

PUCRS

ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS
ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

DOUGLAS JOSÉ FARIA

**BIORREMEDIAÇÃO EM DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO COM ÊNFASE NA TÉCNICA DE
ENCAPSULAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS CONSORCIADOS**

Porto Alegre

2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul



BIORREMEDIAÇÃO EM DERRAMAMENTO DE PETRÓLEO COM ÊNFASE NA TÉCNICA DE ENCAPSULAMENTO DE MICRO- ORGANISMOS CONSORCIADOS

DOUGLAS JOSÉ FARIA

ENGENHARIA DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Rogerio V. Lourega

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Almeida Santos

Dissertação realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

Porto Alegre

Fevereiro, 2019

Ficha Catalográfica

F224b Faria, Douglas José

Biorremediação em derramamento de petróleo com ênfase na técnica de encapsulamento de micro-organismos consorciados / Douglas José Faria . – 2019.

120.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Rogerio Vescia Lourega.

Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Almeida Santos.

1. petróleo. 2. micro-organismos. 3. encapsulamento. 4. biorremediação. 5. degradação. I. Lourega, Rogerio Vescia. II. Santos, Fernando Almeida. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
 ESCOLA POLITÉCNICA
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

BIORREMEDIAÇÃO EM DERRAMAMENTOS DE PETRÓLEO COM ÊNFASE NA TÉCNICA DE ENCAPSULAMENTO DE MICRO-ORGANISMOS CONSORCIADOS

CANDIDATO: DOUGLAS JOSE FARIA

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

DR. ROGÉRIO VESCIA LOUREGA - ORIENTADOR

DR. FERNANDO ALMEIDA SANTOS - CO-ORIENTADOR

BANCA EXAMINADORA

DR. CLAUDIO LUIS CRESCENTE FRANKENBERG - DA FACULDADE DE ENGENHARIA
 - PUCRS

DRA. SÍLVIA DIAS DE OLIVEIRA - DA FACULDADE DE BIOCÊNCIAS - PUCRS

DR. EDUARDO CASSEL - PGETEMA - PUCRS

*“Seja a mudança que você deseja
ver no mundo”.*

(Mahatma Gandhi)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, que sempre me apoiou em tudo o que faço e me auxiliou de todas as formas possíveis. À minha mãe Leila e minha irmã Michelly que são o motivo e razão por eu querer ter um futuro melhor. Também dedico ao meu amigo Roberto e à minha segunda mãe Rosane que estiveram sempre ao meu lado nos momentos bons e nos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter colocado pessoas incríveis para me apoiarem e trabalharem junto comigo durante todo o tempo, sem esse apoio eu jamais teria chegado até aqui.

Também quero agradecer ao meu orientador Prof. Dr. Rogerio V. Lourega que tem me ensinado e me aprimorado ao longo de todo esse tempo, obrigado pela paciência, pelo apoio e, principalmente, pelo laço de amizade que criamos. Se algum dia conseguir alcançar o mesmo patamar de conhecimento que você alcançou, desejo lidar com isso da mesma forma que você faz, passando tudo adiante de igual para igual. Admiro muito pessoas que não permitem que um conhecimento elevado às tornem superiores, e você é esse tipo de pessoa, que ensina com humildade.

Agradeço à minha mãe Leila e minha irmã Michelly, que são o motivo de toda a minha persistência e dedicação, e que, mesmo longe, me apoiam de forma extraordinária. Espero que um dia eu possa retribuir tudo o que vocês vêm fazendo por mim. Amo vocês.

Não posso esquecer do meu amigo Roberto e sua família, que estão sempre me incentivando a ser uma pessoa melhor, que reconhecem todo o meu esforço e dedicação e sempre estão ao meu lado.

Também quero agradecer a toda equipe do IPR, que sempre estiveram a minha disposição para ajudar no projeto, a todos vocês agradeço de coração e estarei sempre disposto a ajudá-los. Muito obrigado a todos.

Além das diversas pessoas que me apoiam, também quero agradecer à Petrobrás e à Enzilimp, empresas que apoiaram meu projeto.

Eu acredito que toda conquista é o espelho das pessoas que estão ao nosso redor, pessoas que ajudam, apoiam e te tornam um indivíduo melhor.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	6
AGRADECIMENTOS	7
SUMÁRIO	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE SÍMBOLOS	13
RESUMO	14
ABSTRACT	16
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. Objetivos Específicos	21
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1. Petróleo e seus Derramamentos	22
3.1.1. Principais causas dos derramamentos	29
3.2. Composição Química do Petróleo	30
3.3. Técnicas de Remediação do Petróleo	34
3.3.1. Remediação física e química	35
3.3.2. Remediação biológica.....	36
3.3.2.1. Consórcio de micro-organismos	38
3.3.2.2. Biossurfactantes	38
3.4. Métodos de Imobilização de Micro-organismos/Enzimas	41
3.4.1. Adsorção.....	42
3.4.2. Ligação em superfícies	43
3.4.3. Aprisionamento em matriz porosa	43
3.4.4. Encapsulamento	44
3.4.4.1. Encapsulamento pelo método de extrusão.....	44
3.4.4.1. 46	
3.4.4.2. Alginato de sódio	46
3.5. Caracterização de Cápsulas.....	48

3.5.1. TGA	48
3.5.2. DSC	49
3.5.3. MEV-FEG.....	49
3.5.4. Contagem de células bacterianas viáveis presentes nas cápsulas	50
3.5.5. Índice de emulsificação.....	50
3.5.6. Tensão superficial	51
3.6. Vias de Degradação do Petróleo por Micro-organismos.....	51
3.6.1. Micro-organismos que degradam petróleo	53
3.6.2. Fatores que afetam a biodegradação do petróleo	54
3.6.2.1. pH	54
3.6.2.2. Temperatura	55
3.6.2.3. Matéria orgânica	55
3.7. Métodos de Quantificação dos Componentes do Petróleo	56
4. MATERIAIS E MÉTODOS/RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	57
5. CONCLUSÕES	102
6. TRABALHOS FUTUROS	104
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Diferentes formas de contaminação de petróleo em ambiente marinho (Adaptado de Kingston, 2002).....	23
Figura 3.2. Localização dos 20 derramamentos de petróleo desde 1967 (ITOPF, 2017).....	24
Figura 3.4. Quantidade de petróleo derramado de 1970 à 2016 e principais empresas responsáveis (Adaptado de ITOPF, 2017).	27
Figura 3.5. Derramamentos de grande e pequeno porte de 1970 à 2016 (Adaptado de ITOPF, 2017).	28
Figura 3.6. Número de derramamentos de petróleo comparado com exploração e comércio do petróleo de 1970 à 2016 (Adaptado de ITOPF, 2017).	28
Figura 3.7. Principais causas de derramamento de petróleo (Adaptado de ITOPF, 2017).....	29
Figura 3.8. Principais componentes do petróleo e subgrupos (Adaptado de Kingston, 2002).....	Erro! Indicador não definido.
Figura 3.9. Estrutura de alguns biossurfactantes (Geetha, Banat e Joshi, 2018; Nitschke e Pastore, 2002).....	39
Figura 3.10. Ação de surfactantes em uma gota de água (Oliveira e Dias, 2017)....	41
Figura 3.11. Principais técnicas de imobilização de micro-organismos (Adaptado de Kourkoutas <i>et al.</i> , 2004).	42
Figura 3.12. Esquema do método de extrusão com agitação para produção de cápsulas de micro-organismos (Silva <i>et al.</i> , 2018; Heidebach <i>et al.</i> , 2009).....	46
Figura 3.13. Representação da estrutura do alginato de sódio (Mofidi, Aghai-Moghadam e Sarbolouki, 2000).....	47
Figura 3.14. Estrutura dos cátions ligados aos blocos de alginato formado (Kawaguti e Sato, 2009).....	48
Figura 3.15. Procedimento de diluição seriada e efeito no crescimento microbiano em placas de Petri.	50

Figura 3.16. Processo de degradação aeróbia dos hidrocarbonetos do petróleo (Das e Chandran, 2011).	52
Figura 3.17. Ação das enzimas AlkT e AlkG (Rojo, 2009).	53
Figura 3.18. Valores médios ótimos de pH para crescimento e aumento metabólico dos micro-organismos (Adaptado de Jacques, 2010).	55
Figura 1. Etapa de precipitação de asfaltenos (Ramos, 2014).	85
Figura 2. Etapas de eluição da cromatografia clássica em coluna aberta.	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Os 20 maiores acidentes de derramamentos de petróleo desde 1967 (Adaptado de ITOPF, 2017).....	24
Tabela 3.2. Componentes do petróleo, características e exemplos (Pehlivan e Ozbay, 2018; Onal, Uzun e Putun, 2017; Bacon <i>et al.</i> , 2000).	31
Tabela 3.3. Exemplos de hidrocarbonetos do petróleo (Adaptado de Morais <i>et al.</i> , 2006).....	33
Tabela 3.4. Principais biossurfactantes e micro-organismos produtores (Adaptado de Santos <i>et al.</i> , 2016).	40
Tabela 3.5. Métodos de encapsulamento, vantagens, desvantagens e principais parâmetros (Brun -Graeppi <i>et al.</i> , 2011).	44
Tabela 3.6. Micro-organismos e os substratos alvo de degradação.	53

LISTA DE SÍMBOLOS

AlkB	Alcano Hidroxilase
AlkG	Rubredoxina
AlkT	Rubredoxina Redutase
BTEX	Benzeno, Tolueno, Etilbenzeno e Xileno
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória
G	Ácido Gulurômico
HPA _s	Compostos Policíclicos Aromáticos
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
M	Ácido Manurômico
MEV-FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo
T _g	Temperatura de transição
TGA	Análise Termogravimétrica
UFC	Unidades Formadoras de Colônia

RESUMO

FARIA, Douglas. **Biorremediação em Derramamento de Petróleo com Ênfase na Técnica de Encapsulamento de Micro-organismos Consorciados**. Porto Alegre. 2018. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

Os derramamentos de petróleo causam severos impactos ambientais e econômicos, assim, a técnica de biorremediação vem sendo amplamente estudada com intuito de utilizar micro-organismos para degradação do petróleo. Devido à sua complexa composição, o petróleo torna a ação dos micro-organismos dificultada em relação à metabolização de seus componentes e, por isso, o uso do encapsulamento com inserção de biomassa vegetal fornece proteção e insumo metabólico inicial para produção de biossurfactantes, que aumentam a área superficial de contato entre os metabólitos e os micro-organismos, acarretando no aumento da degradação dos compostos e maior eficiência no processo de biorremediação. Portanto, os objetivos do presente trabalho são analisar as cápsulas produzidas com uso de alginato de sódio, biomassa vegetal e micro-organismos através de técnicas como: TGA, DSC, MEV-FEG e contagem de células bacterianas viáveis, montar um delineamento experimental fatorial fracionado para analisar a importância das variáveis: concentração de cápsulas, diluição do petróleo, agitação, temperatura, duração do processo e substrato utilizado (petróleo bruto ou fração alifática pura) e, posteriormente, avaliar a degradação do petróleo com uso de células microbianas encapsuladas através de um delineamento fatorial completo. Os resultados de TGA e DSC mostraram que as cápsulas têm estabilidade térmica até 42 °C e que o crescimento dos micro-organismos aumenta a estabilidade e a resistência térmica do consórcio de bactérias. O MEV-FEG permitiu visualizar a presença de poros na membrana capsular e o número de células bacterianas viáveis foram maiores em cápsulas contendo 1% (p/v) de alginato de sódio. O índice de emulsificação apresentou um grande aumento (80%) a partir do quinto dia, assim como a tensão superficial teve um grande decréscimo (48%) no mesmo período, indicando uma maior produção de biossurfactante. As análises de degradação mostraram que

todas as variáveis têm impacto no processo biológico, no entanto, as mais importantes são: concentração de substrato, tempo, agitação e temperatura. Portanto, o planejamento fatorial completo indicou que houve um aumento na concentração de C12 na maioria das amostras, mostrando que os hidrocarbonetos de cadeia mais alta estão sendo degradados primeiramente. Quanto às análises capsulares, as mesmas mostraram excelente estabilidade térmica e porosidade, aumento do crescimento microbiológico a baixas concentrações de alginato de sódio, diminuição da tensão superficial e aumento da emulsificação na presença de petróleo.

Palavras-Chaves: petróleo, micro-organismos, encapsulamento, biorremediação, degradação.

ABSTRACT

FARIA, Douglas. **Bioremediation in Petroleum Spill with Emphasis on the Encapsulation Technique of Consortium Microorganisms**. Porto Alegre. 2018. Master Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

Oil spills cause severe environmental and economic impacts, so the bioremediation technique has been widely studied in order to use microorganisms for the degradation of petroleum. Due to its complex composition, petroleum makes the action of the microorganisms difficult in relation to the metabolization of its components and, therefore, the use of the encapsulation with plant biomass insertion provides protection and initial metabolic input for the production of biosurfactants, which increase the surface area of contact between the metabolites and the microorganisms, resulting in increased degradation of the compounds and greater efficiency in the bioremediation process. Therefore, the objectives of the present work are to analyze the capsules produced with the use of sodium alginate, plant biomass and microorganisms through techniques such as: TGA, DSC, MEV-FEG and viable bacterium cell counting, set up a fractional factorial experimental design to analyze the importance of the variables: capsule concentration, oil dilution, agitation, temperature, process duration and substrate used (crude oil or pure aliphatic fraction), and then evaluate the degradation of the oil using encapsulated microbial cells through a factorial design.

The results of TGA and DSC showed that the capsules have thermal stability up to 42 °C and that growth of the microorganisms increases stability and thermal resistance of bacterium consortium. MEV-FEG showed the presence of pores in the capsular membrane and number of viable bacterium cell counts was increases in capsules containing 1% (w / v) sodium alginate. The emulsification index showed a large increase (80%) from the fifth day, just as the surface tension had a great decrease (48%) in the same period, indicating a higher biosurfactant production. The degradation analysis showed that all variables have an impact on the biological process, however, the most important are: substrate concentration, time, agitation

and temperature. Therefore, the full factorial design indicated that there was an increase in C12 concentration in most samples, showing that the higher chain hydrocarbons are being degraded in the first place. As for the capsular analyzes, they showed excellent thermal stability and porosity, increased microbiological growth at low sodium alginate concentrations, decreased surface tension and increased emulsification in the presence of petroleum.

Key-words: petroleum, microorganisms, encapsulation, bioremediation, degradation.

1. INTRODUÇÃO

O petróleo é, sem sombra de dúvida, um produto de alto valor agregado para a sociedade, pois devido ao seu refino, inúmeros produtos são formados e transformados, de forma a torná-lo um componente de destaque econômico mundial (Safdari *et al.*, 2018). Apesar disso, os desastres ambientais causados por derramamentos de petróleo têm sido uma grande preocupação e alvo de críticas pela sociedade, pois ele é uma das maiores fontes de contaminantes como poluentes orgânicos (benzeno, tolueno, etc.) e inorgânicos, elementos como vanádio, arsênio, níquel, etc., que oferecem grande risco para o meio ambiente e para a saúde pública (Brady, Brady e Borns, 2018).

O número de derramamentos de petróleo têm diminuído nas últimas décadas devido ao maior estudo em relação ao controle operacional das etapas de extração e transporte do petróleo bruto. Apesar disso, ainda se registram diversos derramamentos em ambientes naturais devido a, principalmente, fontes de erro operacionais, como o controle de fluxo de petróleo, manutenção, entre outros (IOTPF, 2017; Figueiredo, Alvarez e Adams, 2018).

O petróleo possui diversos componentes complexos que dificilmente são retirados, em sua totalidade do ambiente poluído e, os métodos para remediação são de alto custo e não podem garantir uma remoção muito eficiente (Morais *et al.*, 2006). Após o derramamento, o petróleo fica sujeito a diversos processos como evaporação, espalhamento, dissolução, entre outros e, todos esses processos influenciam no tratamento e recuperação do ambiente contaminado (Kingston, 2002).

Com intuito de analisar e compreender técnicas de remoção dos componentes do petróleo em ambientes poluídos, vários métodos e formas de tratamento vêm sendo estudados (Murado *et al.*, 2011). Uma das técnicas mais

atuais, com alta eficiência e baixo custo é o uso de micro-organismos que degradam alguns componentes químicos do petróleo (Santos e Maranhão, 2018).

Os processos biológicos, quando comparados aos processos físicos e/ou químicos, são mais seguros, menos agressivos ao meio ambiente, mais eficientes e possuem menor custo de operação. Entretanto, o estudo relacionado ao substrato e ao metabolismo microbiano deve ser realizado para otimizar o processo de degradação, o que ocasiona uma pesquisa mais apurada e demorada antes da utilização desta técnica (Mulligan, 2005; Perfumo *et al.*, 2018). Assim, a biorremediação é uma tecnologia ecológica para remediação de ambientes marinhos contaminados por petróleo, pois usa o estímulo da atividade microbiana para que ocorra a degradação dos compostos orgânicos e, também, a transformação de compostos inorgânicos (Mulligan *et al.*, 2014; Perfumo *et al.*, 2018).

Existem diversos micro-organismos que possuem características específicas de degradação de compostos presentes no petróleo, e, devido aos inúmeros micro-organismos, a técnica de consórcio vem sendo utilizada, pois possibilita que a ação enzimática seja mais eficiente e o número de enzimas produzidas para o metabolismo seja maior (Cao *et al.*, 2012). Logo, uma comunidade com três ou mais micro-organismos é inserida no ambiente poluído de forma a aumentar a eficiência do processo de biodegradação do petróleo no ambiente marinho (Das e Chandran, 2011).

Uma preocupação na utilização de micro-organismos é o efeito causado por ações físicas e químicas do ambiente, como agitação, temperatura, disponibilidade de nutrientes, presença de metais pesados, entre outros (Klein *et al.*, 2012). Assim, uma técnica para combater tal problema é a produção de cápsulas que contendo uma concentração de micro-organismos, tais cápsulas possuem poros que permitem o contato do micro-organismo e das enzimas com o substrato (compostos do petróleo) e, ao mesmo tempo, protegem a comunidade microbiana de agentes físicos e químicos que podem interferir na eficiência do processo de degradação (Etchepare *et al.*, 2016).

Outro aspecto muito importante é a produção de biossurfactantes pelos micro-organismos, tais moléculas são anfipáticas e permitem uma maior e mais

facilitada área de contato entre o micro-organismo e o substrato. Como grande parte do petróleo não se dissolve em água, a biodegradação ocorre na região interfacial entre o petróleo e a água, assim, o biossurfactante facilita o contato e aumenta a quantidade de moléculas degradadas pelos micro-organismos encapsulados (Oliveira e Dias, 2017).

Portanto, o uso de micro-organismos encapsulados é uma técnica com grande credibilidade e perspectivas de uso em grande escala, logo, estudos mais aprofundados e analíticos devem ser realizados para aumentar a qualidade da técnica que podem ser empregadas em variadas constituições químicas do petróleo.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente trabalho é avaliar o uso da técnica de encapsulamento de micro-organismos consorciados na biorremediação em derramamentos de petróleo, de forma a avaliar diferentes parâmetros que aperfeiçoem a degradação dos compostos alifáticos saturados presentes no petróleo através do metabolismo microbiano.

2.1. Objetivos Específicos

Produzir e avaliar a estabilidade das cápsulas formadas através de análises como: TGA, DSC, MEV-FEG, contagem de células bacterianas viáveis, índice de emulsificação e tensão superficial. Além disso, observar se a presença de biomassa vegetal oriunda da casca de tangerina funciona como substrato inicial para multiplicação dos micro-organismos.

Utilizar o delineamento fatorial fracionado para avaliar a importância de diferentes variáveis, tais como: concentração de cápsulas, diluição do petróleo em meio salino sintético, agitação, temperatura, duração do processo e substrato utilizado (petróleo bruto ou fração alifática saturada pura), no processo de biorremediação. Após, utilizar o fracionamento fatorial completo, com as variáveis mais significantes, para otimizar o processo de degradação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Capítulo dedicado à revisão da literatura sobre o trabalho a ser desenvolvido, destacando as pesquisas básicas, a evolução no tema, o estado da arte, as técnicas para monitoramento, análises e interpretação dos fenômenos, os principais resultados divulgados e as tendências de linhas de pesquisa.

3.1. Petróleo e seus Derramamentos

Petróleo é originário do latim *petroleum*, que vêm de *petru*, que significa “pedra” e *oleum*, óleo, “óleo da pedra”, pois tem fonte rochosa (UNICAMP, 2017). É formado pela decomposição de matéria orgânica de forma lenta, que depositada no subsolo em camadas sucessivas forma bacias sedimentares e, devido à pressão e à temperatura, transforma-se em hidrocarbonetos e formam as jazidas (Paim, 2011).

Quando é extraído, recebe a denominação de *óleo cru*, pois está em seu estado natural, formado por hidrocarbonetos e outros contaminantes em frações menores (Junior, 2017). A partir desse óleo cru, várias frações são obtidas através do refino, tais como: gasolina, querosene, diesel, entre outros (Cui *et al.*, 2018; Moro e Nascimento, 2011). Assim, o petróleo é uma fonte de lucro para diversos países e geram produtos de alto valor agregado, entretanto, também é uma fonte de grandes problemas ambientais devido aos constantes derramamentos de plataformas petrolíferas (Balke e Brown, 2018; Paim, 2011).

Milhões de toneladas de petróleo foram derramados no mar nos últimos anos, sendo que 6.000 toneladas foram derramadas no ano de 2016 (IOTPF, 2017). Logo, são inúmeros os casos de derramamento em todo o mundo e, que se tornam um problema de grande importância ambiental.

Depois que ocorre o vazamento de petróleo, a dimensão e velocidade com que há dispersão depende de fatores como a direção do vento e das marés como apresentado na Figura 3.1.



Figura 3.1. Diferentes formas de contaminação de petróleo em ambiente marinho (Adaptado de Kingston, 2002).

O óleo se espalha por toda a superfície formando uma fina camada que prejudica a troca de nutrientes e a penetração da luz, de forma a afetar o processo fotossintetizante do fitoplâncton (Beazley *et al.*, 2012). Os compostos voláteis e hidrocarbonetos mais leves evaporam de forma rápida e, outra pequena fração pode se aderir a qualquer tipo de material suspenso na coluna d'água e contaminar sedimentos mais profundos (González *et al.*, 2009).

Além disso, a radiação ultravioleta (UV) pode propiciar reações de oxidação, como a fotólise, gerando produtos ácidos e fenólicos que podem ser mais tóxicos que os hidrocarbonetos do petróleo, porém, tais produtos acabam sendo diluídos e seus efeitos tóxicos minimizados quando comparados aos hidrocarbonetos dispostos pelo derramamento (Kingston, 2002).

Da mesma forma descrita, os hidrocarbonetos também acabam sendo

diluídos, entretanto, a dissolução ocorre de forma pequena, pois nem 1% dos hidrocarbonetos se dissolvem em água, assim formam-se pequenas gotas de óleo que são degradados pela inserção de micro-organismos específicos na biota contaminada (Kingston, 2002). A partir da Figura 3.2 podemos visualizar no mapa os principais locais de ocorrência de derramamentos de petróleo.

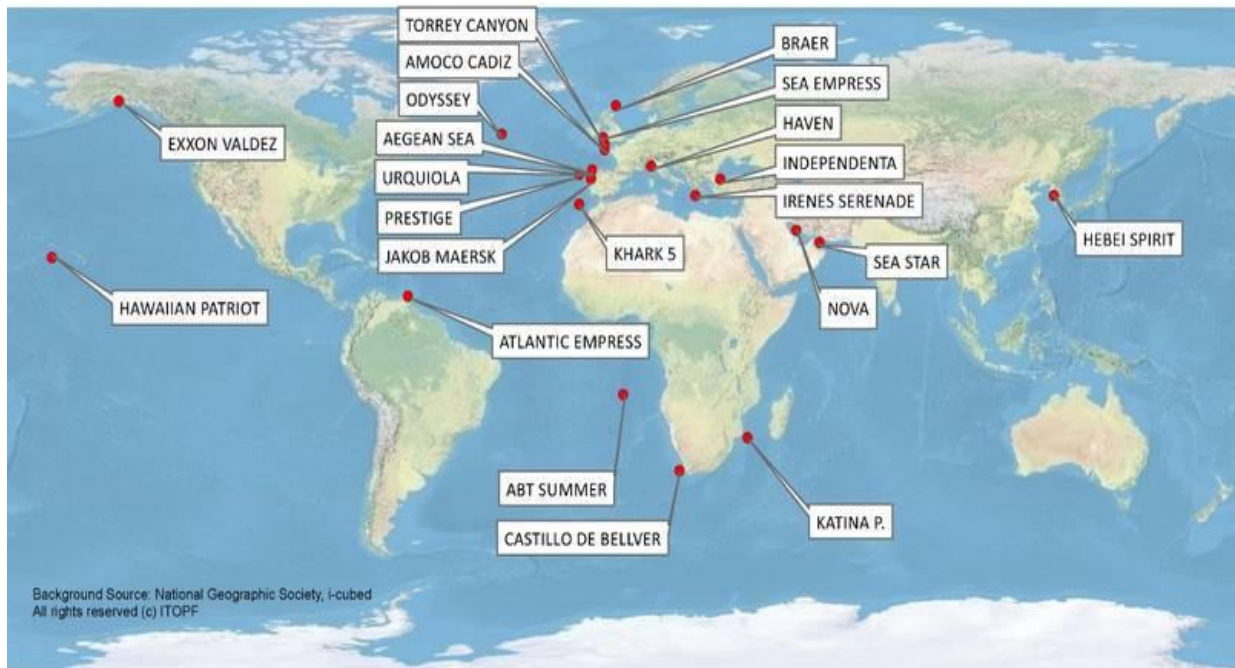


Figura 3.2. Localização dos 20 derramamentos de petróleo desde 1967 (ITOPF, 2017).

A Tabela 3.1 mostra um resumo dos acidentes envolvendo derramamentos e suas principais localizações.

Tabela 3.1. Os 20 maiores acidentes de derramamentos de petróleo desde 1967 (Adaptado de ITOPF, 2017).

Ranking	Nome do navio	Ano	Localização	Quantidade derramada (toneladas)
1	Atlantic Express	1979	Tobago, Caribe	287.000
2	ABT Summer	1991	700 milhas náuticas de Angola	260.000
3	Castillo Bellver	1983	Próximo a baía de Saldanha, África do Sul	252.000
4	Amoco Cadiz	1978	Costa da Bretanha,	223.000

			França	
5	Haven	1991	Genova, Itália	144.000
6	Odyssey	1988	700 milhas náuticas da Nova Escócia, Canadá	132.000
7	Torrey Canyon	1967	Ilhas Scilly, Reino Unido	119.000
8	Sea Star	1972	Golfo de Omã	115.000
9	Irenes Serenade	1980	Baía de Navarino, Grécia	100.000
10	Urquiola	1976	La Coruna, Espanha	100.000
11	Hawaiian Patriot	1977	Próximo a Honolulu, EUA	95.000
12	Independenta	1979	Bósforo, Turquia	94.000
13	Jakob Maersk	1975	Oporto, Portugal	88.000
14	Braer	1993	Ilhas Shetland, Reino Unido	85.000
15	Aegean Sea	1992	La Coruna, Espanha	74.000
16	Sea Express	1996	Milford Haven, Reino Unido	72.000
17	Khark 5	1989	Próximo ao Marrocos	70.000
18	Nova	1985	Próximo à Ilha Kharg, Golfo do Irã	70.000
19	Katina P.	1992	Próximo a Maputu, Moçambique	67.000
20	Petroperu	2016	Região amazônica de Loreto	600 barris

Nos anos 2000, ocorreram 181 derramamentos de petróleo de 7 toneladas ou mais, somando-se 196.000 toneladas, sendo que 10 acidentes são responsáveis por mais de 85% desse total e, entre o período de 2010-2016 foram observados 47 casos de derramamentos resultando em mais de 39.000 toneladas de petróleo

despejados no mar, sendo que 83% correspondem a apenas 10 acidentes (ITOPF, 2017).

O total de acidentes em 2016 gerou um total de petróleo derramado de, aproximadamente, 6.000 toneladas, sendo que a maioria ocorreu em acidentes de grande escala (>700 toneladas). A Figura 3.3 mostra que os derramamentos de petróleo tiveram um decaimento desde 1970, sendo assim, o número médio de grandes vazamentos de petróleo, desde 2010, é de 1,7 por ano (ITOPF, 2017).

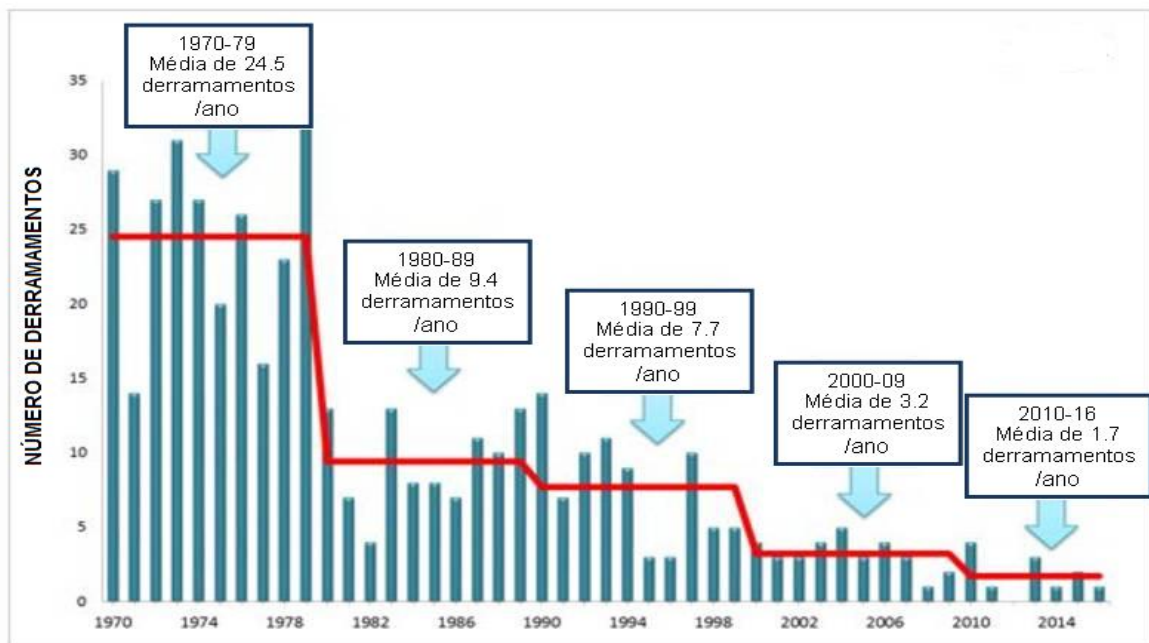


Figura 3.3. Número de derramamentos de petróleo de 1970 a 2016 (Adaptado de ITOPF, 2017).

Já a Figura 3.4, mostra as quantidades derramadas de 1970-2016, e as empresas responsáveis pelos maiores derramamentos durante esse período, sendo que, a diferença de coloração nas barras correspondem a empresa responsável pelo derramamento.

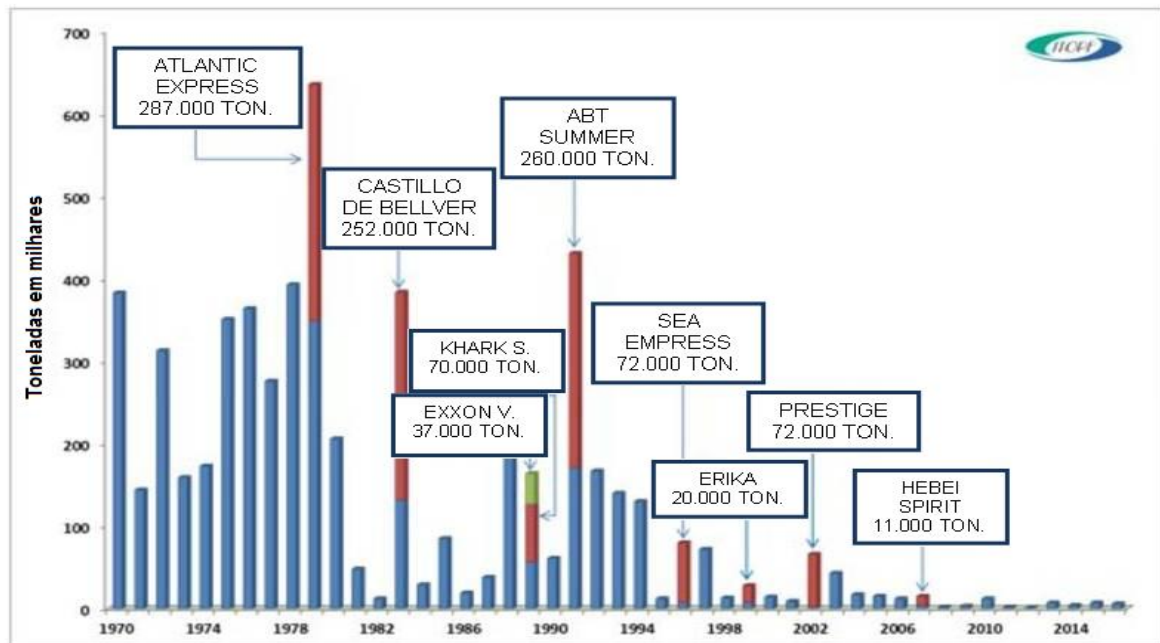


Figura 3.4. Quantidade de petróleo derramado de 1970 à 2016 e principais empresas responsáveis (Adaptado de ITOPF, 2017).

É muito interessante notar que os derramamentos de grande escala tiveram um grande decaimento ao longo das décadas. Além disso, também podemos inferir que derramamentos menores (7-700 toneladas) também diminuíram durante os anos. O número médio de derramamentos por ano na década de 1990 foi de 28,1 toneladas, reduzindo para 14,9 nos anos 2000 e para a década de 2010 é de 5,0, ou seja, a análise de períodos por décadas demonstra a grande efetividade na diminuição mundial dos derramamentos de petróleo (ITOPF, 2017). Na Figura 3.5 podemos observar o número de derramamentos de grande e pequeno porte durante as décadas de 1970-2010.

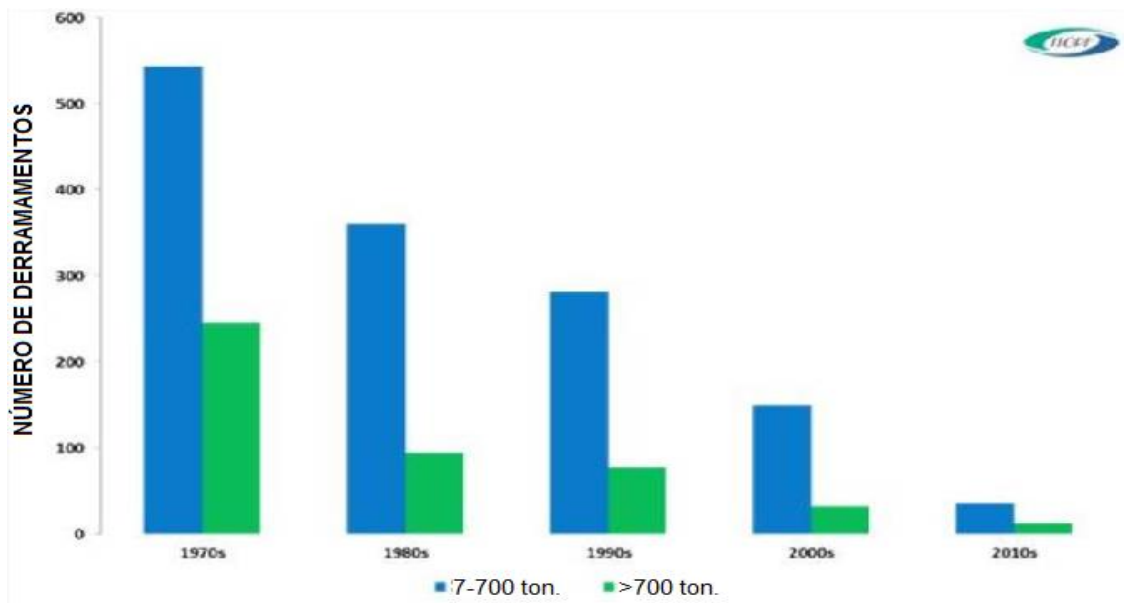


Figura 3.5. Derramamentos de grande e pequeno porte de 1970 à 2016 (Adaptado de ITOPI, 2017).

Através dele, confirmamos a diminuição dos derramamentos de petróleo apesar do aumento do comércio e exploração, conforme mostra a Figura 3.6.



Figura 3.6. Número de derramamentos de petróleo comparado com exploração e comércio do petróleo de 1970 à 2016 (Adaptado de ITOPI, 2017).

3.1.1. Principais causas dos derramamentos

Existem diversas fontes de erro para dar origem a um acidente de derramamento de petróleo. Entretanto, os principais são: erros humanos, incêndios, explosões e encalhe, ainda, devemos considerar o estado do navio e a forma como o mesmo é navegado pois configuram risco para navegação (Fiorati, 1999). No período de 1970 a 2016, quase 50% dos grandes derramamentos ocorreram enquanto as embarcações estavam em andamento em águas abertas, as alocações, colisões e aterramentos representam 59% das causas de derrame. Tais causas ainda tem um grande aumento, cerca de 99%, quando as embarcações estão em andamento em águas restritas (ITOPF, 2017).

A Figura 3.7 apresenta as principais causas de derramamentos e a diferença entre os locais em que ocorreram, confirmando que as causas dos acidentes estão inteiramente ligadas à forma ou estado em que a embarcação se encontra (ancorada ou não, etc.).

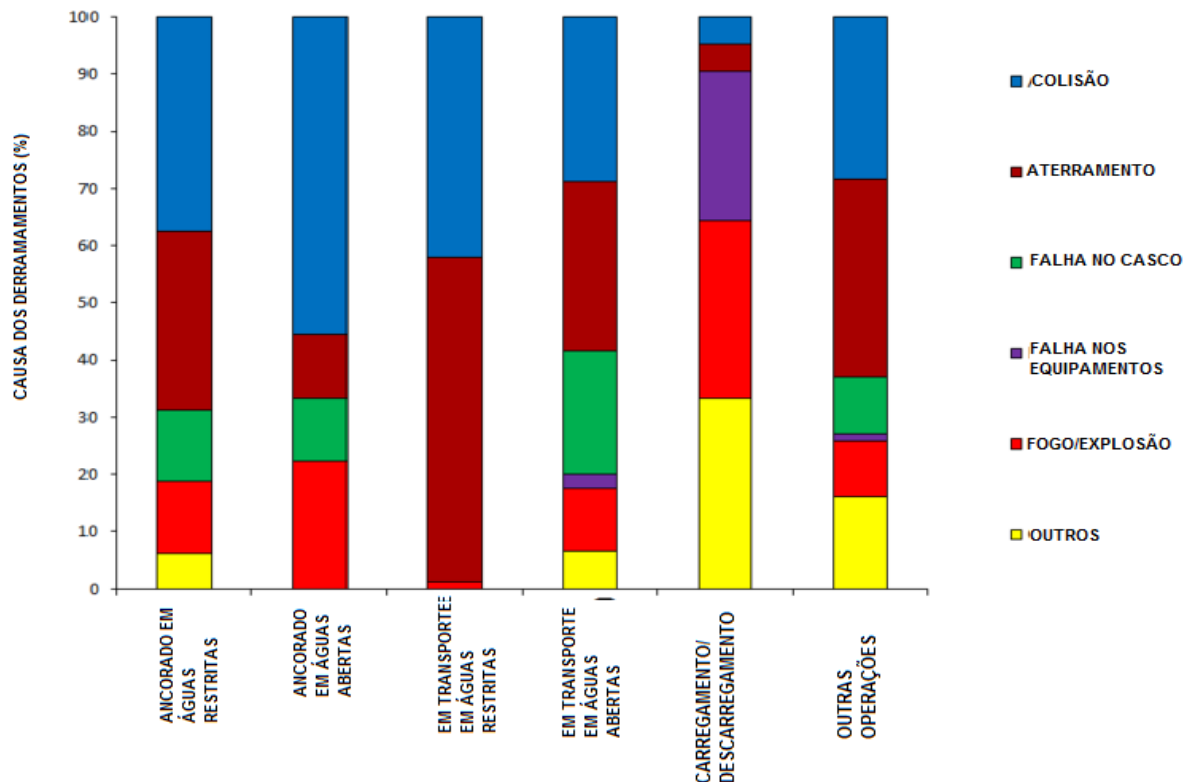


Figura 3.7. Principais causas de derramamento de petróleo (Adaptado de ITOPF, 2017).

3.2. Composição Química do Petróleo

O petróleo possui uma composição química complexa e, de forma geral, possui grandes variações de suas propriedades físicas, como a densidade relativa (0,80-1,00). Pode ser fluido e claro ou até mesmo viscoso e escuro com grandes quantidades de compostos pesados (Hur *et al.*, 2018; Speight, 2001). Tal mistura heterogênea e complexa pode conter milhares de substâncias orgânicas diferentes, dessa forma, são dispostas 4 frações de acordo com a solubilidade em solventes orgânicos: hidrocarbonetos saturados, hidrocarbonetos aromáticos, resinas e asfaltenos (Hur *et al.*, 2018; Chen e Que, 2018; Das e Chandran, 2011).

Os hidrocarbonetos que compõem o petróleo são formados por ligações entre carbono e hidrogênio e podem apresentar diferentes estruturas, tais como: aromáticas e alifáticas (cíclicas ou não) (Cui *et al.*, 2018; Van Hamme, 2003; Andersen, 2001). Os aromáticos são caracterizados por possuírem um anel benzênico em sua estrutura molecular, de forma que são divididos em monocíclicos BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) e policíclicos aromáticos (HPAs) como o antraceno, naftaleno e outros. Já os alifáticos ou parafinas, não possuem anel benzênico em sua estrutura e são formados por cadeias longas mantidas por forças dipolos induzidos e com baixa solubilidade. Além disso, podem ser divididos em: alcanos, alcenos, alcinos e alcadienos (Matapour *et al.*, 2018; Chambers *et al.*, 2018; Akmaz *et al.*, 2011). Com relação aos asfaltenos, ainda não se conhece totalmente a sua composição, porém, possuem, predominantemente, anéis aromáticos condensados, com heteroátomos (oxigênio, nitrogênio e enxofre), substituições alquílicas e compostos metálicos (ferro, níquel, vanádio e outros) (Chamber *et al.*, 2018; Leon, 2000). Com isto, através da Tabela 3.2, podemos observar alguns exemplos de hidrocarbonetos presentes no petróleo e suas características.

Tabela 3.2. Componentes do petróleo, características e exemplos (Pehlivan e Ozbay, 2018; Onal, Uzun e Putun, 2017; Bacon *et al.*, 2000).

Hidrocarbonetos	Características	Exemplos
Alifáticos	<ul style="list-style-type: none"> • Menos densos que a água; • O tamanho da molécula é inversamente proporcional à sua volatilidade e hidrossolubilidade. 	<ul style="list-style-type: none"> • Metano, propano, butano, hexano, octano, hexadecano, eicosano, etc.
Cicloalifáticos	<ul style="list-style-type: none"> • Possuem até 6 átomos de carbono em forma de anel; • Bastante resistentes à degradação microbiana. 	<ul style="list-style-type: none"> • Cicloexano, metilcicloexano, metilciclopentano, etc.
Aromáticos	<ul style="list-style-type: none"> • Muito voláteis; • Possuem anel benzênico; • Resistentes à degradação microbiana. 	<ul style="list-style-type: none"> • Benzeno, naftaleno, tolueno, xileno, fenantreno, etc.

Além disso, podemos utilizar a Figura 3.8, para analisar os diversos componentes existentes no petróleo de forma mais simplificada.

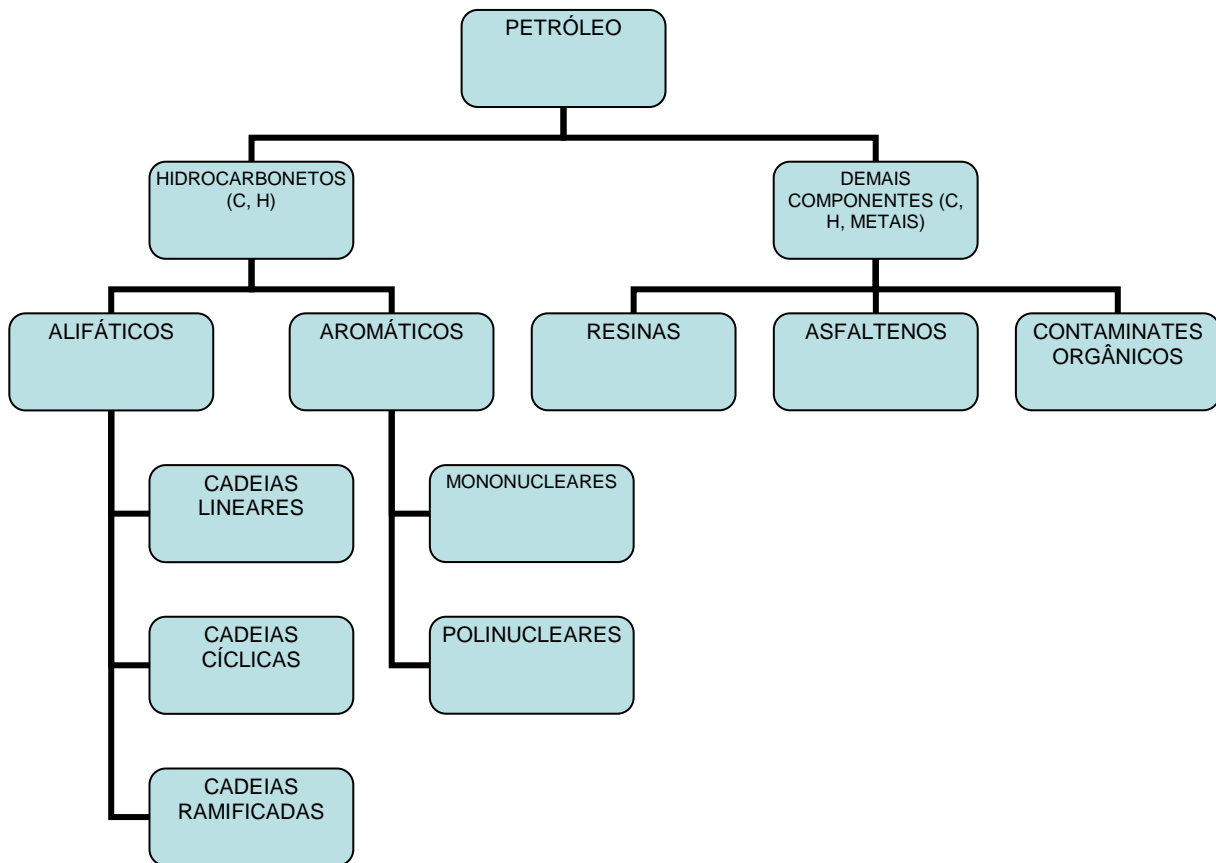


Figura 3.8. Principais componentes do petróleo e subgrupos (Adaptado de Kingston, 2002).

A composição do petróleo descrita na Figura 3.8 destaca os principais grupos e subgrupos de hidrocarbonetos presentes no petróleo (Poulsen *et al.*, 2018). Apesar da alta toxicidade dos componentes, vários compostos podem ser degradados com facilidade apesar de existirem compostos com características recalcitrantes que, devido ao grande tamanho da molécula, tem sua degradação dificultada. Além disso, há associação com moléculas de oxigênio, nitrogênio e enxofre que formam compostos como indol, fenol e tiofeno que atuam como impedidores da degradação (Tyagi *et al.*, 2011). O petróleo também pode ser classificado quanto ao teor de enxofre em doce ou ácido. Os classificados como ácido possuem teor de enxofre superior a 0,5% (p/p) e têm baixo valor comercial devido à alta corrosividade e toxicidade causada pelo enxofre (Shan *et al.*, 2018; Speight, 2006).

As classificações descritas são de grande importância para o estudo da técnica adotada para o refino do petróleo, pois permite avaliar quais micro-

organismos seriam mais viáveis para utilização, com isso, suas características físicas e químicas são imprescindíveis para análise de tratamentos em casos de derramamentos em ambientes aquáticos (Eckert e Skoyhus, 2018; Morais *et al.*, 2006). A Tabela 3.3 apresenta alguns hidrocarbonetos do petróleo de acordo com os grupos de saturados, aromáticos e componentes polares e, também, divisões de subgrupos.

Tabela 3.3. Exemplos de hidrocarbonetos do petróleo (Adaptado de Morais *et al.*, 2006).

Grupos	Sub-grupos	Exemplos
Alifáticos	Lineares	Butano
		Hexano
	Cíclicos	Cicloexano
		Tetraidronaftaleno
	Ceras	Alcanos de cadeia longa
Aromáticos	BTEX	Benzeno
		Tolueno
	HPA	Naftaleno
		Fenantreno
Componentes Polares	Resinas	Tióis
		Decanomarcaptano
	Asfaltenos	Estruturas não conhecidas com grande quantidade de compostos altamente polares devido a presença de heteroátomos e metais.

3.3. Técnicas de Remediação do Petróleo

Existem diferentes técnicas e estudos de remediação em derramamentos de petróleo, dentre eles temos os tratamentos físicos, químicos e biológicos, dos quais os físicos e químicos causam uma maior dispersão do poluente de forma a tornar baixa a eficiência do processo e, além disso, apresentam custo muito elevado (O'Brien *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018; Tyagi *et al.*, 2011; Bao *et al.*, 2012). Entretanto, uma alternativa é o uso de micro-organismos na degradação dos compostos presentes no petróleo, pois apresenta baixo custo e um alto rendimento (Liu *et al.*, 2018; Khan *et al.*, 2004).

Apesar disso, não foram estudados, de forma mais prática, parâmetros de utilização da técnica de biorremediação como tempo de duração e quantidade de micro-organismos e, têm-se um grande aumento de potencial quando se utilizam técnicas em conjunto (Sousa e Spiess, 2018; Khan *et al.*, 2004; Bao *et al.*, 2012). Dessa forma, analisar fatores e parâmetros relativos a inserção de micro-organismos na biorremediação de derramamentos de petróleo pode se tornar uma grande alternativa de degradação dos compostos presentes no poluente. Além disso, deve-se levar em consideração o estudo de micro-organismos mais específicos e eficientes ou, até mesmo, a análise do uso de colônias conjuntas de diferentes micro-organismos para aumento da eficiência e diminuição dos custos (Liu *et al.*, 2018; Tyagi *et al.*, 2011).

As técnicas de remediação dos compostos HPAs, BTEX e hidrocarbonetos presentes no petróleo vêm sendo muito estudadas pelo fato de sua grande contaminação e maior dificuldade de remediação (Orta-Martínez *et al.*, 2018; Sabaté *et al.*, 2001). Já os hidrocarbonetos alifáticos do petróleo possuem baixa solubilidade e, por isso apresentam maior facilidade de degradação. A remoção dos HPAs, BTEX e hidrocarbonetos da água e efluentes está sendo realizada através de processos físico-químicos, como adsorção, ozonização, fotoxidação, entre outros (Pinhati *et al.*, 2014). Entretanto, a maneira mais eficaz para o tratamento e remoção dos diversos grupos de compostos citados é a remediação natural ou biorremediação, cuja técnica baseia-se no uso de micro-organismos para

degradação de compostos tóxicos e difíceis de serem removidos (Partovinia e Naeimpoor, 2018).

Apesar dos inúmeros micro-organismos existentes, é difícil otimizar o uso de diferentes micro-organismos, uma vez que, as condições de sobrevivência dos mesmos são dificultadas nos meios contendo HPAs (Liu e Selby, 2018; Chaillan *et al.*, 2004). Para avaliar a otimização, devemos analisar diversos parâmetros que condicionam a funcionalidade dos micro-organismos como: o pH, concentração de sais, temperatura, agitação, falta ou excesso de substrato, entre outros (Gilbert e Brown, 2018; Kim *et al.*, 2018; Hu *et al.*, 2010).

3.3.1. Remediação física e química

As técnicas de remediação físicas e químicas se baseiam no uso de equipamentos e compostos químicos para dispersar ou solubilizar o petróleo, necessitando de outra etapa processual para remoção. Levando em consideração a fauna e flora presentes no ambiente marinho, tais compostos como os BTEX podem ser altamente tóxicos e causar diversas consequências na biota (Shan *et al.*, 2018; Murado *et al.*, 2011). A inserção desses compostos tóxicos no ambiente marinho pode causar alterações em diversos processos metabólicos dos animais e plantas ali presentes, tais como: interferência nos processos de crescimento, embriogênese e, até mesmo, causar mutações que alteram o ciclo de vida dos organismos (Arsene-Ploetze *et al.*, 2018; Kottumparambil e Agusti, 2018).

Uma das alternativas à dispersão para remoção é a queima do óleo que se localiza na superfície, podendo alcançar uma diminuição de até 10 vezes a concentração desses compostos, entretanto, a parte solúvel que permanece na superfície tem maior potencial de toxicidade para espécies marinhas, dessa forma, a queima do óleo não se torna uma alternativa viável para combater os compostos presentes na superfície (Carlson *et al.*, 2018). Assim, com a dispersão significativa do óleo, a probabilidade de contato entre os animais e os compostos tóxicos é muito maior, de forma a acarretar uma bioacumulação de moléculas com alta toxicidade nos tecidos vivos (Menon e Voordouw, 2018).

Uma forma mecânica de barrar a dispersão é a implementação de barreiras para o bloqueio, com intuito de controlar a mancha de óleo e facilitar a remediação, assim, equipamentos como “skimmers” e diferentes absorventes têm sido usados para tal função (Kelle, 2018; Zhu *et al.*, 2001). Após o controle da dispersão, deve-se recolher o óleo presente, entretanto, parâmetros como o clima e propriedades físico-químicas alteram a forma de recolhimento (Kelle, 2018; Cantagallo *et al.*, 2007). Apesar de aparentar ser uma técnica efetiva, o uso de barreiras apresenta uma eficiência muito baixa, porque até ocorrer bloqueio total do óleo derramado, a dispersão do poluente já é muito extensa, além disso, há grande aderência do petróleo nas rochas e areia (Patrick *et al.*, 2012).

Alguns dos agentes químicos utilizados para conter a dispersão são: os desmulsificantes, que impedem a formação de emulsão do óleo com a água; os solidificantes, que aumentam a polimerização e solidificação do óleo; e os substratos presentes nas regiões costeiras para prevenir a aderência do óleo em rochas e na areia (Patrick *et al.*, 2012). Além disso, podem ser usados surfactantes químicos, que possuem uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica que provocam o aumento da afinidade do óleo com a água (Toor *et al.*, 2018; Aske *et al.*, 2002). Entretanto, por ser um composto químico tem a necessidade de ser retirado do ambiente marinho, tornando o processo mais caro e complexo (Yank *et al.*, 2018; Ramachandran *et al.*, 2004). Outro tipo de surfactante muito estudado cuja aplicação vem sendo analisada em ambientes marinhos são os surfactantes biodegradáveis, também chamados de tensoativos verdes, tais moléculas são degradadas em menos de 24 horas por não possuírem ramificações em sua cadeia carbônica, facilitando a degradação por micro-organismos e reduzindo o impacto ambiental. Entretanto, o alto custo de produção e recuperação desses compostos inviabiliza o seu uso nos processos de biorremediação (Galembeck e Csordas, 2011).

3.3.2. Remediação biológica

A biodegradação de petróleo por micro-organismos depende de diversos fatores, incluindo fatores físicos, químicos e biológicos (Guerra *et al.*, 2018; Cury, 2002). Além disso, temos que a taxa de degradação depende da composição do

óleo, da densidade, da concentração dos hidrocarbonetos, da temperatura, concentração de oxigênio, quantidade de nutrientes, concentração de sais no meio, pressão, agitação e outros parâmetros (Awasthi *et al.*, 2018).

Hidrocarbonetos aromáticos com baixa massa molecular como tolueno, xileno e benzeno são tóxicos e afetam o ambiente de forma drástica imediatamente após o contato com o mesmo, porém, sua degradação ocorre de forma extremamente fácil pelos micro-organismos após a produção de moléculas anfipáticas que possibilitam maior contato entre enzimas e substrato (Bustillo-Lecompte, Kakar e Mehrvar, 2018). Já as moléculas que possuem anéis aromáticos condensados ou possuem ramificações em sua estrutura apresentam maior dificuldade de degradação pelos micro-organismos (Ghazali *et al.*, 2004). Se tais moléculas difíceis de serem degradadas forem comparadas com os hidrocarbonetos de baixa massa molecular, apresentarão menor toxicidade, porém, causam efeitos mais duradouros ou crônicos devido a maior persistência no ambiente (Samanta *et al.*, 2002).

Dessa forma, inúmeros estudos estão abrangendo a descoberta de micro-organismos e associação dos mesmos para degradação do petróleo (Kong *et al.*, 2018; Ruberto *et al.*, 2003). Assim, a biodegradabilidade será afetada de acordo com a complexidade da molécula (Kong *et al.*, 2018). Os *n*-alcanos são os mais simples e, portanto, mais fáceis de serem degradados, depois temos os alcanos de cadeia ramificada, os alquenos ramificados, *n*-alquil ramificados de baixo peso molecular, monoaromáticos, alcanos cíclicos, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) e, o último, os asfaltenos, são os compostos mais difíceis de degradação por micro-organismos (Bustillo-Lecompte, Kakar e Mehrvar, 2018; Haritash e Kaushik, 2009).

A degradação por micro-organismos ocorre de forma que o catabolismo resulta em moléculas muito menores que as originais, com intuito de, após total metabolismo, serem transformadas em água e dióxido de carbono (condições aeróbias) ou metano (condições anaeróbias) (Chadhain *et al.*, 2018; Cury, 2002). Um importante fator que aumenta a biodegradação é a produção e liberação de biossurfactantes, pois aproxima o substrato (hidrocarbonetos) para o processo catabólico dos fungos e bactérias (Geetha, Banat e Joshi, 2018; Bordoloi e Konwar, 2009).

3.3.2.1. Consórcio de micro-organismos

Uma das práticas para utilização de micro-organismos é a técnica de consórcio, onde vários micro-organismos com diferentes características metabólicas são usados para biodegradação de determinados compostos, como os presentes no petróleo (Wolna-Maruwka *et al.*, 2018; Bordoloi e Konwar, 2009).

O consórcio de micro-organismos propicia uma maior e mais variada produção de enzimas que degradam os compostos do petróleo, assim, o processo de degradação ocorre de forma mais eficaz e rápida (Silva *et al.*, 2014). Além disso, um determinado micro-organismo pode produzir metabólitos que servem como substâncias intermediárias para outro micro-organismo do consórcio, auxiliando no metabolismo do mesmo (Cieplak *et al.*, 2018). Portanto, o uso de variados micro-organismos ao mesmo tempo e no mesmo local pode auxiliar no processo de biorremediação, entretanto, os micro-organismos devem possuir enzimas que degradem o composto poluente (Silva *et al.*, 2014).

3.3.2.2. Biossurfactantes

Com o passar dos anos, a sociedade ficou mais interessada em questões relacionadas ao meio ambiente e, por isso, a indústria química criou métodos e produtos menos agressivos para o meio ambiente, dessa forma, o interesse por biossurfactantes e suas fontes naturais microbianas estão sendo estudados mais profundamente (Brumano *et al.*, 2016). De forma natural, diferentes micro-organismos podem produzir diversos surfactantes com inúmeras funções específicas, como os sais biliares, saponinas, surfactantes de origem microbiana, entre outros (Silva *et al.*, 2014). Assim, os biossurfactantes tem ação semelhante à dos surfactantes sintéticos, apresentando uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica e, são classificados de acordo com a composição química da molécula em glicolipídeos, fosfolipídios, entre outros (Geetha, Banat e Joshi, 2018). Através da Figura 3.9 podemos observar a estruturas de alguns tipos de biossurfactantes.

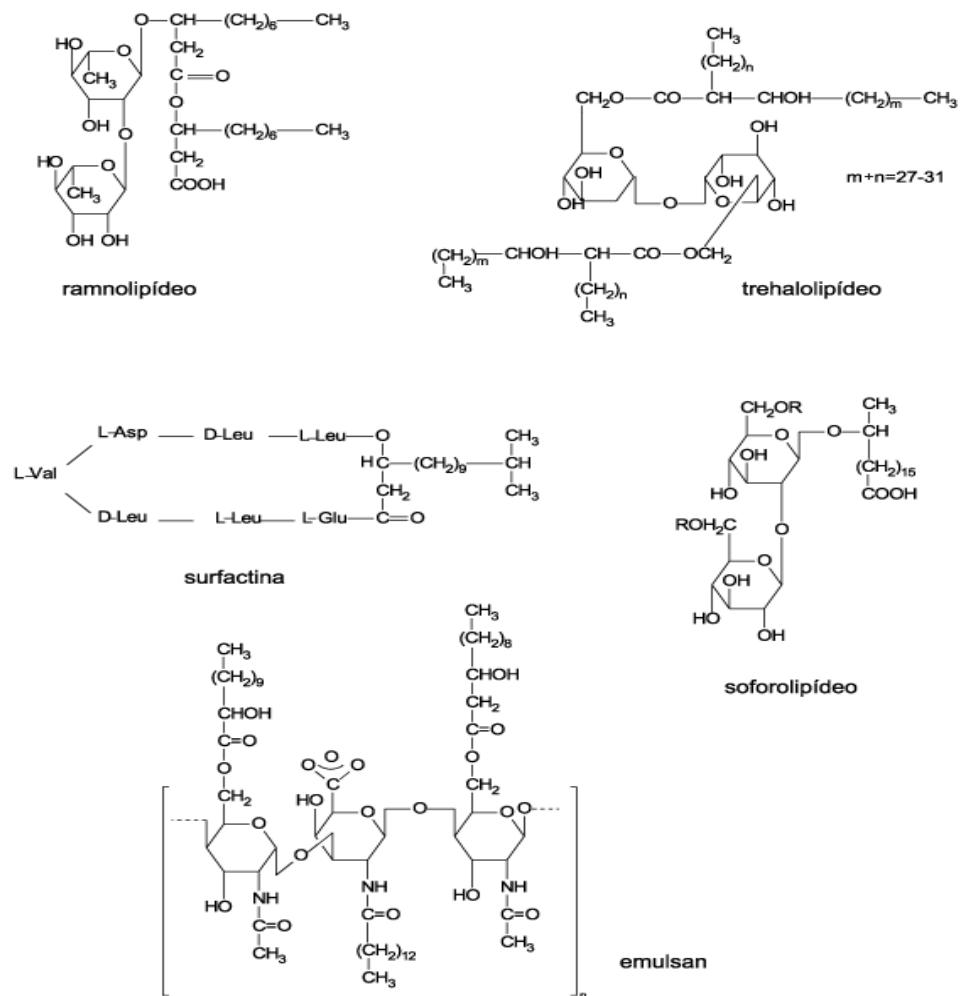


Figura 3.9. Estrutura de alguns biossurfactantes (Geetha, Banat e Joshi, 2018; Nitschke e Pastore, 2002).

Os glicolipídios apresentam em sua estrutura uma combinação de carboidratos e ácidos graxos de cadeia longa; os lipopeptídeos e lipoproteínas são caracterizados por peptídeos e proteínas ligados a ácidos graxos (Perfumo, Banat e Marchant, 2018; Barros *et al.*, 2007).

Por outro lado, os fosfolipídios são formados por ácidos graxos ou lipídios neutros e grupos fosfatos; os lipopolissacarídios são formados por ácidos graxos e polissacarídios ligados de forma covalente e, finalmente, os particulados são vesículas extracelulares produzidas por grande parte das bactérias, de forma a apresentar uma alta atividade tensoativa que causa o transporte de alcanos para o interior da célula, facilitando sua degradação (Geetha, Banat e Joshi, 2018; Silva *et al.*, 2014).

Além disto, os biossurfactantes apresentam algumas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos como: maior atividade superficial, baixa toxicidade, biodegradabilidade, utilização de diferentes substratos para metabolização, preço, entre outros (Mulligan *et al.*, 2014). Dessa forma, existem diversos micro-organismos produtores de biossurfactantes, sendo os principais do gênero *Pseudomonas* e *Bacillus* (Santos *et al.*, 2016). A Tabela 3.4 apresenta os principais tipos de biossurfactantes e os micro-organismos produtores.

Tabela 3.4. Principais biossurfactantes e micro-organismos produtores (Adaptado de Santos *et al.*, 2016).

Classe de Biossurfactante	Micro-organismo
Glicolípídeos	<i>Arthrobacter sp.</i>
	<i>Serratia marcescens</i>
Rhamnolipídios	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	<i>Pseudomonas sp.</i>
Soforolipídios	<i>Candida apícola</i>
	<i>Rhodococcus erythropolis</i>
Lipopolissacarídeos	<i>Pseudomonas sp.</i>
Surfactina	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus pumillus</i>
Lichenisina A e B	<i>Bacillus lichenformis</i>
Fosfolipídios	<i>Acinetobacter sp.</i>
Ácidos Graxos	<i>Penicillium spiculisporum</i>
	<i>Nocardia erythropolis</i>
Particulado	<i>Pseudomonas marginalis</i>

A Figura 3.10 mostra a ação dos surfactantes em uma gota de água, fazendo com que ocorra uma diminuição da tensão superficial da gota de água após a adição do surfactante, fazendo com que a área superficial ou área de contato seja maior.

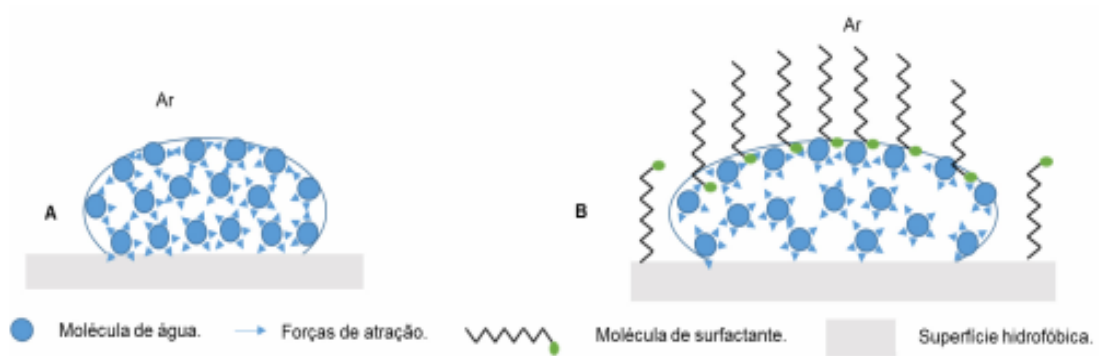


Figura 3.10. Ação de surfactantes em uma gota de água (Oliveira e Dias, 2017).

No caso da biorremediação, o aumento da área superficial e a diminuição da tensão superficial possibilitam uma maior proximidade do substrato com o micro-organismo, facilitando sua degradação e, conseqüentemente, aumenta a eficiência do processo de biorremediação (Oliveira e Dias, 2017).

3.4. Métodos de Imobilização de Micro-organismos/Enzimas

Os métodos de imobilização são definidos como técnicas utilizadas para limitar a mobilidade de células íntegras dos micro-organismos e de seus produtos, como enzimas, além disso, a imobilização preserva as funções catalíticas e viabilizam o metabolismo celular (Kourkoutas *et al.*, 2004; Guzik *et al.*, 2014^a; Guzik *et al.*, 2014^b; Guzik *et al.*, 2014^c; Wojcieszynska *et al.*, 2012). Dessa forma, diferentes estudos estão sendo realizados referentes às diversas técnicas de imobilização para análise da eficiência em diversas aplicabilidades como o uso na biorremediação de ambientes aquáticos e terrestres (Wojcieszynska *et al.*, 2012).

Em relação à imobilização celular, não existe o melhor método, cada método deve ser avaliado individualmente conforme sua aplicabilidade, pois em cada uso são necessários diferentes parâmetros de escolha para maior eficiência da degradação (Kosseva, 2011). A imobilização reduz os custos dos processos de biorremediação e tendem a aumentar a eficiência dos mesmos sendo que, existem diversas vantagens como: a alta eficiência de degradação de poluentes, redução dos riscos de mutação genética, aumento da resistência contra fatores externos, tolerância à presença de metais pesados e a altas concentrações de poluentes (Kourkoutas *et al.*, 2004; Guzik *et al.*, 2014^c). Contudo, algumas das técnicas mais

utilizadas de imobilização são: adsorção, ligação em superfícies (eletrostática ou covalente), floculação (natural ou artificial), aprisionamento e encapsulamento conforme Figura 3.11.

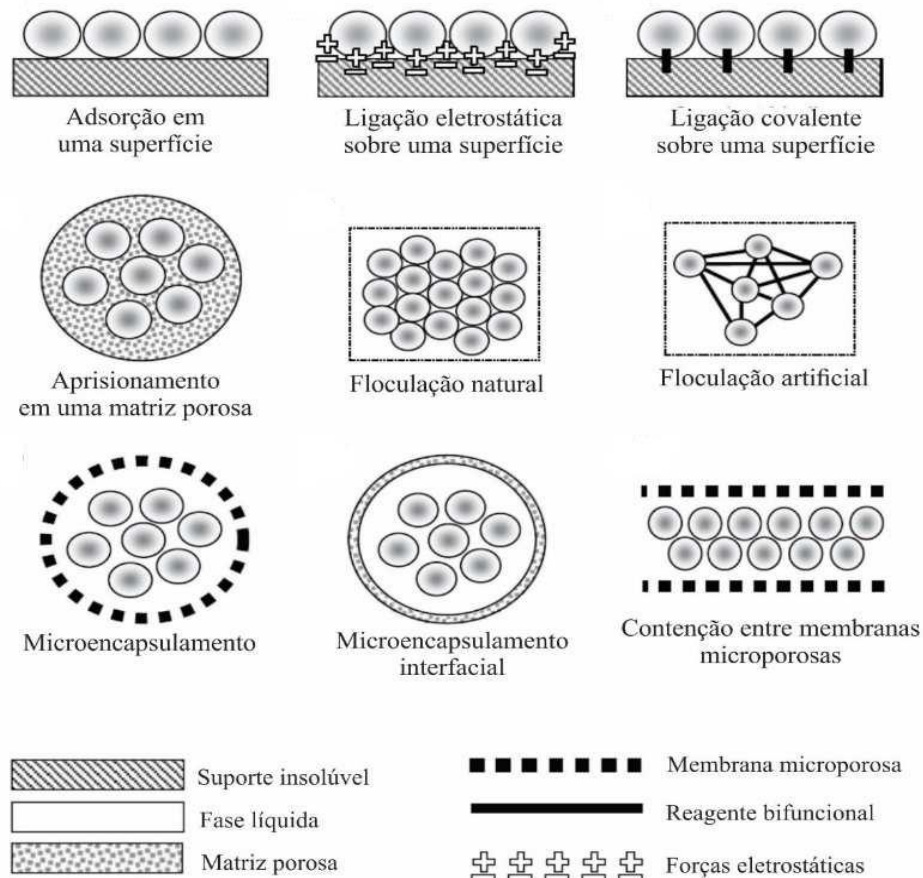


Figura 3.11. Principais técnicas de imobilização de micro-organismos (Adaptado de Kourkoutas *et al.*, 2004).

3.4.1. Adsorção

A imobilização de células íntegras e enzimas pelo método da adsorção ocorrem através da interação física com a superfície (Cristóvão *et al.*, 2011). Esse método é comumente usado em processos de biorremediação por ser rápido, simples, sustentável e de baixo custo (Hou *et al.*, 2014).

A interação entre a superfície e as células ocorre com a formação de ligações fracas, podendo ou não ter a presença de “ligantes” que facilitam tal interação e, por isso, não são usados com micro-organismos geneticamente modificados pela

possível alteração nos ligantes da superfície (Hou *et al.*, 2014).

3.4.2. Ligação em superfícies

Ligações eletrostáticas numa superfície são similares à adsorção física, mas a probabilidade de micro-organismos escaparem da imobilização é muito menor devido a maior força de atração entre as moléculas (Mattiasson, 2018; Hudson *et al.*, 2005). Assim, esse método requer uma lavagem da superfície com uma solução de ligantes, de forma a possibilitar uma interação das células íntegras ou das enzimas com a superfície (Lee e Tsai, 2009).

O procedimento de imobilização utilizando ligações covalentes é diferente do método de adsorção porque requer a presença de agentes que efetuem a ligação, logo, necessitam de agentes químicos que funcionam como ligantes ativados, tais como: amido, éter e carbamatos (Cabana *et al.*, 2009). Tal método é muito usado para imobilização de enzimas, porque os agentes de ligação podem ser tóxicos para as células íntegras de micro-organismos (Yu *et al.*, 2010). A vantagem do uso de ligações covalentes é a alta taxa de imobilização das moléculas (Cabana *et al.*, 2009).

3.4.3. Aprisionamento em matriz porosa

O aprisionamento de micro-organismos em matriz porosa é muito estudado e utilizado em processos de biorremediação. Depois do aprisionamento, as células microbianas só são capazes de se mover na presença de um carregador como nutrientes e metabólitos. As células localizadas na superfície do material poroso terão uma atividade metabólica muito maior do que as células localizadas no interior do material, isso ocorre devido ao maior contato com os metabólitos e nutrientes que ativarão sua atividade metabólica (Bleve *et al.*, 2011; Wojcieszynska *et al.*, 2012).

O aprisionamento é uma técnica rápida, não tóxica, barata e muito versátil por utilizar reagentes comerciais baratos e processos produtivos simplificados (Wojcieszynska *et al.*, 2012). O parâmetro mais importante da técnica de

aprisionamento é avaliar o tamanho dos poros do material e se os carregadores serão capazes de se aproximar com as células microbianas (Bleve *et al.*, 2011).

3.4.4. Encapsulamento

O encapsulamento é uma técnica semelhante ao aprisionamento, mas nesse caso as células possuem uma barreira maior em relação ao ambiente externo, protegendo os micro-organismos de forma mais eficiente (Mattiasson, 2018; Kourkoutas *et al.*, 2004). Portanto, a grande vantagem desse método é a proteção agregada à barreira da cápsula, pois permite o uso de micro-organismos na degradação de poluentes tóxicos e ambientes de condições extremas, como salinidade, temperatura, pH, entre outros (Klein *et al.*, 2012). Assim, o método para produção de cápsulas utilizado é o de extrusão e, a matriz usada é o alginato de sódio.

3.4.4.1. Encapsulamento pelo método de extrusão

Existem diferentes métodos para encapsulamento de diferentes compostos ou células vivas de micro-organismos, todos apresentam vantagens e desvantagens e parâmetros que devem ser considerados para sua aplicabilidade, como mostra a Tabela 3.5.

Tabela 3.5. Métodos de encapsulamento, vantagens, desvantagens e principais parâmetros (Brun - Graeppi *et al.*, 2011).

Método	Parâmetros Importantes	Vantagens	Desvantagens
Leito Fluidizado	Concentração da solução de alimentação, viscosidade, fluxo de ar, temperatura	Aplicável a uma grande variedade de polímeros.	Dificuldade de alcançar revestimento uniforme e completo de pequenas

	e umidade		partículas.
Extrusão seguido de gelificação	Diâmetro da agulha, taxa de fluxo, viscosidade da solução, concentração do polímero e temperatura.	Várias tecnologias têm sido desenvolvidas para diminuir o tamanho, melhorar rendimento e homogeneidade.	Limitado a soluções de baixa viscosidade.
Pulverização	Entrada de ar, temperatura de saída do ar, concentração da solução de alimentação, solubilidade do polímero e forma de cristalização.	Tecnologia simples e bem estabelecida, custo baixo.	Aplicável a uma gama limitada de polímeros.
Emulsão seguida de gelificação	Velocidade de agitação, viscosidade da solução, concentração de polímero, temperatura, solubilidade do polímero e do agente gelificante.	Facilmente aplicado em grande escala.	Obtenção de partículas apresentando grande diâmetros com grande distribuição de tamanho.

Dentre as técnicas apresentadas, a extrusão é um método muito simples, barato e com condições que não agridem o material a ser encapsulado e, comumente, é utilizado para transformação de hidrocolóides em cápsulas

(Mortazavian *et al.*, 2007). A técnica consiste em incorporar o material numa solução encapsulante de forma a homogeneizar tal solução e, depois, simular uma extrusão gota a gota através de uma pipeta ou seringa para otimizar o tamanho das cápsulas conforme Figura 3.12.

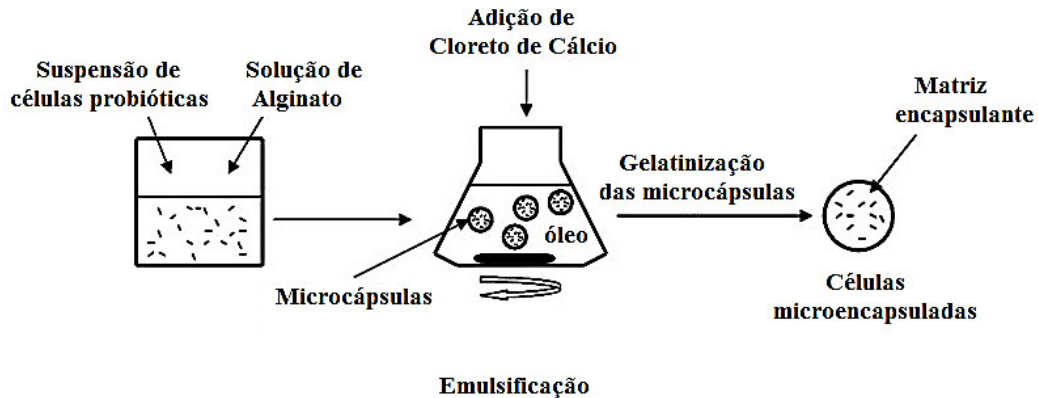


Figura 3.12. Esquema do método de extrusão com agitação para produção de cápsulas de micro-organismos (Silva *et al.*, 2018; Heidebach *et al.*, 2009).

A produção de microcápsulas por essa técnica não utiliza solventes orgânicos e, por isso, torna viável o encapsulamento de fármacos, células vivas e outros compostos de interesse na indústria de alimentos (Silva *et al.*, 2018; Patil *et al.*, 2010). Além disto, o tamanho das cápsulas dependerá da viscosidade da mistura, do diâmetro de gotejamento, da distância entre a solução de endurecimento e da agitação (Etchepare *et al.*, 2016). Assim, o método de encapsulamento por extrusão é simples e reproduzível, onde se obtém microcápsulas/cápsulas de forma rápida e na ausência de condições drásticas, tornando o método ideal para encapsulamento de compostos bioativos e células vivas de micro-organismos (Chew, 2015; Wang, 2003).

3.4.4.2. Alginato de sódio

O alginato pertence a um grupo de polissacarídeos extraídos da parede celular de algas marinhas marrons e possuem estrutura de um copolímero linear (Mackie *et al.*, 2016). A representação de sua estrutura pode ser visualizada na Figura 3.13.

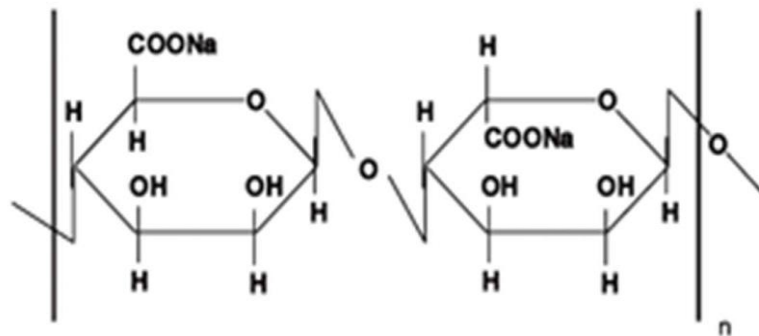


Figura 3.13. Representação da estrutura do alginato de sódio (Mofidi, Aghai-Moghadam e Sarbolouki, 2000).

O alginato dá flexibilidade e rigidez à parede celular e são extraídos em torno de 30 mil toneladas por ano, tal valor não representa 10% do quanto é produzido pelas algas. Além disso, pode ser produzido por bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Azotobacter*, e apresenta a característica de ser mais acetilado, logo, a acetilação influencia as propriedades reológicas e físico-químicas (Cargill, 2017).

Tal composto é constituído por sais de ácidos algínicos, sendo ácido manurônico (M) e ácido gulurônico (G), sendo que esses ácidos se ligam e formam blocos homopoliméricos M-M e G-G ou hetropoliméricos M-G (Cargill, 2017). Os alginatos de sódio, bário e cálcio são muito utilizados para encapsulamento de células íntegras por fornecerem proteção aos micro-organismos e, assim, aumentarem a eficiência de degradação dos poluentes (Kourkoutas *et al.*, 2004). Logo, estes são muito utilizados por serem solúveis em água e insolúveis na presença de cátions bivalentes (Ca^{++} ou Mg^{++}), tais cátions se ligam entre os blocos formados (Figura 3.14) e forma uma estrutura 3D gelatinosa, unidas por íons de cálcio ou magnésio (Cargill, 2017; Raei *et al.*, 2015).

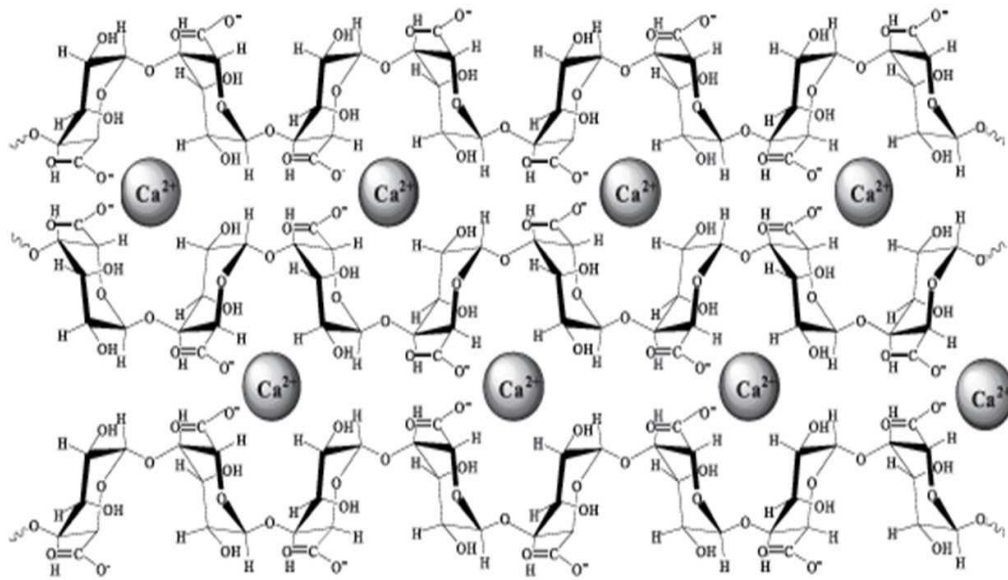


Figura 3.14. Estrutura dos cátions ligados aos blocos de alginato formado (Kawaguti e Sato, 2009).

A estabilidade das cápsulas formadas tende a diminuir ao longo do tempo devido ao aumento da concentração de micro-organismos ou devido à baixa concentração dos alginatos, citados anteriormente, no suporte (Kawaguti e Sato, 2009). No intuito de avaliar a estabilidade das cápsulas deve-se analisar a área superficial e a porosidade das esferas formadas (Cargill, 2017).

3.5. Caracterização de Cápsulas

O capítulo tem como objetivo principal apresentar algumas das técnicas de caracterização das cápsulas, as quais foram realizadas no trabalho. As técnicas descritas são: TGA, DSC e MEV-FEG, contagem de células viáveis, índice de emulsificação e tensão superficial.

3.5.1. TGA

A termogravimetria é uma técnica para medir a perda de massa de uma determinada amostra em função da temperatura e/ou tempo. Os termogramas e a curva fornecida pela primeira derivada (dTG) fornecem informações sobre a estabilidade do material analisado. Entretanto, diversos fatores como: razão de

aquecimento do forno, quantidade de amostra, sensibilidade da balança, solubilidade dos gases envolvidos, atmosfera, entre outros, podem afetar a análise termogravimétrica. Dessa forma, a análise termogravimétrica das cápsulas mostra a faixa ideal de temperatura para utilização sem ocasionar danos em sua estrutura e, conseqüentemente, diminuição de sua estabilidade e eficácia (Brown, 2003).

3.5.2. DSC

A Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) é uma técnica termoanalítica na qual as variações de entalpia são monitoradas em relação a um material de referência termicamente inerte. Assim, os eventos térmicos que podem gerar modificações nas curvas de DSC podem ser transições de primeira e segunda ordem. As transições de primeira ordem apresentam variação de entalpia, seja ela endotérmica ou exotérmica, e dão origem a picos. Com relação às variações endotérmicas, pode-se citar: fusão, perda de massa, dessorção e reações de redução. Enquanto, as variações exotérmicas podem ser: cura, oxidação, degradação oxidativa, adsorção, entre outros. Já as transições de segunda ordem se caracterizam pela variação da capacidade calorífica, porém, sem variações de entalpia (Brown, 2003).

3.5.3. MEV-FEG

O Microscópio Eletrônico de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG) possibilita a visualização de imagens de alta resolução da superfície da amostra com aumento de até 50.000X. Neste arranjo, é necessário que a amostra seja transparente ao feixe de elétrons, o que pode ser feito através do depósito de pó metálico. No caso das cápsulas, o microscópio identifica os poros na superfície da amostra, o que permite concluir que o crescimento do micro-organismo no exterior da cápsula será facilitado, de forma a aumentar a degradação dos compostos de petróleo (Goodhew, Humphreys e Beanland, 2000).

3.5.4. Contagem de células bacterianas viáveis presentes nas cápsulas

A contagem de células bacterianas viáveis presentes nas cápsulas é muito importante pois proporciona a avaliação de possíveis células microbianas com potencial de crescimento. Sendo assim, a diluição seriada é realizada para que tal contagem seja facilitada e precisa, uma vez que, o crescimento microbiano ocorre de forma rápida, gerando muitas colônias e, assim, a diluição diminui a quantidade de colônias e facilita sua contagem. Na Figura 3.15, temos o exemplo de uma diluição seriada e a forma como tal procedimento acarreta numa contagem eficaz e facilitada das unidades formadoras de colônias.

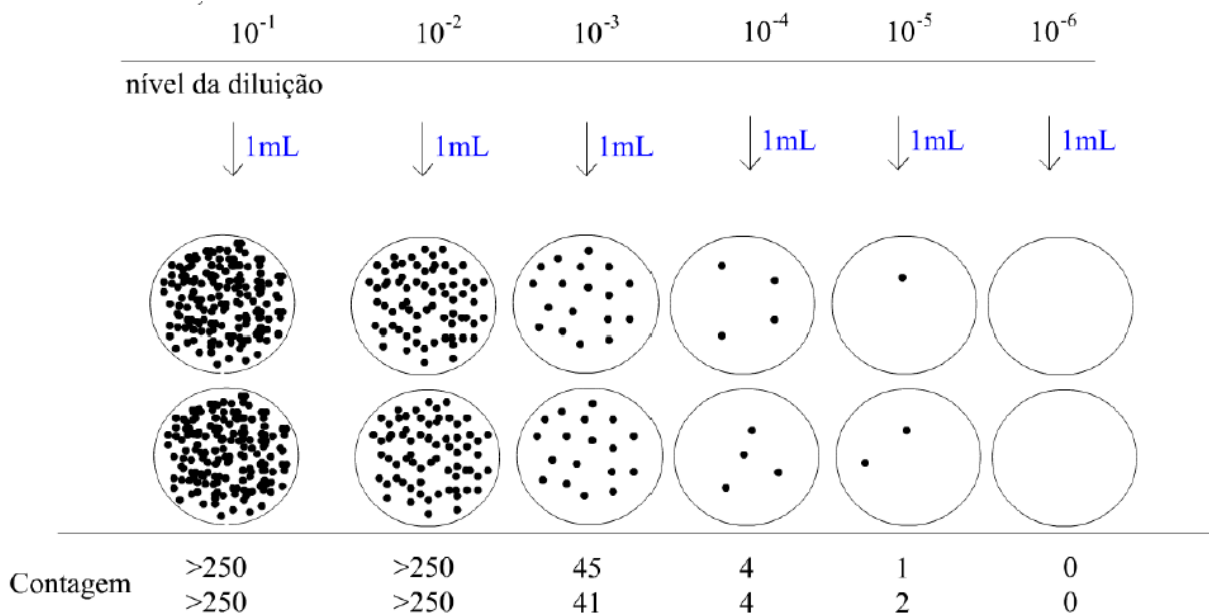


Figura 3.15. Procedimento de diluição seriada e efeito no crescimento microbiano em placas de Petri.

3.5.5. Índice de emulsificação

Atividade ou índice de emulsificação é uma característica muito importante para os biossurfactantes e, através da medida da emulsificação podemos inferir indiretamente se há ou não produção dos biossurfactantes (Uzoigwe *et al.*, 2015). A propriedade de emulsificar se refere à dispersão de uma fase líquida em outra, causando miscibilidade entre os dois líquidos. Além do índice de emulsificação como parâmetro indireto para determinar a produção de biossurfactante, também

podemos avaliar a presença dessas moléculas usando a medida de tensão superficial (Salihu *et al.*, 2009; Walter *et al.*, 2008).

3.5.6. Tensão superficial

A tensão superficial é o efeito causado pela coesão de partículas com características iguais na superfície de um fluido, levando à formação de uma membrana elástica, sendo que as moléculas na superfície do líquido não possuem outras semelhantes, afetando o equilíbrio das forças e tornando a superfície mais resistente a forças externas (U.S Geological Survey, 2018).

Tal propriedade é muito importante, pois elevadas tensões superficiais entre o óleo e a água podem dificultar a extração de hidrocarbonetos em um reservatório de petróleo (Zhang *et al.*, 2019). Além disso, através da medida de tensão superficial, podemos avaliar se há ou não produção de biossurfactantes, uma vez que tais moléculas tendem a diminuir a tensão superficial na interface entre a água e os hidrocarbonetos (Zdziennicka *et al.*, 2017).

3.6. Vias de Degradação do Petróleo por Micro-organismos

Existem diferentes micro-organismos com capacidade de degradar o petróleo bruto em derramamentos sendo que a maioria usa a rota anaeróbia. Entretanto, alguns micro-organismos são aeróbios e utilizam os hidrocarbonetos alifáticos saturados e insaturados como fonte de carbono para seu metabolismo (Thapa, Ajay Kumar e Ghimire, 2012).

As bactérias anaeróbias utilizam carreadores de elétrons como nitrato, sulfato ou ferro, porém, o rendimento energético é muito menor do que o metabolismo de bactérias aeróbias. Isto ocorre, devido ao metabolismo das bactérias aeróbias degradar o petróleo de forma mais rápida com a vantagem de utilizar o oxigênio como acceptor de elétrons (Melo e Azevedo, 2008; Cao *et al.*, 2012).

A Figura 3.16 mostra o processo de degradação aeróbia dos hidrocarbonetos do petróleo, que na etapa inicial depende de reações das enzimas de ativação e a incorporação de oxigênio, catalisadas pelas enzimas oxigenases, de forma a

degradar os hidrocarbonetos em compostos intermediários por várias vias metabólicas (Montagnolli, Lopes e Bidoia, 2015).

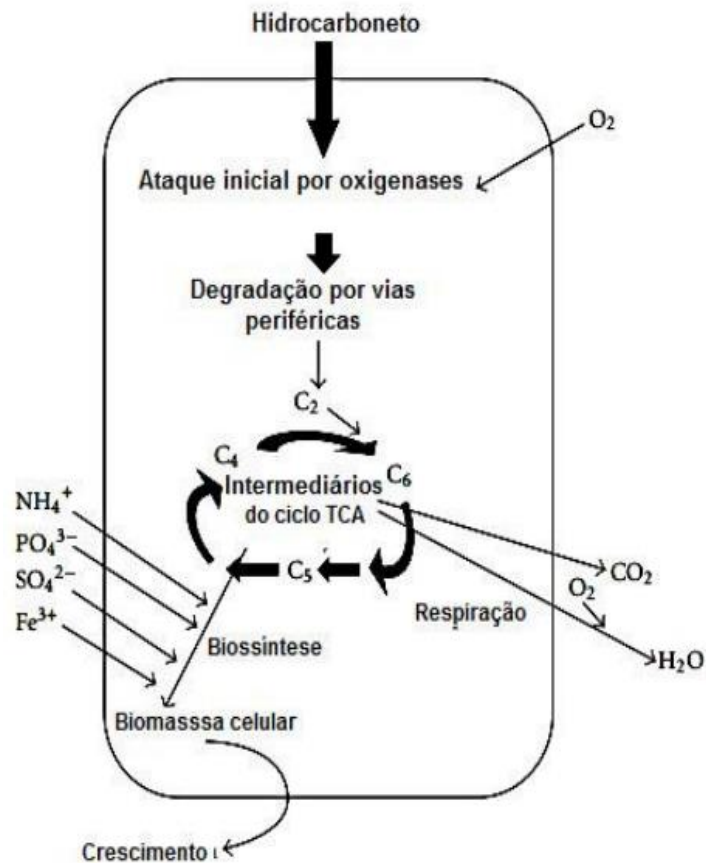


Figura 3.16. Processo de degradação aeróbica dos hidrocarbonetos do petróleo (Das e Chandran, 2011).

As 3 principais enzimas envolvidas no processo de degradação do petróleo são: alcano hidroxilase (AlkB), rubredoxina (AlkG) e rubredoxina redutase (AlkT) (Oliveira *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2014). De início, a enzima AlkT transfere elétrons do cofator NADH para AlkG e o elétron é transferido para AlkB que atua como catalisadora da oxidação do alcano com um átomo de oxigênio advindo da molécula de O₂ (Rojo, 2009). O alcano é convertido em álcool e a segunda molécula de oxigênio reduzida a H₂O através de elétrons transferidos do NADH pelas enzimas alkT e alkG como mostra a Figura 3.17 (Rojo, 2009).

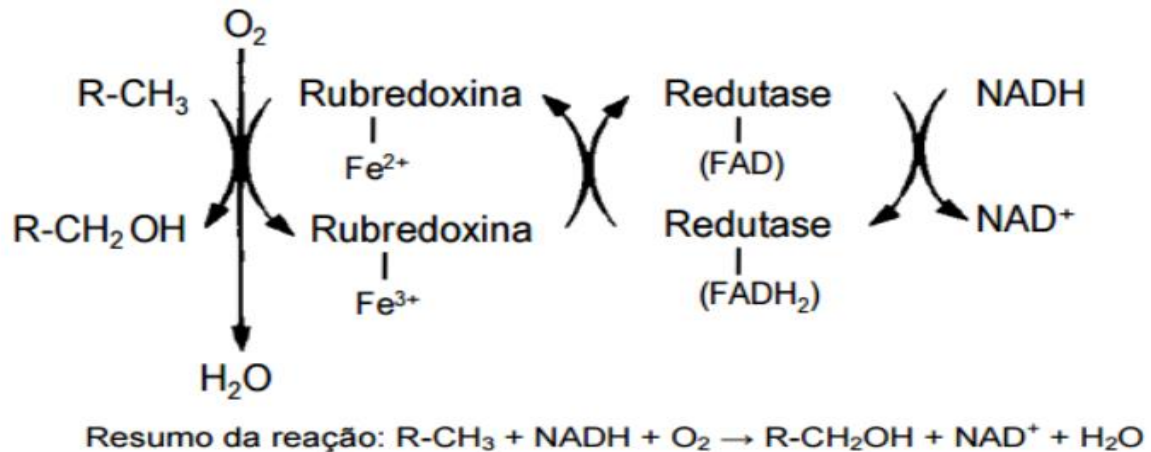


Figura 3.17. Ação das enzimas AlkT e AlkG (Rojo, 2009).

Assim, a AlkB potencializa a reação de hidroxilação, sendo que tal enzima é codificada pelo gene *alkB* (Oliveira *et al.*, 2012). Tal enzima AlkB já foi detectada em vários micro-organismos como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Archeobacter*, entre outros (Rodrigues, 2014; Thapa, Ajay Kumar e Ghimere, 2012; Smits *et al.*, 2002).

3.6.1. Micro-organismos que degradam petróleo

A literatura cita diversos estudos de micro-organismos, como bactérias e alguns fungos, que são utilizados em processos de degradação de diversos compostos xenobióticos, como apresentado na Tabela 3.6.

Tabela 3.6. Micro-organismos e os substratos alvo de degradação.

Micro-organismo	Compostos degradados	Literatura
<i>Bacillus</i>	Óleo diesel, quinolona.	(Bento <i>et al.</i> , 2005; Tuo <i>et al.</i> , 2012).
<i>Rhodococcus</i>	Hidrocarbonetos do petróleo.	(Kuyukina e Ivshina, 2010; Chen <i>et al.</i> , 2012).
<i>Pseudomonas</i>	Petróleo, tabaco.	(Stallwood <i>et al.</i> , 2005; Morgante <i>et al.</i> , 2009;

		Wang <i>et al.</i> , 2012).
<i>Aspergillus sp.</i>	Petróleo, metais pesados.	(Braud <i>et al.</i> , 2006).

O uso de micro-organismos apresenta vantagens como baixo custo e alta eficiência quando comparado a outras técnicas de remediação. Entretanto, a seleção das linhagens, tipo e concentração de contaminantes, restrições ambientais e climáticas e o procedimento de uso dos micro-organismos influenciam na efetividade do processo (Ramadass *et al.*, 2018; Tyagi *et al.*, 2011). Entretanto, apesar dos inúmeros micro-organismos e substâncias tensoativas liberadas pelos mesmos, a vasta quantidade de organismos vivos que degradam diversas substâncias como o petróleo ainda é pouco conhecida. Dependendo do habitat estudado, estima-se que menos de 0,1% e um máximo de 10% dos micro-organismos sejam conhecidos (Van Hamme *et al.*, 2003).

3.6.2. Fatores que afetam a biodegradação do petróleo

Diferentes aspectos físico-químicos são importantes para a análise da degradação de petróleo realizada por micro-organismos, entre eles temos: pH, temperatura, matéria orgânica, concentração de oxigênio, entre outros (Raman e Gnansounou, 2018; Kuyukina e Ivshina, 2010).

3.6.2.1. pH

O pH é um fator importante porque afeta o desenvolvimento e a capacidade metabólica dos micro-organismos devido aos efeitos dos íons H⁺ na permeabilidade celular e na atividade enzimática (Jacques *et al.*, 2007). A faixa ideal para crescimento e taxa metabólica máxima da maioria dos micro-organismos deve estar na faixa da neutralidade, próximo de 7,5, conforme Figura 3.18 (Jacques *et al.*, 2010).

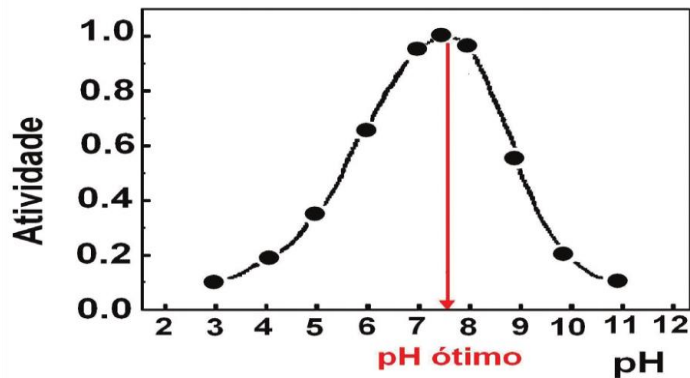


Figura 3.18. Valores médios ótimos de pH para crescimento e aumento metabólico dos micro-organismos (Adaptado de Jacques, 2010).

3.6.2.2. Temperatura

A temperatura influencia o consumo de substrato pelos micro-organismos, como consequência, aumenta ou não sua atividade metabólica e, assim, a biodegradação de HPAs (Haider, 1999). Em temperaturas muito baixas, o metabolismo microbiano tende a diminuir e a viscosidade dos HAPS tende a aumentar, dificultando sua degradação. Já em temperaturas mais amenas (temperatura ambiente) há diminuição da viscosidade dos compostos e maior facilidade de degradação dos mesmos pelos micro-organismos presentes (Tate, 1995; Haider, 1999). Assim, a temperatura influencia tanto no crescimento microbiano como na degradação dos hidrocarbonetos de petróleo, sendo que estes podem ser degradados numa faixa de temperatura de 0 °C a 60 °C (Jain, Daga e Kalamdhad, 2018; Waqas *et al.*, 2018; Sorkhoh *et al.*, 1993).

3.6.2.3. Matéria orgânica

A matéria orgânica fornece carbono e energia para o crescimento dos micro-organismos em determinado local, dessa forma uma maior abundância de matéria orgânica aumenta a diversidade e metabolismo da microbiota (York, 2018; Boopathy, 2000). Além disso, a matéria orgânica propicia uma sorção dos HPAs que, em virtude da baixa solubilidade em água, facilita a disponibilidade para a degradação feita pelos micro-organismos, logo, biomassas vêm sendo utilizadas juntamente com a técnica de biorremediação para aumentar sua eficácia e

proporcionar nutrientes iniciais para produção dos biossurfactantes (Meneses e Araújo, 2014; Reis *et al.*, 2008).

3.7. Métodos de Quantificação dos Componentes do Petróleo

A caracterização do petróleo é uma informação extremamente relevante, porque através dela podemos determinar as técnicas mais apropriadas para remediar possíveis derramamentos (Al-Areeq *et al.*, 2018). Assim, devido à grande e diversificada quantidade de compostos no petróleo, a caracterização composicional é alvo de estudos de diversos pesquisadores (Akakuru e Akudinobi, 2018; Chinelatto *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2018; Taheri-Shakib, Shekarifard e Naderi, 2018).

Os principais componentes do petróleo são os hidrocarbonetos alifáticos (cíclicos ou não), hidrocarbonetos aromáticos, e pelo conteúdo de resinas e asfaltenos (Atiqullah *et al.*, 2018; Speight, 2006). Assim, a determinação de tais componentes pode ser feita pelo método SARA, que se baseia na técnica de cromatografia em coluna clássica para separar as frações presentes no petróleo e sua quantificação através de cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chama. Além disso, também podemos quantificar as frações oriundas do método SARA por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), já que tal técnica permite o uso do petróleo bruto, de forma a não ser necessária a etapa de fracionamento (Coutinho *et al.*, 2018; Woods *et al.*, 2008).

4. MATERIAIS E MÉTODOS/RESULTADOS E DISCUSSÕES

A metodologia, resultados e discussões provenientes da dissertação foram apresentados através da produção de dois artigos científicos. O primeiro, intitulado “PRODUCTION AND ANALYSIS OF CAPSULES CONTAINING MICROORGANISMS CONSORTIATED FOR FUTURE APPLICATION IN PETROLEUM BIOREMEDIATION”, foi submetido à revista “International Biodeterioration & Biodegradation” com fator de impacto de 3.562. A carta de envio do artigo está apresentada no ANEXO I.

Já o segundo artigo, intitulado “AVALIAÇÃO DA BIORREMEDIAÇÃO DE COMPOSTOS ALIFÁTICOS PROVENIENTES DE DERRAMAMENTOS DE PETRÓLEO EM MEIO SALINO” ainda não foi submetido.

ARTIGO 1

PRODUCTION AND ANALYSIS OF CAPSULES CONTAINING MICROORGANISMS CONSORTIATED FOR FUTURE APPLICATION IN PETROLEUM BIOREMEDIATION

Douglas Faria¹, Grazielle Dias Machado¹, Rodrigo de Abreu Lang¹, Fernando Santos², Rogério Lourega^{1*}.

¹ Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

² State University of Rio Grande do Sul, Novo Hamburgo, Rio Grande do Sul, Brazil.

ABSTRACT

Oil spills cause severe environmental and economic impacts, so the use of bioremediation has been widely studied to solve this problem. Due to its complex composition, oil prevents the complete action of the microorganisms, so, the use of the encapsulation with the insertion of plant biomass provides

protection and initial substrate to produce biosurfactants, making the bioremediation process more efficient. Therefore, this work aims to produce capsules containing microbiological consortium and analyze them using techniques such as: TGA, DSC, FESEM, viable cell count, emulsification index and superficial tension. The results of TGA and DSC showed that the capsules have thermal stability up to 40 °C and that growth of the microorganisms increases stability and resistance. The FESEM allowed visualizing the presence of pores in the capsular membrane and viable cell counts were more effective in capsules containing 1% (w/v) sodium alginate. The emulsification index showed a great increase (80%) from the fifth day as well as the superficial tension had a great decrease (48%) in the same period, indicating a greater production of biosurfactant. Therefore, capsular analyzes showed excellent thermal stability and porosity, increased microbiological growth at lower alginate concentrations, decreased superficial tension and increased emulsification in the presence of petroleum.

Key words: capsules, petroleum, degradation, metabolism.

1. INTRODUCTION

Petroleum is a product of high added value for society, because due to its refining, numerous products are formed and transformed in order to make it a prominent economic component worldwide (Safari *et al.*, 2018). Despite this, environmental disasters caused by oil spills in natural environments have been a major concern and a target for review by society, as it is one of the major sources of contaminants such as benzene, toluene, asphaltenes and resins (Brady, Brady and Borns, 2018). In order to analyze and understand techniques of removal of petroleum components in polluted environments, several methods and forms of treatment have been studied (Murado *et al.*, 2011). One of the most used current techniques with high efficiency and low cost is the use of microorganisms to degrade the chemical components of petroleum (Santos and Maranhão, 2018).

Biological processes, when compared to physical and/or chemical processes, are reliable, less aggressive to the environment, more efficient and have a lower operating cost, however, the substrate and microbiological metabolism studies should be performed to optimize the degradation process (Mulligan, 2005; ^aPerfumo *et al.*, 2018). Thus, bioremediation is an ecological technology for

the remediation of marine environments contaminated by petroleum, because it uses the stimulus of microbial activity for the degradation of organic compounds and the transformation of inorganic compounds through the metabolism of microorganisms (Mulligan et al. al., 2014; ^bPerfumo *et al.*, 2018). There are several microorganisms that have specific characteristics of degradation of compounds present in petroleum, thus the consortium technique is being used, since it allows the enzymatic action to be more potent and the number of enzymes produced for the metabolism is higher (Cao *et al.*, 2012). Therefore, a community with three or more microorganisms is inserted into the polluted environment in order to increase the efficiency of the petroleum biodegradation process in the marine environment (Das and Chandran, 2011).

A concern in the use of microorganisms is the effect caused by physical and chemical process of the environment, such as agitation, temperature, nutrient availability, presence of heavy metals, among others (Klein *et al.*, 2012). Thus, a technique to combat the problem is the production of capsules which contain a concentration of microorganisms because the capsules have pores that allow the contact of the microorganism and the enzymes with the substrate (petroleum compounds) and at the same time, protect the microbial community (Etchepare *et al.*, 2016). Another very important aspect is the production of biosurfactants by microorganisms, these molecules are amphipathic and allow a greater and more facilitated area of contact between the microorganism and the substrate (De Oliveira and Dias, 2017). Therefore, the use of a consortium of encapsulated microorganisms is a technique with great credibility and perspectives of large-scale use, therefore, more in-depth and analytical studies regarding the presence of porosity, biological growth velocity, capsular stability, biosurfactant production and the superficial tension should be performed as a first step and then used in means of evaluating the degradation of the oil.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Production of capsules

First, three solutions of sodium alginate in the concentrations of 1% (w/v), 1,5% (w/v) and 2% (w/v) are prepared with a temperature dilution of 70°C. Afterwards, 0,75% (w/v) of the plant biomass meal of *Citrus reticulata* (biomass was dried in an oven and crushed in a ball mill) and 1% (w/v) of the consortium of lyophilized microorganisms containing *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*,

Bacillus amyloliquefaciens and *Rhodococcus sp.*, supplied by Enzilimp Company. After homogenization, successive collections with 20 mL syringes are made to start the drip in 100 mL of 2% (w/v) CaCl_2 solution containing 1 mL of Tween 80 to form the capsules (Etchepare *et al.*, 2015). The capsules were produced by drip extrusion method performed by syringe and dropper, as shown in Figure 1.



Figure 1. Drip in CaCl_2 solution to form capsules containing microorganisms.

Once the drip is made in CaCl_2 solution, the capsules are formed, then the capsules were filtered using a 3 mm porosity sieve and washed with 2% NaCl (w/v) solution to remove any residue from the solution of CaCl_2 . After washing, the capsules were kept in a refrigerator at 4 °C.

2.2 Characterization of capsules

The characterization of the capsules used analytical techniques to analyze the crystalline structure, microstructure, porosity of the capsular membrane, deterioration of the sample as a function of temperature, superficial tension and emulsifying index.

2.2.1 Counting of viable cells present in capsules

The viable cell counts present in the capsules were made according to Lopes *et al.* (2016) and Cunha (2017) and was performed for the capsules containing 1.0%, 1.5% and 2.0% (w/v) sodium alginate, so, 0.2 g of capsules containing lyophilized microorganisms were solubilized in 4.5 ml of 1.5% (w/v) sodium citrate solution at 60 °C. The second step is to perform serial (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}) dilutions of the samples in sterile 0,85% (w/v) NaCl salt or peptone water and after inoculating 1mL of each serial sample in *Petri* dishes counting means AES supplemented with 2% (w/v) glucose by the pour plate method. After inoculating the samples, the plates were incubated in an oven at 37 °C for 72 hours and

the result counts were expressed in Colony Forming Units (CFU)/g of wet capsules. The counting was done in triplicate for each seeded dilution and the calculation of the CFU was done by the number of colonies present on the plates multiplied by dilution factor.

2.2.2 Superficial tension

The superficial tension analysis was performed through the mechanical equipment K6 using the Du Nuoy ring method, and at each superficial tension reading, the ring was sterilized with ethanol and calibrated through the superficial tension of the water (Gomes *et al.*, 2018; Rovina *et al.*, 2018). The culture samples containing microorganisms, oil and water were analyzed at time of 1, 2, 3, 7 and 15 days, and in triplicate. The method consists of withdrawing a sample from the middle where the microorganisms were cultured and inserting the Nuoy ring into the sample, applying a force for the ring to be withdrawn and measuring the force when the ring broke the surface of the sample.

2.2.3 Emulsifying index

Approximately 5mL of sample from the cultured middle was collected at times of 1, 2, 3, 7 and 15 days in triplicate. The samples were centrifuged for 10 minutes and 2000 rpm in *Eppendorf Centrifuge 5810* model equipment, 2 ml of the supernatant was collected and mixed with 2 ml of crude oil. The test was agitated for foam production and allowed to stand for 1 hour, reading the emulsified height and total height after resting time. Finally, we used Equation 1 to determine the percentage of emulsification index (Gomes *et al.*, 2018; Rovina *et al.*, 2018).

$$EI (\%) = (\text{emulsified height} / \text{total height}) * 100 \quad (1)$$

2.2.4 TGA

The samples were analyzed using a TA Instruments Thermogravimetric Analyzer, Model Q600, under a nitrogen atmosphere, with flow of 50.0 mL.min⁻¹ and heating rate of 10 °C.min⁻¹ in a temperature range of 25 °C to 800 °C. Therefore, the analyzes were performed in capsular samples with 2 weeks and recently produced. The main objective of the TGA analysis is to evaluate the temperature range of use of the capsules, that is, the interval where there are no capsules changes.

2.2.5 DSC

The samples were analyzed from Shimadzu DSC 50 Analyzer, under nitrogen atmosphere, with heating rate of $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ in the temperature range of $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ to $350\text{ }^{\circ}\text{C}$. Therefore, the analyzes were performed in capsular samples with 2 weeks and recently produced.

2.2.6 FESEM

Microscopy analysis using the field emission scanning electron microscope (FESEM) was done IN Inspect F50 model equipment, FEI. Through the obtaining high resolution images of the superficial and evaluation in manometric scale. The working voltage was 0.3 to 30 KW and point resolution of 1.2 nm.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Production of capsules

The production of capsules was done with ease and provided capsules of uniform sizes approximately 4mm in diameter. Through Figure 2 we can observe the capsules produced and realize that the microorganisms are compacted together with the plant biomass due to the darker coloration present inside the capsules. Furthermore, the Figure 2 shows the difference in growth of the microorganisms over time, recently produced A-capsule, the two-weeks B-capsules and the 12-weeks C-capsules.

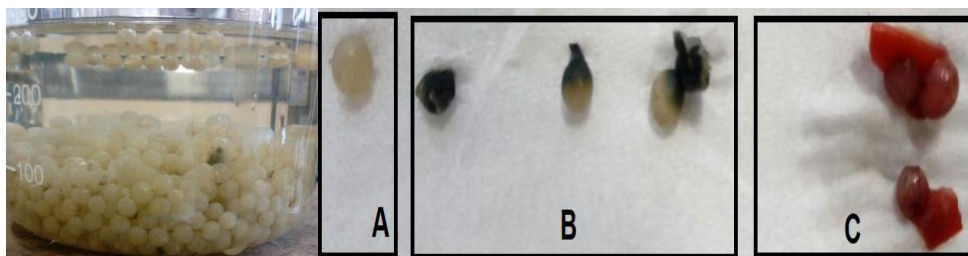


Figure 2. Capsules produced by the extrusion encapsulation technique without stirring and growth of microorganisms with use of biomass as nutrient/substrate.

Remembering that, the propagation of microorganisms occurred without the insertion of substrates and nutrients to promote their growth, so the biomass present inside the capsule provided

the initial microbiological growth, that is, no need to add nutrients. According to Melo and Costa (2005), the presence of biomass or nutritive meal makes the encapsulation more efficient and preserves the microorganism for longer. Furthermore, according to Pethkar and Paknikar (2002), sodium alginate will promote high resistance to microorganisms, allowing their use in aquatic environments and promoting the degradation of petroleum.

3.2 Counting of viable cells present in capsules

The cell count was performed in triplicate at different concentrations of sodium alginate, in order to observe if the increase of the capsular matrix concentration will interfere in the microbiological growth process. The data obtained of cell counts as colony forming units (CFU) are shown in Figure 3.

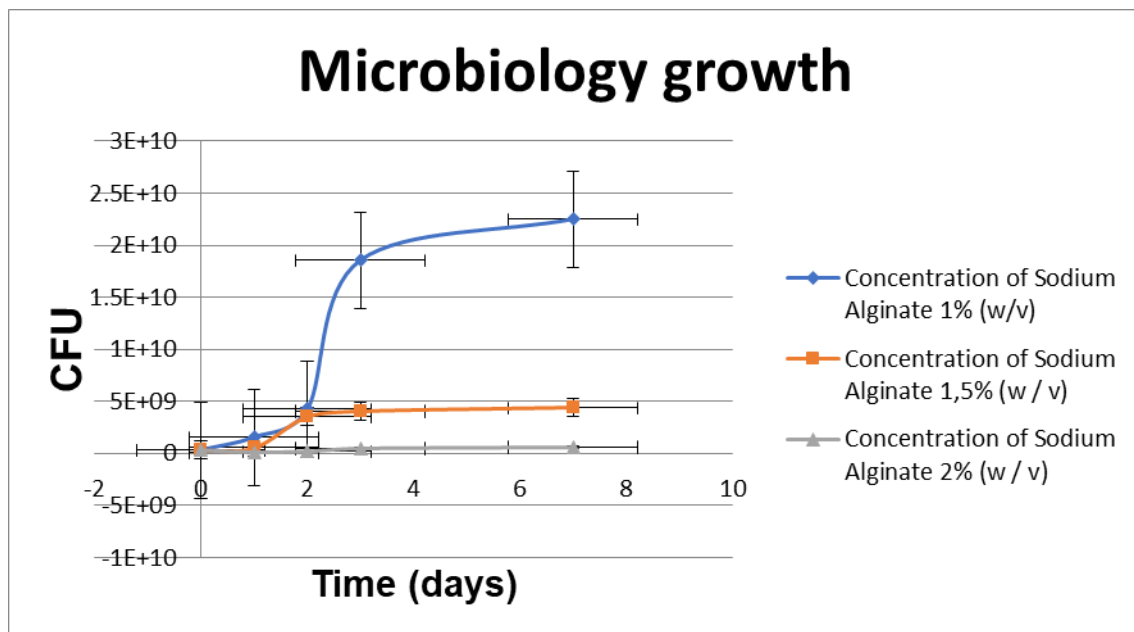


Figure 3. Growth of microorganisms with different concentrations of alginate.

The data indicated that the highest representativity of the microbial growth was in concentration of sodium alginate of 1% (w/v), followed by 1.5% and 2%, that is, a lower concentration of alginate enables better growth of the consortium of microorganisms. According to Lopes et al. (2016), the increase in polymer concentration in the capsular structure directly influences the growth of microorganisms, so, higher concentrations of sodium alginate result in lower microbiological growth. According to Léonard et al. (2014), who studied the microbiological growth of capsules with alginate and pectin, the presence of the polymers affects the growth of *Lactococcus lactis*.

The growth curve of the bacterial consortium showed an exponential phase between the first and second day for the concentration of 1.0% and 1.5% (w/v) of sodium alginate and the third day presented growth stability. The curve for the 2% concentration showed no characteristic microbiological growth, indicating that it would be the worst capsule produced. According to Wei et al. (2017) and Mendis et al. (2018) studied the growth of *Bacillus amyloliquefaciens* and assessed that the highest growth of this species of microorganism occurs between tenth and twentieth day in a specific growth means. In relation to the *Rhodococcus* species, Presentato et al., (2018) verified that the growth of *Rhodococcus* has its exponential around 3 days of cultivation, indicating that the species *Bacillus* can have greater durability than *Rhodococcus* in the consortium inserted in the capsules.

3.3 Superficial tension and emulsifying index

The effectiveness of a biosurfactant occurs through its ability to reduce superficial tension, ie, free superficial energy measure per unit area, required to bring a molecule from the interior of the liquid to the superficial (Mulligan, 2005). The biosurfactant production can be analyzed indirectly through superficial tension data and emulsification index. The superficial tension data are shown in Figure 4.

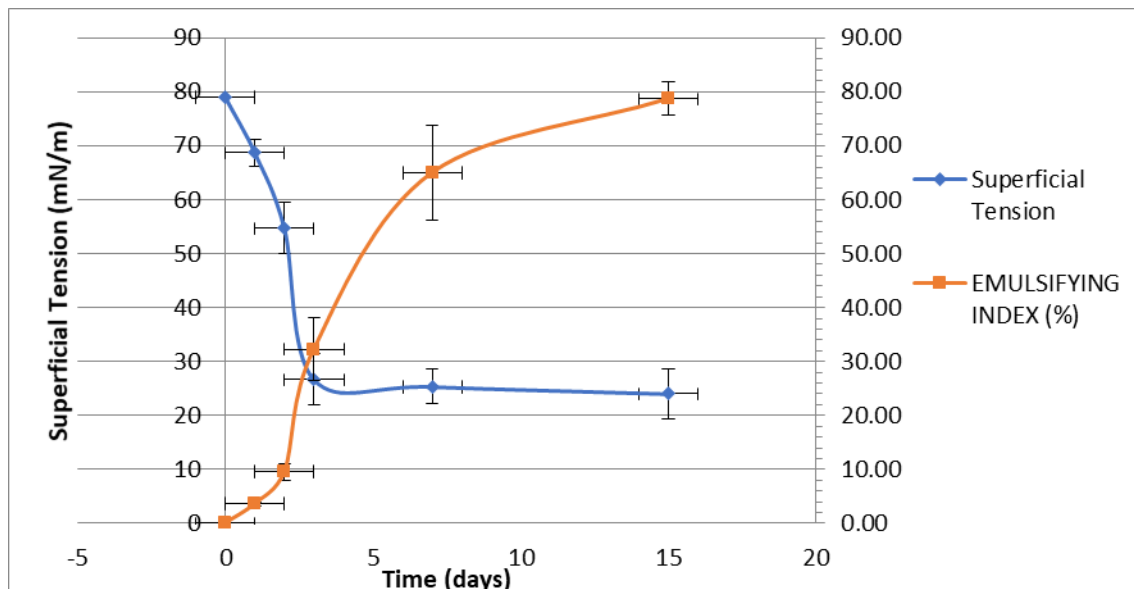


Figure 4. Chart of superficial tension and emulsification index (%).

The chart shows a reduction of approximately $60 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ (48%) of the superficial tension from initial time until the fifteenth day, indicating that the superficial tension of the oil occurs contrary to

the biological growth, therefore, according to Gomes et al. (2018) and Rovina et al. (2018), an increase of the microbiological growth causes the production of biosurfactants by the bacteria present in the consortium and decrease of the superficial tension and increase of the emulsification index, which reaches approximately 80% in 15 days. We also verified that after the third day of analysis, there is an exponential growth of the emulsification and an exponential decrease of the superficial tension, we can confirm the fact through the chart of microbiological growth (Figure 3), where the *lag* phase of growth occurs between the first and second day, indicating that from this period the production of biosurfactant also tends to increase e (Rovina *et al.*, 2018). Decesaro *et al.*, (2013) evaluated the emulsification index and superficial tension of several microorganisms in the presence of diesel, and the increase of emulsification and decrease of superficial tension also occurred around the third day of submerged culture, the microorganism *Bacillus subtilis* sp. reached a decrease of approximately 33% in 4 days of cultivation and emulsification index of 60%. In addition, we can observe that the initial growth of the microorganisms occurred due to degradation of the cellulose present in the plant biomass of bergamot, indicating the importance of this substrate for the growth of the bacteria, increase of the emulsification index and, consequently, decrease of the surface tension.

Maia et al. (2018) verified that *Bacillus subtilis* UCP0146 isolated from liquid residues present in the mangrove and using manioc as substrate, reached a 95.2% increase in emulsification index and 90% decrease in superficial tension in 150 days of cultivation, indicating that the microorganisms have high capacity of metabolism and resistance to the substrate. In addition, Felix et al. (2018) studied the superficial tension of 12 strains of *Bacillus* using cashew juice as a carbon source and concluded that the superficial tension using water as reference decreased from $72\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ to $31.8\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$. On the other hand, Soares et al. (2018), presented the exponential increase of emulsification and decrease of superficial tension around the 24 hours of submerged culture in specific growth means, indicating that the presence of petroleum may initially interfere the production of biosurfactants, since the toxicity of the oil damages the microbial metabolism.

3.4 TGA

The thermogravimetric analysis was performed in two samples, the first one with bacterial growth and the second without the growth (recently produced). Thus, Figure 5 shows the chart of the

weight loss in capsular sample at the time of 2 weeks as a function of the increase in temperature and also the flow of weight loss (derived).

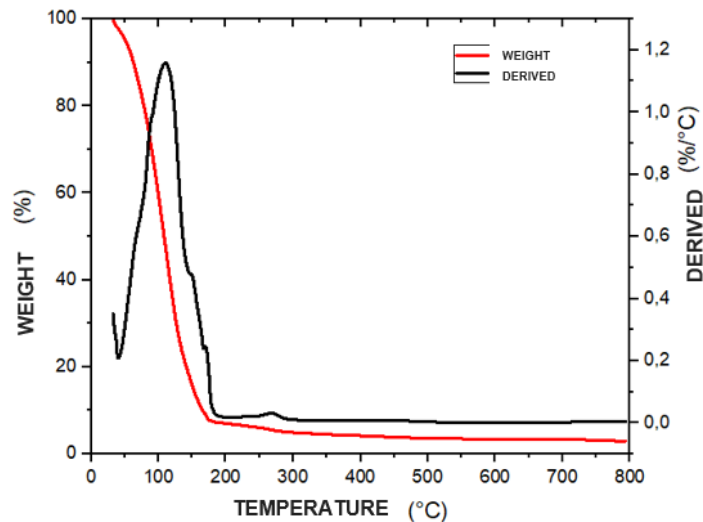


Figure 5. Thermogravimetric analysis for capsular sample produced at 2 weeks ago.

According to the chart, we observed that weight loss (%) occurred more rapidly from the beginning of warming up to 180 °C, with an approximate loss of 90%. This fact happened because in the interval between 50 °C and 120 °C we have the loss of all water available in the capsule, and, when analyzing the derivative of the weight, we have 3 peaks, the first one (100 °C) may be referring to total water loss of the matrix, the second (150 °C) and the third (170 °C) are generated due to the presence of the microbial consortium and the plant biomass inserted inside the capsule. Thus, degradation of microorganisms and biomass may have occurred at the same time of the water loss, because microbiological growth and biomass may have absorbed the moisture present in the capsule, causing water of the sodium alginate solution to be lost first and the water present in plant and microbiological biomass was lost in a secondary way (Anbinder *et al.*, 2011).

Stojanovic *et al.* (2012) observed that thermal decomposition, water removal and depolymerization accompanied by the rupture of CO and CC bonds may be present in the thermal analyzes, and for the TGA curves of *Thymus serpyllum*, alginate of sodium used as encapsulating matrix was degraded near 160 °C and the Glass Transition Temperature (T_G) around 27 °C. Anbinder *et al.*, (2011) used alginate microcapsules with gelatin coating, where TGA showed a large mass loss from 27 °C to 100 °C with T_G equal to 50.8 °C and mass loss of approximately 99.8%.

Therefore, high temperatures can cause the death of the microorganisms, causing their metabolism to be interrupted, consequently, the oil will not to be degraded (Han and Woycechowsky, 2017; Elsayed *et al.*, 2018). Thus, the use of the capsules should be performed at medium temperatures and close to room temperature for greater microbial metabolism. In addition, through Figure 6 we can analyze the TGA results of the recently produced capsule and evaluate whether there is a difference in response due to presence or absence of the microorganisms.

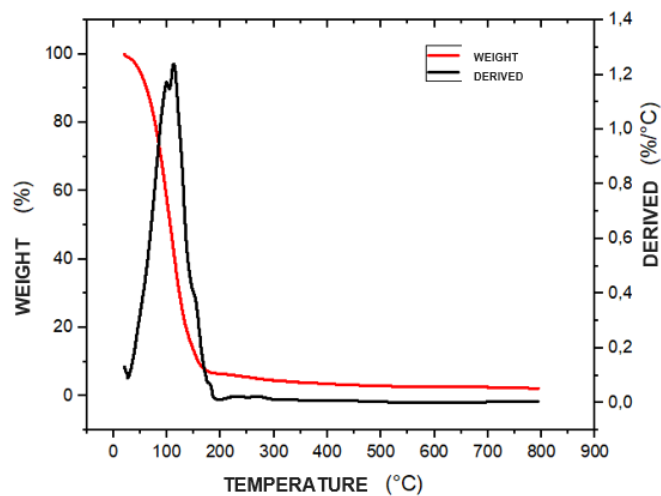


Figure 6. Thermogravimetric analysis for recently produced capsule.

The thermogravimetric analysis of the recently produced capsule, that is, without apparent presence of microbial growth on its superficial, showed that the mass loss occurred very similarly when compared with the analysis of the sample of 2 weeks. However, after 180 °C we can observe that the mass loss already reaches 100%, indicating that the capsule was totally degraded with the increase in temperature. In addition, when compared to the 2 weeks capsule, we observed that the microbiological community present on the capsule superficial caused the total degradation (100%) to occur later than in the recently produced capsule.

Thus, increasing the growth of the bacteria present in the capsule provides a higher temperature resistance and a greater action of the microorganisms, degrading the petroleum present in the sea (Roni *et al.*, 2018). Therefore, the capsule will protect the microorganisms for an initial growth and the oil will be degraded, so, the microbiological colony grows, consequently, the bacterial colony itself is protected and favors its presence and its metabolism in the means in which it was inserted. Thus, the use of capsules in the optimum temperature range (25°C-40°C) provides protection to the microbiological community until the initial growth of microorganisms occurs.

3.5 DSC

The DSC analysis was performed in two samples, the first with recently produced capsules and the second with 2 weeks capsules already showing bacterial growth in their structure, indicating that the plant biomass was consumed for initial growth of the consortium of microorganisms. Through Figure 7, we can evaluate the energy released (exothermic) or absorbed (endothermic) by sample of 2 weeks and thus infer about what occurs in its structure.

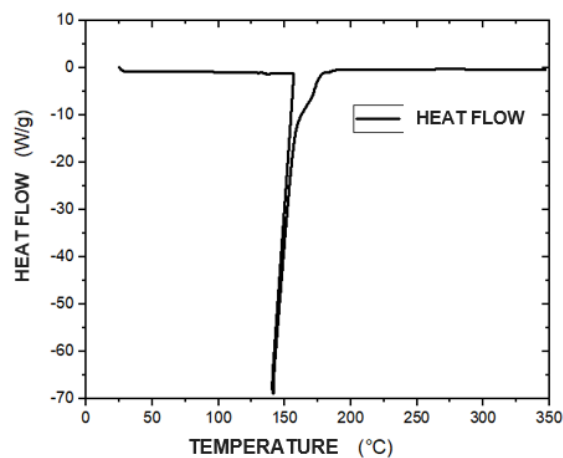


Figure 7. DSC analysis of capsular samples of 2 weeks.

The DSC curve presented is characterized by presence of a change in the slope of the line at around 40 °C, indicating that the T_G of the material is present near temperature. In addition, we observe a peak around 146 °C which corresponds to dehydration of sodium alginate, plant biomass and the microbial consortium contained within the capsule, so that the peak is endothermic due to the absorption of heat to the environment generated by dehydration (DONG *et al.*, 2004). According to Gazori *et al.* (2009), the DSC analysis of particles produced using sodium alginate are similar to those of chitosan, whose loss of water is also associated with the same temperature and the hydrophilic groups present in its structures.

DSC analysis shows that the capsule structure can be maintained up to T_G , since T_G represents some change in the capsular structure as the sample fusion, causing the release of biosurfactants and other molecules generated by bacterial metabolism can occur in a manner more efficient, since the colony of microorganisms will be protected over a wide temperature range and, consequently, will cause the degradation of the oil to occur more satisfactorily. Regarding the recently

produced capsules, we have Figure 8 whose DSC analysis obtained similar results when compared to the 2 weeks capsules.

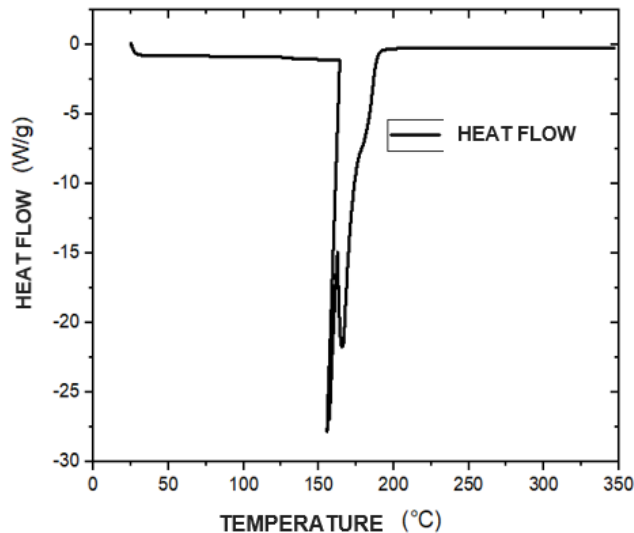


Figure 8. DSC analysis of recently produced capsular samples.

The recently produced capsules also showed a change in slope of the line around the temperature of 42 °C (T_G) and temperature value of the endothermic peak around 150 °C, temperature was slightly higher than that of the 2 week capsule, this may have occurred due to the higher amount of plant biomass present inside the recently produced capsule, since at the 2 weeks capsule the plant biomass was consumed by the microbial consortium for metabolism and growth of the bacteria. According to Soares (2011), the high amount of cellulose present in the plant biomass can to generate endothermic peaks at higher temperatures, so there is still a second endothermic peak around the 170 °C temperature that may belong to the cellulose present in the capsules. These analyzes show that plant biomass is being consumed by the consortium of microorganisms due to the difference between T_G of the samples, since a higher amount of cellulose provides a higher T_G . Thus, microorganisms are susceptible to growth and metabolism in addition to plant biomass as the initial substrate (Soares, 2011).

3.6 FESEM

Microscopy analyzes were performed inside and outside the capsules in order to show the superficial and the presence of pores in the structure. Due to the fragility of the microorganisms, they were agglutinated in the stage of metallization and in the pumping of electrons to form the images in

the microscope. In Figure 9 we can observe the microscopy of the outside of the recently produced capsule.

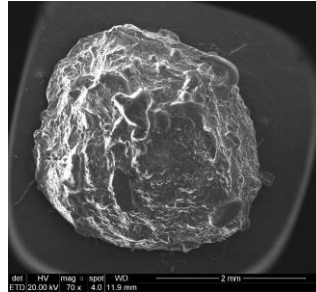


Figure 9. Microscopy of the outside of a recently produced capsule.

We can observe a wrinkling on the capsule superficial, indicating that the lyophilized microorganisms and the plant biomass meal were impregnated, a result also analyzed by Pérez-Chabela et al. (2013), whose presence of microorganisms such as bacteria and fungi present inside the capsules caused the superficial to be wrinkled, making it irregular.

However, in the Figure 10 we observed the presence of propagules and spores of the consortium of microorganisms present in the capsule as well as Martinez et al. (2016), indicating that one part has become impregnated on the superficial of the capsule itself.

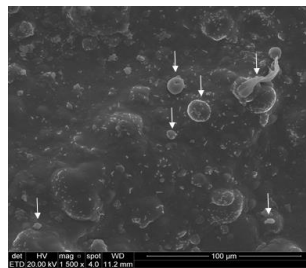


Figure 10. External microscopy of a recently produced capsule showing the presence of microorganism propagules.

In addition to the outside, in the Figure 11 we have the microscopy of the inside of the capsule, as well as the visualization of pores inside.

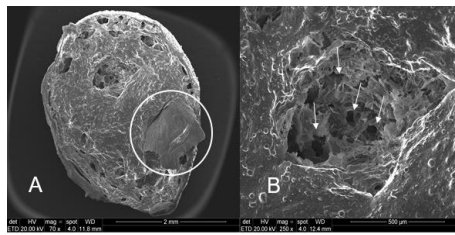


Figure 11. Internal microscopy of the recently produced capsule.

In part B (internal) we verified the presence of several pores, which according to Sundaramurthy and Sundramoorthy (2018) favors spore prospecting, making capsular protection more effective and bacterial growth is greater and easier. In addition, in part A (external) we have the presence of a large granule of plant biomass originating from the lack of sieving of the bergamot flour, which may hinder its degradation by the consortium of bacteria, because it has a larger superficial area than expected. However, the exacerbated size of the flour granule was found only in this capsule.

About the presence of microorganisms inside the capsule, we can see Figure 12, where it is possible to identify some granules/colonies of the bacterial consortium despite the great agglutinated that occurred in the metallization and microscopy process. The granules of bacteria found are identical to the bacterial granules presented by Muller (2012), indicating the presence of the microorganism consortium also inside the capsules.

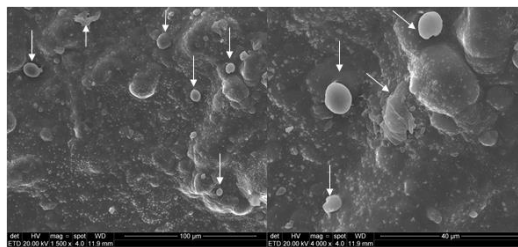


Figure 12. Internal microscopy of a capsule, showing the presence of microorganisms.

In addition to the recently produced capsule, we also evaluated capsules produced 2 weeks and 12 weeks, time elapsed until microscopic analysis. In Figure 13 it is possible to identify the superficial of the 2 weeks capsule.

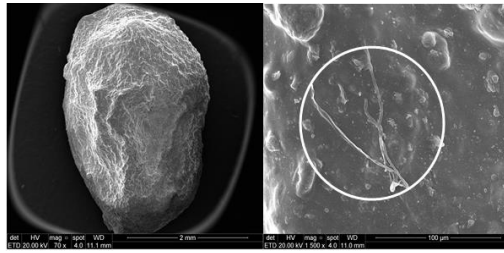


Figure 13. Microscopy of the outside of the capsule.

The outer superficial of the capsule with a time of 2 weeks is very similar to the superficial of the capsule just produced, however, we perceive the formation of a possible flagellum of the bacterial colony that leaves the interior of the capsule and reaches the outside due to the growth of the microorganisms. These structures are found in all *Bacillus* bacteria of the consortium inserted in the capsule and facilitate the movement of the microorganisms, which improves the contact with the substrate and increases the metabolic process (Mohapatra *et al.*, 2017; Mbozo *et al.*, 2017; Ghiuță *et al.*, 2017). Regarding the 12-week capsule, Figure 14 shows the external part of the sample and shows the opening of the capsule due to the growth of the microorganisms inside.

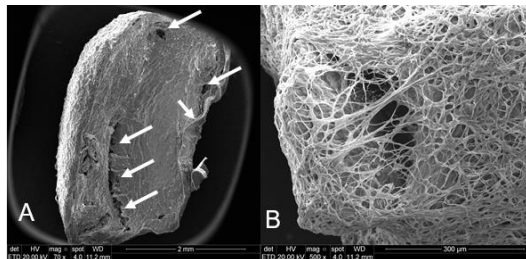


Figure 14. External microscopy of the capsule.

We observe that in part A of Figure 14 there are capsule breaks at several points, indicating a capsular degradation and growth of the microorganisms in its interior, in order to break it. In addition, in part B of the figure it is possible to emphasize the tension which occurs due to the "swelling" of the inner part of the capsule, causing the sodium alginate coating to be forced and opened as the interior inflates. Thus, we can expect that, over time, the colony of consortium microorganisms grow in such a way that there is a total forced opening of the capsule and the microorganisms, in greater quantity, are released. In the inner part of the capsule, we noticed a more deformed sample with a higher pore presence due to microbiological growth, as shown in Figure 15.

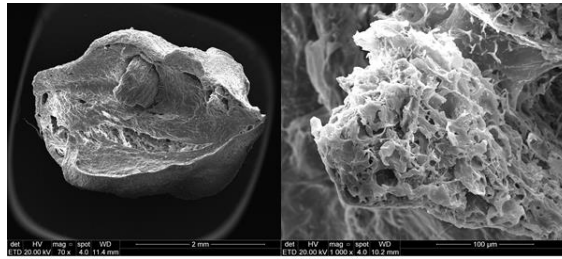


Figure 15. Microscopy of the inside of the capsule.

4. CONCLUSIONS

The method of producing capsules through dripping was efficient, generating uniform capsules with 4mm in diameter and confirmed the ease and low cost of its use. The counting of viable cells in different capsular concentrations of sodium alginate showed that increasing the amount of polymers in the capsule structure affects the integrity and metabolism of the microorganisms.

The presence of the bergamot biomass allowed the initial growth of microbiological biomass and, consequently, increased the production of biosurfactants. The increase in the production of biosurfactants can be analyzed indirectly through the emulsification index and the surface tension. The surface tension was reduced by 48% for 15 days and the emulsification index increased by approximately 80% over the same period, ie there was the presence of biosurfactants for these parameters to be altered.

TGA and DSC showed that the cells have a thermal stability at 42 °C and that increasing the growth of the bacteria consortium causes the microorganisms to acquire greater thermal resistance. In addition, the presence of 2 peaks in the TGA for the newly produced sample and the presence of 1 peak in the sample with longer production time indicate that the biomass is consumed by the consortium as the initial growth substrate.

FESEM showed that there is porosity in the capsular membrane of the samples and there is presence of microorganisms despite the agglutination of the bacteria, due to the process of metallization of the samples. In addition, the microscopies made it possible to infer that the microbiological consortium also degrades the capsular membrane itself composed of sodium alginate.

Therefore, capsules containing 1% (w/v) sodium alginate and bergamot flour can be used for the degradation of petroleum in the marine environment, since the analyzes showed the efficiency of the microbiological growth, the reduction of the surface tension, the increase of the emulsification index and production of biosurfactants. In addition, sodium alginate is non-toxic, and the microorganisms used do not affect human health, animal health and the environment,

REFERENCES

1. Anbinder, P. S., Deladino, L., Navarro, A. S., Amalvy, J. I., & Martino, M. N. (2011). Yerba mate extract encapsulation with alginate and chitosan systems: interactions between active compound encapsulation polymers. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 1(04), 80-87.
2. Brady, P. V., Brady, M. V., & Borns, D. J. (2018). *Natural attenuation: CERCLA, RBCAs, and the future of environmental remediation*. CRC Press.
3. Cao, Y., Xu, Z., Ling, N., Yuan, Y., Yang, X., Chen, L., ... & Shen, Q. (2012). Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber. *Scientia horticulturae*, 135, 32-39.
4. Cunha, M. C. A. (2017). Execução de ensaios microbiológicos nas áreas alimentar, ambiental e técnica em contexto empresarial. Faculdade de Ciências e Universidade do Porto.
5. Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*.
6. de Araújo Etchepare, M., Raddatz, G. C., de Moraes Flores, É. M., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., Barin, J. S., ... & de Menezes, C. R. (2016). Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 511-517.
7. de Oliveira Felipe, L., & de Cássia Dias, S. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens. *Química e Sociedade*. 39 (3), 228 - 236.
8. Decesaro, A., Rigon, M. R., Thomé, A., & Colla, L. M. (2013). Produção de biossurfactantes por microrganismos isolados de solo contaminado com óleo diesel. *Química Nova*, 36(7), 947-954.


9. Dong, Y., Ruan, Y., Wang, H., Zhao, Y., & Bi, D. (2004). Studies on glass transition temperature of chitosan with four techniques. *Journal of Applied Polymer Science*, 93(4), 1553-1558.
10. dos Santos, J. J., & Maranhão, L. T. (2018). Rhizospheric microorganisms as a solution for the recovery of soils contaminated by petroleum: A review. *Journal of environmental management*, 210, 104-113.
11. Elsayed, H., Salama, H., Elshafei, K., & Hegazi, N. M. (2018). Micro-encapsulation of *Eugenia supra-auxillaris* phenolics Rich Fraction for Its Possible Use as a Natural Food Preservative. *Egyptian Journal of Chemistry*, 61(1), 85-91.
12. Etchepare, M. A., Barreto, A. R., Cavalheiro, C. P., & de Menezes, C. R. (2015). Microencapsulation of probiotics by extrusion method associated with electrostatic interactions. *Ciência e Natura*, 37, 75-86.
13. Felix, A. K. N., Martins, J. J., Almeida, J. G. L., Giro, M. E. A., Cavalcante, K. F., Melo, V. M. M., ... & de Santiago Aguiar, R. S. (2018). Purification and characterization of a biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* in cashew apple juice and its application in the remediation of oil-contaminated soil. *Colloids and Superficials B: Biointerfaces*.
14. Gazori, T., Khoshayand, M. R., Azizi, E., Yazdizade, P., Nomani, A., & Haririan, I. (2009). Evaluation of Alginate/Chitosan nanoparticles as antisense delivery vector: formulation, optimization and in vitro characterization. *Carbohydrate Polymers*, 77(3), 599-606.
15. Ghiuță, I., Cristea, D., Croitoru, C., Kost, J., Wenkert, R., Vyrides, I., ... & Munteanu, D. (2018). Characterization and antimicrobial activity of silver nanoparticles, biosynthesized using *Bacillus* species. *Applied Superficial Science*, 438, 66-73.
16. Gomes, M. B., Gonzales-Limache, E. E., Sousa, S. T. P., Dellagnezze, B. M., Sartoratto, A., Silva, L. C. F., ... & Sousa, M. P. (2018). Exploring the potential of halophilic bacteria from oil terminal environments for biosurfactant production and hydrocarbon degradation under high-salinity conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 126, 231-242.
17. Han, X., & Woycechowsky, K. J. (2017). Encapsulation and Controlled Release of Protein Guests by the *Bacillus subtilis* Lumazine Synthase Capsid. *Biochemistry*, 56(47), 6211-6220.
18. Klein, S., Avrahami, R., Zussman, E., Beliavski, M., Tarre, S., & Green, M. (2012). Encapsulation of *Pseudomonas* sp. ADP cells in electrospun microtubes for atrazine


- bioremediation. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 39(11), 1605-1613.
19. Léonard, L., Degraeve, P., Gharsallaoui, A., Saurel, R., & Oulahal, N. (2014). Design of biopolymeric matrices entrapping bioprotective lactic acid bacteria to control *Listeria monocytogenes* growth: Comparison of alginate and alginate-caseinate matrices entrapping *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* cells. *Food Control*, 37, 200-209.
 20. Lopes, S. P. (2016). Desenvolvimento e caracterização de cápsulas probióticas contendo *Lactobacillus Rhamnosus*. XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química. Fortaleza-CE. 2016.
 21. Maia, P., Santos, V., Ferreira, A., Luna, M., Silva, T., Andrade, R., & Campos-Takaki, G. (2018). An Efficient Bioemulsifier-Producing *Bacillus subtilis* UCP 0146 Isolated from Mangrove Sediments. *Colloids and Interfaces*, 2(4), 58.
 22. Martinez, R. C. R., Alvarenga, V. O., Thomazini, M., Fávoro-Trindade, C. S., & de Souza Sant'Ana, A. (2016). Assessment of the inhibitory effect of free and encapsulated commercial nisin (Nisaplin®), tested alone and in combination, on *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in refrigerated milk. *LWT-Food Science and Technology*, 68, 67-75.
 23. Mbozo, A. B. V., Kobawila, S. C., Anyogu, A., Awamaria, B., Louembe, D., Sutherland, J. P., & Ouoba, L. I. I. (2017). Investigation of the diversity and safety of the predominant *Bacillus pumilus* sensu lato and other *Bacillus* species involved in the alkaline fermentation of cassava leaves for the production of Ntoba Mbodi. *Food control*, 82, 154-162.
 24. Melo, I. D., & Costa, F. G. (2005). Desenvolvimento de uma formulação granulada a base de *Trichoderma harzianum* para o controle de fitopatógenos. *Comunicado técnico*, 31.
 25. Mendis, H. C., Thomas, V. P., Schwientek, P., Salamzade, R., Chien, J. T., Waidyarathne, P., & De La Fuente, L. (2018). Strain-specific quantification of root colonization by plant growth promoting rhizobacteria *Bacillus firmus* I-1582 and *Bacillus amyloliquefaciens* QST713 in non-sterile soil and field conditions. *PLoS one*, 13(2), e0193119.
 26. Mohapatra, S., Maity, S., Dash, H. R., Das, S., Pattnaik, S., Rath, C. C., & Samantaray, D. (2017). *Bacillus* and biopolymer: Prospects and challenges. *Biochemistry and biophysics reports*, 12, 206-213.

27. Muller, D. (2012). *Incorporação de polímeros intrinsecamente condutores em nanofibras de celulose bacteriana*. Santa Catarina, Brasil, 143p. (M.Sc. Dissertation, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. UFSC).
28. Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental pollution*, 133(2), 183-198.
29. Murado, M. A., Vázquez, J. A., Rial, D., & Beiras, R. (2011). Dose–response modelling with two agents: application to the bioassay of oil and shoreline cleaning agents. *Journal of hazardous materials*, 185(2-3), 807-817.
30. Pérez-Chabela, M. L., Lara-Labastida, R., Rodriguez-Huezo, E., & Totosaus, A. (2013). Effect of spray drying encapsulation of thermotolerant lactic acid bacteria on meat batters properties. *Food and Bioprocess Technology*, 6(6), 1505-1515.
31. ^aPerfumo, A., Banat, I. M., & Marchant, R. (2018). Going green and cold: biosurfactants from low-temperature environments to biotechnology applications. *Trends in biotechnology*.
32. ^bPerfumo, A., Rudden, M., Marchant, R., & Banat, I. M. (2018). Biodiversity of biosurfactants and roles in enhancing the (bio) availability of hydrophobic substrates. *Cellular Ecophysiology of Microbe: Hydrocarbon and Lipid Interactions*, 75-103.
33. Pethkar, A. V., & Paknikar, K. M. (2003). Thiosulfate biodegradation–silver biosorption process for the treatment of photofilm processing wastewater. *Process Biochemistry*, 38(6), 855-860.
34. Presentato, A., Cappelletti, M., Sansone, A., Ferreri, C., Piacenza, E., Demeter, M. A., ... & Steinbuchel, A. (2018). Aerobic growth of *Rhodococcus aetherivorans* BCP1 using selected naphthenic acids as the sole carbon and energy sources. *Frontiers in microbiology*, 9, 672.
35. Rovina, F., Ehrhardt, D. D., & Tambourgi, E. B. (2018). Utilização do resíduo da casca de laranja para produção de biossurfactantes por *Bacillus subtilis*. *Scientia Plena*, 14(4).
36. Safdari, M. S., Kariminia, H. R., Rahmati, M., Fazlollahi, F., Polasko, A., Mahendra, S., ... & Fletcher, T. H. (2018). Development of bioreactors for comparative study of natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil. *Journal of hazardous materials*, 342, 270-278.
37. Sharma, S. K., Mulligan, C. N., & Mudhoo, A. (2014). *Biosurfactants: research trends and applications*. CRC press.

38. Soares, C. C., de Andrade, A. S. A., Ferreira, G. F. D. O., Druzian, J. I., & Lobato, A. K. D. C. L. (2018). Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* UFPEDA 86 using papaya (*Carica papaya* L.) waste as substrate: Viability studies and pH influence of the culture means. *African Journal of Biotechnology*, 17(30), 928-937.
39. Soares, V. C. (2011). *Comportamento térmico, físico e químico da madeira e do carvão em diferentes idades*. Minas Gerais, Brasil, 109p. (Doctoral thesis, Universidade Federal de Lavras).
40. Soni, A., Oey, I., Silcock, P., & Bremer, P. J. (2018). Impact of temperature, nutrients, pH and cold storage on the germination, growth and resistance of *Bacillus cereus* spores in egg white. *Food Research International*, 106, 394-403.
41. Stojanovic, R., Belscak-Cvitanovic, A., Manojlovic, V., Komes, D., Nedovic, V., & Bugarski, B. (2012). Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 92(3), 685-696.
42. Sundaramurthy, A., & Sundramoorthy, A. K. (2018). Polyelectrolyte capsules preloaded with interconnected alginate matrix: An effective capsule system for encapsulation and release of macromolecules. *International journal of biological macromolecules*, 107, 2251-2261.
43. Wei, X., Liao, X., Cai, J., Zheng, Z., Zhang, L., Shang, T., ... & Zhang, R. (2017). Effects of *Bacillus amyloliquefaciens* LFB112 in the diet on growth of broilers and on the quality and fatty acid composition of broiler meat. *Animal Production Science*, 57(9), 1899-1905.

ANEXO I

 **International Biodeterioration & Biodegradation** <Evisesupport@elsevier.com> 22 de jan de 2019 11:37 ☆ ↶ ⋮
para eu ▾

 inglês ▾ > português ▾ [Traduzir mensagem](#) [Desativar para: inglês](#) ×

Dear Ms faria,

Submission no: IBB_2019_100
Submission title: PRODUCTION AND ANALYSIS OF CAPSULES CONTAINING MICROORGANISMS CONSORTIATED FOR FUTURE APPLICATION IN PETROLEUM BIORREMIEDIATION
Corresponding author: Dr Rogerio Lourega
Listed co-author(s): Ms Douglas faria, Dr. Fernando Santos, Mr Rodrigo de Abreu Lang Lang, Ms Grazielle Machado

Dr Lourega has submitted a manuscript to International Biodeterioration & Biodegradation and listed you as a co-author. This email is to let you know we will be in contact with updates at each decision stage of the submission process.

The link below takes you to a webpage where you can sign in to our submission system using your existing Elsevier profile credentials or register to create a new profile. You will then have the opportunity to tailor these updates and view reviewer and editor comments once they become available.

http://www.evisesupport.com/profile/api/navigate/BB?resourceUri=%2Fco-author%2F%3Fdggcid%3Dinvite_email_coauthoroutreach09648305%23%2FIBB%2Fsubmission%2FIBB_2019_100&email=douglas.faria@acad.pucrs.br&firstName=Douglas&surname=faria&country=Brazil&institution=PUCRS&title=Ms

If you are not a co-author of this manuscript, please contact Researcher Support at: <https://service.elsevier.com>

Thank you very much for your submission and we will be in touch as soon as we have any news to share.

International Biodeterioration & Biodegradation

If you do not wish to receive further update emails on your co-authored submission, you can unsubscribe via this link:

<http://www.evisesupport.com/co-author/#/IBB/unsubscribe/douglas.faria@acad.pucrs.br/L9aVoCtC2pBz1gxiKDuedDc338hjm18RnbRZ1HwvuzWaTu1XujEJ4rN2xemitPSdGyFlpZaTxsNT5HBOPa5anw>

ARTIGO 2

AVALIAÇÃO DA BIORREMEDIAÇÃO DE COMPOSTOS ALIFÁTICOS PROVENIENTES DE DERRAMAMENTOS DE PETRÓLEO EM MEIO SALINO

ABSTRACT

Oil spills cause severe environmental and economic impacts, so the bioremediation technique has been extensively studied in order to use microorganisms for the degradation of petroleum. Due to its complex composition, petroleum makes the action of the microorganisms difficult in relation to the metabolization of its components and, therefore, the use of the encapsulation with plant biomass insertion provides protection and initial metabolic input for the production of biosurfactants, which increase the surface area of contact between the metabolites and the microorganisms, resulting in increased degradation of the compounds and greater efficiency in the bioremediation process. Therefore, the objectives of the present work are to produce capsules of sodium alginate containing plant biomass and consortium microorganisms and to evaluate their use in the degradation of petroleum through a fractional factorial experimental design to evaluate the importance of the variables: capsule concentration, (crude oil or pure aliphatic fraction), and then to use the full factorial design with the variables with the greatest impact in the process to determine the optimization of the degradation. performed with the fraction of saturated aliphatic from SARA fractionation through quantification with gas chromatography technique. The results showed that all variables have an impact on the biological process, however, the most important are: substrate concentration, time, agitation and temperature, so the complete factorial design indicated that there was an increase in C12 concentration in most samples, indicating that higher chain hydrocarbons are being degraded primarily, in addition, the presence of the C14 standard in the pure saturated aliphatic sample and in the other samples was not noticed, ie the petroleum used could already have undergone chemical processes such as oxidation or, even the degradation by microorganisms already present in its composition. Therefore, the use of capsules containing bacterial consortium is an excellent alternative for the degradation of petroleum compounds, since it has demonstrated a great capacity of degradation through the microbiological metabolism.

Key-words: petroleum, microorganisms, capsules, bioremediation, degradation.

1. INTRODUÇÃO

O petróleo é uma fonte de lucro para diversos países e geram produtos de alto valor agregado, entretanto, também é uma fonte de grandes problemas ambientais devido aos constantes derramamentos de plataformas petrolíferas (Balke e Brown, 2018; Paim, 2011; Leon, 2000). Quando o petróleo é extraído recebe a denominação de *óleo cru*, pois está em seu estado natural, formado por hidrocarbonetos e outros contaminantes em frações menores (de França, Machado & Caramão, 2017; Van Hamme, 2003). A partir desse óleo cru, vários produtos são obtidos através do refino, tais como: gasolina, querosene, diesel, entre outros (Chambers *et al.*, 2018; Cui *et al.*, 2018; Matapour *et al.*, 2018; Moro e Nascimento, 2011). Logo, os inúmeros produtos obtidos e até mesmo o petróleo bruto são altamente tóxicos para o meio ambiente e prejudiciais a fauna e flora presente nos locais de derramamento (Paim, 2011).

Existem diferentes frações advindas do petróleo cru que podem ser analisadas, dentre elas temos: alifáticos saturados, asfaltenos, resinas e aromáticos (Chambers *et al.*, 2018). Os compostos alifáticos saturados são aqueles com maior facilidade de degradação e englobam hidrocarbonetos com variado tamanho de cadeia (Matapour *et al.*, 2018).

Portanto, com o propósito de avaliar diferentes técnicas de remediação do petróleo em ambiente marinho, inúmeros estudos em torno de variados métodos físicos, químicos e biológicos vem sendo avaliados para promover uma remediação eficiente e barata (Murado *et al.*, 2011). Uma das técnicas amplamente estudadas, com alta eficiência e baixo custo é o uso de micro-organismos que degradam os componentes químicos do petróleo (Santos e Maranhão, 2018). Os processos biológicos são mais seguros, menos agressivos ao meio ambiente, mais eficientes e possuem menor custo de operação (Perfumo *et al.*, 2018; Sharma, Mulligan & Mudhoo, 2014; Mulligan, 2005).

Diversos micro-organismos podem ser utilizados na biorremediação de petróleo, por isso, a técnica de consórcio está sendo estudada com o intuito de aumentar a produção de enzimas e biossurfactantes que facilitam a degradação do (Cao *et al.*, 2012). Logo, uma comunidade com três ou mais micro-organismos são inseridas no ambiente poluído de forma a aumentar a eficiência do processo de biodegradação do petróleo no ambiente marinho (Das e Chandran, 2011). O consórcio de bactérias propicia o aumento da produção de enzimas, metabólitos e biossurfactantes durante o processo de degradação, acarretando no aumento de sua eficiência (Cao *et al.*, 2012). Os biossurfactantes são moléculas anfipáticas e permitem uma maior área de contato entre o micro-organismo e o substrato. Como grande parte do petróleo não se dissolve em água, a biodegradação ocorre na região interfacial entre o petróleo e a água, assim, o biossurfactante facilita o contato e aumenta a quantidade de moléculas degradadas pelos micro-organismos encapsulados (Oliveira e Dias, 2017). Segundo Varjani (2017), dois mecanismos são considerados para degradação do petróleo pelas bactérias: o contato interfacial direto entre os hidrocarbonetos e os micro-organismos, e, o contato das células microbianas com hidrocarbonetos emulsificados devido a presença de biossurfactantes.

Além disso, a presença do petróleo, como contaminante altamente tóxico, prejudica o metabolismo das bactérias presentes no consórcio e, por isso, o encapsulamento é um método adequado para proteger a comunidade microbiológica (Klein *et al.*, 2012). Assim, a produção de cápsulas possibilita que as mesmas comportem uma concentração de micro-organismos, e ainda permitem o contato do micro-organismo e das enzimas com o substrato (compostos do petróleo) e, ao mesmo tempo, protegem a comunidade microbiana dos efeitos físicos e químicos que podem interferir na eficiência do processo de degradação (Etchepare *et al.*, 2016). Portanto, o objetivo do presente trabalho é avaliar a degradação do petróleo devido ao metabolismo microbiológico usando cápsulas contendo consórcio de bactérias e biomassa vegetal.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais e métodos utilizados na produção das cápsulas e nas análises de degradação de alifáticos saturados estão apresentados nos próximos tópicos.

2.1. Produção de Cápsulas

A primeira etapa consiste no preparo da solução de alginato de sódio 1% (p/v) com diluição em água a 70 °C e da farinha de biomassa vegetal de *Citrus reticulata* utilizando moinho de bolas para trituração. Após, 0,75% (p/v) da farinha e 1% (p/v) do consórcio de micro-organismos liofilizados contendo *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Rhodococcus sp.* são adicionados a solução de alginato de sódio 1% (p/v). Depois, são feitas coletas sucessivas com seringa de 20 mL para iniciar o gotejamento em solução de CaCl₂ 2% (p/v) contendo 1 mL de Tween 80 para formação imediata das cápsulas. Além disso, para que as cápsulas estejam livres de qualquer outro contaminante, é feita lavagem com solução de NaCl 5% (p/v) (Etchepare *et al.*, 2016).

2.2. Definição dos Parâmetros do Meio Reacional

Os meios reacionais serão utilizados para avaliar a degradação do petróleo em meio salino e diferentes parâmetros serão analisados, dentre eles: concentração de cápsulas (p/v), concentração de substrato (p/v), agitação, temperatura, tipo de substrato (petróleo cru/alifáticos saturados) e tempo.

2.2.1 Meio Salino Sintético

O meio salino sintético foi produzido com base em Bidwell e Spotte (1985) para simular a água do mar, onde utilizados os seguintes reagente e concentrações:

- Sulfato de Cálcio 27,6 g.L⁻¹;
- Sulfato de Magnésio 6,9 g.L⁻¹;
- Cloreto de Magnésio 5,4 g.L⁻¹;
- Cloreto de Cálcio 1,4 g.L⁻¹;
- Cloreto de Potássio 0,6 g.L⁻¹;
- Bicarbonato de Sódio 0,2 g.L⁻¹;
- Brometo de Potássio 0,027 g.L⁻¹;
- Cloreto de Estrôncio 0,02 g.L⁻¹;
- Sulfato de Manganês 0,004 g.L⁻¹;
- Fosfato de Sódio 0,004 g.L⁻¹;
- Molibdato de Sódio 0,001 g.L⁻¹.

2.2.2 Purificação inicial do petróleo

O petróleo foi adquirido com apoio da Refinaria Alberto Pasqualini no Rio Grande do Sul/Brasil, sendo que o mesmo apresenta baixo grau API. A retirada de resinas e asfaltenos provenientes do petróleo pode ser realizada seguindo o protocolo do método 1664 da EPA (*Environmental Protection Agency*). Inicialmente foi colocado 30 mL de *n*-hexano no frasco contendo 10 mL de amostra, e o conteúdo deste foi despejado em funil de separação, agitado por 2 minutos e deixado em repouso por 10 minutos para separação das fases e, em seguida, foi feita extração da fase orgânica e coleta em béquer de vidro previamente limpo.

Depois da extração e coleta, foi adicionado 2 g de sulfato de sódio anidro para remoção de resíduos de água, sendo posteriormente filtrado em funil de vidro. Depois, as amostras foram recolhidas em frascos e levados para geladeira a 4 °C para posterior fracionamento SARA e análise de CG-FID.

2.2.3 Fracionamento SARA

A metodologia SARA utiliza a técnica de cromatografia clássica de coluna aberta (norma ASTM D2007-93) para separar as frações do petróleo (saturados alifáticos, aromáticos, resinas e asfaltenos), cujo fracionamento é muito importante para caracterização (Akmaz *et al.*, 2011). A primeira etapa consiste na precipitação

dos asfaltenos, como mostra Figura 1.

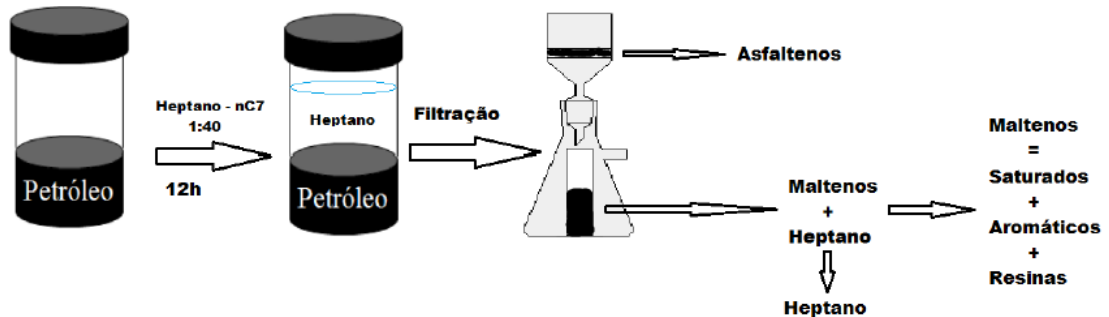


Figura 1. Etapa de precipitação de asfaltenos (Ramos, 2014).

Segundo Ramos (2014), tal procedimento consiste na adição de *n*-heptano à uma amostra de petróleo, na razão de 1:40 m/v (óleo cru/heptano), sob agitação. Em seguida, a amostra permanece 12 horas sob repouso em ambiente escuro e o precipitado asfáltico é filtrado a vácuo com uso de membrana de celulose de 0,45 μm e lavado até a retirada completa da coloração escura. Por fim, os compostos maltênicos são obtidos pela evaporação do solvente (heptano) com auxílio de evaporador rotativo na temperatura de 40 °C sob vácuo. Assim, o óleo resultante é utilizado para análise cromatografia clássica de coluna aberta através do uso de uma bureta de 100 mL, sendo que a coluna é empacotada através da adição de uma suspensão de 15 g de sílica gel 80 mesh em hexano. Após o empacotamento, aplica-se aproximadamente 250mg de maltenos ao topo da coluna e a eluição ocorre conforme Figura 2.

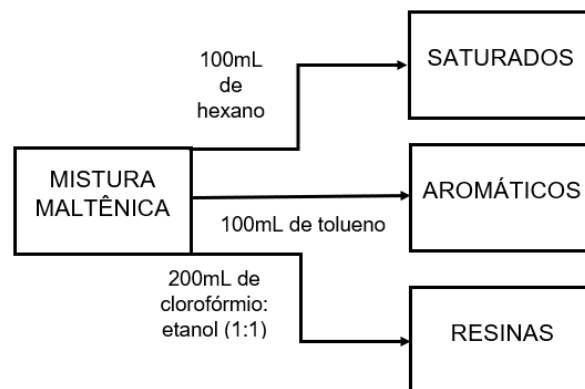


Figura 2. Etapas de eluição da cromatografia clássica em coluna aberta.

Como o intuito do trabalho é a avaliação dos alifáticos saturados, apenas a primeira eluição foi realizada, gerando uma solução de alifáticos saturados em hexano, sendo que o solvente foi evaporado usando evaporador rotativo.

Portanto, após o fracionamento do petróleo, produção de cápsulas e meio salino sintético, foi necessário avaliar a influência dos parâmetros a serem analisados, por isso, foi feito um delineamento fatorial fracionado com o intuito de avaliar os parâmetros e, assim, definir quais seriam os mais significantes no processo de degradação.

2.3. Delineamento Fatorial Fracionado

O software utilizado para realizar o delineamento experimental foi o *Minitab*, com fracionamento 2^{k-2} e, seguiu o uso das variáveis e valores descritos na Tabela 1, onde A: Concentração de Cápsulas; B: Diluição de Substrato; C: Agitação; D: Duração do Processo; E: Substrato; F: Temperatura.

Tabela 1. Variáveis e valores utilizados no delineamento fatorial fracionado.

	A	B	C	D	E	F
-1	20% (p/p)	20% (p/p)	0 rpm	20 dias	Petróleo bruto	25°C
1	50% (p/p)	50% (p/p)	50 rpm	40 dias	Fração alifática saturada pura	40°C

Assim, através do software, o número de corridas e interações foram formuladas conforme Tabela 2.

Tabela 2. Corridas geradas pelo software *Minitab*.

OrdemEns	PtCentral	Blocos	A	B	C	D	E	F
1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1
2	1	1	1	1	-1	1	-1	-1

3	1	1	-1	-1	1	-1	1	1
4	1	1	1	-1	1	1	-1	-1
5	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
7	1	1	-1	1	1	1	-1	1
8	1	1	1	-1	-1	1	1	1
9	1	1	-1	1	1	-1	-1	-1
10	1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
11	1	1	-1	-1	-1	1	-1	1
12	1	1	1	1	1	-1	1	-1
13	1	1	1	-1	1	-1	-1	1
14	1	1	-1	1	-1	-1	1	1
15	1	1	-1	1	-1	1	1	-1
16	1	1	-1	-1	1	1	1	-1

Após o uso do delineamento fatorial fracionado deve ser feita análise das variáveis com maior fator de impacto no processo de biodegradação e, assim, utilizar o delineamento fatorial completo para otimizar o processo.

2.4. Cromatografia Gasosa

O equipamento utilizado foi um Cromatógrafo Shimadzu com uma coluna capilar de sílica fundida recoberta com um filme de 5%-dimetil-95%-dimetil-polisiloxano, Rtx-1 (RESTEK; 30 m x 0,25 mm; espessura de fase de 0,25 µm). A temperatura inicial do forno foi de 40 °C mantida em isoterma por 1 min, aquecimento de 6 °C.min⁻¹ até 310 °C e mantido em isoterma por 20 minutos. A temperatura do injetor foi de 290 °C e do detector de 340 °C. O hidrogênio foi usado como gás de arraste e foi utilizada injeção com divisão de fluxo de 1:20.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Meios Reacionais e Coletas

Os meios reacionais foram montados de forma simples, mostrando a facilidade e eficácia no método de avaliação de degradação. Na Figura 3, podemos visualizar em A um Erlenmeyer contendo petróleo, cápsulas e meio salino sintético, já em B temos algumas amostras de alifáticos saturados coletadas nos primeiros 20 dias de análise das variáveis pelo delineamento fracionado.



Figura 3. Meio reacional estudado (A) e amostras contendo compostos alifáticos saturados (B).

A parte A mostra que as cápsulas aderem ao petróleo no início do processo, indicando que pode haver uma adsorção do petróleo na membrana capsular contendo alginato de sódio. Já na parte B, percebemos que as amostras de alifáticos saturados são de cor amarelada e juntamente com essas amostras temos a presença de biomassa microbiana sedimentada no frasco, portanto, a membrana capsular foi degradada para liberação dos micro-organismos e houve degradação do petróleo e da biomassa vegetal juntamente com a própria cápsula de alginato de sódio. Segundo Cheng et al. (2017) e Zabbey et al. (2017), o estudo da biorremediação em meios reacionais contidos em erlenmeyers fornece uma resposta rápida de tomada de decisão sobre os efeitos da degradação através do metabolismo de micro-organismos.

3.2. Delineamento Fatorial Fracionado

A análise de degradação foi feita com base em dois padrões: C12 e C14, pois os demais não foram eluídos pela coluna, indicando que a coluna utilizada para cromatografia é eficiente para a eluição de alifáticos saturados de menor cadeia.

Os cromatogramas indicaram que a degradação ocorreu de forma eficiente como podemos analisar pela Figura 4.

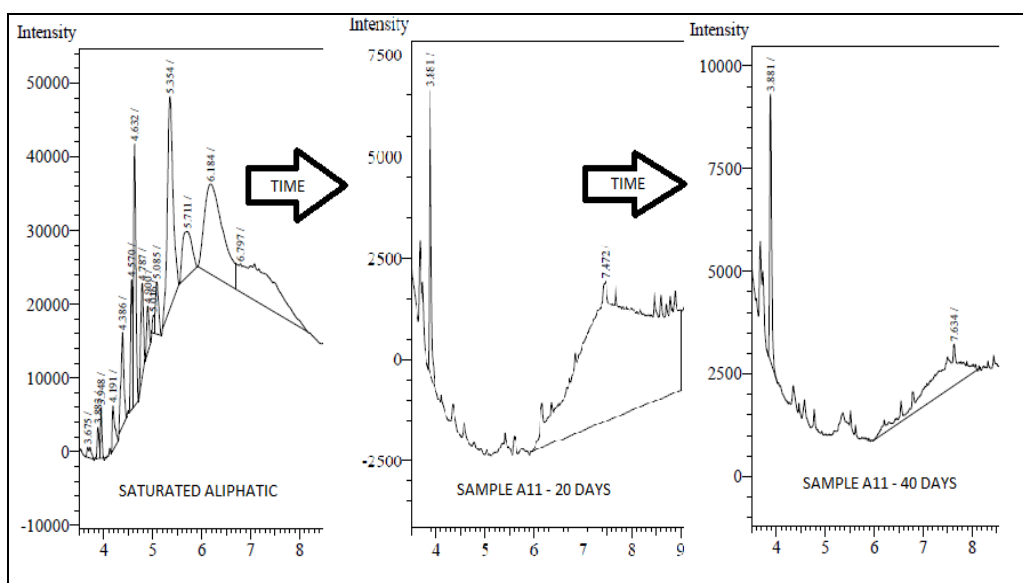


Figura 4. Cromatogramas referentes a amostra de referência (alifáticos saturados puro) e amostra A11 na coleta de 20 dias e 40 dias.

É visível a diminuição dos picos ao longo do tempo e, além disso, percebemos que a maior parte da degradação dos compostos ocorreu até o vigésimo dia, entretanto, mesmo após esse período, a degradação ainda continua ocorrendo, já que ainda há diminuição de compostos entre 6 e 8 minutos. Além disso, também percebemos, através dos cromatogramas, que a coluna não foi adequada para eluição dos alifáticos, uma vez que a maioria dos picos ficaram próximos uns dos outros e com bandas largas, dificultando a análise dos tempos de retenção.

Com relação aos cálculos, as áreas dos picos referentes aos compostos C12 e C14 foram avaliadas com base na área de alifáticos saturados puros, pois todas as amostras possuíam concentração de 2% (p/p), sendo assim, usar a área dos

picos como forma de gerar uma porcentagem de degradação é viável pois as amostras de referência, ou seja, com 0% de degradação são compostas pelos alifáticos saturados puros. Lembrando que, todas as análises cromatográficas foram realizadas em duplicata, logo, foi feita a média de cada amostra, incluindo a de referência (alifáticos saturados puros), as quais foram usadas para definir a porcentagem de degradação. Além disso, os valores de degradação negativos indicam que ao invés de haver diminuição da concentração do composto, houve aumento da concentração, tal fato pode ser explicado devido a degradação de compostos de maior cadeia, gerando aumento da quantidade de C12 e/ou C14 usados como padrões avaliados. O Anexo A, contém todos os dados referentes aos cálculos e valores de área das amostras advindas dos cromatogramas.

Após os cálculos, é feita análise de variáveis utilizando software, o qual gerou o gráfico, referente a degradação de C12 e C14, apresentado pela Figura 5.

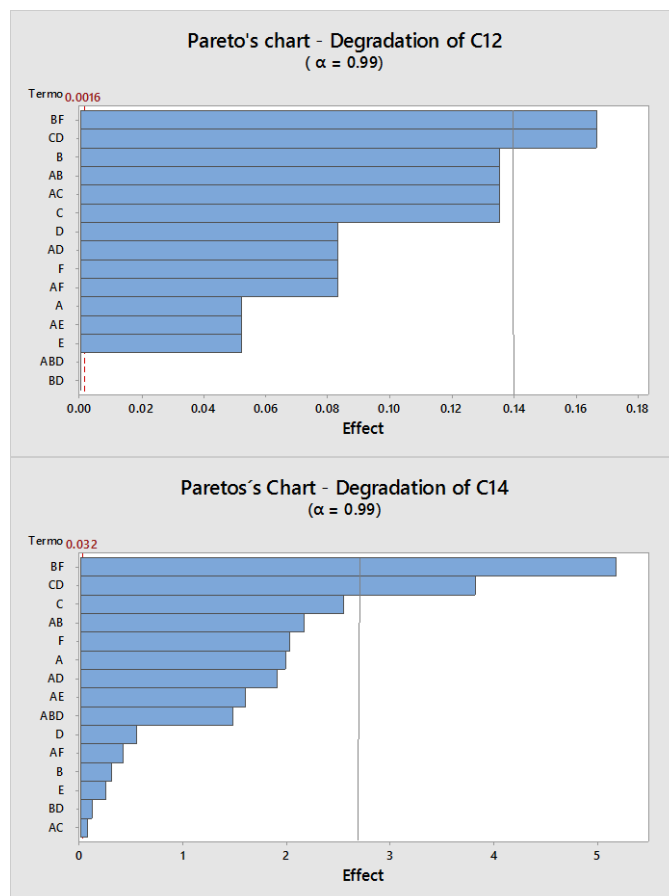


Figura 5. Gráfico de Pareto para degradação de C12 e C14.

Dessa forma, é possível inferir que a maioria das variáveis acabam se tornando importantes na degradação de C12 e C14. Entretanto, as variáveis com maiores efeitos foram BF e CD, e, por isso, foram escolhidas para serem analisadas com delineamento fatorial completo. Além do gráfico de Pareto, também é possível avaliar as variáveis através do gráfico normal de efeitos, o qual apresenta a maior importância da variável de acordo com sua distância do ponto zero. Logo, quanto mais distantes do ponto zero, maior a influência e efeito da variável. Na Figura 6, o gráfico normal de efeito da degradação de C12 e C14 mostra que todas as variáveis têm certo grau de importância, entretanto, as variáveis BF e CD são as mais distantes do ponto zero.

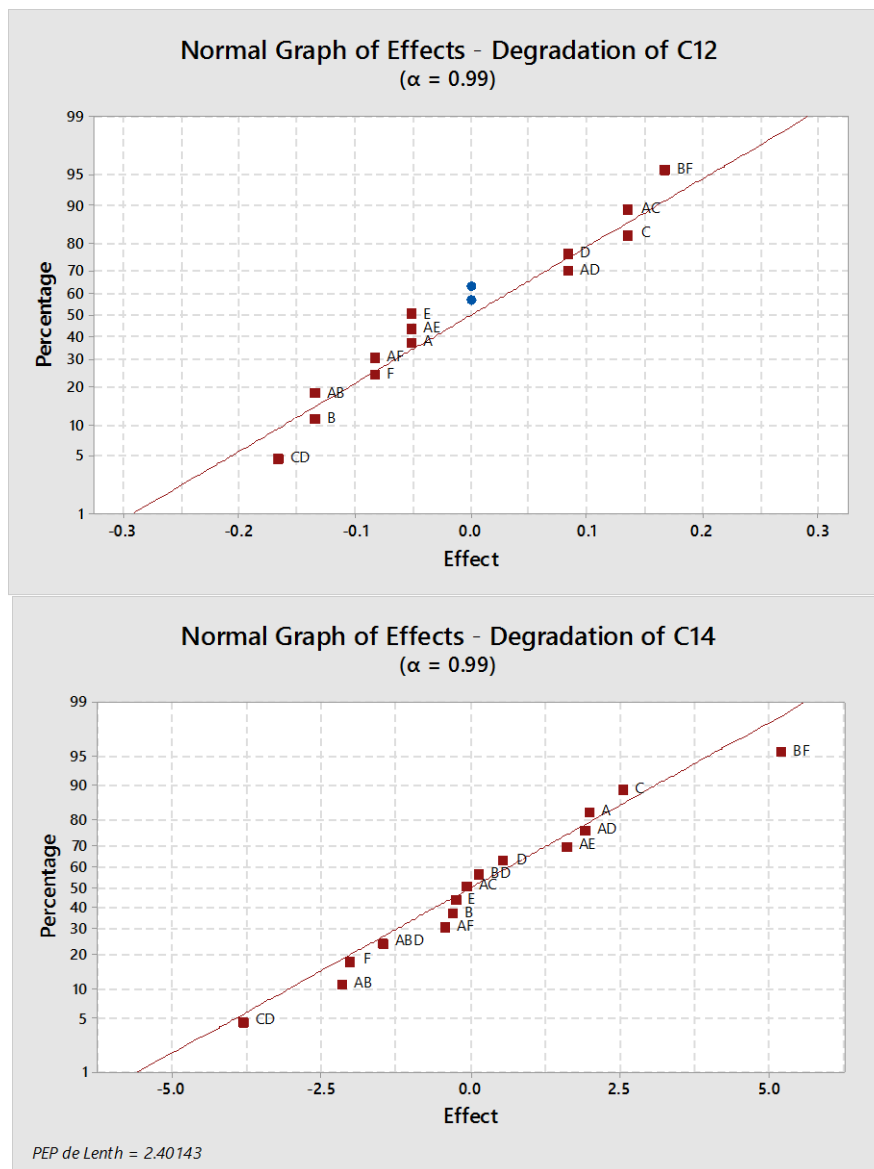
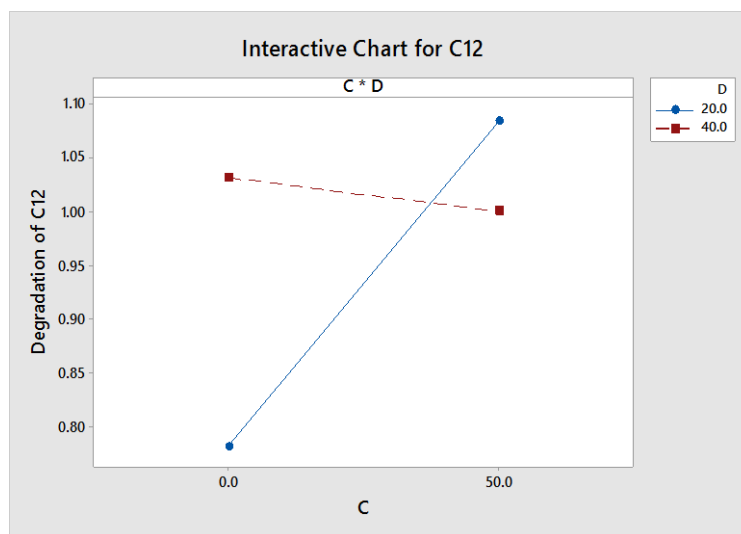
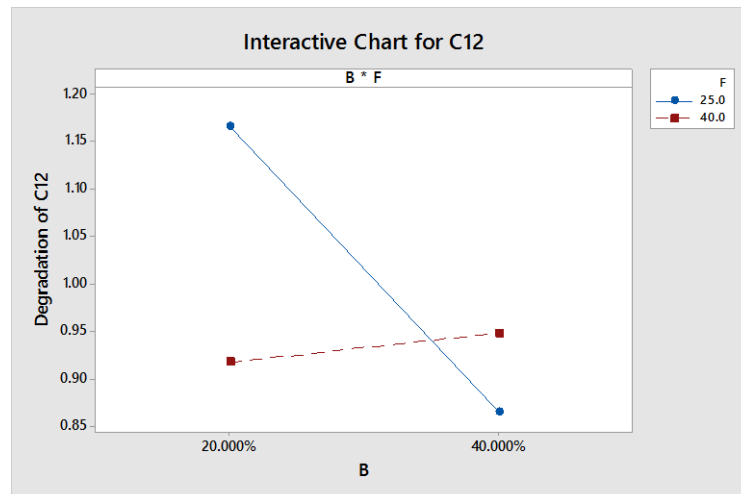


Figura 6. Gráfico normal de efeito para degradação de C12 e C14.

Após determinar quais variáveis são relevantes para o processo de degradação de C12 e C14, podemos analisar quais os valores indicados para cada variável com intuito de aumentar o rendimento do processo de degradação. Assim, o gráfico apresentando pela Figura 7 mostra os valores indicados para maior rendimento de degradação para as variáveis B e F e, para C e D.



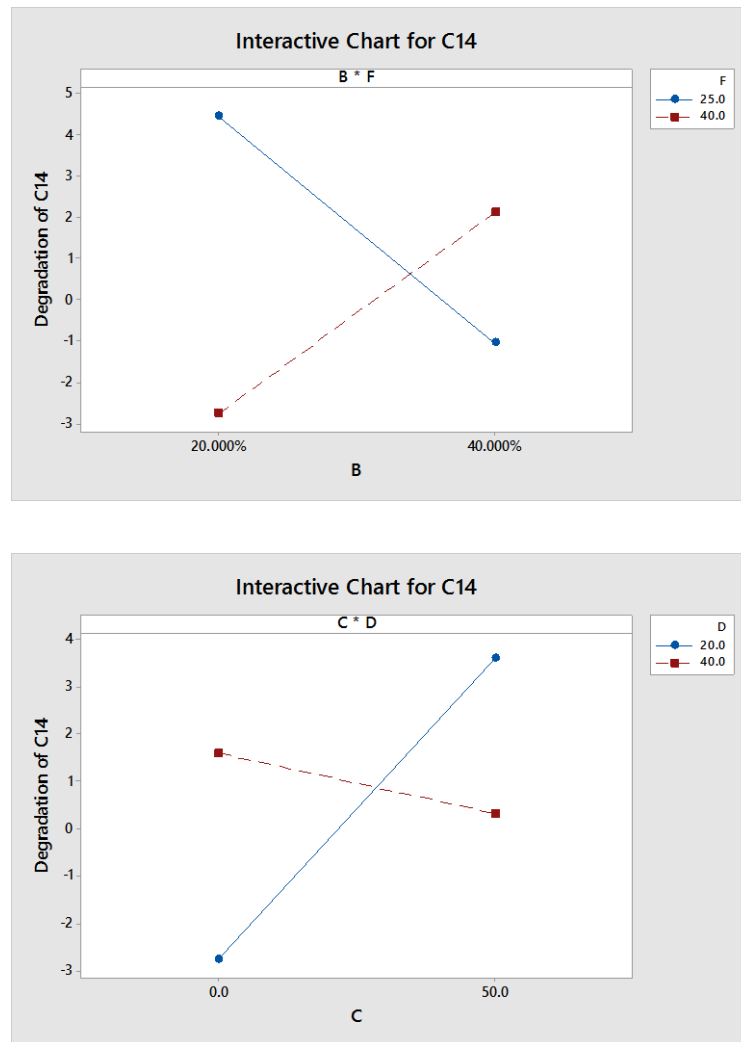


Figura 7. Gráfico de interações para as variáveis de maior importância no processo de degradação de C12 e C14.

Logo, os valores indicados para aumentar o rendimento de C12 são: B= 40%(p/p); F= 25°C; D= 20 DIAS; C= 50rpm. E, os valores indicados para C14 são: B= 20%(p/p); F= 25 °C; D= 20 DIAS; C= 50rpm.

Portanto, o delineamento fatorial fracionado, juntamente com análise de dados advindos da cromatografia gasosa, permitiu avaliar que as variáveis mais influentes no processo de degradação de C12 e C14 são B (Diluição do substrato), F (Temperatura), D (Tempo) e C (Agitação). Assim sendo, os experimentos utilizando delineamento fatorial completo devem ser realizados com base nessas variáveis mantendo as demais variáveis com valor constante, ou seja, A (Concentração de Cápsulas) = 35% (p/p) e E (Tipo de Substrato) = Petróleo.

3.3. Delineamento Fatorial Completo 2⁴

Com base no delineamento fatorial fracionado foi possível determinar as variáveis de maior influência no processo de degradação de C12 e C14. Portanto, as demais variáveis estudadas foram avaliadas com valor constante, por exemplo, a concentração de cápsulas foi de 35% (p/v) e o substrato utilizado foi o petróleo bruto. Logo, o delineamento fatorial completo será de 2⁴ e, utilizando o software *Minitab* temos a quantidade de corridas necessárias para avaliação do processo de degradação, conforme Tabela 3 e Tabela 4.

Tabela 3. Variáveis influentes no processo de degradação e usadas para delineamento fatorial completo.

	A (DILUIÇÃO DO PETRÓLEO)	B (AGITAÇÃO)	C (TEMPO)	D (TEMPERATURA)
-1	20% (p/p)	0 rpm	10 dias	25°C
1	50% (p/p)	50 rpm	20 dias	40°C

Tabela 4. Delineamento Fatorial Completo realizado através do software Minitab.

OrdemEns	PtCentral	Blocos	A	B	C	D
1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	1	1	-1	1
3	1	1	-1	1	-1	1
4	1	1	-1	-1	-1	1
5	1	1	1	-1	1	1
6	1	1	1	1	-1	-1
7	1	1	1	-1	1	-1
8	1	1	1	-1	-1	1
9	1	1	-1	-1	1	1
10	1	1	-1	1	1	-1

11	1	1	-1	1	1	1
12	1	1	1	1	1	-1
13	1	1	-1	-1	1	-1
14	1	1	-1	-1	-1	-1
15	1	1	1	-1	-1	-1
16	1	1	-1	1	-1	-1

Através da análise dos resultados obtidos pela cromatografia gasosa, temos os gráficos de interação para a degradação de C12 na Figura 8.

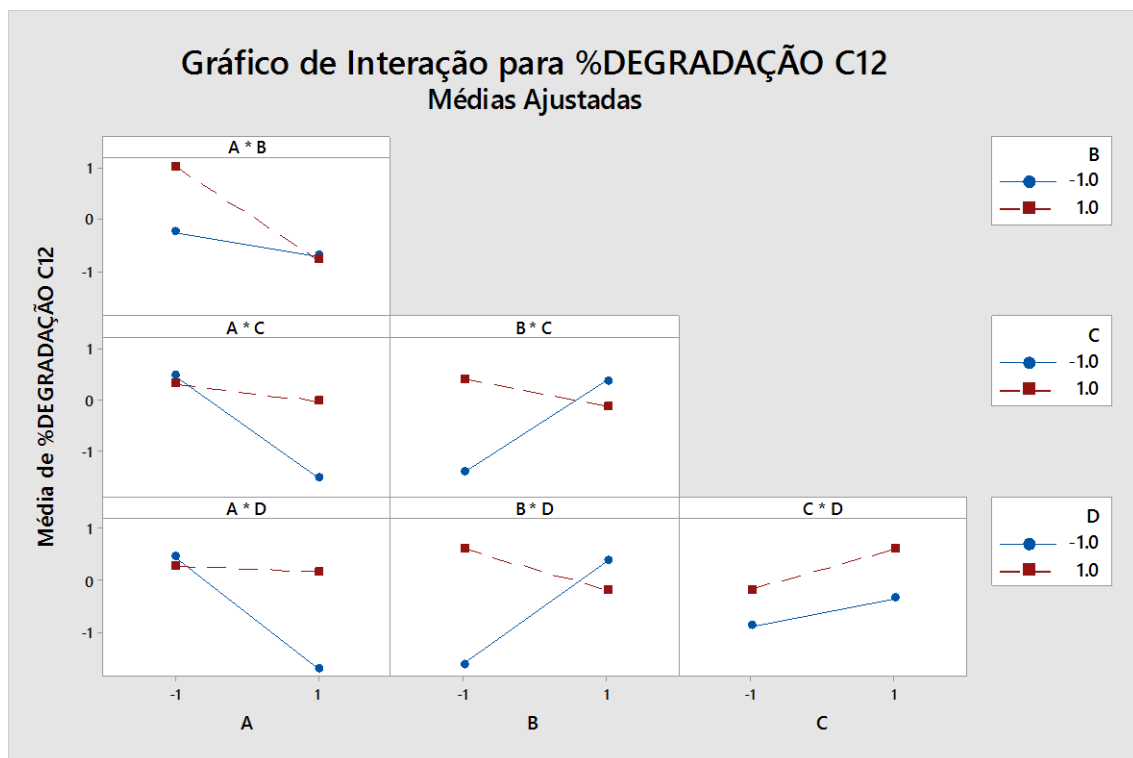


Figura 8. Gráfico de interação das variáveis para degradação de C12.

Através do gráfico percebemos que a interação permite definir os melhores valores para aumentar a eficiência da degradação do petróleo, por exemplo, a interação de A e B, B e C, C e D mostraram que maiores valores das variáveis (+1) irão gerar maior degradação, já a interação de A e C foi igualitária para valores de C (-1 ou +1). Para B e D, e, A e D o maior valor de D e menor valor de B e A geram melhores resultados. Assim sendo, experimentos utilizando 2 variáveis permitem distinguir os valores significativos para seu estudo e avaliação.

Com relação as variáveis estudadas de modo geral, podemos gerar um gráfico contendo a otimização do processo de degradação dos alifáticos saturados (Figura 9).

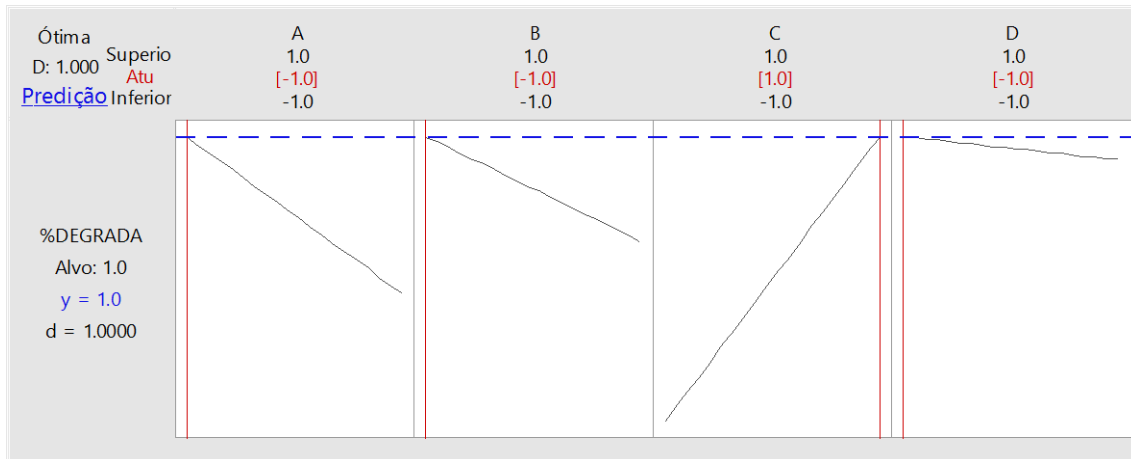


Figura 9. Gráfico de otimização para degradação de C12.

A Figura 9 mostra que para atingir o alvo de valor 1 (100% de degradação), os valores de A, B, C e D devem ser os presentes na Tabela 5.

Tabela 5. Valores otimizados para degradação completa de C12 presente no petróleo.

A	B	C	D
20 %(p/v)	0 rpm	20 dias	25 °C

O aumento da concentração de petróleo tende a aumentar a toxicidade do meio reacional, portanto, era esperado que a diminuição do petróleo acarretasse no aumento da eficiência de degradação (Kadri *et al.*, 2018; Al-Dhabaan, (2018); Suganthi *et al.*, 2018). Com relação a agitação, era esperado que seu aumento ocasionasse em maior degradação, entretanto, não foi o observado, pois, provavelmente a agitação provocou o aumento da solubilização dos sais presentes no meio reacional, assim, impediu o crescimento das bactérias, tornando a taxa de mortalidade maior que a taxa de crescimento e multiplicação celular (da Silva *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2018). Ainda, percebemos que há dependência do tempo de degradação com a quantidade de substrato presente no meio reacional, indicando que uma maior concentração de petróleo implica em maior tempo de uso de

cápsulas, assim como mostra o gráfico correspondente a interação das variáveis na Figura 8.

A temperatura é um parâmetro muito importante, pois temperaturas mais amenas facilitam o crescimento das bactérias utilizadas no estudo, sendo que o mais indicado para aumento do metabolismo seria uma temperatura em torno de 30 °C (Juneja *et al.*, 2019; Shields-Menard *et al.*, 2017). Além disso, não se deve esquecer da fonte de carbono presente para metabolização, o petróleo é altamente tóxico e, geralmente, estudos relacionados ao metabolismo e crescimento microbiológico são realizados com fontes de carbono mais acessíveis e não tóxicas, como arroz, mandioca, batata, soja, feijão, entre outros (Juneja *et al.*, 2019; Hwang & Huang, 2019; Machado & Costa, 2018; Zucareli *et al.*, 2018; Shields-Menard *et al.*, 2017).

Com relação aos dados provenientes da degradação de C14, não houve nenhuma detecção desses alifáticos saturados em nenhuma amostra analisada. Tal fato pode ter ocorrido devido aos erros de análise cromatográfica e integração dos dados, já que foram feitos em tempo menor do que o verificado para eluição de C14.

4. CONCLUSÕES

O delineamento fatorial fracionado comprovou que todas as variáveis estudadas são importantes na biorremediação, entretanto, as variáveis mais impactantes foram: agitação, temperatura, tempo e diluição do petróleo.

O delineamento fatorial completo possibilitou a otimização da degradação de petróleo, mostrando que o tempo deve ser de 20 dias, a diluição do petróleo de 20% (p/v), a agitação de 0 rpm e a temperatura de 25 °C, de forma a aumentar a eficiência de degradação do petróleo.

Portanto, o uso de cápsulas para biorremediação do petróleo foi eficiente, pois, através dos cromatogramas observou-se a diminuição da área referente aos padrões C12 e C14 ao longo do período de degradação pelas cápsulas contendo o consórcio microbiológico e a biomassa vegetal. Além da diminuição dos padrões, também foi possível identificar a diminuição dos demais compostos presentes nas amostras, mesmo sem a utilização dos padrões cromatográficos correspondentes a esses compostos.

REFERENCIAS

1. Akmaz, S., Iscan, O., Gurkaynak, M. A., & Yasar, M. (2011). The structural characterization of saturate, aromatic, resin, and asphaltene fractions of Batiraman crude oil. *Petroleum Science and Technology*, 29(2), 160-171.
2. Al-Dhabaan, F. A. (2018). Morphological, Biochemical and Molecular Identification of Petroleum Hydrocarbons Biodegradation bacteria isolated from Oil polluted soil in Dhahran, Saud Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*.
3. Balke, N. S., & Brown, S. P. (2018). Oil supply shocks and the US economy: An estimated DSGE model. *Energy Policy*, 116, 357-372.
4. Bidwell, J. P., & Spotte, S. (1985). *Artificial seawaters: formulas and methods* (p. 350). Boston: Jones and Bartlett publishers.
5. Cao, Y., Xu, Z., Ling, N., Yuan, Y., Yang, X., Chen, L., ... & Shen, Q. (2012). Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. subtilis* SQR 9 for suppressing Fusarium wilt of cucumber. *Scientia horticulturae*, 135, 32-39.
6. Chambers, D. M., Reese, C. M., Thornburg, L. G., Sanchez, E., Rafson, J. P., Blount, B. C., ... & De Jesús, V. R. (2017). Distinguishing Petroleum (Crude Oil and Fuel) From Smoke Exposure within Populations Based on the Relative Blood Levels of Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes (BTEX), Styrene and 2, 5-Dimethylfuran by Pattern Recognition Using Artificial Neural Networks. *Environmental science & technology*, 52(1), 308-316.
7. Cheng, Y., Wang, L., Faustorilla, V., Megharaj, M., Naidu, R., & Chen, Z. (2017). Integrated electrochemical treatment systems for facilitating the bioremediation of oil spill contaminated soil. *Chemosphere*, 175, 294-299.
8. Cui, C., Billa, T., Zhang, L., Shi, Q., Zhao, S., Klein, M. T., & Xu, C. (2018). Molecular Representation of the Petroleum Gasoline Fraction. *Energy & Fuels*, 32(2), 1525-1533.
9. da Silva, J. B., Fai, A. E. C., dos Santos, R., Basso, L. C., & Pastore, G. M. (2011). Parameters evaluation of fructooligosaccharides production by sucrose

biotransformation using an osmophilic *Aureobasium pullulans* strain. *Procedia Food Science*, 1, 1547-1552.

10. Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*, 2011.
11. de França Ferreira, C. K., Machado, M. E., & Caramão, E. B. (2018). Fracionamento de petróleo e derivados com vistas à separação de constituintes nitrogenados e oxigenados. *Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes-SEMPESq*, (18).
12. de Oliveira Felipe, L., & de Cássia Dias, S. Surfactantes sintéticos e biossurfactantes: vantagens e desvantagens.
13. dos Santos, J. J., & Maranhão, L. T. (2018). Rhizospheric microorganisms as a solution for the recovery of soils contaminated by petroleum: A review. *Journal of environmental management*, 210, 104-113.
14. Etchepare, M., Raddatz, G. C., de Moraes Flores, É. M., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., Barin, J. S., ... & de Menezes, C. R. (2016). Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 511-517.
15. Hwang, C. A., & Huang, L. (2019). Growth and survival of *Bacillus cereus* from spores in cooked rice—One-step dynamic analysis and predictive modeling. *Food Control*, 96, 403-409.
16. IOTPF. Oil tanker spill statistics 2017. London, 2017. Disponível em: <<http://www.itopf.com/knowledge-resources/data-statistics/statistics/>>. Acesso em: 23 set. 2017.
17. Juneja, V. K., Golden, C. E., Mishra, A., Harrison, M. A., Mohr, T., & Silverman, M. (2019). Predictive model for growth of *Bacillus cereus* during cooling of cooked rice. *International journal of food microbiology*, 290, 49-58.
18. Kadri, T., Magdoui, S., Rouissi, T., & Brar, S. K. (2018). Ex-situ biodegradation of petroleum hydrocarbons using *Alcanivorax borkumensis* enzymes. *Biochemical Engineering Journal*, 132, 279-287.

19. Klein, S., Avrahami, R., Zussman, E., Beliavski, M., Tarre, S., & Green, M. (2012). Encapsulation of *Pseudomonas* sp. ADP cells in electrospun microtubes for atrazine bioremediation. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*, 39(11), 1605-1613.
20. León, V. (2000). Composición y Estructura de un Crudo Pesado. *Revista Conicit*, 2(1), 37-46.
21. Machado, A. P., & da Costa, M. J. N. (2018). Biocontrole do fitonematóide *Pratylenchus brachyurus* in vitro e na soja em casa de vegetação por *Bacillus subtilis*. *Revista Biociências*, 23(1), 83-94.
22. Matapour, Z., Karlsen, D. A., Lerch, B., & Backer-Owe, K. (2018). Petroleum occurrences in the carbonate lithologies of the Gohta and Alta discoveries in the Barents Sea, Arctic Norway. *Petroleum Geoscience*, petgeo2017-085.
23. Mulligan, C. N. (2005). Environmental applications for biosurfactants. *Environmental pollution*, 133(2), 183-198.
24. Murado, M. A., Vázquez, J. A., Rial, D., & Beiras, R. (2011). Dose–response modelling with two agents: application to the bioassay of oil and shoreline cleaning agents. *Journal of hazardous materials*, 185(2-3), 807-817.
25. Nascimento, C. A. O., & Moro, L. F. L. (2011). Petróleo: energia do presente, matéria-prima do futuro?. *Revista USP*, (89), 90-97.
26. Paim, M. A. (2011). *O petróleo no mar: o regime das plataformas marítimas petrolíferas no direito internacional*. Renovar.
27. Perfumo, A., Rudden, M., Marchant, R., & Banat, I. M. (2018). Biodiversity of biosurfactants and roles in enhancing the (bio) availability of hydrophobic substrates. *Cellular Ecophysiology of Microbe: Hydrocarbon and Lipid Interactions*, 75-103.
28. Ramos, R. R. (2014). *Desenvolvimento de uma metodologia de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) para análise SARA de petróleo* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
29. Sharma, S. K., Mulligan, C. N., & Mudhoo, A. (2014). *Biosurfactants: research*

trends and applications. CRC press.

30. Shields-Menard, S. A., AmirSadeghi, M., Green, M., Womack, E., Sparks, D. L., Blake, J., ... & Donaldson, J. R. (2017). The effects of model aromatic lignin compounds on growth and lipid accumulation of *Rhodococcus rhodochrous*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 121, 79-90.
31. Silva, L. C. F., Lima, H. S., Sartoratto, A., de Sousa, M. P., Torres, A. P. R., de Souza, R. S., ... & da Silva, C. C. (2018). Effect of salinity in heterotrophic nitrification/aerobic denitrification performed by acclimated microbiota from oil-produced water biological treatment system. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 130, 1-7.
32. Suganthi, S. H., Murshid, S., Sriram, S., & Ramani, K. (2018). Enhanced biodegradation of hydrocarbons in petroleum tank bottom oil sludge and characterization of biocatalysts and biosurfactants. *Journal of environmental management*, 220, 87-95.
33. Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 503-549.
34. Varjani, S. J., & Upasani, V. N. (2017). A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 120, 71-83.
35. Zabbey, N., Sam, K., & Onyebuchi, A. T. (2017). Remediation of contaminated lands in the Niger Delta, Nigeria: Prospects and challenges. *Science of the Total Environment*, 586, 952-965.
36. Zucareli, C., Barzan, R. R., da Silva, J. B., & Chaves, D. P. (2018). Associação de fosfatos e inoculação com *Bacillus subtilis* e seu efeito no crescimento e desempenho produtivo do feijoeiro. *Revista Ceres*, 65(2).

5. CONCLUSÕES

O método de extrusão por gotejamento possibilitou a produção de cápsulas de aproximadamente 4 mm de diâmetro. A contagem de células bacterianas viáveis em diferentes concentrações capsulares de alginato de sódio mostrou que o aumento da quantidade de polímeros na estrutura da cápsula afeta a integridade e o metabolismo dos micro-organismos.

A presença da biomassa de tangerina permitiu o crescimento inicial da biomassa microbiana e, conseqüentemente, aumentou a produção de biossurfactantes. A tensão superficial foi reduzida em 48% em 15 dias e o índice de emulsificação aumentou em aproximadamente 80% no mesmo período, ou seja, houve a produção de biossurfactantes para que estes parâmetros fossem alterados.

TGA e DSC mostraram que as células possuem estabilidade térmica entre 25 °C e 42 °C e que o aumento do crescimento do consórcio de bactérias tornam os micro-organismos mais resistentes. Além disso, a presença de 2 picos no TGA para a amostra recém-produzida e a presença de 1 pico na amostra com maior tempo de produção indicam que a biomassa é consumida pelo consórcio como substrato inicial de crescimento.

O MEV-FEG mostrou que há porosidade na membrana capsular das amostras e que há presença de micro-organismos, apesar da aglutinação das bactérias devido ao processo de metalização das amostras. Além disso, as microscopias permitiram inferir que o consórcio microbiano também degrada a própria membrana capsular composta de alginato de sódio.

Portanto, cápsulas contendo 1% (p/v) de alginato de sódio e 0,75% (p/v) de farinha de tangerina podem ser utilizadas para a degradação do petróleo no ambiente marinho, uma vez que as análises mostraram a eficiência do crescimento

microbiano, a redução da tensão superficial, o aumento do índice de emulsificação e produção de biossurfactantes. Além disso, o alginato de sódio não é tóxico e os micro-organismos utilizados não afetam a saúde humana, a saúde animal e o ambiente.

O delineamento fatorial fracionado comprovou que todas as variáveis estudadas são importantes na biorremediação, entretanto, as variáveis mais impactantes foram: agitação, temperatura, tempo e diluição do petróleo.

O delineamento fatorial completo possibilitou a otimização da degradação de petróleo, mostrando que o tempo deve ser de 20 dias, a diluição do petróleo de 20% (p/v), a agitação de 0 rpm e a temperatura de 25 °C, de forma a aumentar a eficiência de degradação do petróleo.

6. TRABALHOS FUTUROS

Os trabalhos futuros incluem o uso de outras matrizes para encapsulamento, como uso de alginato de cálcio, quitosana e celulose.

Avaliar o uso de micro-organismos isoladamente para comparar com o consórcio de bactérias estudado, assim como alterar a biomassa vegetal utilizada para analisar se há melhora ou piora no crescimento e metabolismo microbológico.

Usar o fracionamento SARA para separar todas as frações do petróleo e, assim, analisar os compostos aromáticos (BTEX e HPAs), resinas e asfaltenos, além dos alifáticos saturados.

Desenvolver uma metodologia de análise cromatográfica mais eficaz, através do uso de coluna específica.

Aplicar as cápsulas em outro ambiente como o solo e, com outros poluentes, como gasolina, diesel, resíduos de tintas, entre outros.

Avaliar o uso da bioestimulação durante a degradação do petróleo, com intuito de analisar se a adição de nutrientes pode aumentar o período de degradação do petróleo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKAKURU, O. C. e Akudinobi, B. E. B. Qualitative characterization of groundwater sources around Nigeria National Petroleum Cooperation Oil Depot Aba, using multiple linear regressions modelling. **International Journal of Advanced Geosciences**, v. 6, n. 1, p. 57-64, 2018.

AKMAZ, S.; Iscan, O.; Gurkaynak, M. A.; Yasar, M. The Structural Characterization of Saturate, Aromatic, Resin and Asphaltene Fractions of batiraman Crude Oil. **Petroleum Science and Technology**, v. 29, n.2, 2011. ISSN 1091-6466.

AL-AREEQ, N. M.; Al-Badani, M. A.; Salman, A. H.; Albaroot, M. A. Petroleum source rocks characterization and hydrocarbon generation of the Upper Jurassic succession in Jabal Ayban field, Sabatayn Basin, Yemen. **Egyptian Journal of Petroleum**, 2018.

ANDERSEN, S. I.; Speight, J. G. Petroleum resins: Separation, character, and role in petroleum. **Petroleum Science and Technology**, v. 19, n. 1-2, 2001.

ARSÈNE-PLOETZE, F.; Chiboub, O.; Lièvremon, D.; Farasin, J.; Freel, K. C.; Fouteau, S.; Barbe, V. Adaptation in toxic environments: comparative genomics of loci carrying antibiotic resistance genes derived from acid mine drainage waters. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 2, 1470-1483, 2018.

ASKE, N.; Kallevik, H.; Sjöblom, J. 2002. Water-in-crude oil emulsion stability studied by critical electric field measurements: correlation to physico-chemical parameters and near-infrared spectroscopy. **J. Pet. Sci. Eng**, v. 36, p. 1-17, 2002.

ATIQULLAH, M.; Al-Sarkhi, A. S.; Al-Thenayan, F. M.; Al-Malki, A. R.; Xu, W.; Hossaen, A. **U.S. Patent Application**, n. 15/782, p. 199, 2018.

AWASTHI, M. K.; Selvam, A.; Chan, M. T.; Wong, J. W. Bio-degradation of oily food waste employing thermophilic bacterial strains. **Bioresource Technology**, v. 248, p. 141-147, 2018.

BACON, C. A.; Calver, C. R.; Boreham, C. J.; Leaman, D. E.; Morrison, K. C.; Reville, A. T.; Volkman, J. K. The petroleum potential of onshore Tasmania: a review. **Geol. Surv. Bull.**, v. 71, p. 1-93, 2000.

BALKE, N. S. e Brown, S. P. Oil supply shocks and the US economy: An estimated DSGE model. **Energy Policy**, v. 116, p. 357-372, 2018.

BAO, M. T.; Wang, L. N.; Sun, P.Y.; Cao, L.X.; Zou, J.; Li, Y. M. Biodegradation of crude oil using an efficient microbial consortium in a simulated marine environment. **Mar. Pollut. Bull.**, v. 64, p. 1177-1185, 2012.

BARROS, F. F. C.; Quadros, C. P.; Maróstica Júnior, M. R.; P, G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 409-414, 2007.

BEAZLEY, M. J.; Martinez, M.; Rajan, S.; Powell, J.; Piceno, A.; Tom, L. M.; Andersen, G. L.; Hazen, T. C.; Nostrand, J. D.; Jizhong Zhou, B.; Patricia A.; Sobecky, P. A. Microbial Community Analysis of a Coastal Salt Marsh Affected by the Deepwater Horizon Oil Spill. **PLoS ONE**, v. 7, 2012.

BENTO, F. M.; Camargo, F. A.; Okeke, B. C.; Frankenberger, W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, n.9, p. 1049-1055, 2005.

BLEVE, G.; Lezzi, C.; Chiriatti, M. A.; D'Ostuni, I.; Tristezza, M.; Di Venere, D. Selection of non-conventional yeasts and their use in immobilized form for the bioremediation of olive oil mill wastewaters. **Bioresour. Technol.**, v. 102, p. 9-982, 2011.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, v. 74, p. 63, 2000.

BORDOLOI, N. K.; Konwar, B. K. Bacterial biosurfactant in enhancing solubility and metabolism of petroleum hydrocarbons. **J. Hazard. Mater.**, v. 170, p. 495-505, 2009.

BRADY, Patrick V.; Brady, Michael V.; Borns, David J. Natural attenuation: CERCLA, RCAs, and the future of environmental remediation. **CRC Press**, 2018.

BRAUD, A.; Jézéquel, K.; Vieille, E.; Tritter, A.; Lebeau, T. Changes in extractability of Cr and Pb in a polycontaminated soil after bioaugmentation with microbial producers of biosurfactants, organic acids and siderophores. **Water, Air, & Soil Pollution: Focus**, v. 6, n. 3-4, p. 261-279, 2006.

BROWN, M. E. Handbook of thermal analysis and calorimetry. Amsterdam: **Elsevier**, p. 691, 2003.

BRUMANO, L. P.; Soler, M. F.; Da Silva, S. S. Recent advances in sustainable production and application of biosurfactants in Brazil and Latin America. **Industrial Biotechnology**, v. 12, n. 1, p. 31-39, 2016.

BRUN-GRAEPI, A. K. A. S.; Richard, C.; Bessodes, M.; Scherman, D.; Merten, O.-W. Cell microcarriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers. **Journal of Controlled Release**, v. 149, p. 209-224, 2011.

BUSTILLO-LECOMPTE, C. F.; Kakar, D.; Mehrvar, M. Photochemical treatment of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX) in aqueous solutions using advanced oxidation processes: Towards a cleaner production in the petroleum refining and petrochemical industries. **Journal of Cleaner Production**, v. 186, p. 609-617, 2018.

CABANA, H.; Alexandre, C.; Agathos, S. N.; Jones, J. P. Immobilization of laccase from the white rot fungus *Coriolopsis polyzona* and use of the immobilized biocatalyst for the continuous elimination of endocrine disrupting chemicals. **Bioresour. Technol.**, v. 100, p. 58-3447, 2009.

CANTAGALLO, C. A. C.; Ilanelli, J.; Rito, D. Limpeza de ambientes costeiros brasileiros contaminados por petróleo: uma revisão. **Panam. J. Aquat. Sci.**, v. 2, p. 1-12, 2007.

CAO, Y.; Xu, Z.; Ling, N.; Yuan, Y.; Yang, X.; Chen, L.; Shen, B.; Shen, Q. R. Isolation and identification of lipopeptides produced by *B. Substillis* SQR 9 for suppressing *Fusarium* wilt of cucumber. **Scientia Horticulturae**, v. 135, p. 32-9, 2012.

CARGILL. Alginatos. Disponível em: <<http://www.cargillfoods.com/lat/pt/produtos/hidrocoloides/alginatos/index.jsp>>. Acesso em: 04/09/2017.

CARLSON, K. M.; Heilmayr, R.; Gibbs, H. K.; Noojipady, P.; Burns, D. N.; Morton, D. C.; Kremen, C. Effect of oil palm sustainability certification on deforestation and fire in Indonesia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 1, 121-126, 2018.

CHADHAIN, S. M. N.; Miller, J. L.; Dustin, J. P.; Trethewey, J. P.; Jones, S. H.; Launen, L. Assessment of the petroleum hydrocarbon biodegradation potential of the sediment microbial community from an urban fringing tidal marsh of Northern New England. **bioRxiv**, 2018.

CHAILLAN, F.; Le Flèche, A.; Bury, E.; Phantavong, Y. H.; Grimont, P.; Saliot, A.; Oudot, J. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon-degrading microorganisms. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 7, p. 587-595, 2004.

CHAMBERS, D. M.; Reese, C. M.; Thornburg, L. G.; Sanchez, E.; Rafson, J. P.; Blount, B. C.; De Jesus, V. R. Distinguishing petroleum (crude oil and fuel) from smoke exposure within populations based on the relative blood levels of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes (BTEX), styrene and 2, 5-dimethylfuran by pattern recognition using artificial neural networks. **Environmental Science & Technology**, 2018.

CHEN, C. C. e Que, H. U.S. Patent No. 9,934,367. Washington, DC: U.S. **Patent and Trademark Office**. 2018

CHEW, S. C. In-vitro evaluation of kenaf seed oil in chitosan coated-high methoxylpectin-alginate microcapsules. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p.

230–236, 2015.

CHINELATTO Júnior, L. S.; Cabral de Menezes, S. M.; Honorato, H. D. A.; Oliveira, M. C. K. D.; Marques, L. C. D. C. Dosy-nmr as an alternative technique to improve asphaltenes characterization. **Energy & Fuels**, 2018.

CIEPLAK, T.; Soffer, N.; Sulakvelidze, A.; Nielsen, D. S. A bacteriophage cocktail targeting *Escherichia coli* reduces *E. coli* in simulated gut conditions, while preserving a non-targeted representative commensal normal microbiota. **Gut Microbes**, p. 01-19, 2018.

COUTINHO, D. M.; França, D.; Vanini, G.; Mendes, L. A. N.; Gomes, A. O.; Pereira, V. B.; Azevedo, D. A. Rapid hydrocarbon group-type semi-quantification in crude oils by comprehensive two-dimensional gas chromatography. **Fuel**, v. 220, p. 379-388, 2018.

CRISTÓVÃO, R. O.; Tavares, A. P.; Brígida, A. I.; Loureiro, J. M.; Boaventura, R. A.; Macedo, E. A. Immobilization of commercial laccase onto green coconut fiber by adsorption and its application for reactive textile dyes degradation. **Journal Mol. Catal. Enzym.**, v. 72, p. 6-12, 2011.

CUI, C.; Billa, T.; Zhang, L.; Shi, Q.; Zhao, S.; Klein, M. T.; Xu, C. Molecular Representation of Petroleum Gasoline Fraction. **Energy & Fuels**, 2018.

CURY, J. D. E. C. Atividade microbiana e diversidades metabólica e genética em solo de mangue contaminado com petróleo. Universidade de São Paulo. 2002.

DAS, N.; Chandran, P. Review Article: Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbon Contaminants: An Overview. **Biotechnology Research International**, Article ID 941810, v.13, 2011.

ECKERT, R. B. e Skovhus, T. L. Advances in the application of molecular microbiological methods in the oil and gas industry and links to microbiologically influenced corrosion. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 126, p.169-176, 2018

ETCHEPARE, M. A., Raddatz, C. G., Flores, E. M. M., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E.,

Barin, J. S., Grosso, C. R. F., Menezes, C. R. Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 511-517, 2016.

FIGUEIREDO, M. G.; Alvarez, D.; Adams, R. N. Revisiting the P-36 oil rig accident 15 years later: from management of incidental and accidental situations to organizational factors. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 34, n. 4, 2018.

FIORATI, J. J. A disciplina jurídica dos espaços marítimos na convenção das Nações Unidas sobre Direito do Mar de 1982 e na jurisprudência internacional. **Renovar**, Rio de Janeiro, p. 223, 1999.

GALEMBECK, F.; Csordas, Y. Cosméticos: a química da beleza. v. 2, n. 09, p. 20103, 2011. Disponível em: <<http://3.web.ccead.pucrio.br/>>. Acessado em: 25/01/2018.

GEETHA, S. J.; Banat, I. M.; Joshi, S. J. Biosurfactants: Production and potential applications in microbial enhanced oil recovery (MEOR). **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, 2018.

GHAZALI, F. M.; Rahman, R. N. Z. A.; Salleh, A. B.; Basri, M. Biodegradation of hydrocarbons in soil by microbial consortium. **Int. Biodeterior. Biodegradation**, v. 54, p. 61-67, 2004.

GILBERT, P. e Brown, M. R. Microorganisms in Liquid Media: Effects of Growth Rate and Nutrient Limitation. **Microbiological Quality Assurance: A Guide Towards Relevance and Reproducibility of Inocula**, 2018.

GONZALEZ, J.; Figueiras, F. G.; Aranguren-Gassis, M.; Crespo, B. G.; Fernandez, E.; Moran, X. A. G.; Nieto-Cid, M. Effect of a simulated oil spill on natural assemblages of marine phytoplankton enclosed in microcosms. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, n. 83, p. 265-276, 2009.

GOODHEW, P. J.; Humphreys, J.; Beanland, R. **Electron Microscopy and Analysis**, CRC Press, 2000.

GUERRA, A. B.; Oliveira, J. S.; Silva-Portela, R. C.; Araújo, W.; Carlos, A. C.; Vasconcelos, A. T. R.; Agnez-Lima, L. F. Metagenome enrichment approach used for selection of oil-degrading bacteria consortia for drill cutting residue bioremediation. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 869-880, 2018.

GUZIK, U.; Hupert-Kocurek, K.; Krysiak, M.; Wojcieszynska, D. Degradation potential of protocatechuate 3,4-dioxygenase from crude extract of *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 immobilized in calcium alginate hydrogels and on glyoxyl agarose. **Biomedical Research International**, p.1-8, 2014^a.

GUZIK, U.; Hupert-Kocurek, K.; Marchlewicz, A.; Wojcieszynska, D. Enhancement of bio- degradation potential of catechol 1, 2-dioxygenase through its immobilization in calcium alginate gel. **Electronical Journal of Biotechnology**, v. 17, p.8-83, 2014^b.

GUZIK, U.; Hupert-Kocurek, K.; Wojcieszynska, D. Immobilization as a strategy for improving enzyme properties-Application to oxidoreductases. **Molecules**, v.19, p. 8995–9018, 2014^c.

HAIDER, K. Microbe-soil-organic contaminant interactions. In: ADRIANO, D. C. *et al.* (Ed). **Bioremediation of Contaminated Soils**. Madison: ASA/CSSA/SSSA, p. 33-51, 1999.

HARITASH, A. K.; Kaushik, C. P. Biodegradation aspects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 169, p. 1-15, 2009.

HEIDEBACH, T.; Forst, P.; Kulozik, U. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1670– 1677, 2009.

HOU, J.; Dong, G.; Ye, Y.; Chen, V. Laccase immobilization on titanium nanoparticles and titanium-functionalized membranes. **J. Memb. Science**, v. 452, p. 229-40, 2014.

HU, L. M.; Meegoda, J. N.; Lo, I. M.; Liu, Y.; Gao, S. Y.; Wu, Z. Q. Gasoline Contaminated Sites: Pollutant Transport and Remediation. In: **Advances in Environmental Geotechnics**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 221-235, 2010.

HUDSON, S.; Magner, E.; Cooney, J.; Hodnett, B. K. Methodology for the

immobilization of enzymes onto mesoporous materials. **J. Phys. Chem. B.**, v. 109, p. 496-506, 2005.

HUR, M.; Ware, R. L.; Park, J.; McKenna, A. M.; Rodgers, R. P.; Nikolau, B. J.; Marshall, A. G. Statistically Significant Differences in Composition of Petroleum Crude Oils Revealed by Volcano Plots Generated from Ultrahigh Resolution Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectra. **Energy & Fuels**, 2018.

IOTPF. Oil tanker spill statistics. London, 2017. Disponível em: <<http://www.itopf.com/knowledge-resources/data-statistics/statistics/>>. Acesso em: 23 set. 2017.

JACQUES, R. J. S.; Okeke, B. C.; Bento, F. M.; Peralba, M. C.; Camargo, F. A. Characterization of a polycyclic aromatic hydrocarbon degrading microbial consortium from a petrochemical sludge landfarming site. **Bioremediation Journal**, Philadelphia, v. 11, n. 1, p.1-11, 2007.

JACQUES, R. J. S.; Silva, K. J.; Bento, F. M.; Antonioli, Z. I.; Camargo, F. A. O. Biorremediação de um solo contaminado com antraceno sob diferentes condições físicas e químicas. **Ciência Rural**, v. 40, n. 2, p. 310-317, 2010.

JAIN, M. S.; Daga, M.; Kalamdhad, A. S. Composting physics: A degradation process-determining tool for industrial sludge. **Ecological Engineering**, v. 116, p. 14-20, 2018.

JÚNIOR, G. Processamento primário de petróleo/noções de processo de refino. Aracajú, p.20. Disponível em: <http://www.tecnicodepetroleo.ufpr.br/apostilas/engenheiro_do_petroleo/processamento_primario.pdf>. Acesso em: 31 set. 2017.

KAWAGUTI, H. Y.; Sato, H. H. Isomaltulose production, a new sucrose substitute, using microbial glucosyl transferase. **Química Nova**, v. 31, n. 1, 2009.

KELLE, H. I. Mopping of crude oil and some refined petroleum products from the environment using sawmill factory waste: adsorption isotherm and kinetic studies. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 22, n. 1, p. 34-40, 2018.

KHAN, F.I.; Husain, T.; Hejazi, R. An overview and analysis of site remediation technologies. **J. Environ. Manage.**, v. 71, p. 95-122, 2004.

KIM, H. W.; Lee, K.; Kim, S. H.; Rhee, M. S. Predictive modeling of bacterial growth in ready-to-use salted napa cabbage (*Brassica pekinensis*) at different storage temperatures. **Food Microbiology**, v. 70, p. 129-136, 2018.

KINGSTON, P.F. Long-term Environmental Impact of Oil Spills. **Spill Science & Technology Bulletin**, v. 7, n. 1-2, p. 53-61, 2002.

KLEIN, S.; Avrahami, R.; Zussman, E.; Beliavski, M.; Tarre, S.; Green, M. Encapsulation of *Pseudomonas sp.* ADP cells in electro spun microtubes for atrazine bioremediation. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 39, p. 13-1605, 2012.

KONG, L.; Gao, Y.; Zhou, Q.; Zhao, X.; Sun, Z. Biochar accelerates PAHs biodegradation in petroleum-polluted soil by biostimulation strategy. **Journal of Hazardous Materials**, v. 343, p. 276-284, 2018.

KOSSEVA, M. R. Immobilization of microbial cells in food fermentation processes. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, n. 6, p. 1089-1118, 2011.

KOTTUPARAMBIL, S. e Agusti, S. PAHs sensitivity of picophytoplankton populations in the Red Sea. **Environmental Pollution**, v. 239, p. 607-616, 2018.

KOURKOUTAS, Y.; Bekatorou, A.; Banat, I. M.; Marchant, R.; Koutinas, A. A. Immobilization technologies and support materials suitable in alcohol beverages production: A review. **Food Microbiology**, v. 21, p. 97-377, 2004.

KUYUKINA, M. S. e Ivshina, I. B. *Rhodococcus* biosurfactants: biosynthesis, properties, and potential applications. **Biology of Rhodococcus**, Springer, Berlin, Heidelberg, p. 291-313, 2010.

LEE, C. A.; Tsai, Y. C. Preparation of multiwalled carbon nanotube-chitosan-alcohol dehydrogenase nanobiocomposite for amperometric detection of ethanol. **Sens. Actuators B.**, v. 138, p. 23-518, 2009.

LEON, V. Composición y Estructura de un Crudo Pesado. **Codicic**, v. 2, p. 36-45,

2000.

LI, D. C.; Xu, W. F.; Mu, Y.; Yu, H. Q.; Jiang, H.; Crittenden, J. C. Remediation of Petroleum-Contaminated Soil and Simultaneous Recovery of Oil by Fast Pyrolysis. **Environmental Science e Technology**, 2018.

LIU, G.; Zhong, H.; Yang, X.; Liu, Y.; Shao, B.; Liu, Z. Advances in applications of rhamnolipids biosurfactant in environmental remediation: A review. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 115, n. 4, 796-814, 2018.

LIU, J. e Selby, D. A Matrix-Matched Reference Material for Validating Petroleum Re-Os Measurements. **Geostandards and Geoanalytical Research**, v. 42, n. 1, p. 97-113, 2018.

LUO, C.; Zhou, H.; Wang, X.; Chen, Z. Identification of four NRPS gene clusters in *Bacillus subtilis* 916 for four families of lipopeptides biosynthesis and evaluation of their intricate functions to the typical phenotypic features. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 1, p. 31-422, 2014.

MACKIE, A. R.; Macierzanka, A.; Aarak, K.; Rigby, N. M.; Parker, R.; Channel, G. A.; Harding, S. E.; Bajka, B. H. Sodium alginate decreases the permeability of intestinal mucus. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 749-755, 2016.

MATAPOUR, Z.; Karlsen, D. A.; Lerch, B.; Backer-Owe, K. Petroleum occurrences in the carbonate lithologies of the Gohta and Alta discoveries in the Barents Sea, Arctic Norway. **Petroleum Geoscience**, 2018.

MATTIASSON, B. Immobilization methods. In **Immobilized Cells and Organelles**, CRC Press., 2018.

MELO, I. S.; Azevedo, J. L. Microbiologia ambiental. 2. ed. **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, p. 1-647, 2008.

MENESES, C. G.; Araújo, G. P. Avaliação do resíduo de cascalho de perfuração de poços de petróleo da bacia potiguar e alternativas para sua destinação e reaproveitamento. **RUnPetro**, v. 3, n. 1, p. 29-38, 2014.

MENON, P. e Voordouw, G. Impact of light oil toxicity on sulfide production by acetate-oxidizing, sulfate-reducing bacteria. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 126, p. 208-215, 2018.

MOFIDI, N.; Aghai-Moghadam, M. e Sarbolouki, M. N. Mass preparation and characterization of alginate microspheres. **Process Biochemistry**, v. 35, n. 9, p. 885-888, 2000.

MONTAGNOLLI, R. N.; Lopes, P. R. M. e Bidoia, E. D. Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, n. 1, p. 4116, 2015.

MORAIS, O.; Almeida, P.; Gonçalves, K.; Cogan, S. **A Teoria das Restrições no Processo de Refino de Petróleo**. 6º Congresso USP, 2006.

MORGANTE, V.; López-López, A.; Flores, C.; González, M.; González, B.; Vásquez, M.; Seeger, M. Bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. strain MHP41 promotes simazine attenuation and bacterial community changes in agricultural soils. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 71, n. 1, p. 114-126, 2009.

MORO, L. F. L.; Nascimento, C. A. O. Petróleo: energia do presente, matéria-prima do futuro?. **Revista USP**, São Paulo, mar./maio 2011, n. 89, p. 90-97. Disponível em: <<http://rusp.scielo.br/pdf/rusp/n89/07.pdf>>. Acesso em: 30 set. 2017.

MORTAZAVIAN, A. M.; Sohrabvandi, S. Probiotics and Food Probiotic Products: based on Dairy Probiotic Products (Ed. MORTAZAVIAN). **Eta Publication**, 2007.

MULLIGAN, C. N. Environmental applications for biosurfactants. **Environ. Pollut.**, v. 133, p. 98-183, 2005.

MULLIGAN, C. N.; Sharma, S. K.; Mudhoo, A.; Makhijani, K. Green chemistry and biosurfactant research. In: MULLIGAN, C. N.; SHARMA.S. K.; Mudhoo, A. **Taylor & Francis Group**, 2014. Biosurfactants: Research Trends and Applications, v. 1, p. 1-30.

MURADO, M. A.; Vázquez, J. A.; Rial, D.; Beiras, R. Dose-response modelling with two agents: application to the bioassay of oil and shoreline cleaning agents. **J.**

Hazard. Mater., v. 185, p. 17-807, 2011.

NITSCHKE, M. e Pastore, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, 2002.

O'BRIEN, P. L.; DeSutter, T. M.; Casey, F. X.; Khan, E.; Wick, A. F. Thermal remediation alters soil properties—a review. **Journal of Environmental Management**, v. 206, p. 826-835, 2018.

OLIVEIRA, F. L.; Dias, C. S. Surfactantes sintéticos e biosurfactantes: vantagens e desvantagens. **Química Nova**, v. 39, n. 3, p. 228-236. São Paulo – SP. 2017.

OLIVEIRA, P. F. L.; Vasconcellos, S. P.; Angolini, C. F. F.; Cruz, G. F.; Marsaioli, A. J.; Santos Neto, E. V.; Oliveira, V. M. Taxonomic diversity and biodegradation potential of bacteria isolated from oil reservoirs of an offshore southern Brazilian basin. **Journal of Petroleum and Environmental Biotechnology**, v. 3, n. 132, p. 1-14, 2012.

ÖNAL, E.; Uzun, B. B. e Pütün, A. E. The effect of pyrolysis atmosphere on bio-oil yields and structure. **International Journal of Green Energy**, v. 14, n. 1, p. 1-8, 2017.

ORTA-MARTÍNEZ, M.; Rosell-Melé, A.; Cartró-Sabaté, M.; O'Callaghan-Gordo, C.; Moraleda-Cibrián, N.; Mayor, P. First evidences of Amazonian wildlife feeding on petroleum-contaminated soils: A new exposure route to petrogenic compounds?. **Environmental Research**, v. 160, p. 514-517, 2018.

PAIM, M. A. O petróleo no mar: o regime das plataformas marítimas petrolíferas no direito internacional. **Renovar**, Rio de Janeiro, p. 9, 2011.

PARTOVINIA, A. e Naeimpoor, F. Application of Cell Immobilization in Slurry-Phase Bioremediation: Phenanthrene Biodegradation and Detoxification. In **Toxicity and Biodegradation Testing**. Humana Press, New York, NY, 2018.

PATIL, J. S.; Kamalapur, M. V.; Marapur, S. C.; Kadam, D. V. Ionotropic gelation and Polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. **Digest Journal of**

Nanomaterials and Biostructures, v. 5, n. 1, p. 241-248, 2010.

PATRICK, A.; Craig, D. L.; Sena, E.; Magalhães, L.; Canielas, M. Técnicas de limpeza de vazamentos de petróleo em alto mar. **Cad. Grad. - Ciências Exatas e Tecnológicas**, v.1, p. 75-86, 2012.

PEHLIVAN, E. e Özbay, N. Evaluation of Bio-Oils Produced From Pomegranate Pulp Catalytic Pyrolysis. **Exergetic, Energetic and Environmental Dimensions**, p. 895-909, 2018.

PERFUMO, A., Rudden, M., Marchant, R. e Banat, I. M. Biodiversity of biosurfactants and roles in enhancing the (bio) availability of hydrophobic substrates. **Cellular Ecophysiology of Microbe: Hydrocarbon and Lipid Interactions**, p. 75-103, 2018.

PERFUMO, A.; Banat, I. M.; Marchant, R. Going Green and Cold: Biosurfactants from Low-Temperature Environments to Biotechnology Applications. **Trends in biotechnology**. 2018.

PINHATI, F. R.; Del Aguila, E. M.; Tôrres, A. P. R.; Sousa, M. P. D.; Santiago, V. M. J.; Silva, J. T.; Paschoalin, V. M. F. Evaluation of the efficiency of deterioration of aromatic hydrocarbons by bacteria from wastewater treatment plant of oil refinery. **Química Nova**, v. 37, n. 8, p. 1269-1274, 2014.

POULSEN, K. G.; Kristensen, M.; Tomasi, G.; Cruz, M. D.; Christensen, J. H. The Pixel-Based Chemometric Approach for Oil Spill Identification and Hydrocarbon Source Differentiation: Two Case Studies From the Persian Gulf. In **Oil Spill Environmental Forensics Case Studies**, p. 443-463, 2018.

RAEI, M.; rajabzadeh, G.; Zibaei, S.; Jafari, S. M.; Sani, A. M. Nano-encapsulation of isolated lactoferrin from camel milk by calcium alginate and evaluation of its release. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 669-673, 2015.

RAMACHANDRAN, S. D.; Hodson, P. V.; Khan, C. W.; Lee, K. Oil dispersant increases PAH uptake by fish exposed to crude oil. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 59, p. 8-300, 2004.

RAMADASS, K.; Megharaj, M.; Venkateswarlu, K.; Naidu, R. Bioavailability of weathered hydrocarbons in engine oil-contaminated soil: Impact of bioaugmentation mediated by *Pseudomonas* spp. on bioremediation. **Science of The Total Environment**, v. 636, p. 968-974, 2018.

RAMAN, J. K. e Gnansounou, E. A Review on Bioremediation Potential of Vetiver Grass. **Waste Bioremediation**, Springer, Singapore, 2018.

REIS G.; Régia. M.; Carvalho L., L. F.; Araújo, A. S. F. D.; Alcantara, R. M. C. M. D.; Batista C. Inoculação e adubação mineral em feijão-caupi: efeitos na nodulação, crescimento e produtividade. **Scientia Agraria**, v.9, n.4, 2008.

RODRIGUES, L. R.; Microbial surfactants: fundamentals and applicability in the formulation of nano-sized drug delivery vectors. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 449, p. 16-304, 2014.

ROJO, F. Degradation of alkenes by bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 10, p. 90-2477, 2009.

RUBERTO, L.; Vazquez, S. C.; Mac Cormack, W. P. Effectiveness of the natural bacterial flora, bioestimulation and bioaugmentation on the bioremediation of a hydrocarbon contaminated Antarctic soil. **Int. Biodeterior. Biodegradation**, v. 52, p. 115-125, 2003.

SABATÉ, J.; Bayona, J.M.; Solanas, A.M. Photolysis of PAHs in Aqueous Phase by UV Irradiation. **Chemosphere**, v. 44, p. 119-124, 2001.

SAFDARI, M. S.; Kariminia, H. R.; Rahmati, M.; Fazlollahi, F.; Polasko, A.; Mahendra, S.; Fletcher, T. H. Development of bioreactors for comparative study of natural attenuation, biostimulation, and bioaugmentation of petroleum-hydrocarbon contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 342, p. 270-278, 2018.

SALIHU, A.; Abdulkadir, I.; Almustapha, M. N. An investigation for potential development on biosurfactants. **Biotechnology and Molecular Biology Reviews**, v. 4, n. 5, p. 111-117, 2009.

SAMANTA, S. K.; Singh, O. V.; Jain, R. K. Polycyclic aromatic hydrocarbons:

environmental pollution and bioremediation. **Trends Biotechnol.**, v. 20, p. 8-243, 2002.

SANTOS, D. K.; Rufino, R. D.; Luna, J. M.; Santos, V. A.; Sarubbo, L. A. Biosurfactants: Multifuncional Biomolecules of the 21 Century. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 401, p. 1-31, 2016.

SANTOS, J. J.; Maranhão, L. T. Rhizospheric microorganisms as a solution for the recovery of soils contaminated by petroleum: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 210, p. 104-113, 2018.

SHAN, J.; Huang, J. J.; Li, J. Z.; Li, G.; Zhao, J. T.; Fang, Y. T. Insight into transformation of sulfur species during KOH activation of high sulfur petroleum coke. **Fuel**, v. 215, p. 258-265, 2018.

SILVA, M. P.; Tulini, F. L.; Martins, E.; Penning, M.; Fávoro-Trindade, C. S.; Poncelet, D. Comparison of extrusion and co-extrusion encapsulation techniques to protect *Lactobacillus acidophilus* LA3 in simulated gastrointestinal fluids. **Food Science and Technology**, v. 89, p. 392-399, 2018.

SILVA, R. C. F. S.; Almeida, D. G.; Rufino, R. D.; Luna, J. M.; Santos, V. A.; Sarubbo, L. A. Applications of biosurfactants in the petroleum industry and the remediation of oil spills. *Internacional*. **Journal of Molecular Science**, n.15, p. 12542-12523, 2014.

SMITS, T. H. M.; BALADA, S. B.; WITHOLT, B.; VAN BEILEN, J. B. Functional analysis of alkene hydroxylases from Gram-negative and Gram-positive bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 6, p. 1733-42, 2002

SORKHOH, N. A.; Ghannoum, M. A.; Ibrahim, A. S.; Stretton, R. J.; Radwan, S. S. Crude oil and hydrocarbon-degrading strains of *Rhodococcus rhodochrous* isolated from soil and marine environments in Kuwait. **Environmental Pollution**, v. 65, n. 1, p. 1-17, 1993.

SOUSA, C. A. e Spiess, T. B. The management of brownfields in Ontario: A comprehensive review of remediation and reuse characteristics, trends, and outcomes, 2004–2015. **Environmental Practice**, v. 20, n. 1, p. 4-15, 2018.

SPEIGHT, J. G. S. The chemistry and technology of petroleum. 4. ed. London. **E. Taylor & Francis Group**, 2006.

STALLWOOD, B.; Shears, J.; Williams, P. A.; Hughes, K. A. Low temperature bioremediation of oil-contaminated soil using biostimulation and bioaugmentation with a *Pseudomonas* sp. from maritime Antarctica. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, n. 4, p. 794-802, 2005.

STUART, B. Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications. **Wiley**, 2004.

TAHERI-SHAKIB, J.; Shekarifard, A.; Naderi, H. Characterization of the wax precipitation in Iranian crude oil based on Wax Appearance Temperature (WAT): Part 1. The influence of electromagnetic waves. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 161, p. 530-540, 2018.

TATE, R.L. Soil Microbiology. **John Wiley**, New York, p. 107, 1995.

THAPA, B; Ajay Kumar, K. C.; Ghimiere, A. A review on bioorremediation of petroleum hydrocarbon contaminants in soil. **Journal of Science Engineering and Technology**, v. 8, n. 1, p. 70-164, 2012.

TOOR, A.; Lamb, S.; Helms, B. A.; Russell, T. P. Reconfigurable Microfluidic Droplets Stabilized by Nanoparticle Surfactants. **ACS Nano**, v. 12, n. 3, p. 2365-2372, 2018.

TUO, B. H.; Yan, J. B.; Fan, B. A.; Yang, Z. H., Liu, J. Z. Biodegradation characteristics and bioaugmentation potential of a novel quinoline-degrading strain of *Bacillus* sp. isolated from petroleum-contaminated soil. **Bioresource Technology**, v. 107, p. 55-60, 2012.

TYAGI, M. M.; Fonseca, M. R., Carvalho, C. C. C. Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. **Biodegradation**, v. 22, p. 41-231, 2011.

U. S. GEOLOGICAL SURVEY. Water Resources of the United States: U.S. Geological Survey. Disponível em: <https://www2.usgs.gov/water/>.

UNICAMP. Divisão de Engenharia de Petróleo. O que é petróleo? Campinas. Disponível em: <<http://www.dep.fem.unicamp.br/?q=pt-br/oqueepetroleo>>. Acesso em: 31 set. 2017.

UZOIGWE, C. et al. Bioemulsifiers are not biosurfactants and require different screening approaches. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 245, 2015.

VAN HAMME, J. D.; Singh, A.; Ward, O. P. Recent advances in petroleum microbiology. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, n. 67, p. 503-549, 2003.

WALTER, V.; Sylatk, C.; Hausmann, R. Screening concepts for the isolation of biosurfactant producing microorganisms. In: **Biosurfactants**. Springer, New York, NY, 2010. p. 1-13.

WANG, M. Z.; Zheng, X.; He, H. Z.; Shen, D. S.; Feng, H. J. Ecological roles and release patterns of acylated homoserine lactones in *Pseudomonas* sp. HF-1 and their implications in bacterial bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 125, p. 119-126, 2012.

WANG, W. Co-extrusion encapsulation of canola oil with alginate: Effect of quercetin addition to oil core and pectin addition to alginate shell on oil stability. **Food Research International**, v. 54, p. 837-851, 2003.

WAQAS, M.; Nizami, A. S.; Aburizaiza, A. S.; Barakat, M. A.; Rashid, M. I.; Ismail, I. M. I. Optimizing the process of food waste compost and valorizing its applications: A case study of Saudi Arabia. **Journal of Cleaner Production**, v. 176, p. 426-438, 2018.

WOJCIESZYŃSKA, D.; Hupert-Kocurek, K.; Jankowska, A.; Guzik, U. Properties of catechol 2,3-dioxygenase from crude extract of *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 immobilized in calcium alginate hydrogels. **Biochem. Eng. J.**, v. 66, p. 1-7, 2012. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2012.04.008>.

WOLNA-MARUWKA, A.; Sulewska, H.; Niewiadomska, A.; Panasiewicz, K.; Borowiak, K.; Ratajczak, K. The Influence of Sewage Sludge and a Consortium of Aerobic Microorganisms Added to the Soil under a Willow Plantation on the

Biological Indicators of Transformation of Organic Nitrogen Compounds. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 27, n. 1, 2018.

WOODS, J.; Kung, J.; Kingston, D.; Kotlyar, L.; Sparks, B.; McCracken, T. Canadian crudes: A comparative study of SARA fractions from a modified HPLC separation technique. **Oil e Gas Science and Technology-Revue D IFP Energies Nouvelles**, v. 63, n.1, 2008.

YANG, Z.; Wei, J.; Sobolev, Y. I.; Grzybowski, B. A. Systems of mechanized and reactive droplets powered by multi-responsive surfactants. **Nature**, 2018.

YORK, A. Environmental microbiology: Marine biogeochemical cycles in a changing world. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n.5, p. 259, 2018.

YU, C. M.; Yen, M. J.; Chen, L. C. A bioanode based on MWCNT/protein-assisted co-immobilization of glucose oxidase and 2,5-dihydroxybenzaldehyde for glucose fuel cells. **Biosens. Bioelectron.**, v. 25, p. 21-2515, 2010.

ZDZIENNICKA, A. et al. Components and parameters of solid/surfactant layer surface tension. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 522, p. 461-469, 2017.

ZHANG, L. et al. Intermolecular and surface forces at solid/oil/water/gas interfaces in petroleum production. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 537, p. 505-519, 2019.

ZHANG, P.; Lu, S.; Li, J.; Chen, C.; Xue, H.; Zhang, J. Petrophysical characterization of oil-bearing shales by low-field nuclear magnetic resonance (NMR). **Marine and Petroleum Geology**, v. 89, p. 775-785, 2018.

ZHU, X.; Venosa, A. D.; Suidan, M. T.; Lee, K. Guidelines for the bioremediation of marine shorelines and freshwater wetlands. U.S. **Environmental Protection Agency**, Cincinnati, 2001.