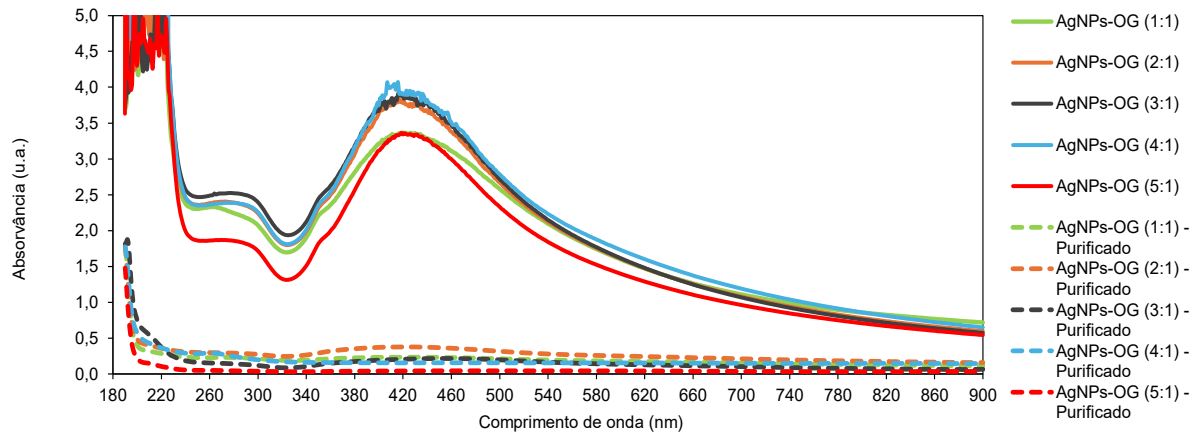
Figura 32. Espectros UV-Vis das soluções de prata antes e após formação das nanopartículas e antes e após purificação.



Nota: Solução AgNP 90°C diluída de 100x.

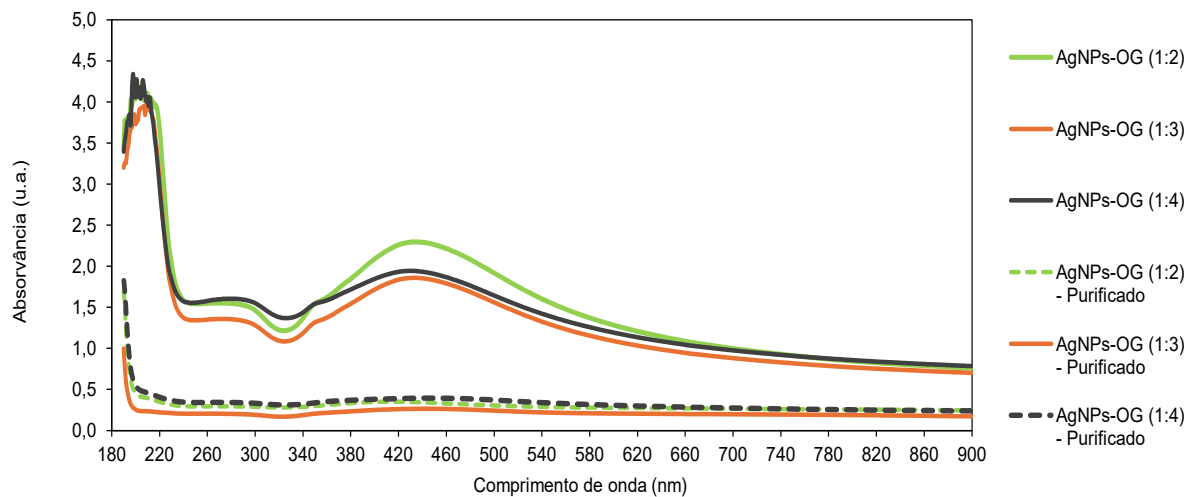
Fonte: Este trabalho.

Figura 33. Espectros UV-Vis dos nanocompósitos com diferentes proporções de AgNPs, antes e após a purificação.



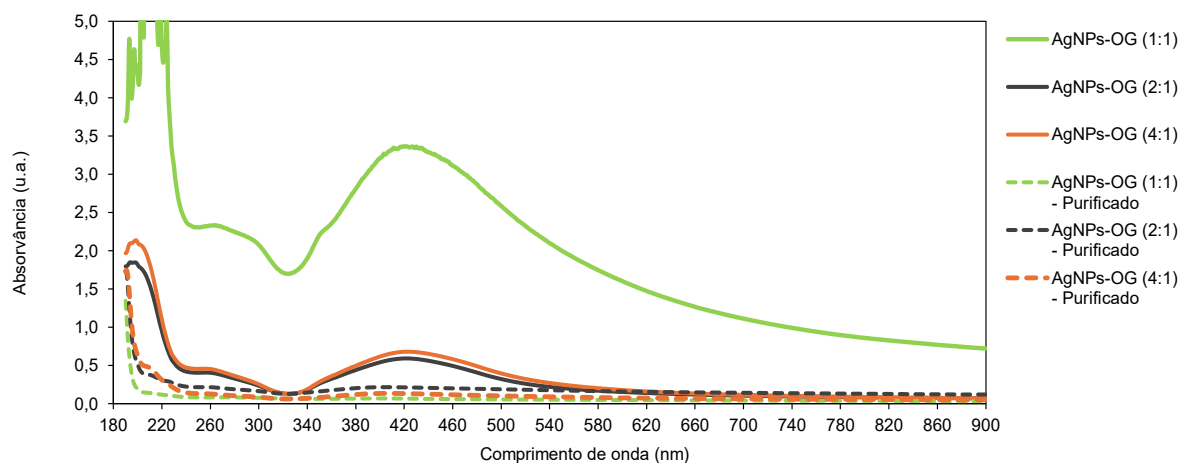
Fonte: Este trabalho.

Figura 34. Espectros UV-Vis dos nanocompósitos com diferentes proporções de OG, antes e após a purificação.



Fonte: Este trabalho.

Figura 35. Espectros UV-Vis dos nanocompósitos que foram sintetizados novamente, antes e após a purificação.



Fonte: Este trabalho.

5.4.2. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

Nenhuma das amostras obtidas fluoresceu. Esse resultado se deu provavelmente devido à ação de *quenching* causada nas AgNPs pelo óxido de grafeno (OG).

O grafeno puro não emite fluorescência, uma vez que não possui *band gap* para os elétrons se moverem. Quando ele é oxidado e vira óxido de grafeno, são introduzidos grupos funcionais contendo oxigênio (-C-O, -C=O, -COOH), quebrando a estrutura contínua de carbono sp^2 do grafeno, formando ilhas, ou *band gaps*, entre as ligações sp^2 e sp^3 , possibilitando a excitação dos elétrons e seu retorno para a camada de valência inicial, emitindo luz. Quando as AgNPs são iluminadas, seus elétrons são facilmente transferidos para a camada superficial do OG, que é mais carregada. Essa energia recebida pelo OG é rapidamente dissipada como calor ou vibração, não emitindo fluorescência (Xiao *et al.*, 2022).

5.5. DIFUSÃO DINÂMICA DE LUZ (DLS) E POTENCIAL ZETA

Os resultados obtidos a partir da leitura de DLS e Potencial Zeta (**Tabela 6**) foram analisados em conjunto. A amostra contendo $AgNO_3 + Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$, sem passar pela reação de redução para gerar AgNP, foi utilizada como parâmetro inicial de comparação.

As amostras de AgNP aquecidas a 83 °C e 85 °C obtiveram resultados parecidos, com seu tamanho hidrodinâmico relativamente menor em comparação ao controle e maior valor absoluto do potencial zeta, indicando maior estabilidade (Bhattacharjee, 2016). Os picos de tamanho de maior predominância nas duas nanopartículas se encontram dentro ou bem próximo dos parâmetros da Recomendação 2011/696/UE, que diz que um nanomaterial deve consistir de 50% ou mais de partículas tendo tamanho de 1 a 100 nm (a AgNP 85 °C foi selecionada para continuação do protocolo pela soma destes resultados com os obtidos na leitura UV-Vis). A amostra AgNP 90 °C ainda é relativamente estável, mas já apresenta valores de tamanho predominante mais altos.

Das nanopartículas que obtiveram resultados positivos na triagem de potencial antimicrobiano, foi possível observar a mudança que o PEI ocasionou no Potencial Zeta, deixando os valores mais positivos. Isso se dá pelo fato de que o PEI é um polímero catiônico com alta densidade de cargas positivas (Lee *et al.*, 2011)

Tanto antes e depois da funcionalização, a amostra de AgNPs-OG que apresentou as características mais dentro do esperado (tamanho hidrodinâmico de predominância dentro da faixa nanométrica e alto valor absoluto de potencial zeta) foi a A2 e a que apresentou características mais divergentes do esperado (tamanho hidrodinâmico de predominância muito alto e valores absolutos de potencial zeta muito baixos, indicando agregação e baixa estabilidade) foi a A1 funcionalizada, com mais de 50% das partículas tendo tamanho hidrodinâmico fora da escala nanométrica. Enquanto isso, a amostra A4 apresentou tamanho hidrodinâmico esperado, porém menor estabilidade, principalmente sem PEI.

Estudos como o de Bao *et al.* (2022), que também produziram nanocompósitos de nanopartículas de prata e óxido de grafeno - porém sem funcionalização com PEI -, obtiveram como resultado de DLS um tamanho hidrodinâmico médio de 455.9 ± 84.42 nm e um potencial zeta de -16.8 mV, indicando que os resultados podem variar bastante a depender de como foi o protocolo de síntese dos compostos.

Tabela 6. Resultados da caracterização (DLS e Potencial Zeta) dos nanocompósitos.

(continua)

Amostra	Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)	Picos (nm)			Potencial Zeta
		Máximo [faixa] (abundância %)			
AgNO ₃ + Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2 H ₂ O	185	147 [32 - 988] (94,34 %)	> 1000 (5,66%)	--	-10,2
AgNP 83 °C	81	8 [4-14] (8,64 %)	99 [35 - 206] (91,36 %)	--	-38,9
AgNP 85 °C	81	8 [4 - 16] (8,35 %)	101 [28- 265] (91,65 %)	--	-33,5
AgNP 90 °C	687	245 [90-876] (92,33 %)	> 1000 (7,67 %)	--	-26,3
AgNPs-OG (1:1) (purificado)	6940	310 [206 - 422] (68,28 %)	> 1000 (31,72 %)	--	0,6
AgNPs-OG (1:1) (purificado) com PEI	3081	8 [5 - 7] (0,24 %)	155 [90 - 224] (48,62 %)	> 1000 (51,14 %)	5,5

(continua)

Amostra	Diâmetro hidrodinâmico médio (nm)	Picos (nm)			Potencial Zeta
		Máximo [faixa] (abundância %)			
AgNPs-OG (2:1) (purificado)	202	233 [36 - 736] (97,93 %)	> 1000 (2,07 %)	--	-24,3
AgNPs-OG (2:1) (purificado) com PEI *	2080	37 [19 - 65] (11,02 %)	165 [77 - 365] (65,77 %)	> 1000 (23,21 %)	21,6
AgNPs-OG (4:1) (purificado)	1725	20 [16 - 21] (1,31 %)	207 [124 - 301] (61,66 %)	> 1000 (37,03 %)	2,9
AgNPs-OG (4:1) (purificado) com PEI	3362	5 [3 - 7] (0,58 %)	242 [133 - 570] (72,55 %)	> 1000 (26,87 %)	13,8

Nota¹: A amostra A2 (purificado) com PEI* apresentou 3 picos com valores maiores que 1000 nm, sendo compilados em apenas um valor de porcentagem. **Nota²:** Os dados mais relevantes estão em negrito.

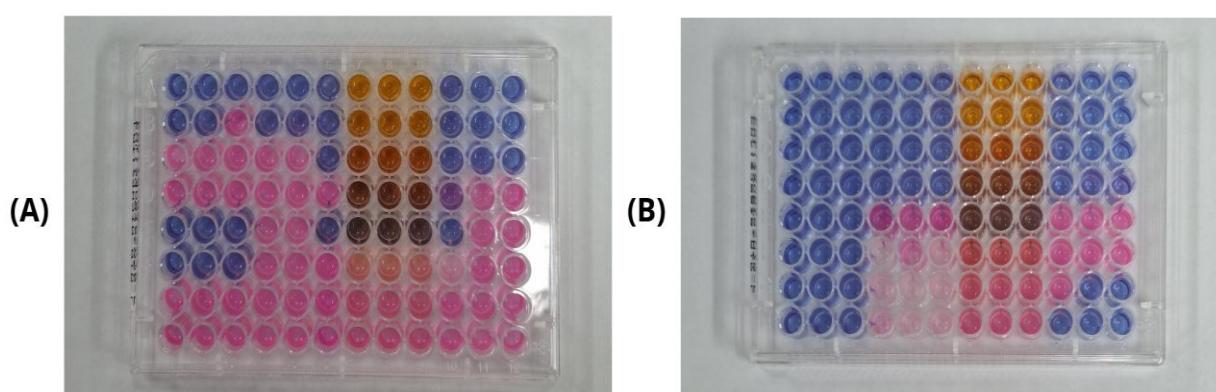
5.6. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO

As triagens de potencial antimicrobiano foram realizadas com os isolados de código CR-08 e BU-07, escolhidos com base nos resultados dos ensaios de

degradação de HPA e goma xantana, realizados com lugol e vermelho congo. Ambos os isolados faziam parte do grupo que apresentou degradação para os dois polímeros e foram escolhidos de forma aleatória.

A triagem inicial (**Figura 36**) teve seus resultados analisados a partir de diluições realizadas nas amostras, para avaliar, primeiramente, se seria observada alguma inibição. Das amostras contendo apenas AgNPs, as três apresentaram inibição contra o isolado BU-07, enquanto as de 83 °C e 85 °C apresentaram inibição contra o isolado CR-08, sendo estes últimos mais significativos do que os primeiros (vistos apenas na menor diluição). Das amostras contendo os nanocompósitos, as que apresentaram melhor taxa de inibição foram as denominadas A1, A2 e A4, sendo estas selecionadas para a segunda triagem, realizada após funcionalização com PEI.

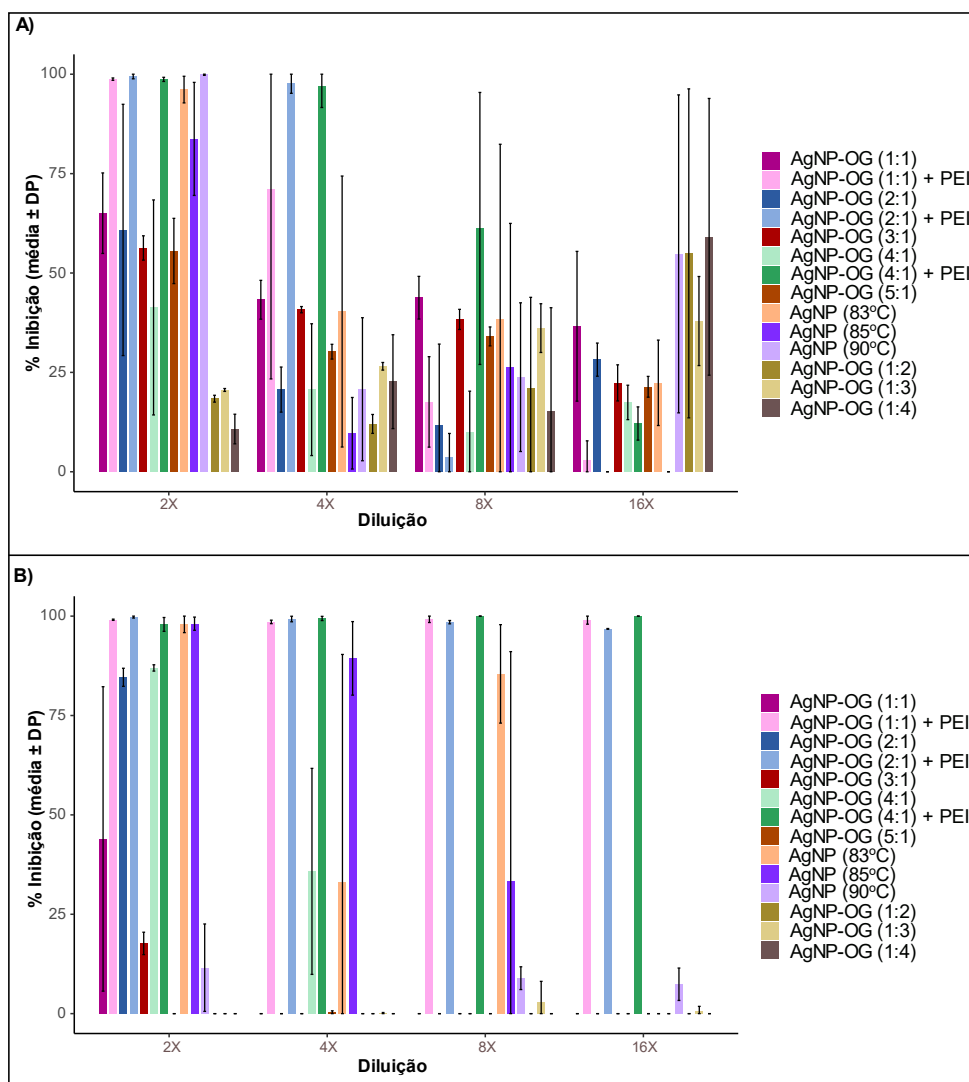
Figura 36. Ensaio de potencial antimicrobiano realizado com resazurina. **A:** Placa em que foi inoculado o isolado de código BU-07. **B:** Placa em que foi inoculado o isolado de código CR-08.



Fonte: Este trabalho.

Na segunda triagem, também realizada com diluições dos nanocompósitos selecionados, foram obtidos resultados de inibição das três amostras, principalmente contra o isolado CR-08, na qual a inibição ainda se manteve significativa mesmo na maior diluição (**Figura 37**).

Figura 37. Potencial antibacteriano dos nanocompósitos (AgNPs-OG). A) Potencial antibacteriano dos AgNPs-OG contra o isolado BU-07. B) Potencial antibacteriano dos AgNPs-OG contra o isolado CR-08.



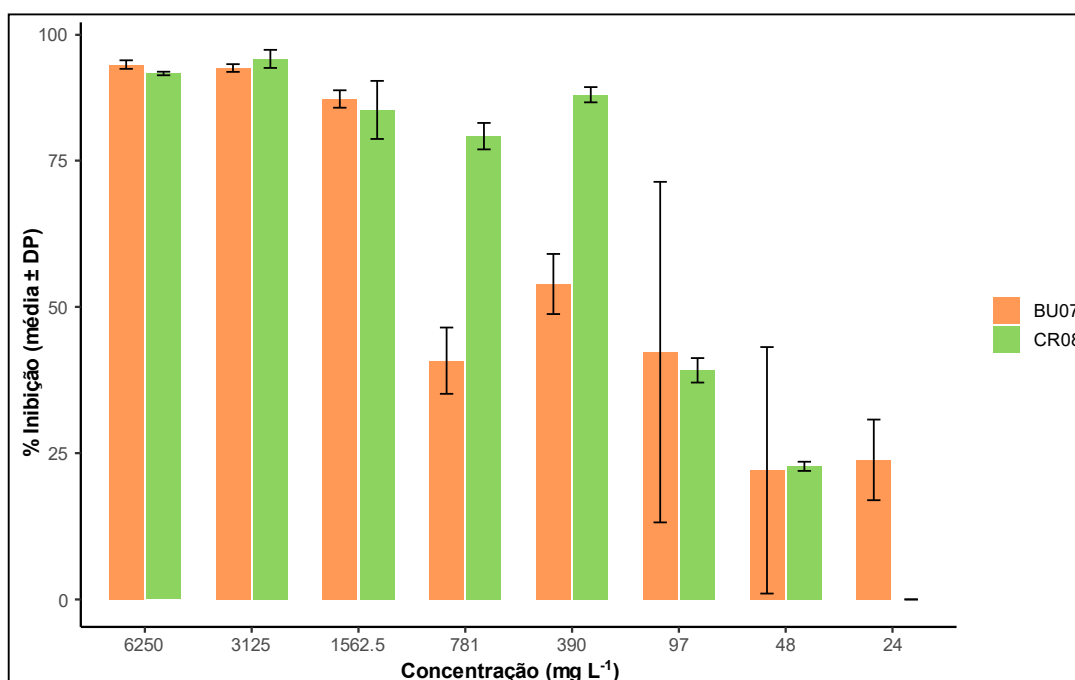
Fonte: Este trabalho.

O glutaraldeído é o biocida utilizado nos fluidos de perfuração atualmente, uma vez que ele funciona fazendo um “*cross linking*” entre aminas e proteínas nas membranas bacterianas, alterando sua permeabilidade, causando imobilização de enzimas e precipitando componentes citoplasmáticos, sendo efetivo contra crescimento bacteriano e a formação de biofilmes, além de não ser seletivo, atingindo um amplo espectro microbiano (Kahrilas *et al.*, 2016; Migneault *et al.*, 2009; Maillard, 2002). Além de tóxico para bactérias, o glutaraldeído possui alta toxicidade contra humanos quando seu vapor é inalado, podendo causar asma ocupacional, ou em

contato com a pele ou olhos, mesmo em baixíssima quantidade – concentrações como 0,13% podem causar dermatite alérgica, e a concentração mínima para danos sensibilizantes à pele e à respiração não é conhecida, sendo suposta como 0,1% por ser a concentração permitida em cosméticos (Searl; Galea, 2011).

Não há uma concentração exata recomendada para FPs descrita na literatura, uma vez que o comportamento e a eficácia do glutaraldeído mudam conforme as condições (temperatura, salinidade, pH) dos poços (Kahrilas et al., 2016). Mesmo este trabalho apresentando CIM do glutaraldeído de 1562,5 mg L⁻¹ para BU-07 e 390 mg L⁻¹ para CR-08 (**Figura 38**), a Petrobras, nas suas formulações de fluido, aplica a quantidade de de 856 mg L⁻¹ de glutaraldeído, sendo uma concentração intermediária do encontrado, porém ainda extremamente alta e tóxica. Neste caso, seria muito interessante a possibilidade de substituí-lo por outro composto (as AgNPs-OG) e em quantidades muito menores e menos tóxicas.

Figura 38. Concentração inibitória mínima do glutaraldeído contra os isolados BU-07 e CR-08.



Fonte: Este trabalho.

A partir das concentrações finais obtidas de cada nanocompósito, foi possível realizar a última triagem e calcular a concentração inibitória mínima (CIM) de cada

uma (**Figura 39**). De maneira geral, as amostras se mostraram mais efetivas contra o isolado CR-08, incluindo a amostra contendo apenas PEI.

O PEI, como um composto policatiônico, tem ação bactericida envolvendo uma interação destrutiva com a parede celular e/ou a membrana plasmática bacteriana, provavelmente ligada à redistribuição dos fosfolipídios, as desorganizando de maneira irreversível, além de agregar e precipitar compostos intracelulares como lipídeos e ácidos nucleicos (Azevedo *et al.*, 2014). De acordo com o estudo de Helander *et al.* (1997), o PEI tem caráter permeabilizador que afeta a membrana externa de bactérias Gram-negativas, apesar de que, no geral, apresenta maior atividade antibiótica contra bactérias Gram-positivas.

Outro fator importante a ser considerado nessa análise de resultados é o peso molecular do PEI utilizado - no presente estudo foi utilizado PEI de 2000 g mol^{-1} -, uma vez que esse caráter afeta o potencial bactericida do composto. Baseado nos experimentos de Xu *et al.* (2016), complexos PEI-AgNPs feitos com PEI de pesos moleculares mais baixos apresentaram comportamento antibacteriano mais intenso. Um estudo de Liu; Zhang e Chen (2025) comparou as atividades de um PEI de 10000 g mol^{-1} e de outro de 1800 g mol^{-1} contra bactérias resistentes a antibióticos (MSSA e MRSA), apresentando resultados de concentração mínima inibitória (CIM) menores para o PEI₁₈₀₀: contra MSSA, as CIM foram, respectivamente, de 512 mg L^{-1} e 256 mg L^{-1} ; enquanto contra MRSA, as CIM foram, respectivamente, de 128 mg L^{-1} e 64 mg L^{-1} .

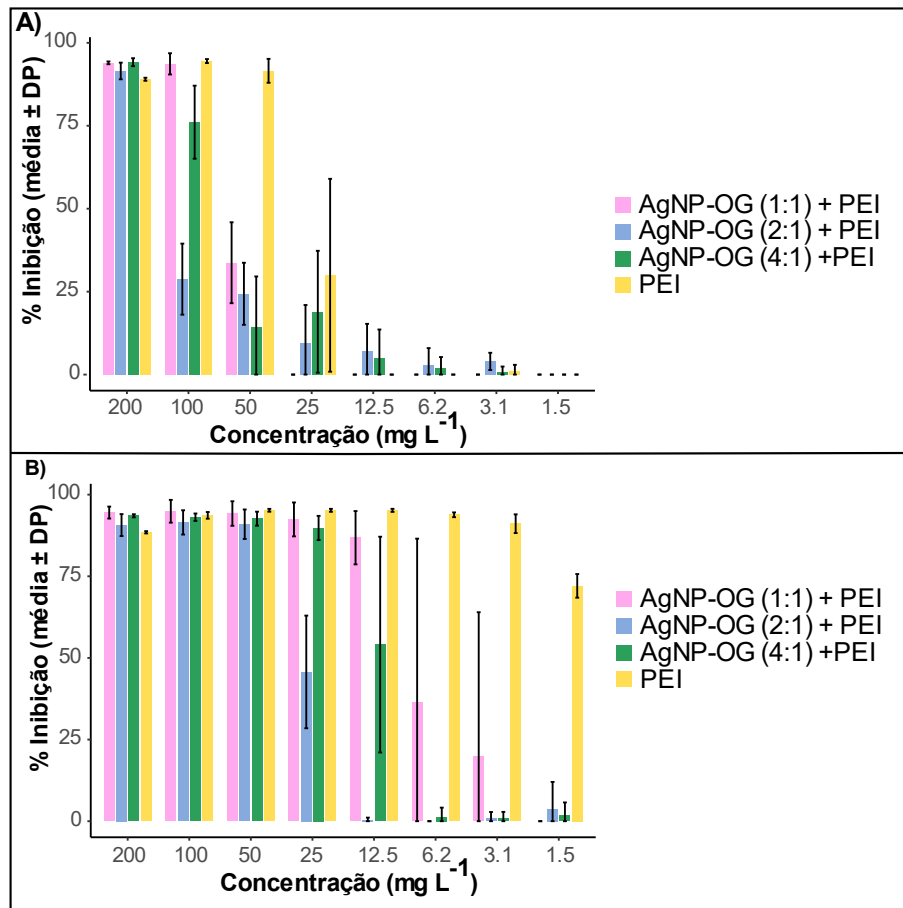
De acordo com o CLSI (2022, M07), a concentração inibitória mínima (CIM) corresponde à menor concentração que inibe totalmente o crescimento. Sendo assim, contra o isolado BU-07, o nanocompósito A1 tem CIM de 100 mg L^{-1} , enquanto A2 e A4 têm CIM de 200 mg L^{-1} . Já contra o isolado CR-08, o nanocompósito A1 tem CIM de $12,5 \text{ mg L}^{-1}$, enquanto A2 tem CIM de 50 mg L^{-1} e A4 tem CIM de 25 mg L^{-1} .

Em um estudo de Cobos *et al.* (2020), a CIM de AgNPs-OG encontrada contra bactérias Gram-negativas foi de 64 mg L^{-1} , enquanto para *S. aureus* (Gram-positiva) foi de 32 mg L^{-1} , sendo estes valores intermediários aos que foram obtidos neste estudo.

Em relação ao PEI, contra o isolado BU-07 foi apresentada CIM de 50 mg L^{-1} , enquanto contra o isolado CR-08 o resultado foi muito satisfatório, apresentando CIM

de $3,1 \text{ mg L}^{-1}$ (concentrações menores que as observadas na literatura, com PEI de peso molecular parecido).

Figura 39. Concentração inibitória mínima (CIM) dos nanocompósitos (AgNPs-OG). A) CIM dos AgNPs-OG contra o isolado BU-07. B) CIM dos AgNPs-OG contra o isolado CR-08.



Fonte: Este trabalho.

6. CONCLUSÃO

Os fluidos de perfuração abrigam uma microbiota diversa e complexa, na qual há a predominância de bactérias do gênero *Bacillus*, características por serem encontradas em todos os tipos de ambiente, incluindo ambientes com condições adversas como os poços de perfuração, uma vez que tem a capacidade de formar esporos resistentes. Além disso, possuem relevância na degradação de polímeros como a Goma Xantana e o Hidroxipropilamido (HPA), já que são produtoras de diversas enzimas extracelulares. Tais características reforçam a importância do monitoramento microbiológico dos sistemas de perfuração, visando manter a integridade operacional.

Paralelamente aos isolamentos, a síntese dos nanocompósitos de nanopartículas de prata associadas ao óxido de grafeno (AgNPs-OG) apresentou resultados com potencial antimicrobiano significativo contra os isolados selecionados para as triagens. Entre as formulações testadas, destacaram-se aquelas funcionalizadas com PEI (polietilenoimina), cuja maior eficiência pode ser atribuída não só à maior estabilidade que confere o composto produzido, como também à sua própria atividade antimicrobiana intrínseca. Para usos futuros, os nanocompósitos A2 e A4 são os mais promissores, somando todas as caracterizações e a concentração inibitória mínima.

Para aprofundar ainda mais a compreensão das propriedades físico-químicas dos AgNPs-OG, fazem-se necessários protocolos de caracterização complementares aos realizados no projeto, como a espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) para identificação de grupos funcionais e confirmação das interações químicas entre os componentes presentes na dispersão. Além disso, seria interessante a implementação de técnicas de microscopia, preferencialmente microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET), como foi observado na literatura, utilizadas para análise morfológica, medição de tamanho real das partículas e características superficiais.

Além do desenvolvimento de novas caracterizações, é necessário melhorar a identificação microbiana com novos sequenciamentos e expandir as triagens, utilizando um espectro maior de isolados nas avaliações de potencial antimicrobiano, incluindo espécies com diferentes perfis metabólicos (de preferência incluindo outros

gêneros encontrados além de *Bacillus*). Também seria pertinente a realização de tais testes utilizando um *pool* de isolados, simulando, de maneira mais realista, a estrutura complexa da microbiota dos FPs, para identificar se a eficácia dos nanomateriais se dá apenas em ambiente controlado de laboratório ou em condições próximas às do ambiente de operação.

Por fim, as análises devem-se estender à avaliação da atuação dos AgNPs-OG diretamente nos fluidos de perfuração e sua interação com os polímeros analisados, visando observar seu impacto sobre as propriedades reológicas de ambos. Tais etapas são fundamentais para validar a aplicabilidade prática do uso dos nanocompósitos como inovação no contexto industrial

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAH, Md *et al.* A review on multifunctional applications of nanoparticles: Analyzing their multi-physical properties. *Results in Surfaces and Interfaces*, v. 21, n. 100635, p. 100635, 2025.

AHMAD, B., Shireen, F., Rauf, A., Shariati, M. A., Bashir, S., Patel, S., Khan, A., Rebezov, M., Khan, M. U., Mubarak, M. S., & Zhang, H. (2021). Phyto-fabrication, purification, characterisation, optimisation, and biological competence of nano-silver. *IET Nanobiotechnology*, 15(1), 1–18. <https://doi.org/10.1049/nbt2.12007>

AL-THANI, Roda F.; PATAN, Noorunnisa Khanam; AL-MAADEED, Mariam A. Graphene oxide as antimicrobial against two Gram-positive and two Gram-negative bacteria in addition to one fungus. *OnLine journal of biological sciences*, v. 14, n. 3, p. 230–239, 2014.

ARAÚJO, Alice dos Santos. [POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA PRODUZIDAS POR SÍNTESE VERDE]. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em 2021) – Disponível em: <https://repositorio.unisc.br/jspui/bitstream/11624/3303/1/Alice%20dos%20Santos%20Araujo.pdf>

ASSIS, Denilson de Jesus. Influência da aeração e agitação nas propriedades das gomas xantana produzidas por *Xanthomonas campestris mangiferaeindicae* 2103 com glicerina residual do biodiesel: otimização e cinética do bioprocesso. Salvador: Universidade Federal da Bahia, Escola Politécnica, 2014. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Disponível em: <https://repositorio.ufba.br/bitstream/ri/18960/1/Dissertação>

AZEVEDO, M. M., Ramalho, P., Silva, A. P., Teixeira-Santos, R., Pina-Vaz, C., & Rodrigues, A. G. (2014). Polyethyleneimine and polyethyleneimine-based nanoparticles: novel bacterial and yeast biofilm inhibitors. *Journal of Medical Microbiology*, 63(Pt 9), 1167–1173. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.069609-0>

AZWATUL, H. M. *et al.* Plant-based green synthesis of silver nanoparticle via chemical bonding analysis. *Materials today: proceedings*, 2023.

BAO, Yunhui *et al.* In situ green synthesis of graphene oxide-silver nanoparticles composite with using Gallic acid. *Frontiers in chemistry*, v. 10, p. 905781, 2022.

BEMILLER, J. N. Starches: molecular and granular structures and properties. *Carbohydrate chemistry for food scientists*, v. 3, p. 159-189, 2019. apud Borba *et al.*, 2021

BEMILLER, J. N., & Huber, K. C. (2009). Chapter 1 - Rheological Properties of Starch. In J. N. Bemiller, & R. L. Whistler (Eds.), *Starch: Chemistry and Technology* (3rd ed., pp. 165-212). Academic Press.

BEREZINA, Oksana V. *et al.* Xanthan: enzymatic degradation and novel perspectives of applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 1 dez. 2024.

BHATTACHARJEE, S. (2016). DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release: Official Journal of the Controlled Release Society*, 235(C), 337–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>

BORBA, Verônica Simões de *et al.* MODIFICAÇÕES DO AMIDO E SUAS IMPLICAÇÕES TECNOLÓGICAS E NUTRICIONAIS. In: *Ciência e Tecnologia de Alimentos: pesquisa e práticas contemporâneas*. [S.l.]: Editora Científica Digital, 2021. p. 428–457.

BRITO, Josimar Elpídio de *et al.* Ação antimicrobiana das nanopartículas de prata (AgNPs) estabilizadas em extrato de jurema preta (*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.). *Research, Society and Development*, v. 11, n. 8, p. e10011830617, 2022.

BUNCH, J.S., *et al.* (2008) Impermeable Atomic Membranes from Graphene Sheets. *Nano Letters*, 8, 2458-2462.

CAI, Xiang *et al.* Sodium 1-naphthalenesulfonate-functionalized reduced graphene oxide stabilizes silver nanoparticles with lower cytotoxicity and long-term antibacterial activity. *Chemistry, an Asian journal*, v. 7, n. 7, p. 1664–1670, 2012.

CHEN, Yanyan *et al.* “Graphene nanospikes exert bactericidal effect through mechanical damage and oxidative stress”. *Carbon*, v. 218, n. 118740, p. 118740, 2024.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically*. 12. ed. Wayne, PA: CLSI, 2024. (CLSI standard M07).

COBOS, M., De-La-Pinta, I., Quindós, G., Fernández, M. J., & Fernández, M. D. (2020). Graphene oxide-silver nanoparticle nanohybrids: Synthesis, characterization, and antimicrobial properties. *Nanomaterials* (Basel, Switzerland), 10(2), 376. <https://doi.org/10.3390/nano10020376>

COMISSÃO EUROPEIA. Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial (2011/696/EU). *Jornal Oficial da União Europeia*, L 275, p. 38–40, 20 out. 2011.

COSTA, Anna Carolina Amorim. [Incorporação de diferentes sólidos e seus efeitos nas propriedades de fluidos de perfuração]. Dissertação (Mestrado em Ciências e Engenharia de Materiais) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM), Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2018. Disponível em:

<https://dspace.sti.ufcg.edu.br/bitstream/riufcg/21093/3/ANNA%20CAROLINA%20AMORIM%20COSTA%20-%20DISSERTA%C3%87%C3%83O%20PPGCEM%202018.pdf>

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. Química de Alimentos de Fennema. 5. ed. Porto Alegre: 2019. apud Borba *et al.*, 2021

DE MORAES, Ana Carolina Mazarin *et al.* Graphene oxide-silver nanocomposite as a promising biocidal agent against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. International journal of nanomedicine, v. 10, p. 6847–6861, 2015.

DIAS, Brenna Mendes. Estudo de fluidos de perfuração microemulsionados e de fluidos base água com diferentes granulometrias de pó de concha de marisco. 2023. Trabalho Final de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) — Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2023. Disponível em: https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/27932/1/TCC%20final_Brenna%20Mendes%20Dias.pdf

DONMEZ, D.; PINHO, L.; PATEL, B.; DESAM, P.; CAMPANELLA, O. H. Characterization of starch–water interactions and their effects on two key functional properties: starch gelatinization and retrogradation. Current Opinion in Food Science, v. 39, p. 103–109, 2021. apud Borba *et al.*, 2021

DURÁN, Nelson *et al.* NANOTOXICOLOGIA DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA: TOXICIDADE EM ANIMAIS E HUMANOS. Química nova, 2018.

FANG, Yujie *et al.* Multilocus sequence analysis, a rapid and accurate tool for taxonomic classification, evolutionary relationship determination, and population biology studies of the genus *Shewanella*. Applied and environmental microbiology, v. 85, n. 11, 2019.

FENTANES, E. G. Polisacarídeos microbianos. In: RAMIREZ, R. Q. Prospectiva de la biotecnología em México. México: Fundación Javier Barros Sierra, p.73-92, 1985. apud Assis, 2013

GEIM, A. K.; NOVOSELOV, K. S. The rise of graphene. *Nature materials*, v. 6, n. 3, p. 183–191, 2007.

GHANNAM, Mamdouh T. *et al.* Flow characteristics of xanthan solutions and their crude oil emulsions in terms of thixotropic behavior. *Petroleum science and technology*, v. 37, n. 11, p. 1279–1288, 2019. DOI: 10.1080/10916466.2019.1566363

GLAESER, Stefanie P.; KÄMPFER, Peter. Multilocus sequence analysis (MLSA) in prokaryotic taxonomy. *Systematic and applied microbiology*, v. 38, n. 4, p. 237–245, 2015.

GLICKSMAN, M. Gelling hydrocolloids in food product applications. In: BLANSHARD, J. M. V.; MITCHELL, J. R. Polysaccharides in food. London: Butterworths, p. 185-204, 1979. apud Assis, 2013

HAN, Rui *et al.* Identification of a novel xanthan-binding module of a multi-modular *Cohnella* sp. xanthanase. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, 2024.

HELANDER, I. M., Alakomi, H.-L., Latva-Kala, K., & Koski, P. (1997). Polyethyleneimine is an effective permeabilizer of Gram-negative bacteria. *Microbiology (Reading, England)*, 143 (Pt 10)(10), 3193–3199. <https://doi.org/10.1099/00221287-143-10-3193>

INEEP. Um diagnóstico do segmento de exploração de petróleo e gás no Brasil (2000-2023). [S.l.]: Instituto de Estudos Estratégicos de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis – INEEP, 2024. Disponível em: <https://aepet.org.br/wp-content/uploads/INEEP-diagnostico-do-segmento-de-exploracao-de-petroleo-e-gas-no-brasil-2000-2023.pdf>

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. Nanotechnologies – Terminology and definitions for nano-objects – Nanoparticle, nanofibre and nanoplate. ISO/TS 27687:2008 (E). 1. ed. Geneva: ISO, out 2008. Corrigida em fevereiro 2009.

JANSSON, P. E., Kenne, L. and Lindberg, B. (1975) Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. *Carbohydrate Research*, 45, 275–282. doi:10.1016/S0008-6215(00)85885-1

KAHRILAS, G. A., Blotevogel, J., Corrin, E. R., & Borch, T. (2016). Downhole transformation of the hydraulic fracturing fluid biocide glutaraldehyde: Implications for flowback and produced water quality. *Environmental Science & Technology*, 50(20), 11414–11423. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b02881>

KAMAT, Prashant V. Photophysical, photochemical and photocatalytic aspects of metal nanoparticles. *The journal of physical chemistry. B*, v. 106, n. 32, p. 7729–7744, 2002.

KARAHAN, Hüseyin Enis *et al.* Graphene materials in antimicrobial nanomedicine: Current status and future perspectives. *Advanced healthcare materials*, v. 7, n. 13, p. e1701406, 2018.

KI-WON, S.; YONG-SEOK, K.; GAP-SHIK, C. Rheology of concentrated xanthan gum solutions: steady shear flow behavior. *Fibers and Polymers*, v. 7, n. 2, 129-138, 2006. apud Assis, 2013.

KIM, Meera. Evaluation of degradability of hydroxypropylated potato starch/polyethylene blend films. *Carbohydrate polymers*, v. 54, n. 2, p. 173–181, 2003.

LANSDOWN, A. B. G. Critical observations on the neurotoxicity of silver. *Critical reviews in toxicology*, v. 37, n. 3, p. 237–250, 2007.

LEE, H. J., Lee, S. G., Oh, E. J., Chung, H. Y., Han, S. I., Kim, E. J., Seo, S. Y., Ghim, H. D., Yeum, J. H., & Choi, J. H. (2011). Antimicrobial polyethyleneimine-silver nanoparticles in a stable colloidal dispersion. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 88(1), 505–511. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2011.07.041>

LIU, W., Zhang, J., & Chen, L. (2025). Poly (hexamethylene guanidine): An effective compound in tackling persistent bacterial subpopulations. *Microorganisms*, 13(9), 2002. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13092002>

MACHADO, J. C. Fundamentos e Classificação de Fluidos Viscosos. Reologia e Escoamento de Fluidos – Ênfase na indústria do petróleo. Editora Interciência. Rio de Janeiro, 2002. Pg 1-40. Apud Dias, 2023.

MAILLARD, J.-Y. (2002). Bacterial target sites for biocide action: ANTIBACTERIAL MECHANISMS OF ACTION OF BIOCIDES. *Journal of Applied Microbiology*, 92(s1), 16S-27S. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.92.5s1.3.x>

MARGOS, Gabriele *et al.* MLST of housekeeping genes captures geographic population structure and suggests a European origin of *Borrelia burgdorferi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 105, n. 25, p. 8730–8735, 2008.

MASINA N, Choonara YE, Kumar P, du Toit LC, Govender M, Indermun S, Pillay V. A review of the chemical modification techniques of starch. *Carbohydr Polym*. 2017 Feb 10; 157:1226-1236. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.09.094.

MEHL, Hiary. Nanocompósitos constituídos por grafeno e nanopartículas metálicas: síntese, caracterização e aplicação. 2015. Tese (Doutorado em Química) – Curso de Pós-Graduação em Química, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015.

MIGNEAULT, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J., & Waldron, K. C. (2004). Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *BioTechniques*, 37(5), 790–796, 798–802. <https://doi.org/10.2144/04375RV01>

MILAS, Michel; RINAUDO, Marguerite. Properties of xanthan gum in aqueous solutions: Role of the conformational transition. *Carbohydrate research*, v. 158, p. 191–204, 1986. DOI: 10.1016/0008-6215(86)84017-4

MOHAMMED, Hiba *et al.* Antimicrobial mechanisms and effectiveness of graphene and graphene-functionalized biomaterials. A scope review. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, v. 8, p. 465, 2020.

MØLLER, Marie Sofie; SVENSSON, Birte. Structural biology of starch-degrading enzymes and their regulation. *Current opinion in structural biology*, v. 40, p. 33–42, 2016.

MONDOL, Muhammad Abdul Mojid; SHIN, Hee Jae; ISLAM, Mohammad Tofazzal. Diversity of secondary metabolites from marine *Bacillus* species: chemistry and biological activity. *Marine drugs*, v. 11, n. 8, p. 2846–2872, 2013.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. 16S Ribosomal RNA Reference Sequence Similarity Search – Beta Release Help Document. [s.l.], 29 dez. 2009.

OSTROWSKI, M.P., La Rosa, S.L., Kunath, B.J. *et al.* Mechanistic insights into consumption of the food additive xanthan gum by the human gut microbiota. *Nat Microbiol* 7, 556–569 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01093-0>

PATEL, Jwala *et al.* Xanthan gum derivatives: review of synthesis, properties and diverse applications. *RSC advances*, v. 10, n. 45, p. 27103–27136, 2020. DOI: 10.1039/d0ra04366d

PEREIRA, Fabio Roberto. FLUÍDOS DE PERFURAÇÃO OU LAMA DE PERFURAÇÃO. Disponível em: <<https://pt.linkedin.com/pulse/flu%C3%ADdos-de-perfura%C3%A7%C3%A3o-ou-lama-fabio-roberto-pereira>>.

RAO, C. N. R.; CHEETHAM, A. K. Journal of materials chemistry, v. 11, n. 12, p. 2887–2894, 2001.

REN, Wei *et al.* Cross-habitat distribution pattern of Bacillus communities and their capacities of producing industrial hydrolytic enzymes in Paracel Islands: Habitat-dependent differential contributions of the environment. Journal of environmental management, v. 323, n. 116252, p. 116252, 2022.

RIAZ, Tahreem *et al.* A review of the enzymatic, physical, and chemical modification techniques of xanthan gum. International journal of biological macromolecules, v. 186, p. 472–489, 2021.

SANFELICE, R. C.; PAVINATTO, A.; CORRÊA, D. S. Introdução à nanotecnologia. In: Nanotecnologia aplicada a polímeros, São Paulo: Blucher, 2022, cap. 1, p. 27-47.

SEARL, A., & Galea, K. (2011). Toxicological review of the possible effects associated with inhalation and dermal exposure to drilling fluid production streams. https://www.iom-world.org/wp-content/uploads/2024/04/IOM_TM1104.pdf

SERRA, A. C. S. A influência de aditivos de lama de perfuração sobre as propriedades geoquímicas de óleos. 2003. 146f. Dissertação (Mestrado em Ciências em Engenharia Civil) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro. apud Costa, 2018.

SILVA *et al.* (2022). Síntese e caracterização de nanocompósitos de óxido de grafeno reduzido e nanopartículas de prata. Repositório UNESP.

SILVA, Beatriz Penido. *Estudo do efeito da sedimentação prévia na filtração de fluidos não-Newtonianos*. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química, Tecnologia Química) — Instituto de Tecnologia, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018. Disponível em: <https://rima.ufrjr.br/jspui/bitstream/20.500.14407/13336/3/2018%20-%20Beatriz%20Penido%20da%20Silva.pdf>

SILVA, S. S. S.; NÓBREGA, K. C.; AMORIM, L. V.; LIRA, H. L. Avaliação de amidos modificados empregados na mineração para aplicação em fluidos de perfuração de poços de petróleo. *Revista Materia*, v. 24, n. 3, 2019. DOI: 10.1590/s1517-707620190003.0742

SINGH, M., Sinha, I., & Mandal, R. K. (2009). Role of pH in the green synthesis of silver nanoparticles. *Materials Letters*, 63(3–4), 425–427. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2008.10.067>

SINGH, Richa *et al.* Bacteriogenic silver nanoparticles: synthesis, mechanism, and applications. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 99, n. 11, p. 4579–4593, 2015.

THOMAS, José Eduardo (org.). *Fundamentos da Engenharia de Petróleo*. Rio de Janeiro: Interciência; Petrobras, 2001. Disponível em: https://www.escolaelectra.com.br/alumni/biblioteca/Fundamentos_da_Engenharia_do_Petroleo.pdf

THORMANN, Pedro Tocchetto. Process for obtaining hydroxypropylstarch (HPS) for use in the treatment of drilling wells. US Pat. Appl. Publ. US 2007/0004915 A1, Jan. 04, 2007.

TURNBULL, Peter C. B. Bacillus. In: *Medical Microbiology*. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996.

URLACHER, B., Noble, O. (1997). Xanthan gum. In: Imeson, A.P. (eds) Thickening and Gelling Agents for Food. Springer, Boston, MA. DOI: 10.1007/978-1-4615-2197-6_13

VINOTHINI, Kandasamy; RAJAN, Mariappan. Investigation on the use of graphene as a unique drug delivery platform for dissimilar anticancer drugs. Progress in Bioscience and Bioengineering, v. 1, n. 1, p. 11-17, 2017.

WANG, Yuzi *et al.* How Does Starch Structure Impact Amylolysis? Review of Current Strategies for Starch Digestibility Study. Foods, v. 11, n. 9, 1 maio 2022.

XIA, Younan *et al.* Shape-controlled synthesis of metal nanocrystals: simple chemistry meets complex physics? Angewandte Chemie (International ed. in English), v. 48, n. 1, p. 60–103, 2009.

XIA, Yun; KONG, Yunhong; NIELSEN, Per Halkjær. In situ detection of starch-hydrolyzing microorganisms in activated sludge. FEMS Microbiology Ecology, v. 66, n. 2, p. 462–471, nov. 2008.

XIAO, X., Zhang, Y., Zhou, L., Li, B., & Gu, L. (2022). Photoluminescence and fluorescence quenching of graphene oxide: A review. Nanomaterials (Basel, Switzerland), 12(14), 2444. <https://doi.org/10.3390/nano12142444>

XU, D., Wang, Q., Yang, T., Cao, J., Lin, Q., Yuan, Z., & Li, L. (2016). Polyethyleneimine capped silver nanoclusters as efficient antibacterial agents. International Journal of Environmental Research and Public Health, 13(3), 334. <https://doi.org/10.3390/ijerph13030334>

ZARBIN, A. J. G.; OLIVEIRA, M. M. Nanoestruturas de carbono (nanotubos, grafeno): Quo Vadis? Química Nova, São Paulo, v. 36, n. 10, p. 1533-1539, 2013. DOI: 10.1590/S0100-40422013001000009.

ZARBIN, Aldo J. G. Química de (nano)materiais. *Química nova*, v. 30, n. 6, p. 1469–1479, 2007.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Microrganismos isolados das amostras de fluidos de perfuração.

(continua)

Fonte/Fluido	Código	Meio de Isolamento	Característica da colônia
MRL-24	MR-01	<i>Tryptic Soy</i> Ágar	Colônia puntiforme, borda inteira, plana, superfície lisa, textura manteigosa, translúcida, cor branca
	MR-02	<i>Tryptic Soy</i> Ágar	6 mm, colônia circular, borda inteira/enrolada, umbonada, superfície rugosa, textura viscosa, opaca, cor branca
	MR-03	<i>Tryptic Soy</i> Ágar	Colônia puntiforme, borda inteira, elevada, superfície brilhante, textura manteigosa, opaca com cor amarelo claro
	MR-04	<i>Tryptic Soy</i> Ágar	Colônia circular, plana, superfície brilhante, transparente
	MR-05	<i>Tryptic Soy</i> Ágar	6 mm, colônia circular, borda inteira, plana, superfície lisa (acetinada), manteigosa, opaca, cor bege
	MR-08	<i>Tryptic Soy</i> Ágar	3 mm, colônia puntiforme, borda "scalloped", elevada, superfície brilhante, textura manteigosa, opaca, cor bege-médio
	MR-15	<i>Tryptic Soy</i> Ágar	Colônia circular, com borda inteira, umbilicada, superfície lisa, textura manteigosa, transparente
	MR-13	<i>Tryptic Soy</i> Ágar	3 mm, colônia circular, borda inteira, elevada, superfície rugosa, textura friável, opaca, cor creme
	MR-14	<i>Tryptic Soy</i> Ágar	Colônia circular, elevada, superfície lisa, brilhante, cor branca
MRL-24	MR-06	Ágar R2A	4 mm, colônia circular, borda inteira, umbonada, superfície lisa, textura manteigosa, opaca com cor creme
	MR-07	Ágar R2A	Colônia circular, borda inteira, elevada, superfície lisa (acetinada), textura manteigosa, opaca, cor bege

(continua)

Fonte/Fluido	Código	Meio de Isolamento	Característica da colônia
MRL-24	MR-09	Ágar R2A	Colônia irregular, pulvinada, com borda lobada, superfície rugosa, textura friável (mas com círculos mucosos mais claros), opaca, cor creme
	MR-10	Ágar R2A	7 mm, colônia circular, com borda inteira, umbonada, superfície lisa/fosca, textura manteigosa, opaca, cor creme
	MR-11	Ágar R2A	4 mm, colônia circular, borda inteira, umbonada, superfície lisa, textura manteigosa, opaca com cor creme
	MR-12	Ágar R2A	Colônia circular, borda inteira, elevada, superfície rugosa, textura friável, opaca, cor creme-claro
CRT-25	CR-01	<i>Tryptic Soy</i> Ágar	6 mm, colônia circular, borda pouco serrilhada (mais clara que o centro), plana, superfície lisa fosca, textura manteigosa cor branca opaca
	CR-02	<i>Tryptic Soy</i> Ágar	4 mm, colônia circular, com borda serrilhada, plana, com superfície fosca, textura manteigosa, opaca, cor creme, com mau cheiro
	CR-03	<i>Tryptic Soy</i> Ágar	4 mm, colônia circular, margem inteira, elevada, superfície lisa, textura manteigosa, opaca, cor creme
	CR-04	<i>Tryptic Soy</i> Ágar	6 mm, colônia circular, borda lisa (um pouco mais clara que o centro), plana, superfície fosca e rugosa, opaca, cor branca-bege
CRT-25	CR-05	Ágar R2A	3 mm, colônia circular, margem inteira, elevada, superfície lisa, textura manteigosa, opaca, cor creme
	CR-06	Ágar R2A	4 mm, colônia circular, margem inteira, elevada, superfície brilhante, manteigosa, opaca, com cor creme
	CR-07	Ágar R2A	Colônia irregular, pulvinada, com borda lobada, superfície rugosa, textura pegajosa, opaca/fosca, cor branca
	CR-08	Ágar R2A	1 mm, colônia circular, borda inteira, elevada, lisa brilhante, textura manteigosa e opaca, cor branca

(continua)

Fonte/Fluido	Código	Meio de Isolamento	Característica da colônia
CRT -25	CR-09	Ágar R2A	Colônia irregular, borda "scalloped", plana, superfície lisa/fosca, textura mucosa, cor creme
	CR-10	Ágar R2A	Colônia com formato irregular, margem "scalloped", umbonada, superfície rugosa, viscosa, opaca/fosca, de cor branca
	CR-11	Ágar R2A	<1mm, colônia puntiforme, elevada, margem inteira, superfície brilhante, mucóide, translúcida, cor creme
BR-25	BR-01	<i>Tryptic Soy</i> Ágar	Colônia irregular, borda lobada, superfície brilhante, textura viscosa, cor branca
TOT-20	TO-01	Ágar R2A	Colônia puntiforme, plana, borda inteira, superfície lisa/brilhante, textura manteigosa, translúcida, cor creme
	TO-02	Ágar R2A	Colônia com formato irregular, margem "scalloped", umbonada, superfície rugosa, viscosa, opaca/fosca, de cor branca
	TO-03	Ágar R2A	Colônia circular, plana, borda inteira, opaca/fosca, cor branca
BUZ-23	BU-01	Ágar R2A	Colônia circular, plana, borda inteira, cor creme
	BU-02	Ágar R2A	Colônia circular, plana, borda inteira, opaca/fosca, cor branca
	BU-03	Ágar R2A	Colônia circular, plana, borda inteira, cor amarela
	BU-04	Ágar R2A	1mm, colônia puntiforme, borda inteira, elevada, superfície lisa/brilhante, textura manteigosa, opaca, cor amarelo-claro
	BU-05	Ágar R2A	1mm, colônia puntiforme, borda inteira, elevada, superfície lisa brilhante, textura manteigosa, translúcida de cor amarela
	BU-06	Ágar R2A	3mm, colônia puntiforme, borda inteira, superfície brilhante (aparência molhada), textura manteigosa, translúcida cor bege claro

(continua)

Fonte/Fluido	Código	Meio de Isolamento	Característica da colônia
BUZ-23	BU-07	Ágar R2A	Colônia irregular, borda " <i>scalloped</i> " (mais clara que o centro da colônia), plana, superfície rugosa/fosca, opaca, textura friável, cor branca
Xantana Petrobras	XP-01	Meio Mineral suplementado com Xantana (2,85 g L ⁻¹)	Colônia irregular, borda inteira, convexa, rugosa, textura mucóide (parece que escorre), translúcida, bege/transparente
Xantana LBBMA	XL-01	Meio Mineral suplementado com Xantana (2,85 g L ⁻¹)	Colônia circular, borda serrilhada, plana, superfície lisa fosca, textura manteigosa, translúcida, cor branca
	XL-02	Meio Mineral suplementado com Xantana (2,85 g L ⁻¹)	Colônia irregular, borda serrilhada, plana, superfície fosca textura manteigosa, opaca, cor creme
CRT-25	BD-01	TSA (placa adaptada)	Colônia circular, borda " <i>scalloped</i> ", plana, superfície fosca, consistência friável, opaca, cor branca
	BD-02	TSA (placa adaptada)	Colônia irregular, elevação crateriforme, borda lobada, superfície rugosa, textura viscosa, opaca fosca, cor creme
	MO-01	TSA (placa adaptada)	5mm, colônia circular, borda inteira, plana, superfície lisa/fosca, consistência manteigosa, opaca, cor creme