

PUCRS

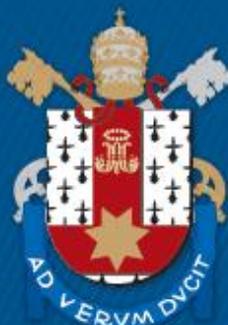
PUCRS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

PAULO EICHLER

**AVALIAÇÃO DO USO DE BAGAÇO DE MALTE EM ESFERAS DE ALGINATO
APLICADAS EM BIORREMEDIAÇÃO DE HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS
DO PETRÓLEO**

Porto Alegre
2022

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

Ficha Catalográfica

E34a Eichler, Paulo

Avaliação do uso de bagaço de malte em esferas de alginato aplicadas em biorremediação de hidrocarbonetos alifáticos do petróleo / Paulo Eichler. – 2022.

93.

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

Orientadora: Profa. Dra. Rosane Angélica Ligabue.

Coorientador: Prof. Dr. Fernando Almeida Santos.

1. Biorrefinaria. 2. Biotecnologia. 3. Biomateriais. 4. Biorremediação. I. Ligabue, Rosane Angélica. II. Santos, Fernando Almeida. III. , . IV. 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



**AVALIAÇÃO DO USO DE BAGAÇO DE MALTE EM ESFERAS DE
ALGINATO APLICADAS EM BIORREMEDIAÇÃO DE
HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS DO PETRÓLEO**

PAULO EICHLER

ENGENHEIRO DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA

MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA

**TESE PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM ENGENHARIA E
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Porto Alegre

Agosto, 2022



AVALIAÇÃO DO USO DE BAGAÇO DE MALTE EM ESFERAS DE ALGINATO APLICADAS EM BIORREMEDIAÇÃO DE HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS DO PETRÓLEO

PAULO EICHLER

ENGENHEIRO DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA
MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Rosane Angélica Ligabue

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Almeida Santos

Tese 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 Doutor em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

Porto Alegre

Agosto, 2022



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

**AVALIAÇÃO DO USO DE BAGAÇO DE MALTE EM ESFERAS
 DE ALGINATO APLICADAS A BIORREMEDIAÇÃO DE
 HIDROCARBONETOS ALIFÁTICOS DO PETRÓLEO**

CANDIDATO: PAULO EICHLER

Esta Tese de Doutorado foi julgada para obtenção do título de DOUTOR 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.

DRA. ROSANE ANGÉLICA LIGABUE - ORIENTADORA

DR. FERNANDO ALMEIDA SANTOS - COORIENTADOR

BANCA EXAMINADORA

**DR. HERNANE DA SILVA BARUD - PPG EM BIOTECNOLOGIA EM
 MEDICINA REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL -UNIVERSIDADE DE
 ARARAQUARA – UNIARA**

DRA. SÍLVIA DIAS DE OLIVEIRA - PPGBCM - PUCRS

DR. MARÇAL JOSÉ RODRIGUES PIRES - DO PGETEMA - PUCRS

*“A felicidade da sua vida depende
da qualidade dos seus
pensamentos”*

(Marcus Aurelius)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à minha família, tanto os que moram perto quanto os que moram longe, por todo suporte e ajuda nos momentos de dificuldade, pelas orientações e dicas nos momentos de dúvidas e pelos sorrisos nos momentos de alegria. Em especial, meus pais Walter e Virginia, e meu irmão Gustavo, sempre incentivando a busca por conhecimento, dedicação e responsabilidade.

Também agradeço a todos os amigos pelas horas de descontração, conversas e ajuda. “A felicidade é verdadeira apenas quando compartilhada”.

Sou muito grato também à minha esposa Sheila, pela atenção, carinho, compreensão, amor e apoio. Durante os tempos difíceis, foi minha principal motivadora e inspiradora, mostrando que posso produzir cada vez mais e cada vez melhor. Também, agradeço por mostrar esse mesmo afeto a nossa filha, Laís, que se tornou a maior fonte de inspiração para continuar crescendo e evoluindo. Obrigado por me dar um lar amoroso que tenho prazer de ficar todos os dias.

Agradeço, em especial, ao professor Dr. Rogério Lourega, que possibilitou que esse trabalho se tornasse possível, sempre disponibilizando seu tempo e recursos para isso. Obrigado por acreditar em mim e no meu trabalho!

Da mesma forma, um agradecimento especial para a professora Dra. Rosane Ligabue, que prontamente aceitou assumir o papel de minha orientadora, mesmo em condições adversas, e que muito contribuiu para o aprimoramento do trabalho. Obrigado pela atenção e pela ajuda.

Também agradeço ao meu co-orientador Dr Fernando Santos, pela orientação tanto dentro da Universidade quanto fora dela, me inspirando a não desistir dos meus sonhos. Obrigado pela inspiração, confiança e incentivo.

Agradeço aos grupos de pesquisa CESBIO e GTR2, pelas amizades, pela dedicação nos trabalhos acadêmicos, companheirismo e pelos momentos de descontração. Com certeza, o trabalho é feito com ajuda de todos.

Por último, mas não menos importante, agradeço aos funcionários, demais professores e colegas da PUCRS pelo empenho e dedicação à universidade, mostrando sempre alto grau de profissionalismo. Também às empresas Ralf Beer, Petrobrás e Enzilimp, pela contribuição com o trabalho. Muito obrigado!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	7
SUMÁRIO	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE QUADROS	14
LISTA DE ABREVIÇÕES	15
RESUMO	16
ABSTRACT	17
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	22
2.1. Objetivos Específicos.....	22
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
3.1. Uso do Petróleo ao longo do Tempo	23
3.1.1. Derramamentos de petróleo	24
3.1.2. Composição química do petróleo.....	28
3.1.3. Petróleo e meio ambiente	30
3.1.4. Técnicas de remediação de contaminação de petróleo	31
3.2. Biorrefinaria	33
3.2.1. Resíduos agroindustriais.....	34
3.2.2. O resíduo bagaço de malte para uso em bioprocessos.....	35
3.3. Biorremediação	37
3.3.1. Técnicas de biorremediação	39
3.3.2. Imobilização de microrganismos.....	41
3.4. Imobilização de microrganismos em cápsulas/esferas	44
3.4.1. Esferas de alginato de sódio.....	45
3.4.2. Esferas de alginato de sódio com materiais de reforço	48
4. MATERIAIS E MÉTODOS	49
4.1. Laboratório e reagentes	49

4.2. Produção das esferas de alginato com diferentes concentrações de bagaço de malte.....	49
4.3. Teste preliminar para avaliação das esferas durante biorremediação	49
4.4. Caracterização das esferas.....	50
4.4.1. Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV	50
4.4.2. Análise Dinâmica Mecânica - DMA.....	50
4.4.3. Teste de crescimento de microbiano	51
4.5. Ensaio de Biodegradação de Petróleo.....	51
4.5.1. Extração das amostras após teste de biorremediação	52
4.5.2. Determinação dos percentuais de biodegradação.....	53
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1. Caracterização das esferas em teste preliminar	55
5.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV	55
5.1.2. Ensaio de Compressão Dinâmico-Mecânico	62
5.1.3. Análise do crescimento microbiano	65
5.2. Resultados do ensaio de biorremediação	67
5.2.1. Caracterização parcial das esferas e meio aquoso	67
5.2.2. Resultados da fração orgânica do ensaio de biorremediação	73
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	80
7. TRABALHOS FUTUROS.....	82
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83
9. ANEXO	91
10. APENDICE.....	93

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1 - Consumo global de combustíveis líquidos de 2010 até 2022, sendo o eixo vertical a quantidade de barris consumidos (em milhões de barris por dia) e o eixo horizontal o ano (Adaptado de REUTERS, 2021).....24
- Figura 3.2 - Número de derramamentos de petróleo de 1970 a 2021 (Adaptado de ITOPF, 2022).....25
- Figura 3.3 - Quantidade de petróleo derramado de 1970 a 2021 e principais empresas responsáveis (Adaptado de ITOPF, 2022)26
- Figura 3.4 - Número de derramamentos de petróleo comparado com exploração e comércio do petróleo de 1970 a 2018 (Adaptado de ITOPF, 2020)27
- Figura 3.5 – Composição química simplificada do petróleo cru (Adaptado de Neahma, 2014)28
- Figura 3.6 - Esquema geral das etapas para definição e implementação de um processo de biorremediação (Gaylarde et al., 2005).....38
- Figura 3.7 – Principais técnicas de imobilização de microrganismos (Faria, 2019) ..43
- Figura 3.8 - Estruturas químicas de monômeros de alginato (a) e polímero (b) mostrando diferentes blocos dependentes da sequência de monômeros (Adaptado de Ayarza, 2017).....46
- Figura 3.9 - Formação do gel de alginato de cálcio: a) homopolímeros de ácido gulurônico; b) ligação entre cadeias homopoliméricas através dos íons de cálcio; c) formação da rede do gel de alginato de cálcio (Kawaguti, 2008).47
- Figura 4.1 - Fluxograma das etapas de processamento das amostras do ensaio de biorremediação.....53
- Figura 5.1 – Esferas de alginato com diferentes composições de bagaço de malte (0, 0,25, 0,75, 1,5, 3 e 5%), em 0, 30 e 60 dias de cultivo.....56
- Figura 5.2 - Imagens obtidas por MEV da superfície da seção transversal das esferas depois de 60 dias de teste de biorremediação com a) 0% de BM, b) 0,25% de BM e c) 1,5 % de BM, com magnificação de 70.....58
- Figura 5.3 - Imagens obtidas por MEV da superfície da seção transversal das esferas recém feitas (0 dias de teste de biorremediação) com a) 0% de BM, 1,5% de BM e 5% de BM, com magnificação de 80x.59

- Figura 5.4 - Imagens obtidas por MEV das esferas de alginato, com 30 dias do ensaio de biorremediação, com (a) 1,5%, (b) 3% e (c, d, e) 5% de bagaço de malte, com magnificação de 1200x, 2500x, 1200x, 80x e 600x, respectivamente. 60
- Figura 5.5 - Imagem obtida de MEV da superfície de esfera de alginato/MO com 0,75% de BM na composição, em 30 dias de ensaio de biorremediação, com magnificação de 5000x. 61
- Figura 5.6 - Imagem obtida por MEV da seção transversal interna da esfera de alginato com 0,75% de bagaço em 30 dias após ensaio de biodegradação, com magnificação de 2500x. 62
- Figura 5.7 - Gráficos de a) Curvas de tensão (MPa) x deformação (%) das esferas de alginato/MO com bagaço de malte (0, 0,25, 0,75, 1,5, 3 e 5% m/m) e b) pontos da mesma curva até -20% de deformação. 63
- Figura 5.8 - Resultado do crescimento microbiano em densidade óptica dos tratamentos com diferentes composições de bagaço de malte por tempo. 66
- Figura 5.9 - Perda de peso das esferas de alginato após ensaio de biorremediação, para os tratamentos CS, CS0%, S0,25%, S0,75%, S1,5%, S3% e S5%. 67
- Figura 5.10 - Imagens de MEV das esferas após 40 dias do ensaio de biorremediação sendo os tratamentos a) CS, b) CS0%, c) S0,75% e d) S5%, todas com magnificação de 80x. 69
- Figura 5.11 - Imagens de MEV das esferas após 40 dias de ensaio de biorremediação sendo os tratamentos a) S3% e b) S0,25%, com magnificações de 1200x e 2000x, respectivamente. 70
- Figura 5.12 - Resultado de pH do meio após 40 dias de ensaio de biorremediação para os tratamentos CS, CMO, CS0%, S0,25%, S0,75%, S1,5%, S3% e S5%. 71
- Figura 5.13 - Resultado de concentração de biomassa (sólidos em suspensão) no meio após 40 dias de ensaio de biorremediação para os tratamentos CS, CMO, CS0%, S0,25%, S0,75%, S1,5%, S3% e S5%. 72
- Figura 5.14 - Perfil cromatográfico da fração de hidrocarbonetos alifáticos extraídos do petróleo cru usado no ensaio de biorremediação. 74
- Figura 5.15 - Resultados de degradação dos hidrocarbonetos alifáticos por grupos: geral, alcanos de cadeia curta, alcanos de cadeia longa e pristano e fitano,

para os tratamentos CS, CMO, CS0%, S0,25%, S0,75%, S1,5%, S3% e S5%.....75

Figura 5.16 - Percentual de degradação de hidrocarbonetos alifáticos, do C8 até C27 incluindo pristano e fitano, após 40 dias do ensaio de biorremediação para os tratamentos CS, CMO, CS0%, S0,25%, S0,75%, S1,5%, S3% e S5%.
.....78

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Composição química (%) de resíduos agroindustriais de importância (Adaptado de RAVINDRAN <i>et al.</i> , 2018).....	34
Tabela 5.1 - Composição e concentração de hidrocarbonetos do petróleo cru usado no experimento como fonte contaminante.	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1 - Componentes Hidrocarbonetos de petróleo, características e exemplos (Adaptado de Faria, 2019)	29
Quadro 3.2 - Classificação dos hidrocarbonetos de acordo com peso molecular (Adaptado de Patrick, 2012 e Pereira, 2019)	30
Quadro 3.3 - Resumo das principais estratégias de biorremediação (Adaptado de Boopathy, 2000).....	39
Quadro 3.4 - Principais fatores que afetam a biorremediação (Adaptado de Boopathy, 2000)	40
Quadro 3.5 – Vantagens e desvantagens das técnicas de imobilização mais comuns (Adaptado de Es, 2015).	42

LISTA DE ABREVIACOES

BM – Bagaço de Malte

CCMO – Consórcio Comercial de Microrganismos ou *Commercial Consortium of Microrganisms*

ITOPF – *International Tanker Owners Pollution Federation Limited*

MB – *Malt Bagasse*

MO – Microrganismos ou *Microrganisms*

RESUMO

EICHLER, Paulo. **Avaliação do uso de bagaço de malte em esferas de alginato aplicadas em biorremediação de hidrocarbonetos do petróleo.** Porto Alegre. 2022. Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

A biorremediação de contaminação de derramamento de petróleo, através de encapsulamento de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos em esferas de alginato se apresenta atualmente como uma alternativa de grande interesse pelo relativo baixo custo e menor impacto ambiental que as tradicionais soluções (químicas e físicas). O presente trabalho teve como objetivo avaliar o uso de Bagaço de Malte (BM) como uma fonte de nutrientes de baixo custo, que podem ser inseridos em esferas de alginato a fim de auxiliar no crescimento inicial dos microrganismos, sem alterar negativamente as propriedades mecânicas das esferas. As esferas foram produzidas com 1% (m/m) de alginato de sódio, 1% (m/m) de consórcio comercial de microrganismos e variadas composições de BM. Foram avaliados o crescimento inicial dos microrganismos, caracterizações das esferas e biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos usando diferentes composições de BM em esferas de alginato. Observou-se maior crescimento inicial de microrganismos nas esferas com maior composição de BM, no entanto a incorporação de 3% de BM apresentou maior módulo de elasticidade (398 kPa). O ensaio de biorremediação, em 40 dias, mostrou que, para a fração de hidrocarbonetos alifáticos de C12 até C27, existe uma tendência de que maiores concentração de BM nas esferas aumenta também a porcentagem de biorremediação. As esferas com 5% de BM apresentaram os melhores resultados de biorremediação com porcentagem média geral de 75% e porcentagens médias de 81%, 64% e 61% para hidrocarbonetos de cadeia média (C12 a C18), hidrocarbonetos de cadeia longa (C19 a C27) e isoprenóides (pristano e fitano), respectivamente.

Palavras-Chaves: Biorrefinaria, Biotecnologia, Biomateriais, Biorremediação.

ABSTRACT

EICHLER, Paulo. **Evaluation of the use of malt bagasse in alginate spheres applied to bioremediation of petroleum hydrocarbons.** Porto Alegre. 2022. PhD Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

Bioremediation of oil spill contamination, through encapsulation of hydrocarbon-degrading microorganisms in alginate spheres, is currently an alternative of great interest due to its relatively low cost and lower environmental impact than traditional solutions (chemical and physical). The present work aimed to evaluate the use of Malt Bagasse (MB) as a low-cost source of nutrients, which can be inserted into alginate spheres to assist in the initial growth of microorganisms, without negatively altering the mechanical properties of the spheres. The spheres were produced with 1% (m/m) of sodium alginate, 1% (m/m) of commercial consortium of microorganisms and different compositions of MB. Initial growth of microorganisms, bead characterizations and biodegradation of aliphatic hydrocarbons were evaluated using different compositions of MB in alginate beads. Higher initial growth of microorganisms was observed in the spheres with higher MB composition, however the incorporation of 3% of MB presented a higher elastic modulus (398 kPa). The 40-day bioremediation test showed that, for the aliphatic hydrocarbon fraction from C12 to C27, there is a tendency that higher concentration of MB in the spheres also increases the percentage of bioremediation. The spheres with 5% MB showed the best bioremediation results with an overall average percentage of 75% and average percentages of 81%, 64% and 61% for medium chain hydrocarbons (C12 to C18), long chain hydrocarbons (C19 to C27) and isoprenoids (pristane and phytane), respectively.

Key-words: Biorefinery, Biotechnology, Biomaterials, Bioremediation.

1. INTRODUÇÃO

O petróleo e seus derivados são importantes fontes de energia, vastamente utilizadas no último século e responsável pelo incrível crescimento humano e tecnológico que temos hoje em dia. Apesar disso, o solo e a água contaminados com hidrocarbonetos de petróleo representam uma importante pauta ambiental devido aos seus efeitos negativos sobre os ecossistemas (KALGHATGI, 2018; PHILP, 1985). Organismos marinhos afetados com contaminações de petróleo podem sofrer de alteração de crescimento e de padrões de reprodução, complicações anatômicas e aumento de susceptibilidade a hipotermia (WAIKHOM *et al.*, 2020). O amplo uso de hidrocarbonetos de petróleo, em atividades industriais, juntamente com as atividades associadas à extração e transporte do petróleo os levaram a serem identificados como um dos contaminantes ambientais mais difundidos na mídia. Diversos métodos físicos, químicos e térmicos, bem como biológicos foram propostos e aplicados para remediar esses ambientes contaminados. No entanto, a remediação destes ambientes contaminados com hidrocarbonetos de petróleo permanece desafiadora devido à sua baixa solubilidade e natureza hidrofóbica (BOOPATHY, 2000; KUZHAIEVA; BERLINSKII, 2018; PATRICK *et al.*, 2012; PHILP, 1985).

A biorremediação é uma técnica que chama a atenção devido à sua natureza simples, econômica e ecológica. A biorremediação do solo e da água pode ser implementada *in situ* e *ex situ* e diferentes técnicas têm sido estudadas extensivamente, entre elas, uso de biorreatores, bioaugmentação e bioestimulação (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016; BOOPATHY, 2000). A bioaugmentação, isto é, a adição de microrganismos (MO) aos locais contaminados, é frequentemente considerada um método mais prático comparado a outros métodos, pois pode ser implementado *in situ* e *ex situ*, bem como, em uma combinação de outras técnicas de biorremediação (PARTOVINIA; RASEKH, 2018; TAHSEEN *et al.*, 2016). A eficiência da bioaugmentação depende da inoculação dos meios apropriados,

quantidade de biomassa microbiana, o método de entrega e a possível sorção para o meio circundante. Existem várias maneiras de transferir microrganismos para os locais contaminados, nas quais o mais comum é o procedimento direto do estágio de cultura líquida ou do sistema de células livres. Contudo, a distribuição adequada de microrganismos, especialmente no perfil do meio, sua atividade, e a viabilidade não pode ser completamente garantida usando células livres. Para aumentar a eficácia da biorremediação, várias técnicas de transferência de microrganismos para áreas poluentes tem sido investigadas, sendo que uma das técnicas mais promissoras, neste campo, é o uso de diferentes materiais de suporte para imobilização celular, mantendo a atividade microbiana suficiente por um longo período tempo, permitindo maior eficiência de biorremediação (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005; PARTOVINIA; RASEKH, 2018).

Confinamento de biocatalisadores, como enzimas e células inteiras, dentro ou sobre o transportador ou material de suporte é chamado de imobilização. As tecnologias de células imobilizadas são, por vezes, consideradas mais vantajosas que os sistemas de células livres devido à separação mais fácil, possível reutilização de microrganismos (MO), estabilidade contra tensões, maior proteção contra metabólitos tóxicos, por longos períodos de tempo, e impedimento de lavagem celular a altas taxas de diluição (BICKERSTAFF, GORDON, 1997; CASSIDY; LEE; TREVORS, 1996; XUE *et al.*, 2019). O método de fixação de células em uma superfície sólida, como o aprisionamento e/ou encapsulamento é amplamente aplicado para a degradação de hidrocarbonetos de petróleo. Neste contexto, destaca-se o polímero alginato de sódio, um material de fixação de microrganismos que é biodegradável, barato e oferece proteção para crescimento inicial dos microrganismos (XUE *et al.*, 2019).

O alginato é um dos materiais poliméricos mais usados em imobilizações de microrganismos já que o procedimento de imobilização é simples e relativamente barato. O material é degradado facilmente por hidrólise química, enzimática ou usando radiação e tem baixa toxicidade. O alginato de sódio, sendo solúvel em água, tem sua aplicação facilitada como agentes espessantes, emulsificantes, formadores de filme e gelificantes, entre outros (EL-MOHDY, 2017; PARTOVINIA; RASEKH, 2018; TAO *et al.*, 2009). O alginato é um polissacarídeo natural não tóxico e um copolímero linear constituído de ácidos β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G), extraídos de algas marrons, algas marinhas e produzido por algumas bactérias. A composição dos

resíduos (M) e (G) podem variar de acordo com a fonte de obtenção do alginato. Esferas de alginato de sódio com MOs têm se mostrado um suporte adequado para microrganismos na degradação de contaminações de petróleo bruto indicando que suas limitações de difusão protegem o microrganismo contra a inibição do substrato (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016; FARIA, D., 2019; PARTOVINIA; RASEKH, 2018; ZINJARDE; PANT, 2000). Contudo, as esferas de alginato de sódio ainda apresentam algumas limitações como: a) baixa resistência mecânica, tornando-as frágeis para seu transporte e uso em biorreatores com agitação e b) dificuldade de crescimento inicial dos organismos encapsulados nas esferas, pelas limitações de entrada de nutrientes pelos poros destas esferas (OBUEKWE; AL-MUTTAWA, 2001). Desta forma, a inserção de cargas de reforço na matriz das esferas pode ajudar na melhoria das propriedades mecânicas das mesmas. Além disso, a adição de nutriente na composição das esferas também pode auxiliar na melhoria das taxas de crescimento inicial dos microrganismos, levando a um aumento nos rendimentos de biodegradação de ambientes, com alta toxicidade, contaminados por petróleo (FARIA, D., 2019; GUO *et al.*, 2017; WANG; SHANKAR; RHIM, 2017). Contudo, o uso de fonte nutriente pode inviabilizar economicamente o produto de biorremediação dependendo do custo de obtenção. Portanto, o uso de resíduos agroindustriais como material nutriente e possivelmente de reforço é desejado, visto que podem ter baixo custo de aquisição e contribuem para sustentabilidade de produção e processamento.

O bagaço de malte é um resíduo agroindustrial e é o maior subproduto da indústria de fabricação de cerveja, representando cerca de 85 % do total de resíduos gerados. Estima-se que, para cada hectolitro de cerveja produzida, geram-se 20 kg de bagaço de malte (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2006; THIAGO; PEDRO; ELIANA, 2014). Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo mesmo após uma estagnação em tempos de pandemia, atrás da China e dos EUA, com uma estimativa de 143 milhões de hectolitros produzidos em 2021, o que representa um potencial de 2,86 milhões de toneladas de bagaço de malte disponíveis para uso em processos de biorrefinaria por ano (GLOBO, 2022). Esta biomassa está disponível a baixo custo ou mesmo sem custo ao longo do ano, possuindo nutrientes disponíveis como lipídios, proteínas, amido e celulose permitindo uso em processos de biorrefinaria (EICHLER *et al.*, 2020).

Desta forma, este estudo propõe a utilização do bagaço de malte, um resíduo agroindustrial de grande importância comercial, para o crescimento de microrganismos, o que pode acarretar melhora do crescimento inicial do consórcio de microrganismos e, conseqüentemente, a melhora na degradação de contaminantes de petróleo. Além disso, espera-se que este resíduo agroindustrial possa contribuir de forma significativa na melhora da resistência mecânica das esferas de alginato, levando a um melhor desempenho deste sistema tanto em ambiente marinho quanto em biorreatores.

2. OBJETIVOS

O objetivo do trabalho foi avaliar o uso do bagaço de malte para melhoramento das condições de biorremediação de contaminação de petróleo em meio salino sintético usando a técnica de imobilização de consórcio comercial de microrganismos em esferas de alginato de cálcio.

2.1. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar o uso do bagaço de malte, um resíduo agroindustrial, como material de reforço e melhoramento do percentual de biorremediação em esferas de alginato;
- ✓ Avaliar a influência da incorporação de diferentes concentrações de bagaço de malte em esferas de alginato e seu efeito nas características das esferas: crescimento microbiano inicial e resistência mecânica a compressão;
- ✓ Avaliar a influência das diferentes concentrações de bagaço de malte em esferas de alginato quanto a degradação da fração de hidrocarbonetos alifáticos de petróleo em teste de biorremediação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Capítulo dedicado à revisão da literatura sobre o tema deste trabalho, 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. Uso do Petróleo ao longo do Tempo

O petróleo é formado a partir do acúmulo e preservação de matéria orgânica em locais geológicos específicos ao longo de muito tempo. A decomposição da matéria orgânica, para formação do petróleo, ocorre de forma lenta, depositando-se no subsolo em camadas que formam posteriormente bacias sedimentares e finalmente transformam-se em jazidas, com a matéria orgânica se tornando hidrocarbonetos de diferentes tamanhos e complexidades. O termo se origina do latim “*petrus oleum*”, que significa óleo de pedra, referenciando o local onde é encontrado (PHILP, 1985). O petróleo é comercialmente explorado desde o meio do século 19, sendo usado por muitos anos como iluminação e lubrificante. Contudo, com o avanço da construção de motores de combustão interna e a rápida adoção do petróleo e seus derivados como combustíveis, ocorreu um grande aumento da demanda do petróleo. O consumo global de combustíveis líquidos de petróleo vem aumentando a cada ano, mostrando que, por mais que existam novos incentivos para substituição de combustíveis fósseis, a tendência ainda mostra um aumento do consumo para um futuro próximo (PALA *et al.*, 2006). Como pode ser visto na Figura 3.1, mesmo com o declínio acentuado de consumo de combustíveis líquidos ocasionados pela pandemia em 2019, é possível notar um crescimento rápido de consumo no período pós-pandemia.

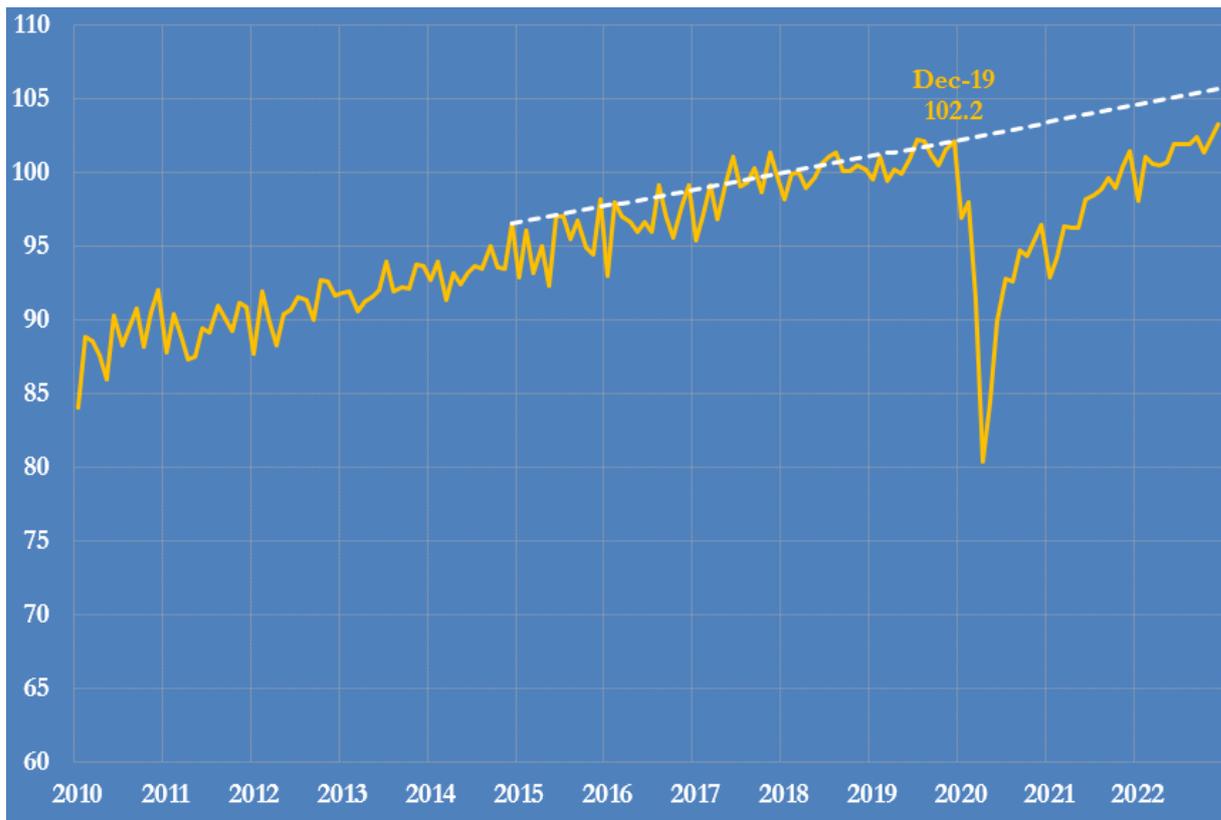


Figura 3.1 - Consumo global de combustíveis líquidos de 2010 até 2022, sendo o eixo vertical a quantidade de barris consumidos (em milhões de barris por dia) e o eixo horizontal o ano (Adaptado de REUTERS, 2021).

Com esse aumento do consumo, também se tornam evidentes as preocupações com os riscos envolvidos nos processos de extração e transporte desse produto, visto que grande parte dele também se encontra em ambiente aquático (em especial marinho) causando maiores dificuldades no caso de derramamentos.

3.1.1. Derramamentos de petróleo

Sabe-se que milhões de toneladas de petróleo já foram derramados no mar ao longo dos últimos anos. Somente no ano de 2016, mais de 6.000 toneladas foram derramadas no mar. Apesar disso, tem-se observado um decaimento de derramamentos de petróleo nas últimas décadas (Figura 3.2), observando uma tendência de decréscimo desses desastres ambientais.

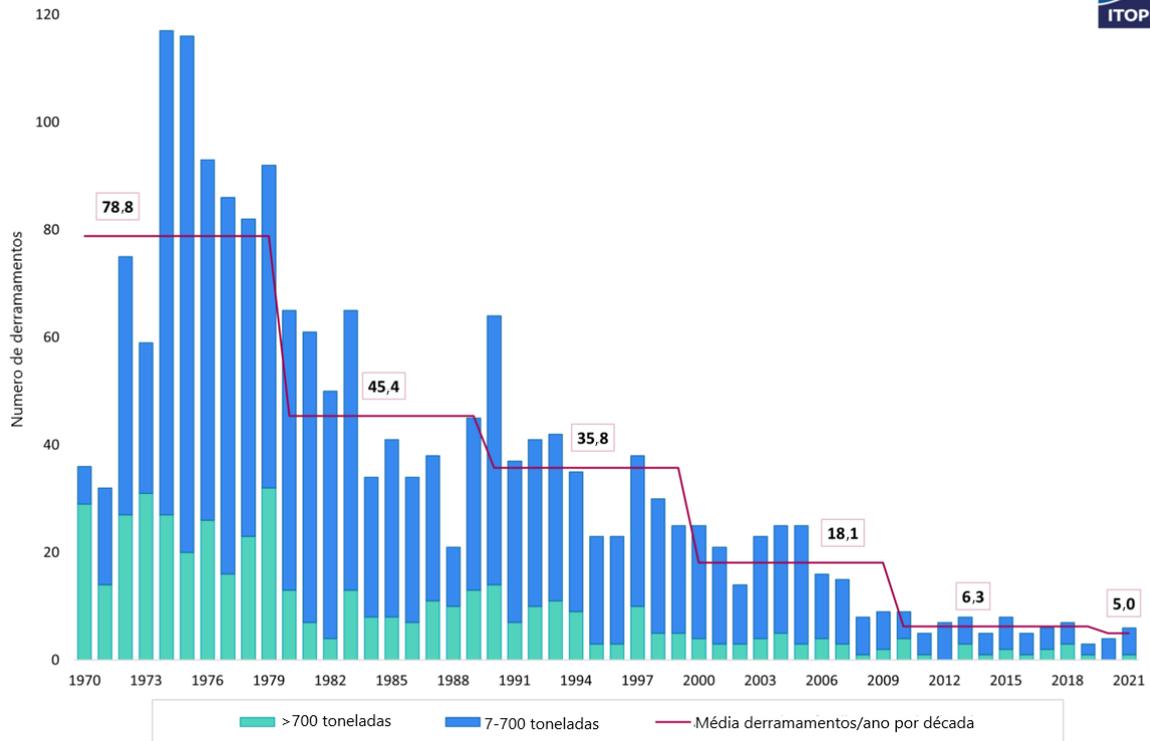


Figura 3.2 - Número de derramamentos de petróleo de 1970 a 2021 (Adaptado de ITOPF, 2022)

De 2010 a 2018 houve uma média de 6,4 derramamentos por ano, o que é um número razoavelmente baixo comparado com o que havia anteriormente. De 2018 até 2021 a média reduziu para 5. Seguindo na mesma tendência, a quantidade de petróleo derramado também tem decrescido nos últimos anos, como observado na Figura 3.3.

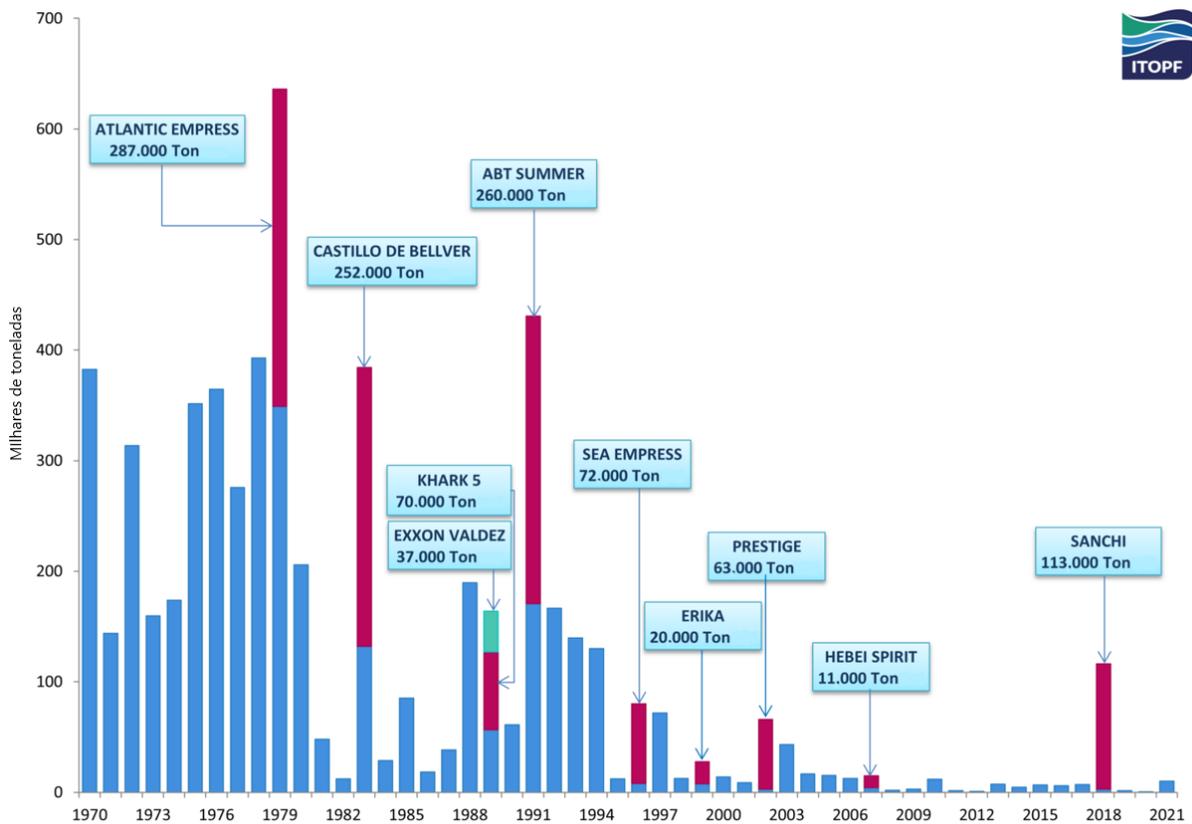


Figura 3.3 - Quantidade de petróleo derramado de 1970 a 2021 e principais empresas responsáveis (Adaptado de ITOPF, 2022)

Assim, podemos perceber que realmente os derramamentos de petróleo, tanto em quantidade de derramamentos (acidentes) quanto em quantidade de petróleo que vai para o mar (toneladas) tem diminuído ao longo do tempo. Apesar de ter aumentado a exploração e retirada de petróleo, como mostrado na figura 3.4.

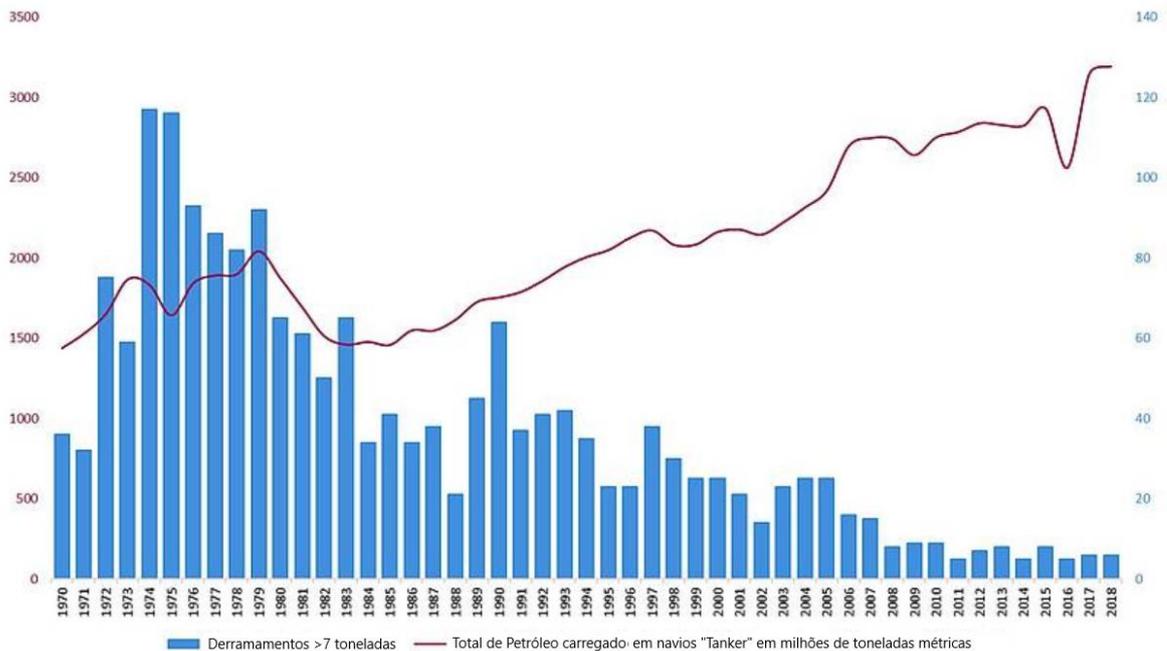


Figura 3.4 - Número de derramamentos de petróleo comparado com exploração e comércio do petróleo de 1970 a 2018 (Adaptado de ITOPF, 2020)

Embora haja visivelmente uma tendência de diminuição da quantidade de petróleo que é derramada nos mares e oceanos, ainda assim sabe-se que até pouca quantidade pode ser extremamente nocivo para o meio ambiente (KUZHAIEVA; BERLINSKII, 2018). Além disso, apesar de todo o esforço com protocolos de segurança, outros acidentes poderão ocorrer. Um exemplo recente (em 2018, na costa da China), houve uma colisão do navio tanque *Sanchi* ocasionando um derramamento de aproximadamente 136.000 toneladas de petróleo ultraleve cru (Figura 3.3) (QIAO *et al.*, 2019). Este derramamento foi um dos maiores dos últimos tempos, mostrando que mesmo que tenha uma tendência de diminuição, ainda pode haver casos em que uma quantidade sem precedentes seja derramada nos oceanos. De acordo com a Figura 3.3, e dados do *International Tanker Owners Pollution Federation Limited* - ITOPF, um derramamento dessa magnitude não ocorria desde 1991. Está classificado como o nono (9º) maior derramamento dos últimos 50 anos. Por isso, por mais que os mecanismos de prevenção a acidentes e derramamentos tenham sido melhorados ao longo do tempo, ainda é extremamente necessário que seja investigado formas de remediação de contaminações de petróleo. Em 2019, outro derramamento atingiu a costa brasileira, afetando 11 estados do Nordeste e Sudeste

do Brasil, atingindo cerca de 120 municípios e 724 localidades. Foi considerado o maior derramamento de óleo bruto da história do país e um dos mais extensos registrados no mundo (PENA *et al.*, 2020).

3.1.2. Composição química do petróleo

O petróleo é composto, de forma geral, por uma mistura complexa de hidrocarbonetos, associados a pequenas quantidades de nitrogênio, enxofre e oxigênio, contendo também níquel e vanádio em menores quantidades. Apesar disso, existem diferentes composições de petróleos, variando algumas propriedades físicas como a densidade relativa. De maneira simples, pode-se dividir o petróleo em 2 grandes grupos (hidrocarbonetos e não-hidrocarbonetos) conforme exemplificado na Figura 3.5, e alternativamente, o petróleo também pode ser dividido em 4 frações principais de acordo com a solubilidade em solventes orgânicos: hidrocarbonetos saturados, hidrocarbonetos aromáticos, resinas e asfaltenos (NEAMAH, 2014).

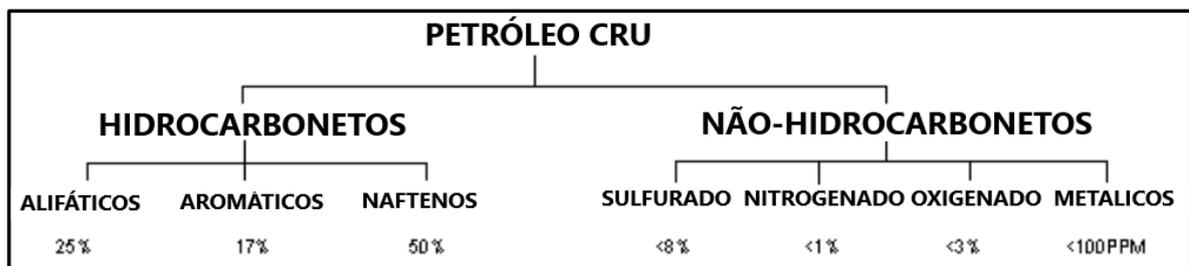


Figura 3.5 – Composição química simplificada do petróleo cru (Adaptado de Neahma, 2014)

Os hidrocarbonetos que compõem o petróleo podem apresentar diferentes estruturas como aromáticas e alifáticas, sendo cíclicas ou não. Os hidrocarbonetos aromáticos são compostos por anel benzênico em sua estrutura molecular, podendo ser divididos em monocíclicos, conhecidos como BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), e policíclicos aromáticos (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos ou HPAs) como antraceno e naftaleno. Os hidrocarbonetos alifáticos e parafinas não possuem anel benzênico em sua estrutura, sendo formados por longas cadeias e baixa solubilidade. Os asfaltenos possuem predominantemente anéis

aromáticos condensados, com heteroátomos (oxigênio, nitrogênio e enxofre) (AKMAZ *et al.*, 2011; ANDERSEN; SPEIGHT, 2001; CHAMBERS *et al.*, 2018; CUI *et al.*, 2018). No Quadro 3.1 é possível ver alguns exemplos de hidrocarbonetos que compõe a fração de hidrocarbonetos do petróleo e suas características (FARIA, D., 2019).

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.

Quadro 3.1 - Componentes Hidrocarbonetos de petróleo, características e exemplos (Adaptado de Faria, 2019)

A composição do petróleo, principalmente devido aos hidrocarbonetos de cadeias longas, mostra-se uma fonte poluidora para o meio ambiente devido a sua grande quantidade e dificuldade de degradação. Os hidrocarbonetos de cadeia menor, principalmente os mais voláteis, são degradados mais rapidamente, sendo também fonte de carbono para alguns microrganismos. Moléculas de grande peso molecular têm a sua degradação dificultada. Além disso, pode haver a ocorrência de associação de moléculas de hidrocarboneto com oxigênio, hidrogênio e enxofre, formando compostos que atuam como impedidores de degradação (ex.: indol, fenol, tiofeno)

(OLLIVIER; MAGOT, 2005; PHILP, 1985-; STOUT; WANG, 2018). O Quadro 3.2 mostra a classificação dos hidrocarbonetos quanto ao seu peso molecular.

Classificação dos alcanos por peso molecular		
Baixo	Médio	Alto
C ₁ a C ₁₁	C ₁₂ a C ₁₈	>C ₁₉

Quadro 3.2 - Classificação dos hidrocarbonetos de acordo com peso molecular (Adaptado de Patrick, 2012 e Pereira, 2019)

3.1.3. Petróleo e meio ambiente

Muito já se sabe sobre os danos ambientais causados por derramamentos de petróleo, já que foi um tema muito abordado pela mídia nas últimas duas décadas. Nos mares e oceanos, existem diversos fatores que irão contribuir para agravar ou suavizar os problemas ambientais como: velocidade do vento, direção do vento, força e direção das marés, tamanho do derramamento, temperatura, incidência solar, presença de microrganismos e quantidade de sal na água. Após um derramamento, ocorre o espalhamento da mancha de petróleo sobre a água. O espalhamento impede luz solar de entrar pela superfície, o que prejudica, entre outros organismos, a fotossíntese de fitoplâncton. Como esse organismo é um dos mais básicos da cadeia alimentar, pode afetar um ecossistema inteiro caso a mancha seja de grandes proporções e demore a degradar (GILDE; PINCKNEY, 2012; KUZHAIEVA; BERLINSKII, 2018; PATRICK *et al.*, 2012).

Além do óleo derramado na água atuar como uma barreira física para luz solar, os componentes do petróleo podem ainda causar alterações físico-químicas no meio ambiente e seres vivos. Os compostos voláteis e hidrocarbonetos mais leves, apesar de serem mais facilmente degradáveis, também são os primeiros a entrar em cadeias alimentares do meio ambiente. Ainda, a radiação ultravioleta pode propiciar reações de oxidação, gerando produtos ácidos e fenólicos que poderiam ser mais tóxicos que os hidrocarbonetos do petróleo. Os hidrocarbonetos também acabam sendo diluídos

na água em pequenas quantidades, cerca de 1% dos hidrocarbonetos são dissolvidos em água. Esses hidrocarbonetos são mais facilmente degradados por microrganismos presentes na água (GILDE; PINCKNEY, 2012; OLLIVIER; MAGOT, 2005; STOUT; WANG, 2018).

Também quanto à composição, hidrocarbonetos mais leves acabam tendo um efeito tóxico maior do que hidrocarbonetos de cadeia longa. Apesar disso, hidrocarbonetos de cadeia longa também possuem efeito danoso ao meio ambiente, podendo provocar efeito sufocante em organismos vivos. Esse efeito se dá fisicamente, ao impedir certas funções biológicas básicas de organismos, provocando morte por “sufocamento” (KUZHAIEVA; BERLINSKII, 2018).

Os danos causados por derramamentos de petróleo no curto prazo são mais perceptíveis e midiáticos, principalmente por se tratar de manchas grandes que se aderem a populações animais que convivem naquele habitat. Diversos estudos já são feitos avaliando os efeitos em populações como plâncton, peixes, aves marinhas, mamíferos marinhos, répteis, corais e algas marinhas. Além disso, há o problema de danos em longo prazo, que apesar de terem poucos casos documentados, ainda podem ocasionar sérios problemas em habitats marinhos. Quando ocorre um derramamento em habitats que são naturalmente protegidos de condições climáticas, a tendência de dissipação do petróleo é menor, o que pode ocasionar danos ao ecossistema local com o tempo. Portanto, é necessário que sempre haja um acompanhamento ao longo de anos em locais onde houve derramamento de petróleo (GERACI; AUBIN, 1988; KUZHAIEVA; BERLINSKII, 2018; PAYNE, 1982).

3.1.4. Técnicas de remediação de contaminação de petróleo

Os danos causados por derramamentos de petróleo dependem de fatores como a quantidade de petróleo, sua composição e a área em que ocorreu o acidente. Impactos de derramamentos, além de ambientais, podem também gerar consequências econômicas. Para empresas extratoras e transportadoras de petróleo, os derramamentos podem gerar graves multas ambientais. Ainda, para casos de contaminação atingindo praia turística, o comércio local é extremamente prejudicado, assim como visto no recente acidente de derramamento no litoral brasileiro em 2019

onde mais de 144 mil pescadores artesanais do Nordeste foram expostos a riscos de saúde, agravando situação de vulnerabilidade socioeconômica (PENA *et al.*, 2020b). Geralmente, métodos de limpeza ou remediação podem ser divididas em três grandes grupos: técnicas físicas, químicas e biológicas.

Técnicas físicas de remediação são geralmente aquelas que envolvem processos físicos de remoção ou degradação do petróleo. São técnicas mais conhecidas por sua praticidade e pouca tecnologia envolvida, principalmente as técnicas como barreiras físicas ou incineração. Barreiras físicas, como barreiras de contenção, direcionam a mancha do óleo para áreas menos vulneráveis ou favoráveis para seu recolhimento através de *skimmers*, que são barcaças que recolhem o óleo (dependendo do tipo). Essas técnicas sofrem muito com situações adversas de clima ou tempo, como por exemplo, más condições meteorológicas prejudicam o uso dessas barreiras. A queima é uma técnica usada como solução *in situ* onde ocorre a recuperação térmica de petróleo, sendo a queima realizada dentro de uma barreira física. Neste caso, o petróleo entra em combustão, com a entrada de oxigênio, provendo uma combustão completa, que libera água e CO₂. Existem diversos problemas associados à essa tecnologia como perigo da fonte de ignição, formação de resíduos densos que podem afundar e questões de segurança operacional. Para essa situação, devem existir barreiras físicas antifogo para evitar maiores problemas, as condições meteorológicas devem ser favoráveis, com ventos estáveis e fracos e distância segura de outros barcos e pessoas. Outro problema associado à essa prática é a formação de subprodutos densos que podem afundar e contaminar organismos vivos (PATRICK *et al.*, 2012).

Técnicas químicas de remediação das contaminações de petróleo envolvem uso de produtos como dispersantes e surfactantes. Neste caso, dispersantes ao serem pulverizados na mancha de óleo aceleram o processo de dispersão, removendo a camada de óleo da superfície. Este caso é mais usado quando a remoção mecânica do petróleo é inviável, minimizando os impactos do óleo flutuante. Esses dispersantes possuem surfactantes e solventes, onde surfactantes agem como moléculas de interface para líquidos distintos que não se misturam, reduzindo a tensão superficial óleo-água. Assim, permite-se mais facilmente que o óleo penetre na água, em gotículas menores, sendo mais facilmente degradada por bactérias do ambiente. Para o uso de dispersantes e surfactantes, existem alguns fatores que afetam

drasticamente o seu sucesso em remoção de petróleo: Condições climáticas favoráveis, composição do petróleo, tamanho da mancha e maneira de aplicação do dispersante. Dispersantes tem pouca eficácia em óleos pesados e muito viscosos, sendo que condições como mar pouco agitado dificultam a mistura do dispersante (FARIA, D., 2019; KUZHAIEVA; BERLINSKII, 2018; PATRICK *et al.*, 2012). Segundo o IBAMA (2022), atualmente existem apenas dois dispersantes comerciais registrados para esse tipo de uso: “Corexit EC9500A” e “Finasol OSR 52”, sendo o primeiro com composição química (glicol, sais de ácido sulfurônico e solvente hidrocarboneto) e o segundo com composição química e biológica, contendo também ativador biológico (IBAMA, 2022).

A remediação biológica, ou biorremediação é uma técnica onde são usados microrganismos que possuem capacidade de degradação de cadeias de hidrocarbonetos em moléculas menores. Essa técnica também depende de diversos fatores como: condições climáticas favoráveis, taxa de degradação do microrganismo, concentração de oxigênio, quantidade de nutrientes e composição do óleo. Apesar disso, é uma das técnicas que é priorizada em muitos casos, pois não causa danos adicionais à comunidade de organismos do ecossistema. Normalmente é usada em conjunto com outras técnicas, como barreiras físicas, visto que melhoram o desempenho no processo de descontaminação. Hidrocarbonetos aromáticos com baixa massa molecular são tóxicos, afetando drasticamente o meio ambiente, porém a sua degradação por microrganismos é relativamente fácil e simples. Em contrapartida, moléculas com anéis aromáticos condensados, ou que possuem ramificações, são degradadas com maior dificuldade. A degradação do petróleo por microrganismos resulta na formação de moléculas menores que as originais, sendo gradativamente quebradas até a geração final de água e dióxido de carbono (em condições aeróbicas) ou metano (em condições anaeróbicas) (FARIA, D., 2019; KUZHAIEVA; BERLINSKII, 2018; OLLIVIER; MAGOT, 2005; PATRICK *et al.*, 2012).

3.2. Biorrefinaria

Com a rápida ascensão econômica mundial movida pelo aumento do uso de combustíveis fósseis, diversos fatores foram negligenciados. A rápida expansão trazida pelos combustíveis fósseis deixou um rastro de efeitos colaterais percebidos

apenas recentemente como mudanças climáticas globais, aumento sem precedentes de resíduos gerados pela indústria e falta de alternativas sustentáveis para problemas energéticos. Com o aumento da consciência sobre os temas de poluição ambiental, combustíveis renováveis e alternativas sustentáveis de produção, surge o conceito de biorrefinaria como forma de alternativa sustentável. A biorrefinaria é o complexo integrado de produtos e processos sustentáveis que visa o uso de uma matéria-prima renovável, que pode ser biomassa ou resíduos industriais, para geração de produtos como biocombustíveis, bioprodutos e bioenergia. Os processos de biorrefinaria podem ser divididos pelos tipos de processos utilizados para conversão, que podem ser químicos, termoquímicos ou bioquímicos (EICHLER *et al.*, 2015; MOHAN *et al.*, 2016).

3.2.1. Resíduos agroindustriais

Pelo anseio em mitigar problemas ambientais, a biorrefinaria atual visa realizar uma mudança nos processos de produção. Diversos estudos foram conduzidos no passado examinando os efeitos e utilização de resíduos agroindustriais para processos de biorrefinaria (BACHMANN; CALVETE; FÉRIS, 2022; EICHLER *et al.*, 2020; RAVINDRAN *et al.*, 2018). Um dos casos mais conhecidos e valorizados, tanto pela disponibilidade quanto pelo potencial de sua composição, é o uso de bagaço de cana para produção de energia e etanol de segunda geração (SANTOS *et al.*, 2020). A fim de se tornar mais sustentável, deve-se pensar não somente no uso de biomassa para produção de produtos e energia, como também qual é a fonte de biomassa a ser utilizada. Diversos resíduos agroindustriais disponíveis para uso são ricos em polissacarídeos como celulose, hemiceluloses, amido e pectina, como pode ser observado na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Composição química (%) de resíduos agroindustriais de importância (Adaptado de RAVINDRAN *et al.*, 2018).

Resíduo agroindustrial	Carboidratos	Fibras	Cinzas	Pectina	Lipídios	Proteína	Lignina
Bagaço de cana	66,48		8,8			2,3	17,79
Farelo de arroz	14,1	26,9	3,4		30,4	38,2	25,63
Farelo de trigo	56,8	33,4-63	3,9-8,1		3,5-3,9	13,2-18,4	5,6
Borra de café	55,53	60,46	1,3		2,29	17,44	23,9

Bagaço de malte	79,9	3,3	7,9		2,4	30,48
Casca de mandioca	75,5	11,2	2,4	3,1	1,7	1,92
Bagaço de maçã	48-62		4,7		3,9-5,7	23,5
Bagaço de azeitona	34,8		6,6	16,65	0,4	43,2
Casca de banana	79	9,3	2,7	3	0,6	6,4
Casca de laranja	30		1,7	14,4	7,9	1

Garcia et al. (2016) mostram que o uso de resíduos agroindustriais (bagaço de cana, polpa de madeira, bagaço de frutas, entre outros), no caso de um bioproduto específico (nanocelulose), ajuda a reduzir custos de processo de fibrilação, justamente pelo resíduo ter sofrido um pré-tratamento na indústria (maceração, esmagamento ou trituração). Além disso, ambientalmente se torna mais eficaz, pois um resíduo que seria direcionado para descarte e decomposição em aterros agora será direcionado para recuperação e transformação em produtos de alto valor agregado (DE JONG; JUNGMEIER, 2015; DEMIRBAS, 2009; GARCÍA *et al.*, 2017).

3.2.2. O resíduo bagaço de malte para uso em bioprocessos

O melhor entendimento da estrutura da biomassa e de seus constituintes é de fundamental importância para a determinação dos parâmetros dos processos e para a máxima obtenção de produtos de alto valor agregado dos resíduos agroindustriais. Os principais componentes químicos dos resíduos agroindustriais são a celulose, hemicelulose e lignina, além de pequena quantidade de material mineral e extrativos. A concentração de cada um desses componentes depende do tipo de biomassa, tipo de tecido, da idade da planta, das condições de crescimento e dos processos industriais que a biomassa foi submetida (EICHLER *et al.*, 2015).

O resíduo mais abundante em uma cervejaria é o bagaço de malte, compondo aproximadamente 85% do total de resíduos dessa indústria. Este resíduo está disponível a baixo custo, ou até sem custo, durante o ano inteiro e em grandes quantidades, sendo gerado tanto em cervejarias de grande porte quanto microcervejarias. Estima-se que, para cada hectolitro de cerveja produzida, geram-se 20 kg de malte (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2006; THIAGO; PEDRO; ELIANA, 2014). Atualmente, o Brasil é o terceiro maior produtor de cerveja do mundo mesmo após uma estagnação em tempos de pandemia, atrás da China e dos EUA,

com uma estimativa de 143 milhões de hectolitros produzidos em 2021, o que representa um potencial de 2,86 milhões de toneladas de bagaço de malte disponíveis para uso em processos de biorrefinaria por ano (GLOBO, 2022). Este resíduo, normalmente, se encontra disponível logo após o processo de brassagem, ou sacarificação, onde o bagaço sai da batelada com uma temperatura de aproximadamente 75°C. O resíduo de bagaço de malte, ao final do processo, é considerado um resíduo rico em material lignocelulósico, rico em proteína (cerca de 20%) e fibras (cerca de 70%) (MUSSATTO; DRAGONE; ROBERTO, 2006). Pela sua composição nutritiva, o bagaço de malte já é estudado em diversas aplicações como: suplemento de comida animal (em ração de gado e porcos), nutrição humana (usando o bagaço para fazer pão, biscoitos e suplemento), energia (combustão direta, fermentação anaeróbica para produção de biogás e produção de etanol), carvão vegetal, papel e substrato em cultivo de microrganismos (BACHMANN; CALVETE; FÉRIS, 2022). O bagaço de malte, por possuir valor nutritivo relativamente alto e disponibilidade em grandes volumes, se tornou um substrato interessante para uso em processos biotecnológicos. Alguns trabalhos já reportam o uso de bagaço de malte para cultivo de microrganismos com a finalidade de produzir enzimas ou outros bioprodutos de interesse como: amilases, etanol, xylanases, proteases e ácido lático (ALIYU; BALA, 2013; TERRASAN; CARMONA, 2015; XIROS; CHRISTAKOPOULOS, 2009).

A importância do uso de bagaço de malte em biorremediação pode ser observada através de estudos recentes que já consideram o resíduo agroindustrial como potencial para esse fim. Ogugbue et al. (2017), em estudo de eficácia de uso de bagaço de malte e esterco de coelho para biorremediação *ex situ* de contaminação de petróleo envelhecido, mostrou que o bagaço de malte pode ser usado como um bioestimulante eficiente durante a biorremediação de petróleo (OGUGBUE; MBAKWEM-ANIEBO; SOLOMON, 2017). Abioye et al (2012), investigando diversos nutrientes orgânicos para biorremediação de solos contaminados com óleo de motor, obteve melhores resultados de biorremediação (55-92%), em 84 dias, com uso de bagaço de malte (ABIOYE; AGAMUTHU; ABDUL AZIZ, 2012). Fica evidente que o bagaço de malte tem sido usado para diversas aplicações industriais e biotecnológicas. No entanto, estudos de condições operacionais, avaliações de custo e eficiência energética, estudos de desempenho de produtos, entre muitos outros,

ainda são necessários para a consolidação do bagaço de malte como matéria-prima (BACHMANN; CALVETE; FÉRIS, 2022).

3.3. Biorremediação

A biorremediação consiste no uso de microrganismos para retirar, ou degradar, componentes tóxicos em ambientes contaminados. Existem diversas etapas necessárias para avaliar a implementação de um processo de biorremediação, assim como pode ser visto na Figura 3.6. De maneira geral, existem dois tipos de biorremediação com microrganismos: o primeiro é a bioestimulação, onde ocorre o favorecimento de algum microrganismo local com a introdução de algum fator de estímulo para os mesmos; o segundo é a bioaugmentação, onde adiciona-se microrganismos específicos para realizar a biorremediação (GAYLARDE; BELLINASSO; MANFIO, 2005).

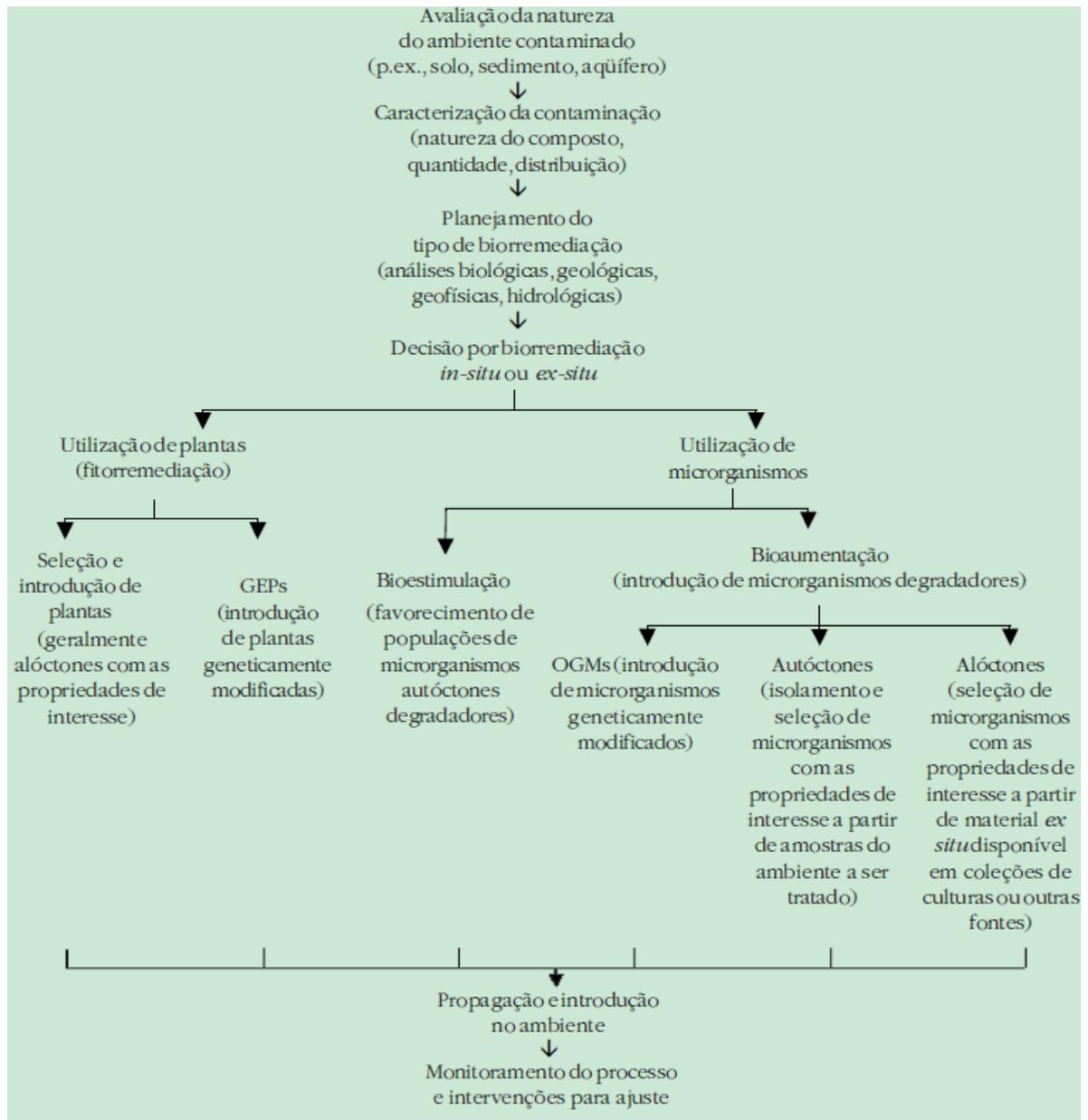


Figura 3.6 - Esquema geral das etapas para definição e implementação de um processo de biorremediação (Gaylarde et al., 2005)

Para avaliar a implantação de um processo de biorremediação é necessário um estudo prévio do problema ou contaminação e das diferentes técnicas a serem usadas. Na bioaumentação, diversos fatores devem ser levados em conta quando pensa-se no uso de microrganismos que não são originários do local de contaminação. Apesar de o microrganismo selecionado ser eficiente na remoção do contaminante, ele pode ser prejudicial para a biota local. Neste caso, está se resolvendo um problema ambiental e criando outro potencialmente mais grave. Ainda,

deve-se pensar nas maneiras de se inserir o microrganismo para biorremediação no local da contaminação. No caso do petróleo, diversas substâncias podem ser tóxicas para as células, sendo necessário um meio que ofereça uma proteção mínima até que haja uma população suficiente para sobreviver ao ambiente hostil antes de realizar a biorremediação (OLLIVIER; MAGOT, 2005).

3.3.1. Técnicas de biorremediação

De maneira geral, as técnicas de biorremediação podem ser divididas em dois grandes grupos *ex situ* ou *in situ*, ou seja, ou a contaminação é coletada e levada para ser tratada em outro lugar, ou o tratamento ocorre no local da contaminação (Quadro 3.3).

Tipo	Exemplos	Vantagens	Desvantagens
<i>In situ</i>	Biosparging Bioaumentação Bioestimulação	Maior custo-benefício Não-invasivo Relativamente passivo Atenuação natural Trata solo e águas	Confinação ambiental Período de tratamento extenso Dificuldade de monitoramento
<i>Ex situ</i>	Landfarming Compostagem Bio-pilhagem	Baixo custo	Requerimento de espaço Tratamento demorado Problemas de transferência de massa
Biorreatores	Reatores de lodo Reatores de água	Degradação rápida Parâmetros ambientais otimizados Melhor transferência de massa	Requer escavação para solos Alto custo de operação e instalação

Quadro 3.3 - Resumo das principais estratégias de biorremediação (Adaptado de Boopathy, 2000).

Neste caso, um dos fatores mais importantes é a viabilidade de coleta e transporte do material (solo, água ou ar) contaminado. No caso de derramamento de petróleo (grandes manchas) a remoção física de toda contaminação não é algo prático, então procura-se soluções *in situ* para sanar a contaminação (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016). Também deve-se conhecer os principais fatores que afetam a biorremediação, conforme mostrado no Quadro 3.4, para que a escolha do microrganismo e da maneira de inserção do mesmo no ambiente contaminado seja efetiva (BOOPATHY, 2000).

Microbiológico
Crescimento até que a biomassa crítica seja atingida

Mutação e transferência horizontal de genes
Indução enzimática
Enriquecimento das populações microbianas capazes
Produção de metabolitos tóxicos
Ambiental
Depleção de substratos preferenciais
Falta de nutrientes
Condições ambientais inibitórias
Substrato
Concentração muito baixa de contaminantes
Estrutura química de contaminantes
Toxicidade de contaminantes
Solubilidade de contaminantes
Processo aeróbico vs anaeróbico biológico
Potencial de oxidação / redução
Disponibilidade de aceptadores de elétrons
População microbiana presente no local
Substrato de crescimento vs co-metabolismo
Tipo de contaminantes
Concentração
Fonte alternativa de carbono presente
Interação microbiana (competição, sucessão e predação)
Biodisponibilidade físico-química de poluentes
Sorção de equilíbrio
Sorção irreversível
Incorporação em assuntos húmicos
Limitações de transferência de massa
Dióxido de oxigênio e solubilidade
Dose de nutrientes
Solubilidade / miscibilidade em água

Quadro 3.4 - Principais fatores que afetam a biorremediação (Adaptado de Boopathy, 2000)

No caso de técnicas *in situ*, levando em conta os principais fatores que afetam a biorremediação do Quadro 3.4, deve-se decidir sobre duas possibilidades de inserção de microrganismos no ambiente a ser tratado: microrganismos livres ou imobilizados. Ao colocar os microrganismos livres, no caso de contaminações que podem oferecer toxicidade alta aos organismos, aumenta-se consideravelmente a quantidade de inóculo de microrganismos para que os sobreviventes possam crescer, multiplicar e realizar a biorremediação. Contudo, nesses casos também é possível a inserção dos organismos imobilizados em meio nutriente com certa proteção para que

possa haver menor impacto do contaminante no organismo ao primeiro contato. Sabe-se também que variações drásticas de temperatura, pH e agitação podem também afetar o crescimento e desempenho dos microrganismos. Portanto, entende-se que os métodos de biorremediação com imobilização ou encapsulamento de microrganismos para uso em contaminações de derramamento de petróleo oferece uma solução interessante para sobrevivência inicial do organismo e melhores resultados de biorremediação (BAYAT; HASSANSHAHIAN; CAPPELLO, 2015; BOOPATHY, 2000; FARIA, D., 2019).

3.3.2. Imobilização de microrganismos

Técnicas de imobilização são aquelas que procuram restringir mobilidade das células/enzimas desejadas, preservando suas funções catalíticas e metabólicas. A Figura 3.7 mostra as principais técnicas de imobilização de microrganismos e enzimas em suportes. Basicamente, os microrganismos podem ser fixados em uma matriz sólida por adesão, ligação covalente, por aprisionamento ou encapsulamento. Cada técnica possui suas vantagens e desvantagens, sendo de vital importância a análise prévia dos fatores que afetam a biorremediação como base para tomada de decisão (AZUBUIKE; CHIKERE; OKPOKWASILI, 2016; BAYAT; HASSANSHAHIAN; CAPPELLO, 2015; BOOPATHY, 2000). O Quadro 3.5 mostra as principais técnicas de imobilização de células e suas vantagens e desvantagens (EŞ; VIEIRA; AMARAL, 2015).

Técnica de Imobilização	Vantagens	Desvantagens
Adsorção física	<p>Simples e barato;</p> <p>Alta atividade catalítica;</p> <p>Sem mudanças conformacionais no biocatalisador;</p> <p>Sem necessidade de reagente;</p> <p>Reuso de materiais caros</p>	<p>Baixa estabilidade;</p> <p>Possível perda de material;</p> <p>Ligações fracas podem causar dessorção do biocatalisador</p>
Encapsulamento e Aprisionamento	<p>Proteção do biocatalisador;</p>	<p>Limitações de transferência de massa;</p>

	Permite transporte de compostos de baixo peso molecular; Permite operação contínua; Facilita separação das células e processos <i>downstream</i> ;	Baixa carga enzimática;
Cross-link	Ligação forte ao catalisador; Previne lixiviação; Diminui dessorção; Aumenta estabilidade do catalisador;	Pode causar alteração em sítio ativo; Limita difusão; Perda de atividade enzimática;
Ligação covalente	Forte ligação; Alta estabilidade a calor; Facilita contato entre enzima substrato; Previne eluição de catalisador;	Limita mobilidade enzimática, ocasionado menor atividade; Pouco efetivo para imobilização de células; Materiais suporte não são renováveis.

Quadro 3.5 – Vantagens e desvantagens das técnicas de imobilização mais comuns (Adaptado de Es, 2015).

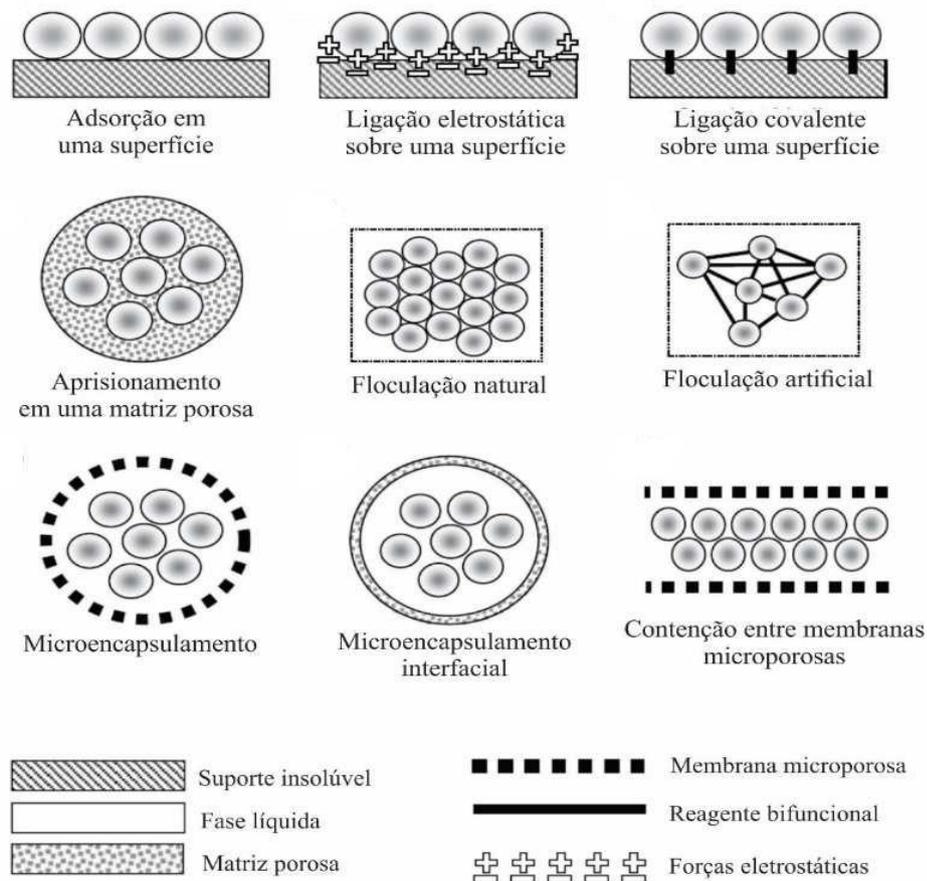


Figura 3.7 – Principais técnicas de imobilização de microrganismos (Faria, 2019)

Matrizes suporte podem ser divididas em dois grandes grupos: naturais (alginato, quitosana, serragem, palha, carvão, fibras naturais, bagaços, etc.) ou sintéticos (polipropileno, poliuretano, policloreto de vinila, poliéster, álcool polivinílico, etc.), sendo que nem todos são adequados para todas as situações. A imobilização por meio de adsorção ocorre quando células interagem com a superfície da matriz suporte, formando interações fracas, podendo ou não ter ligantes que auxiliam na interação. Apesar disso, no caso de contaminantes com alta toxicidade ou nocivo para células, pode acabar sendo uma alternativa menos atrativa, visto que o contato direto e imediato com o contaminante pode prejudicar as células. Essa técnica também é muito usada com enzimas, por apresentar baixo custo e condições de imobilização relativamente brandas, possuindo menores chances de desnaturação da enzima (BOOPATHY, 2000; DZIOEK; WOJCIESZYŃSKA; GUZIK, 2016).

O aprisionamento ou imobilização de células em matriz porosa ou matriz semipermeável é uma técnica muito usada em processos de biorremediação. O

motivo é a técnica ser de fácil utilização, baixo custo, versáteis e muitas vezes usam-se matrizes não tóxicas e até consumíveis (biodegradáveis) pelo organismo. Apesar disso, é muito importante se avaliar o tamanho dos poros da matriz. No caso do encapsulamento ou aprisionamento, além da matriz servir de suporte imobilizador no início, ela também serve de barreira ao ambiente externo, principalmente lidando com contaminantes mais tóxicos. Por isso essa técnica é muito utilizada para biorremediação de poluentes tóxicos, como o petróleo, ou condições extremas como alta salinidade, temperatura e pH. Desta forma, uma das técnicas mais usadas para biorremediação em contaminações de petróleo é o aprisionamento de microrganismos por extrusão e gelificação, onde se usa um substrato como alginato de sódio, não tóxico e serve de barreira física para o contato com compostos químicos tóxicos presentes no petróleo (BAYAT; HASSANSHAHIAN; CAPPELLO, 2015; BOOPATHY, 2000; FARIA, D., 2019; OLLIVIER; MAGOT, 2005).

3.4. Imobilização de microrganismos em cápsulas/esferas

O aprisionamento é uma das técnicas de imobilização celular nas quais os microrganismos são encerrados em uma matriz polimérica porosa para permitir a difusão do substrato e do produto (neste caso o substrato seriam os hidrocarbonetos e os produtos seriam as cadeias menores de hidrocarbonetos). Portanto, a transferência de massa é um dos principais fatores que afetam a atividade e a eficiência dos sistemas de células imobilizadas. O aprisionamento em gel e as matrizes porosas pré-formadas são duas técnicas diferentes para aprisionamento celular dentro de matrizes porosas. No aprisionamento em gel, a matriz porosa é sintetizada *in situ* ao redor da célula, enquanto para sistemas pré-formados, as células se difundem na matriz porosa pré-formada e crescem até serem imobilizadas. A técnica de aprisionamento em gel confina células microbianas nos poros de uma matriz-gel (KLEIN; STOCK; VORLOP, 1983). As células aprisionadas são cercadas por uma camada espessa e volumosa. O encapsulamento celular é semelhante à técnica de aprisionamento, na qual as células estão livres na solução, mas restritas dentro de uma camada fina. No entanto, as matrizes de aprisionamento (ex.: alginato de cálcio e alginato de alumínio) são reconhecidas como mais duráveis do que as matrizes de encapsulamento (ex.: poliéster, alginato de polilisina e quitosana) e,

portanto, são mais adequadas para aplicações ambientais (BOROLE; HAMILTON, 2010; PARTOVINIA; RASEKH, 2018).

É importante observar que, de acordo com Partovinia et al. (2018), a maioria dos estudos descritos na literatura sobre imobilização celular foram realizados com o aprisionamento de células na fase aquosa e em escala laboratorial, e suas aplicações em ambiente aberto ainda não foram avaliadas. Para aplicações ambientais em biorremediação com microrganismos, vários polímeros naturais (ágar, alginato de sódio e quitosana) e sintéticos (álcool polivinílico, polietileno glicol, poliuretano e poliacrilamida) são usados (DZIOEK; WOJCIESZYŃSKA; GUZIK, 2016). Embora polímeros sintéticos sejam frequentemente considerados como tendo resistência e durabilidade mecânica superiores, seu uso é limitado, pois pode não ser desejável em aplicações ambientais, já que podem causar passivo ambiental maior que a biorremediação proposta. Além disso, pode ocorrer danos celulares durante a polimerização das matrizes sintéticas. Por exemplo, o calor produzido e os radicais livres durante a polimerização da poliacrilamida afetam a atividade das células. Contudo, o aprisionamento celular no polímero natural como matriz biodegradável pode ser um método eficaz para introdução do microrganismo no meio ambiente. Por esse motivo, gel de alginato, um polímero natural, tem sido o mais estudado na literatura (COVARRUBIAS *et al.*, 2012).

3.4.1. Esferas de alginato de sódio

Alginato de sódio é um dos materiais mais usados para encapsulamento de células. É um polissacarídeo não tóxico, natural, extraído de algas marinhas marrons e sintetizado por alguns tipos de bactérias como do gênero *Pseudomonas*, *Laminaia*, *Macrocystis* e *Azotobacter*. É composto por uma cadeia de ácido manurônico (M) e ácido gulurônico (G), podendo ser ligados como homopolímeros (M-M e G-G) ou heteropolímeros (M-G) (Figura 3.8). É comercialmente vendido como sal de alginato de sódio, sendo usado em diversas áreas da indústria como agente espessante, emulsificante, formador de filme e agente gelificador. O alginato comercial tipicamente possui faixa de peso molecular de 33.000 a 400.000 Da, possuindo um mercado projetado de US\$ 409,2 milhões e taxa de crescimento anual de 3,8% para o período de 2014 até 2019 (BOROLE; HAMILTON, 2010; FARIA, D., 2019; LIU *et al.*, 2019).

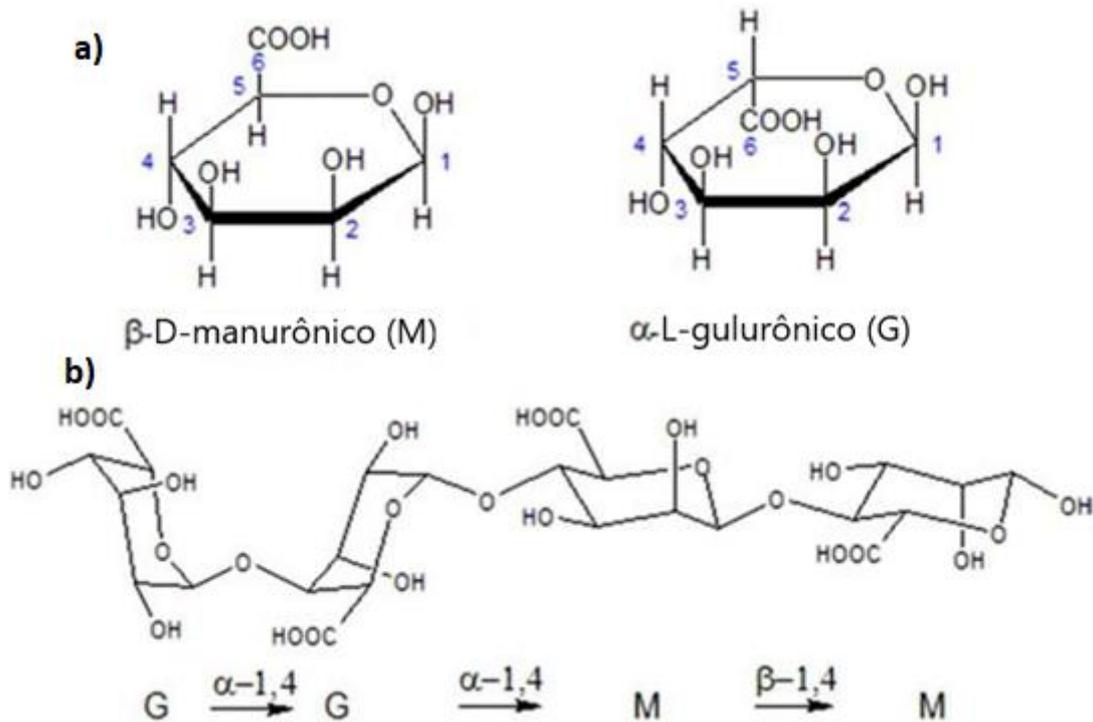


Figura 3.8 - Estruturas químicas de monômeros de alginato (a) e polímero (b) mostrando diferentes blocos dependentes da sequência de monômeros (Adaptado de Ayarza, 2017)

O alginato possui capacidade de formação de filmes e géis pela reação com cátions divalentes, como íons cálcio. Normalmente, esferas de alginato são produzidas pela interação química de uma solução de alginato de sódio em contato com uma solução contendo cátions divalentes, através de mecanismo extrusor (tipicamente uma seringa). A troca de íons do sódio com o cátion divalente permite a gelificação do polímero (SILVÉRIO, 2018). Uma das principais vantagens do gel de alginato de cálcio é sua estabilidade em uma ampla faixa de pH (3-10) e temperatura (até 85 °C). É sabido que o aumento da concentração de alginato de sódio na composição de géis, para o caso de géis de alginato de cálcio com água como solvente, influi diretamente na estabilidade mecânica da mesma e na biodegradação, visto que ocorre a diminuição de poros com o aumento do percentual de alginato. Como já relatado por Zinjarde e Pant (2000), à medida que a concentração de alginato aumentou de 1% para 4%, em relação ao solvente (água), a porosidade diminuía, o que levou a uma redução na degradação da fração alifática do petróleo bruto. De acordo com os resultados do mesmo trabalho, as esferas com 2% de alginato e 1% de ágar degradaram 92% do petróleo bruto, enquanto as células livres degradaram

apenas 78% do petróleo bruto em cinco dias. Na imobilização com alginato, em geral, a suspensão de microrganismos é misturada a uma solução de alginato de sódio, em seguida a solução é submetida a extrusão, sendo gotejada em uma solução contendo sais de íons bivalentes como cloreto de cálcio, formando esferas conforme a gota cai na solução. Neste caso, os microrganismos ficam retidos dentro de uma rede polimérica, onde íons de cálcio estão presos na cadeia de alginato pelo efeito quelante do polímero, conforme mostrado na Figura 3.9 (BOROLE; HAMILTON, 2010; FARIA, D., 2019; PARTOVINIA; RASEKH, 2018; ZINJARDE; PANT, 2000).

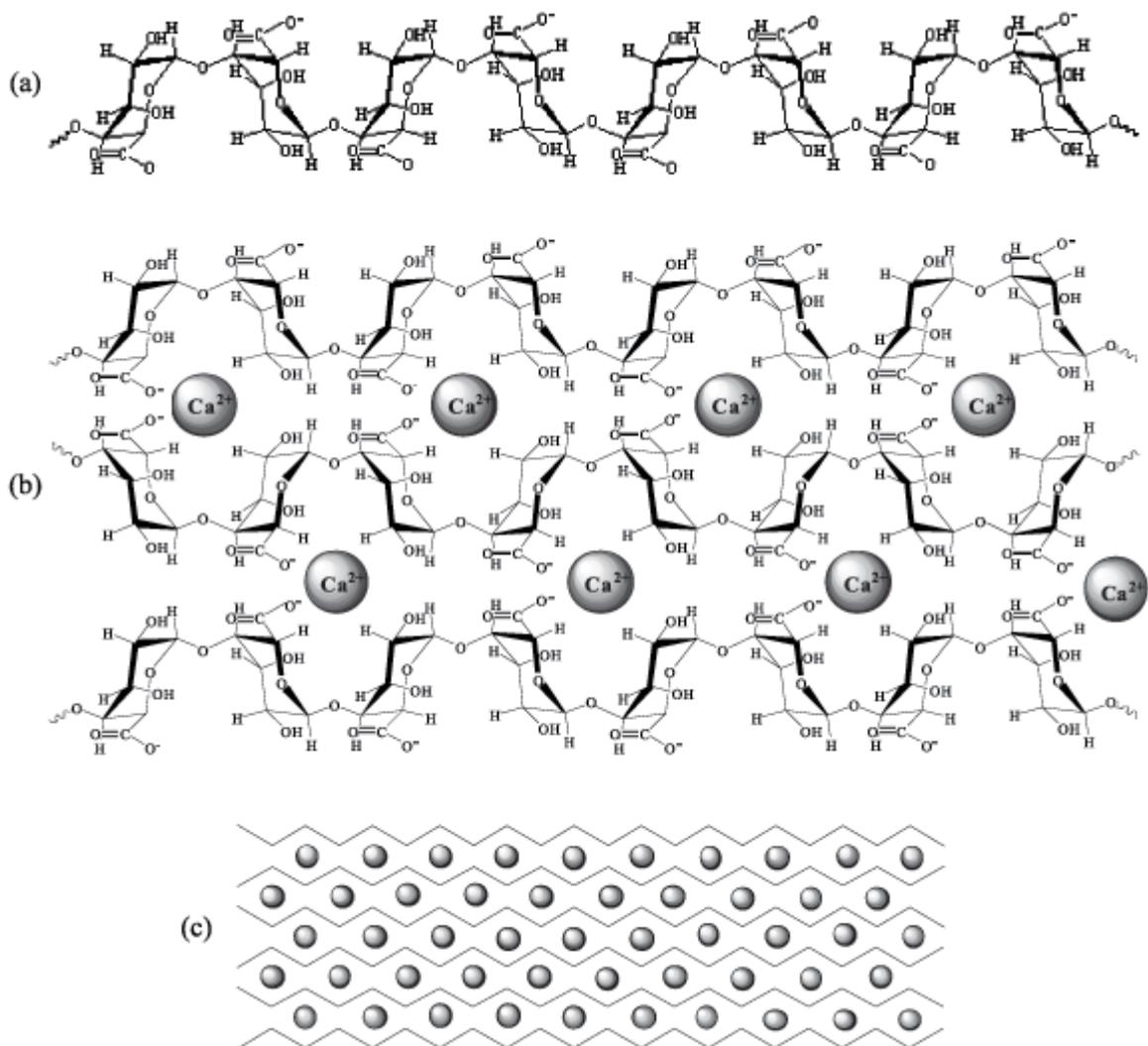


Figura 3.9 - Formação do gel de alginato de cálcio: a) homopolímeros de ácido gulurônico; b) ligação entre cadeias homopoliméricas através dos íons de cálcio; c) formação da rede do gel de alginato de cálcio (Kawaguti, 2008).

Apesar de seu extenso uso em biorremediação, o alginato é relativamente frágil e possui resistência à transferência de massa ao ser usado em altas concentrações nas esferas. Além disso, a secagem parcial reduz significativamente a porosidade das esferas de alginato. Portanto, é necessário encontrar uma maneira de aumentar a resistência mecânica das esferas de alginato, ao mesmo tempo em que não ocorra obstrução ou fechamento dos poros, o que poderia dificultar ainda mais a eficiência de degradação de compostos (FARIA, D., 2019; KAWAGUTI; SATO, 2008; WANG *et al.*, 2012).

3.4.2. Esferas de alginato de sódio com materiais de reforço

Para resolver os problemas de baixa resistência mecânica das esferas de gel de alginato, alguns trabalhos introduziram compostos que ofereceriam algumas vantagens, tanto para estrutura quanto para degradação final. Wang *et al.* (2012) realizaram experimentos com células livres e imobilizadas de um consórcio isolado de microrganismos (*Microbacterium foliorum*, *Gordonia alkanivorans* e *Mesorhizobium*) em gel de alginato e gel de alginato com diatomito ou diatomáceas (dióxido de silício). Os autores obtiveram melhores resultados com microrganismos imobilizados (29,8%), em comparação com a degradação usando microrganismos livres (21,2%), e a adição de diatomáceas promoveu melhoramento na degradação de petróleo cru e crescimento microbiano devido à melhora de transferência de massa. Xue *et al.* (2019), com objetivo de melhorar as propriedades mecânicas (densidade, força de tensão e tensão de ruptura) e degradação de diesel das esferas de alginato, fez testes com inserção de palha (celulose, hemiceluloses e lignina), obtendo resultados mais expressivos de degradação de diesel comparando com uso de células livres de *Halomonas* e *Aneurinibacillus*. Também, o trabalho registrou propriedades mecânicas de resistência mais acentuados, comparando com as esferas sem palha, e melhores capacidades de adsorção de diesel. Ainda, diversos autores têm reportado o uso de nanocelulose como material de reforço em diversos materiais com gel de alginato, mostrando que há a possibilidade de melhorar as propriedades mecânicas, assim como aumentar eficiência de biorremediação em contaminações de petróleo (LIN; BRUZZESE; DUFRESNE, 2012; MOHAMMED *et al.*, 2015; PERULLINI *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2012; XUE *et al.*, 2019).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Laboratório e reagentes

Os reagentes utilizados são de grau analítico e todos os experimentos foram realizados no laboratório de química da Pontifícia Universidade Católica, em Porto Alegre, Brasil. O bagaço de malte (BM) foi gentilmente cedido por uma cervejaria local. O BM foi coletado, seco em estufa (105 °C por 24 h) e depois processado em moinho de facas até ser obtido um pó (0,5 mm). O consórcio comercial de microrganismos (CCMO) degradadores de petróleo foi cedido gentilmente por uma empresa local, contendo principalmente *Bacillus subtilis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus amyloliquefaciens* e *Rhodococcus* sp., com viabilidade celular testada de $1,5 \times 10^8$ CFU/g (Anexo A1). As vidrarias usadas no ensaio de biorremediação, assim como para extração em cromatografia foram preparadas e limpas conforme literatura (PEREIRA, 2018).

4.2. Produção das esferas de alginato com diferentes concentrações de bagaço de malte

A produção das esferas de alginato foi realizada pelo método de extrusão em solução iônica, conforme Farias et al. 2021. Primeiramente é feita uma solução estéril de 1% (m/m) de alginato de sódio, sob agitação a 70 °C. Em seguida, após resfriamento, colocou-se 1 % (m/m) do consórcio liofilizado de microrganismos comercial. Para testar as concentrações de biomassa, diferentes proporções de bagaço de malte, previamente seco, moído e peneirado (0,5 mm), foram pesados e incorporados separadamente na solução de alginato com consórcio comercial. As proporções usadas (m/m) foram: (0%, 0,25%, 0,75%, 1,5%, 3% e 5%). Depois de homogêneas, as soluções foram colocadas em seringas de 20 mL, e gotejadas em 500 mL de solução de CaCl_2 2 % (m/m) contendo 0,5 mL de Tween 80. As esferas formadas na solução CaCl_2 foram lavadas usando uma peneira e solução NaCl 2% (m/m) e por fim usando água deionizada.

4.3. Teste preliminar para avaliação das esferas durante biorremediação

Um ensaio preliminar de biodegradação do petróleo utilizando o sistema esferas de alginato/BM/CMO foi realizado conforme descrito na literatura (FARIA *et al.*, 2021). Foi feito um sistema de biorremediação com frascos Erlenmeyer 250 mL, colocados em agitador orbital (150 rpm) e com temperatura controlada de 25°C. A concentração de petróleo em relação ao meio de reação (sistema alginato/BM/CMO – meio salino – petróleo) foi de 20 % m/m, a proporção de esferas de alginato foi de 35% (m/m), usando diferentes quantidades de bagaço de malte (0%, 0,25%, 0,75%, 1,5%, 3% e 5%) e 45% (m/m) de meio salino sintético. Neste ensaio, foram coletadas amostras das esferas em 30 e 60 dias de cultivo para análise morfológica em MEV

4.4. Caracterização das esferas

Para fins de comparação das esferas em diferentes proporções de bagaço de malte, foram realizados testes mecânicos de compressão em DMA (stress x strain), testes de crescimento em ambiente salino sintético e imagens em microscopia eletrônica de varredura.

4.4.1. Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

A morfologia da superfície e da seção transversal interna das amostras foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura de campo elétrico (MEV), modelo F50 Inspect, para ver a diferença das superfícies das esferas com diferentes concentrações de bagaço de malte. A voltagem de operação foi de 20 kW e resolução de 1,2 nm. No teste preliminar de análise das esferas em condições de biorremediação, as esferas foram coletadas em 0, 30 e 60 dias de experimento (item 4.3), analisando a parte superficial e a parte interna das esferas. Para o teste de biorremediação final, conforme item 4.5 as esferas foram coletadas depois de 40 dias de biorremediação para análise da parte superficial e interna das esferas.

4.4.2. Análise Dinâmica Mecânica - DMA

A resistência mecânica foi inferida pelo uso de Análise Dinâmica Mecânica (DMA), usando o instrumento da marca TA instruments TMA modelo 2980. A

temperatura registrada foi temperatura ambiente (25°C) usando módulo de análise de compressão com análise de stress x strain (tensão/pressão x deformação), com força dinâmica inicial de 0,0001 N e taxa de 0,5 N/min. A análise foi feita em triplicata. Para obtenção do módulo de Young, usou-se a Equação de Hertz (Equação 4.1), ajustada com os dados experimentais (OUWERX *et al.*, 1998).

$$E = \frac{0.7956 \times F}{D^{3/2} \times d^{1/2}} \quad (4.1)$$

Onde D é a deformação (mm), d é o diâmetro da esfera (mm), F é a força de compressão (N) e E é o módulo de Young.

4.4.3. Teste de crescimento de microbiano

Foi realizado um teste de crescimento microbiano para avaliar o crescimento inicial dos microrganismos com diferentes composições de MB nas esferas de alginato de cálcio. Para tal, 50g de esferas de alginato e consórcio de microrganismos com diferentes concentrações de bagaço de malte (0%, 0,25%, 0,75%, 1,5%, 3% e 5%) foram colocadas em frascos Erlenmeyer 500 mL com 250 mL de meio salino sintético (BIDWELL, J. P., SPOTTE, 1985) e deixados em agitador orbital por 48 h a 30 °C e 180 rpm. Os dados de densidade ótica foram coletados nos tempos 0 h, 17 h, 19 h, 21 h, 23 h, 25 h, 33 h e 35 h. As análises foram feitas em espectrômetro em comprimento de onda de 600 nm, usando como branco uma solução de meio salino sintético esterilizada. O cultivo foi realizado em duplicata e as análises de espectrofotometria foram feitas em triplicata. O cultivo de controle foi realizado com a adição dos microrganismos livres (consórcio comercial) dentro do meio salino sintético.

4.5. Ensaio de Biodegradação de Petróleo

Um ensaio de biodegradação do petróleo utilizando o sistema esferas de alginato/BM/CMO foi realizado com adaptação da literatura (FARIA, D. J., 2019; PEREIRA *et al.*, 2019). O sistema de ensaio de biorremediação foi feito com frascos Erlenmeyer 125 mL, colocados em agitador orbital (120 rpm) e com temperatura

controlada de 25 °C. As amostras foram coletadas após 40 dias de ensaio. A concentração de petróleo em relação ao meio de reação (sistema alginato/BM/CCMO - meio salino - petróleo) foi de 1 % m/m, a proporção de esferas de alginato foi de 10% (m/m), usando diferentes quantidades de bagaço de malte (0%, 0,25%, 0,75%, 1,5%, 3% e 5%) e 89% (m/m) de meio salino sintético previamente autoclavado. O volume total de cada frasco foi de 50mL. Os tratamentos de controle foram realizados: a) com esferas de alginato sem BM e sem CCMO (chamado de CS) e b) sem esferas, mas com o consórcio de microrganismos livres no meio (chamado de CMO). Neste ensaio, foram coletadas amostras das esferas após 40 dias de cultivo para análise morfológica em MEV e o restante do meio foi submetido a separação de fases para análises separadas. A fase aquosa foi usada para análise de pH ao final de 40 dias, assim como análise de peso de sólidos suspensos (biomassa). A fase orgânica foi usada para análise de percentual de biodegradação de compostos alifáticos do petróleo.

4.5.1. Extração das amostras após teste de biorremediação

Depois de passados os 40 dias do teste de biorremediação, os frascos foram coletados e processados, conforme literatura, para análises de pH, biomassa e composição de hidrocarbonetos alifáticos. A Figura 4.1 mostra o fluxograma das etapas de processamento do meio de cultivo para obtenção das amostras de esferas assim como para obtenção das frações orgânica e aquosa. Primeiramente, foi realizado uma extração líquido-líquido, em duas etapas, com 50mL de hexano em cada. A separação das esferas foi realizada através de peneiramento. Em cada etapa da extração, o hexano era passado primeiramente nas esferas para retirada de petróleo da superfície, depois para retirada do conteúdo do frasco. Em seguida, as esferas foram lavadas com água destiladas, suavemente e superficialmente secas com papel toalha, pesadas e armazenadas em solução NaCl 2% para posterior análise de imagem em MEV/EDS. A fração líquida foi separada através de funil de decantação. A parte orgânica, depois de separada, é introduzida em uma coluna líquida de cromatografia empacotada com hexano e 10g de SiO₂ 60mesh. O solvente recuperado na separação foi extraído por rotaevaporação (65 °C, 400 mmHg por 15 min). A concentração dos hidrocarbonetos alifáticos foi determinada por Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama (CG-FID).

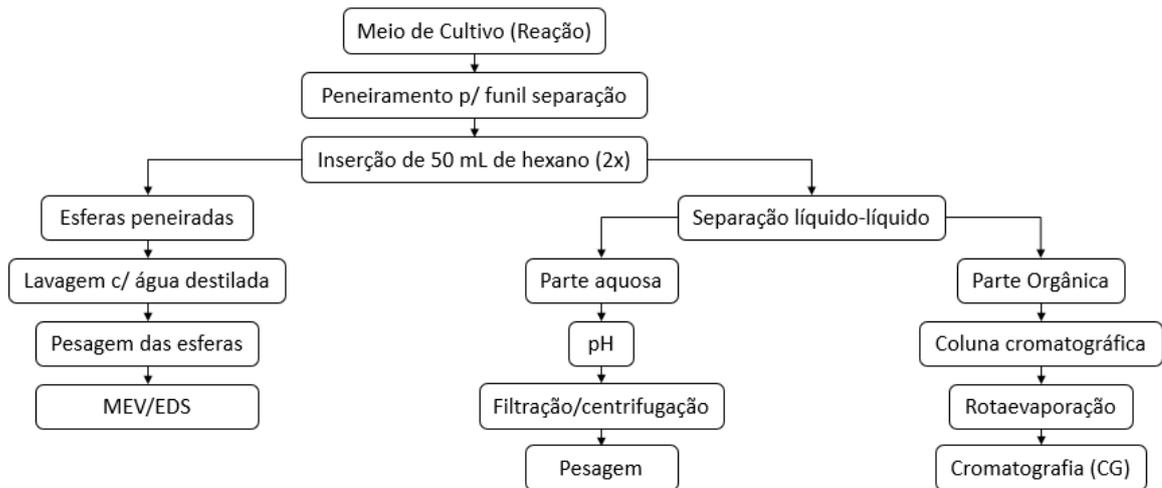


Figura 4.1 - Fluxograma das etapas de processamento das amostras do ensaio de biorremediação.

Para avaliar parte de biomassa que possivelmente conteria no meio aquoso, foi realizado uma filtração em papel celulósico seguido de uma centrifugação de uma amostra de 5 mL. Os tubos contendo as amostras de 5 mL foram pesados antes e depois de permanecerem em estufa até secagem do material visto por peso constante.

4.5.2. Determinação dos percentuais de biodegradação

Os hidrocarbonetos alifáticos foram quantificados através de um CG-FID, em um cromatógrafo (SHIMADZU) com injeção manual. As amostras foram injetadas (1 µl) em modo split (10:1) com gás de arraste (He) em fluxo constante de 1,28 mL/min. Foi utilizada uma coluna Shimadzu (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano, com 30m, 0,25 mm d.i. x 0,25 mm). A temperatura inicial foi de 40 °C, com taxa de aquecimento de 5 °C/min até 240 °C e isoterma de 20 min. A porcentagem de biodegradação foi calculada conforme a Equação 2 (PEREIRA *et al.*, 2019; ROY *et al.*, 2018).

$$D = \frac{C_i - C_f}{C_i} \times 100 \quad (4.2)$$

Onde: BD é o percentual de biodegradação, C_i é a quantidade de contaminante no início do ensaio e C_f a quantidade de contaminante ao final do ensaio.

A identificação e quantificação de hidrocarbonetos alifáticos foi realizada de acordo com Pereira et al (2019). As análises quantitativas foram realizadas pelo método de padronização externa. Padrões externos usados para curvas de calibração (2 – 1000 ng.µL⁻¹) foram undecano (C8 a C14), pristano (C15 a C21) e heptacosano (C22 a C27) para hidrocarbonetos alifáticos. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software Origin, versão 2022, OriginLab Corporation, EUA. A análise ANOVA foi realizada para diferentes resultados, utilizando significância ao nível de 0,05.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas observações de resultados preliminares, notou-se que à medida que aumenta a proporção de BM nas esferas, seu diâmetro aumenta ligeiramente. Diferentemente do que foi observado por Guo et al. (2017), que notaram a diminuição do diâmetro médio das esferas de alginato (de 1,52 mm para 1,18 mm) ao inserir fibra de algodão e diferentes tipos de nanoceluloses. No entanto, o estudo avaliou esferas secas, enquanto o presente trabalho analisou as esferas com máxima retenção de umidade, o que pode ocasionar diferença de tamanho comparado com as esferas obtidas por Guo et al. (2017). Contudo, desta variação de tamanho ($\pm 1\text{mm}$), também ocorreu em outros trabalhos que usaram diferentes resíduos de biomassa com alginato de sódio (GUO *et al.*, 2017; XUE *et al.*, 2019).

5.1. Caracterização das esferas em teste preliminar

O principal objetivo da caracterização é mostrar a diferença das propriedades e características das esferas de alginato com diferentes quantidades de bagaço de malte que foram usadas nos testes preliminares de biodegradação de petróleo. O estudo das características físico-químicas e mecânicas ajudam a ter um melhor entendimento sobre os efeitos na biorremediação e uso deste bioproduto.

5.1.1. Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

As imagens obtidas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura foram usadas para analisar a interação do bagaço e microrganismos com a estrutura de alginato, observando as diferenças que podem ocorrer na morfologia das esferas com o aumento da quantidade de bagaço e o tempo no ensaio de biorremediação. A Figura 5.1 mostra a morfologia da superfície das esferas de alginato/BM/MO com 0, 0,25, 0,75, 1,5, 3 e 5 % m/m de BM antes (0 dias) e após (30 e 60 dias) seu uso na biorremediação.

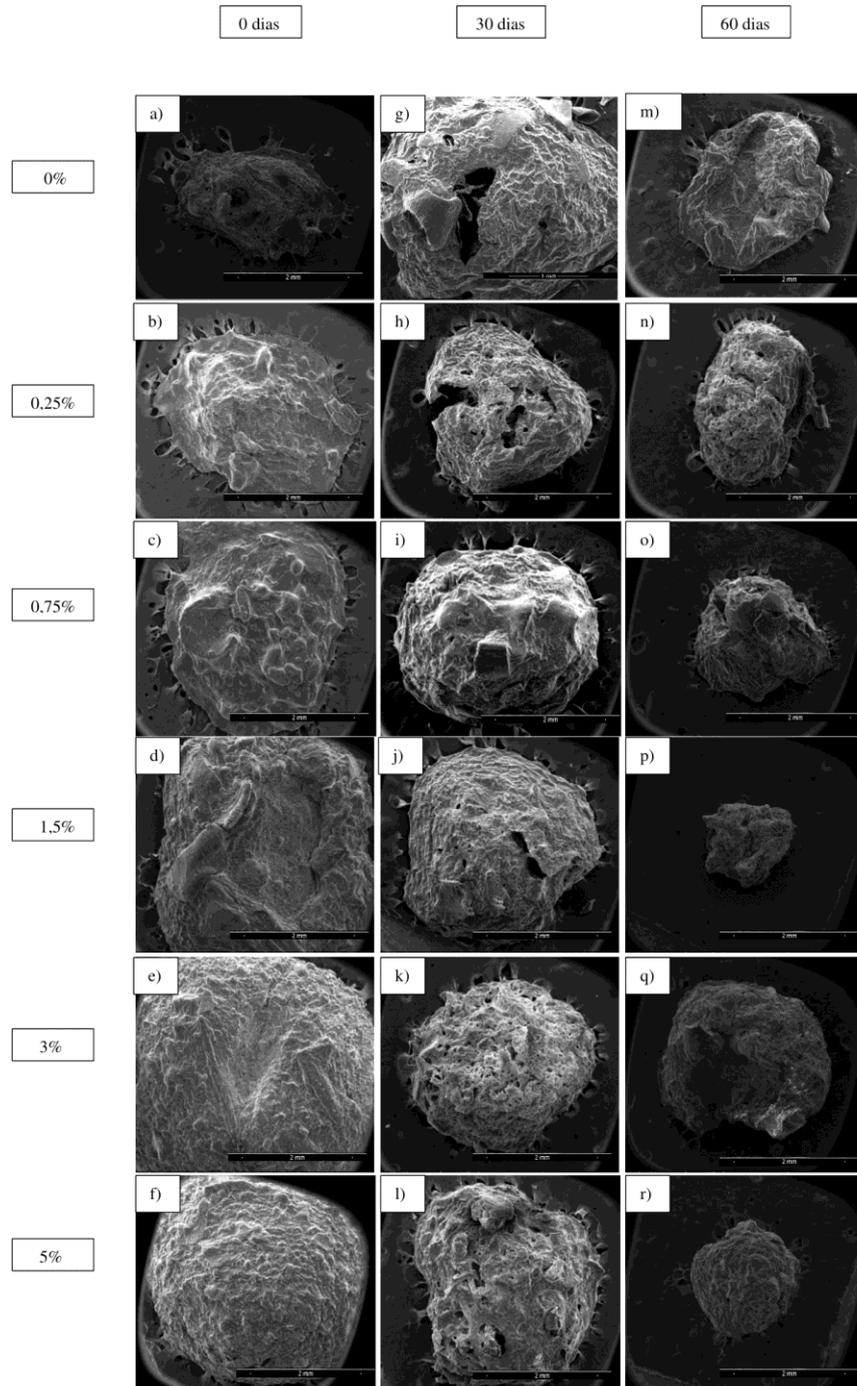


Figura 5.1 – Esferas de alginato com diferentes composições de bagaço de malte (0, 0,25, 0,75, 1,5, 3 e 5%), em 0, 30 e 60 dias de cultivo.

A Figura 5.1 mostra diferentes composições e tempos de cultivo com as esferas: (a) com 0% de bagaço de malte e 0 dias de cultivo; (b) com 0,25% de bagaço de malte e 0 dias de cultivo; (c) com 0,75% de bagaço de malte e 0 dias de cultivo; (d) com 1,5% de bagaço de malte e 0 dias de cultivo; (e) com 3% de bagaço de malte e 0 dias de cultivo; (f) com 5% de bagaço de malte e 0 dias de cultivo; (g) com 0% de bagaço de malte e 30 dias de cultivo; (h) com 0,25% de bagaço de malte e 30 dias de cultivo; (i) com 0,75% de bagaço de malte e 30 dias de cultivo; (j) com 1,5% de bagaço de malte e 30 dias de cultivo; (k) com 3% de bagaço de malte e 30 dias de cultivo; (l) com 5% de bagaço de malte e 30 dias de cultivo; (m) com 0% de bagaço de malte e 60 dias de cultivo; (n) com 0,25% de bagaço de malte e 60 dias de cultivo; (o) com 0,75% de bagaço de malte e 60 dias de cultivo; (p) com 1,5% de bagaço de malte e 60 dias de cultivo; (q) com 3% de bagaço de malte e 60 dias de cultivo; e (r) com 5% de bagaço de malte e 60 dias de cultivo.

O processo de polimerização superficial que acontece com o alginato de sódio em contato com a solução de cloreto de cálcio causa um encolhimento, provavelmente também formando cavidades na superfície e aparecimento de poros na esfera (COVARRUBIAS *et al.*, 2012). Também, é notado presença de partículas maiores de bagaço de malte, sendo mais frequente em esferas com maior composição de bagaço de malte. É possível observar mais partículas de sólidos nos tratamentos de 3 e 5% de bagaço de malte. Outro ponto interessante é a maneira que as esferas estão se degradando comparando com 0, 30 e 60 dias de cultivo. Nota-se, principalmente para esferas com composição de BM maior e iguais a 0,75%, que ocorre uma diminuição do diâmetro (tamanho) das esferas durante a biodegradação, mais evidente depois de 60 dias de cultivo. As exceções para essa diminuição podem ser vistas em composição de 0 e 0,25% de BM, onde não é observado diminuição aparente do diâmetro das esferas. Essa diminuição pode estar associada a uma maior atividade microbiana nos tratamentos de maior composição de BM, que conseguem degradar mais rapidamente a esfera. Como o material usado nas esferas é biodegradável, pode-se esperar que seja consumido pelo consórcio de microrganismos. Nas imagens (j), (k), (l), (p), (q) e (r) também se nota maior porosidade, o que pode representar que à medida que os dias de cultivo passam a parte interna da esfera fique mais acessível, podendo agregar mais nutrientes (provenientes do bagaço) e microrganismos, que antes estavam encapsulados nas esferas. Entretanto, tal comportamento também foi

apresentado na esfera com 0,25% de BM (b), (h) e (n), com aumento de porosidade com o tempo, sem haver diminuição aparente de tamanho.

As esferas de alginato/BM/MO, após uso no ensaio de biorremediação, não mantiveram sua integridade, perdendo massa e diminuindo seu tamanho. O diâmetro inicial (em 0 dias) era aproximadamente 4 mm passando a valores de aproximadamente 3 mm e em torno de 2 mm após 30 e 60 dias de biorremediação, respectivamente. Esta redução no tamanho pode ter ocorrido devido à lixiviação de material (alginato, bagaço e microrganismos) pelo meio salino usado no ensaio de biodegradação ou devido a biodegradação pelos microrganismos presentes no ensaio. Em 60 dias ainda é possível encontrar maior ocorrência de rachaduras ou poros na seção transversal do interior das esferas, o que é visualizado na Figura 5.2.

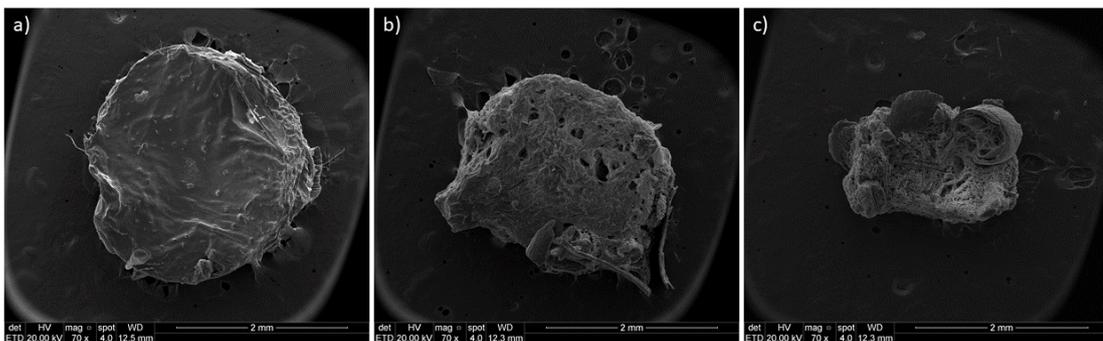


Figura 5.2 - Imagens obtidas por MEV da superfície da seção transversal das esferas depois de 60 dias de teste de biorremediação com a) 0% de BM, b) 0,25% de BM e c) 1,5 % de BM, com magnificação de 70.

Após 60 dias de teste de biorremediação, a superfície da seção transversal da esfera de alginato/MO com 0% de BM tem aspecto mais liso (Figura 5.2a) em comparação com esferas que contém 0,25 % e 1,5 % de BM (Figura 5.2b e 5.2c). Estas últimas têm aparência mais rugosa, ou com maior quantidade de poros do que esferas com 0 % de BM. Também, maiores quantidades de BM incorporado nas esferas parece contribuir com a diminuição do diâmetro da esfera após 60 dias de ensaio de biorremediação. Maior quantidade de poros observados nas esferas com 0,25 % e 1,5 % de BM, indicam provável incremento na difusão do meio no interior da esfera levando a uma maior acessibilidade de nutrientes (provenientes do bagaço) pelos microrganismos, que antes estavam aprisionados nas esferas. A presença de poros é necessária para garantir a viabilidade das células de MO dentro das esferas,

permitindo a troca de substratos, metabólitos e gases entre a parte interna e externa (ANGELIM *et al.*, 2013).

Também é notado presença de partículas de maior tamanho de BM, sendo mais frequente em esferas com maior composição de bagaço de malte, como observado nas setas vermelhas na Figura 5.3. É possível observar mais partículas de bagaço nas esferas com 3 e 5% de BM, influenciando nas características da superfície das esferas, isto é, superfícies com maior quantidade de irregularidades.

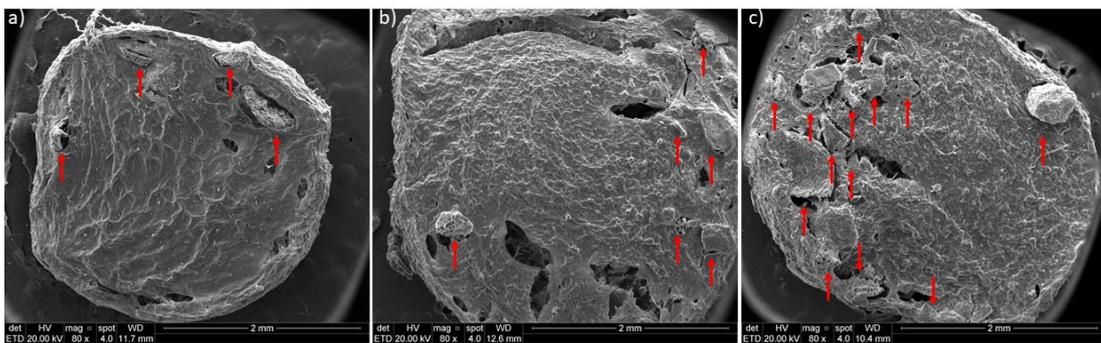


Figura 5.3 - Imagens obtidas por MEV da superfície da seção transversal das esferas recém feitas (0 dias de teste de biorremediação) com a) 0% de BM, 1,5% de BM e 5% de BM, com magnificação de 80x.

Na Figura 5.3a, ainda é possível observar indícios de material similar a biomassa (material celulósico ou lignocelulósico), que provavelmente é usado de meio suporte para liofilização dos microrganismos comerciais pela empresa que vende o consórcio comercial. Apesar disso, ainda é possível ver que à medida que aumenta a quantidade de BM nas esferas, há maior presença de material celulósico nas mesmas, indicado pelas setas vermelhas nas Figuras 5.3c.

A presença de estruturas compatíveis com crescimento microbiano, pelo que é observado nas imagens de MEV (Figura 5.4), parece ser favorecido nos locais onde se observa a presença de partículas de biomassa nas esferas.

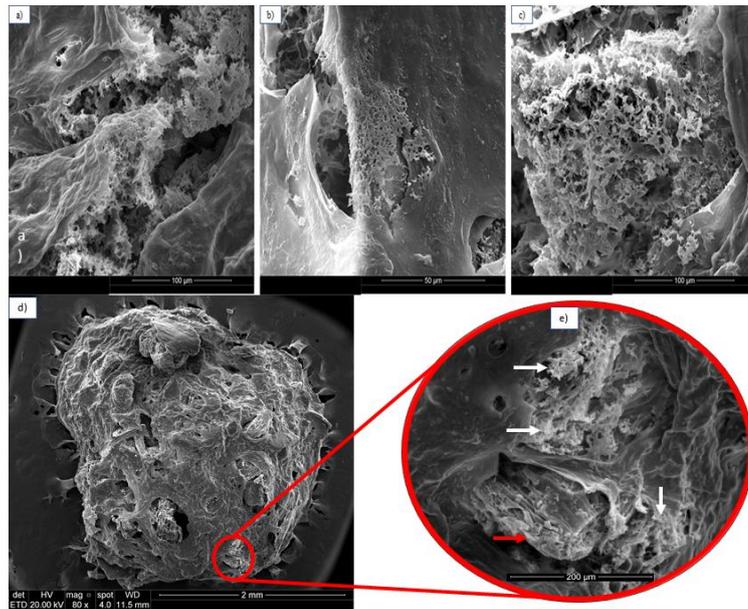


Figura 5.4 - Imagens obtidas por MEV das esferas de alginato, com 30 dias do ensaio de biorremediação, com (a) 1,5%, (b) 3% e (c, d, e) 5% de bagaço de malte, com magnificação de 1200x, 2500x, 1200x, 80x e 600x, respectivamente.

Também é observado a possível ocorrência da formação de biofilme (Figuras 5.4a e 5.4b), similar ao observado em outros trabalhos (COVARRUBIAS *et al.*, 2012; OBUEKWE; AL-MUTTAWA, 2001), onde as bactérias presentes no alginato formam uma barreira de proteção, sendo um indicativo de crescimento e incorporação dos microrganismos em alginato com bagaço.

Nas Figuras 5.3 (a, b e c) e 5.4 (d e e) é possível observar que há ruptura da superfície das esferas, podendo ser atribuída tanto a presença de partículas de biomassa que causam a ruptura da superfície ou do próprio processo de secagem à vácuo e metalização das esferas para analisar no MEV. Essas rupturas podem estar associadas a uma quebra superficial pela tensão sofrida na esfera devido a um inchaço interno da mesma, causando uma ruptura na superfície, normalmente onde há partículas sólidas. Com o crescimento microbiano, há também uma tendência de aumento de massa interna na esfera e degradação das partículas de biomassa consumidas pelos microrganismos, o que facilitaria o rompimento. Tal processo é mostrado por Faria (2019), onde as esferas com 12 semanas tendem a ter maiores rupturas de superfície. Outra coisa importante de notar na Figura 5.4e, é a presença de microrganismos (indicado pelas setas brancas), aparentemente também com formação de uma película de exopolissacarídeos (biofilme), sendo próximos do local

onde há presença de biomassa (indicado pela seta vermelha). Obuekwe et al. (2001) salientam a importância da formação desse biofilme, que além de proteção, serve também para aderência do MO à superfície do alginato. Além disso, a formação do é especialmente bom para uso em biorremediação em ambientes com clima quente, pois aumenta a resistência do organismo à temperatura.

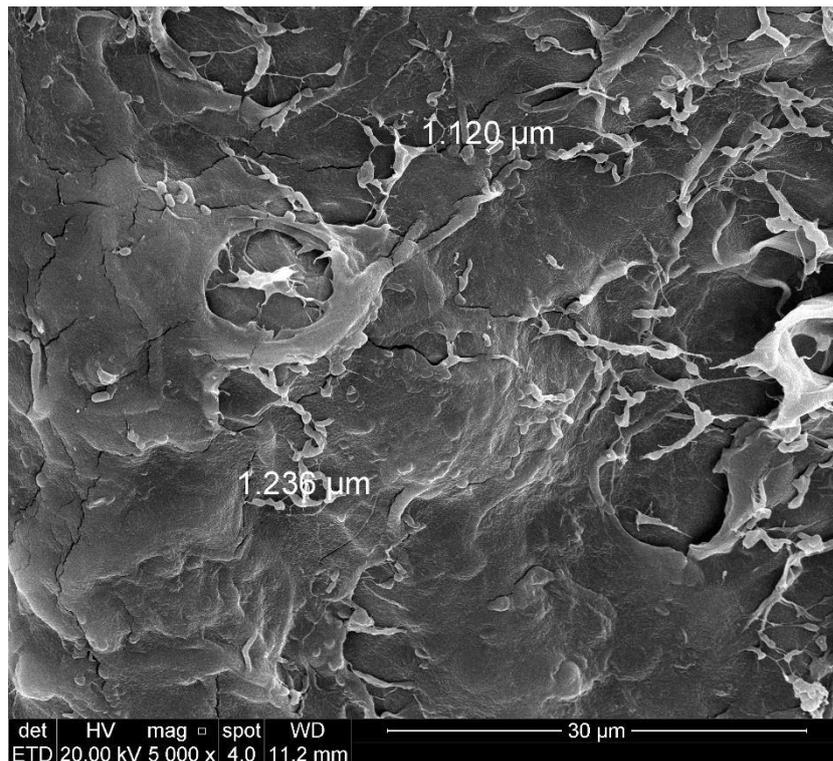


Figura 5.5 - Imagem obtida de MEV da superfície de esfera de alginato/MO com 0,75% de BM na composição, em 30 dias de ensaio de biorremediação, com magnificação de 5000x.

A presença de microrganismos parece ocorrer principalmente onde há maior disponibilidade de nutriente, assim observado na superfície da esfera (Figura 5.4d), no local onde há partícula sólida (possivelmente bagaço de malte). Nas esferas também foi possível encontrar presença de estruturas compatíveis com células microbianas (bastonete de aproximadamente $1\mu\text{m}$) evidenciado na Figura 5.5. Este resultado está de acordo com os encontrados no trabalho de Lin et al. (2014) no qual mostra que ocorre uma impregnação dos microrganismos na superfície e no interior das esferas de alginato (LIN *et al.*, 2014).

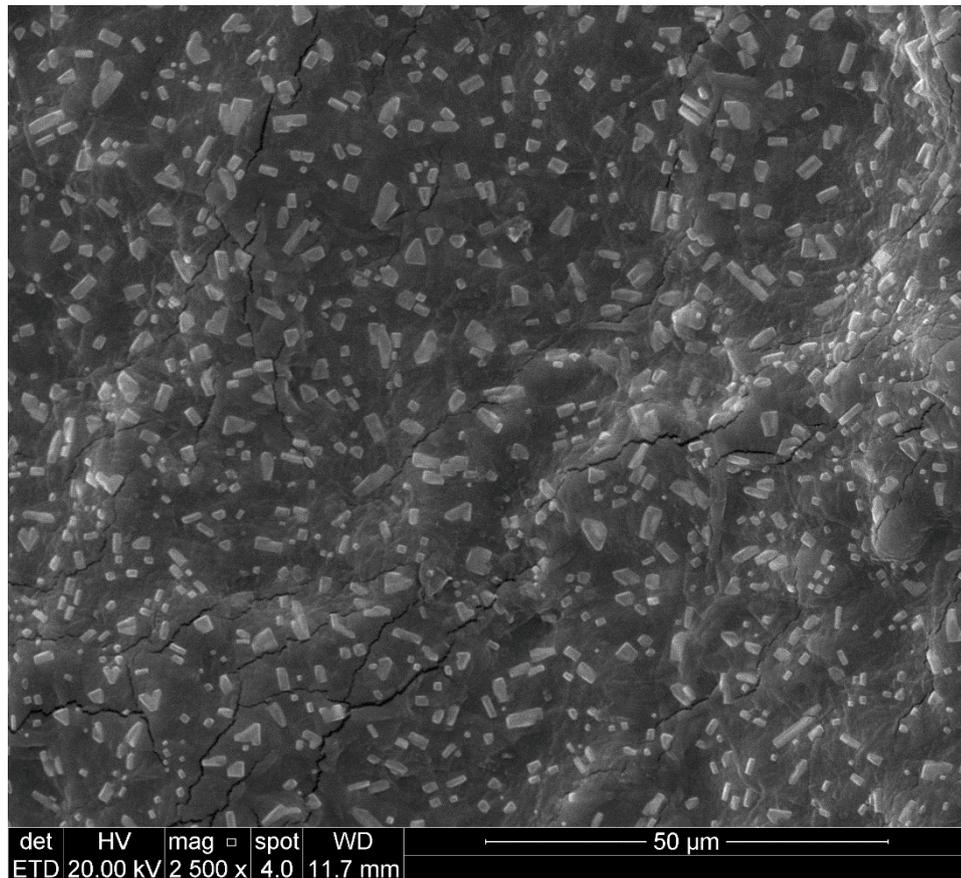


Figura 5.6 - Imagem obtida por MEV da seção transversal interna da esfera de alginato com 0,75% de bagaço em 30 dias após ensaio de biodegradação, com magnificação de 2500x.

Outra comprovação da aparente porosidade das esferas depois de 30 dias de ensaio de biorremediação é a presença de cristais de sais na seção interna da esfera, como evidenciado na Figura 5.6. Como o meio usado no ensaio é um meio salino sintético e o preparo das esferas para análise de MEV não envolve presença de sais, constata-se que esses sais são provenientes do meio usado no ensaio de biodegradação. Assim, evidencia-se que existem caminhos por onde o meio salino se difunde no interior das esferas o que facilitaria tanto o transporte de nutrientes e componentes solubilizados no meio, quanto a biorremediação dos mesmos.

5.1.2. Ensaio de Compressão Dinâmico-Mecânico

O ensaio de compressão nas esferas de alginato foi realizado para avaliar possíveis diferenças de resistência mecânica das esferas com diferentes

concentrações de bagaço de malte. Na Figura 5.7 é possível ver a comparação das curvas de tensão (MPa) x deformação (%) das esferas de alginato/MO com diferentes quantidades de bagaço de malte.

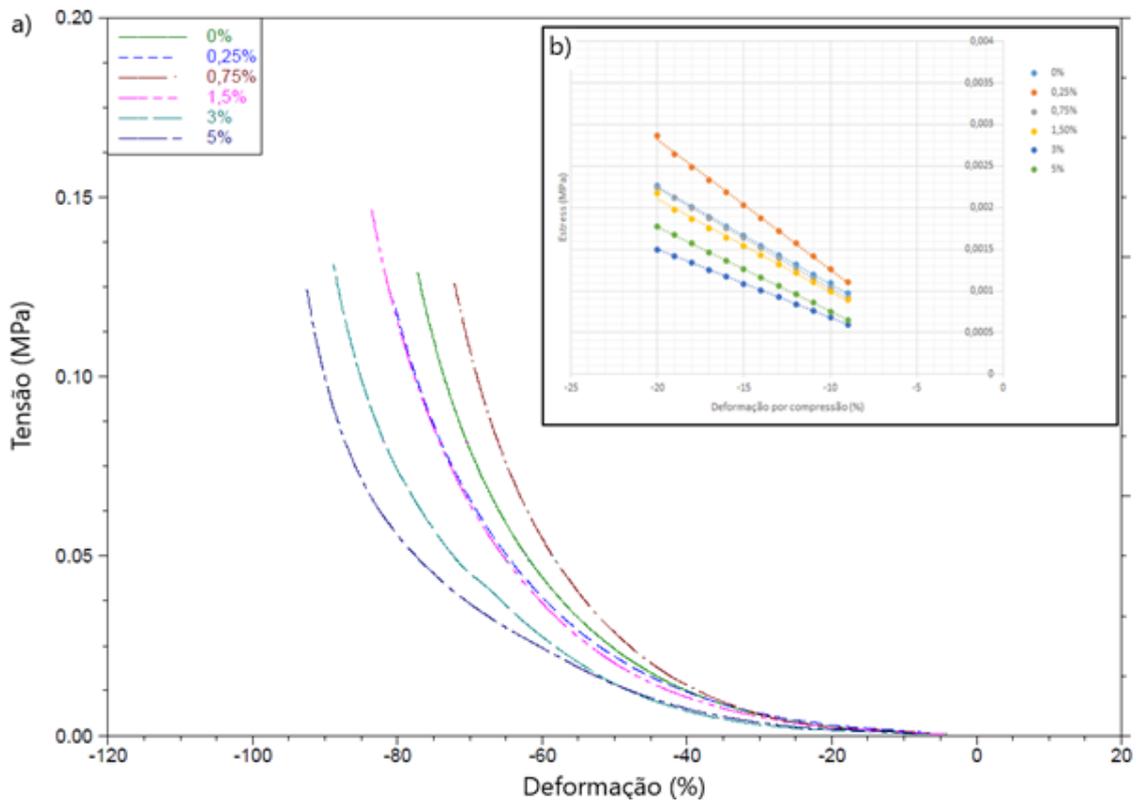


Figura 5.7 - Gráficos de a) Curvas de tensão (MPa) x deformação (%) das esferas de alginato/MO com bagaço de malte (0, 0,25, 0,75, 1,5, 3 e 5% m/m) e b) pontos da mesma curva até -20% de deformação.

A partir das curvas de tensão x deformação obtidas no ensaio de compressão das esferas, e analisando a região de comportamento elástico linear das curvas (Figura 5.7b), pode-se estimar o módulo de elasticidade das esferas, conforme Eq. 4.1. Ao realizar a deformação do material, percebe-se que há variações na sua derivada, sendo assim interpretadas como as fases de deformação de material (deformação elástica linear, deformação elástica não linear e deformação plástica) (CHAN *et al.*, 2011; OUWERX *et al.*, 1998). A região de deformação elástica linear é usada para determinar a resistência mecânica do material à compressão, visto que ao entrar na região plástica, ocorrem deformações irreversíveis no. Tais deformações podem afetar a durabilidade das esferas em biodegradação de longo período, potencialmente prejudicando resultados de biodegradação.

Os valores obtidos de módulo de elasticidade (E) a partir da tangente das retas apresentadas na região elástica linear foram 271, 199, 265, 273, 398 e 312 kPa para as esferas de alginato/MO e bagaço com 0, 0,25, 0,75, 1,5 3 e 5 % de composição, respectivamente. Os resultados indicam que o bagaço de malte exerceu um efeito de reforço, aumentando a resistência da matriz de alginato nas esferas. O maior valor de E (387 kPa) foi obtido com as esferas de alginato/MO e 3 % BM. Contudo, o valor de módulo de elasticidade de esferas com 5% de BM foi menor (312 kPa), indicando que um excesso de carga de BM pode comprometer as interações carga-polímero e polímero-polímero e favorecer as interações carga-carga.

Os resultados de módulo de elasticidade (198 – 386 kPa) são ligeiramente maiores que os encontrados em trabalhos semelhantes como de Tomovic (2015) (entre 53,2 – 131 kPa), Dabiri (2017) (entre 30,5 – 119,47 kPa) e Ouwerx et al. (1998) (entre 50 – 100 kPa), similares aos encontrados por Chan et al. (2011) (entre 250 – 400 kPa) e de menor valor comparando com os resultados de Voo et al. (2016) (entre 460 – 3600 kPa) (em trabalhos com esfera de alginato para fármacos) e Costa et al. (2018) (entre 230 – 14000 kPa) (em trabalho com filmes de alginato com diferentes razões de M/G em concentrações variadas de CaCl₂). O aumento de potencial iônico, pelos trabalhos analisados, também pode aumentar a força de interação da matriz polimérica, aumentando também a resistência à compressão (módulo de elasticidade). Assim também é possível que compostos como celulose tenham contribuições positivas para incremento de resistência quando efetivamente participando das ligações com a matriz polimérica (CHAN *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2018; DABIRI *et al.*, 2017; LEE *et al.*, 2017; OUWERX *et al.*, 1998; TOMOVIĆ *et al.*, 2015; VOO *et al.*, 2016).

Sabe-se que a incorporação de celulose na produção de esferas de alginato pode melhorar características, como valor de dureza (GUO *et al.*, 2017), mas para isso é necessário que a molécula esteja mais disponível para ligações cruzadas com o polímero de alginato (COSTA *et al.*, 2018). Como não houve um pré-tratamento do bagaço de malte para possibilitar a formação de ligações cruzadas entre a celulose e o polímero alginato, pode não ter havido a devida mudança nas propriedades mecânicas como módulo de elasticidade, sendo o bagaço apenas um sólido preso na matriz de alginato (Figura 5.1 e 5.3). Outro fator, já citado anteriormente, que pode

estar afetando a resistência mecânica das esferas, é a heterogeneidade da dispersão destas cargas na matriz, bem como, a real quantidade incorporada.

5.1.3. Análise do crescimento microbiano

A avaliação do crescimento microbiano foi realizada com a técnica de espectrofotometria por comparação de densidade óptica, devido à facilidade e praticidade da técnica. Também, como o experimento é realizado com o mesmo consórcio comercial, em ambiente estéril e controlado, assume-se que toda turbidez está associada ao crescimento microbiano dos microrganismos inoculados nas esferas de alginato.

A Figura 5.8 apresenta a variação da densidade óptica em função do tempo de em que as esferas de alginato com MOs ficaram no meio cultivo. Observou-se que as esferas com as maiores concentrações de bagaço de malte (3 e 5%) contribuíram para maior crescimento microbiano, no estágio inicial, sendo maior inclusive que o crescimento da amostra controle nas mesmas condições de cultivo. O controle foi feito com o MO livre, mas também deve-se salientar que no consórcio comercial, muito provavelmente, os MOs estão liofilizados em uma matriz de biomassa e nutriente, o que também pode estar contribuindo para melhoramento no crescimento inicial. Contudo, este resultado é concordante com aquele encontrado nas análises das imagens obtidas por MEV, onde as esferas com as maiores concentrações de partículas de bagaço de malte apresentaram maior presença de microrganismos (ver Figura 5.4).

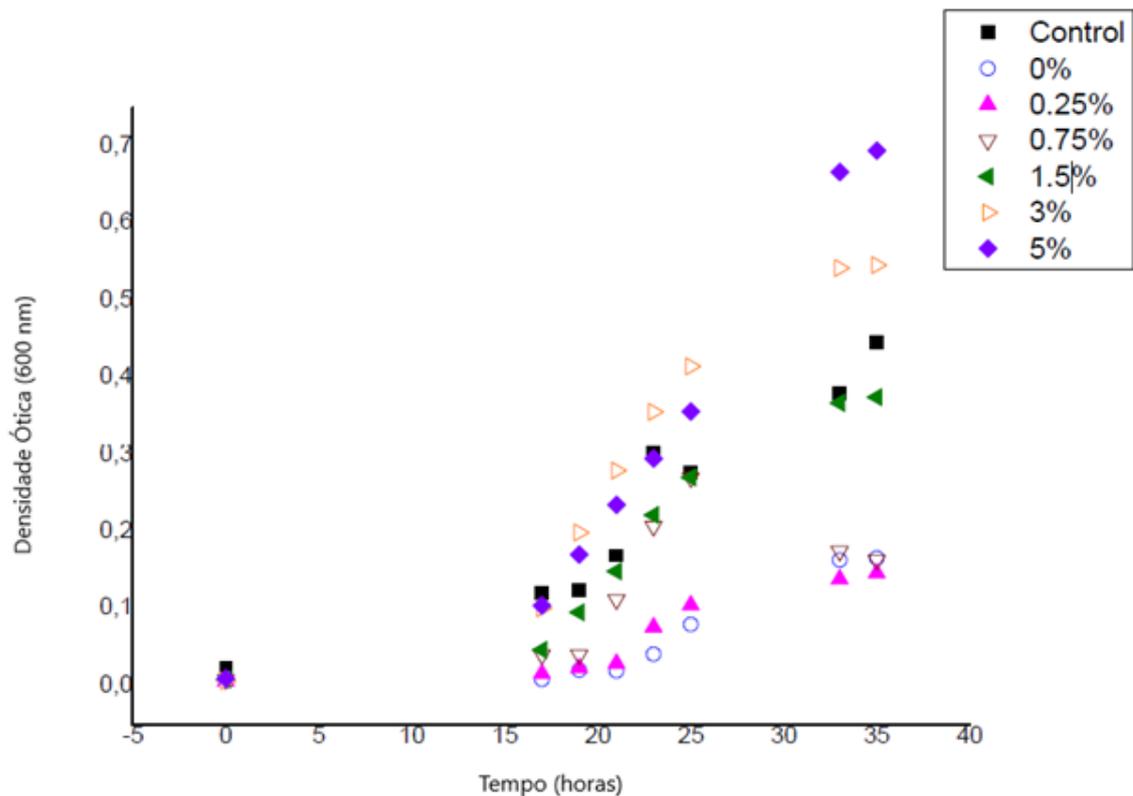


Figura 5.8 - Resultado do crescimento microbiano em densidade óptica dos tratamentos com diferentes composições de bagaço de malte por tempo.

Foi observado que as esferas com 1,5% de bagaço de malte mostraram comportamento semelhante à amostra controle e que as esferas com menor quantidade que 1,5% tiveram resultados mais baixos de crescimento inicial. Como os MOs, nas esferas, são aprisionados em matriz polimérica, entende-se que haverá menor crescimento inicial comparando com a mesma quantidade de MO livre. Também, como o consórcio comercial de microrganismos é realizado com a imobilização dos mesmos em um substrato nutritivo, presume-se que o controle, além de ter mais microrganismos livres disponíveis, ainda possui nutriente para crescimento. O objetivo da adição de bagaço de malte em esferas de alginato para degradação de petróleo também é para ajudar no crescimento inicial em um ambiente com pouco ou nenhum nutriente no meio. Assim, o pequeno aumento em composição de bagaço de malte foi o suficiente para apresentar uma diferença no crescimento em tempos de menos de 48h, o que pode representar uma vantagem para técnicas como biorremediação. Farias (2019), analisando crescimento microbiano em esferas com diferentes composições de alginato, com o mesmo consórcio comercial, verificou que somente após 3 dias (56 h) havia a estabilização de crescimento microbiano. Nota-se

também que o crescimento de *Bacillus* se assemelha ao comportamento observado neste trabalho (PEREIRA *et al.*, 2019).

5.2. Resultados do ensaio de biorremediação

5.2.1. Caracterização parcial das esferas e meio aquoso

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram utilizadas para entender aspectos de crescimento microbiológico dentro das esferas, assim como aspecto das esferas depois do teste de biorremediação de petróleo de 40 dias. Esferas que continham menor quantidade de BM na composição apresentavam aspecto mais translúcido, enquanto tratamentos com maior quantidade de BM tinham aparência mais turbida, com coloração amarelada. Ainda, era visível em tratamentos com maior quantidade de BM a presença de pequenas partículas tanto internamente na esfera quanto na superfície.

Após o ensaio de biorremediação, percebeu-se que o tamanho das esferas reduziu, para todos os tratamentos. Ainda, o peso das esferas depois do tratamento também sofreu redução, sendo que em alguns casos as esferas foram completamente dissolvidas. A Figura 5.9 mostra a perda percentual de peso das esferas, em média, depois do ensaio de biorremediação por 40 dias.

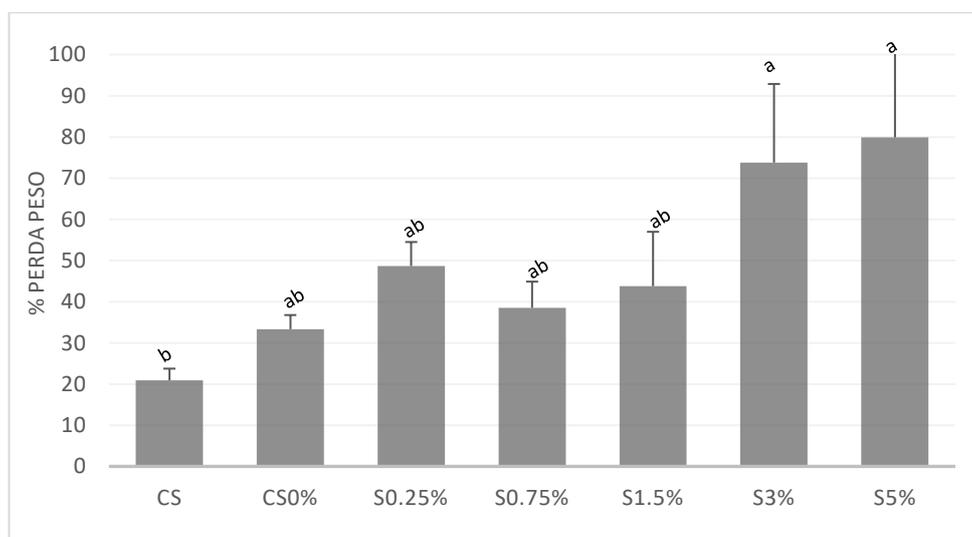


Figura 5.9 - Perda de peso das esferas de alginato após ensaio de biorremediação, para os tratamentos CS, CS0%, S0,25%, S0,75%, S1,5%, S3% e S5%.

Nota-se que os tratamentos com maior composição de BM (3 e 5%) aparentam ter resultado de perda de biomassa maior do que tratamentos com 0, 0,25, 0,75 e 1,5% de BM. Mesmo assim, houve um percentual de perda associado ao tempo e somente a esfera de alginato. O tratamento controle somente com esferas mostrou que o material (alginato de cálcio) parece sofrer perda natural do seu peso durante o tempo do ensaio. Levando esse fator em conta, imagina-se que há uma perda de peso que possa ser considerada “básica” entre os tratamentos que contêm esferas, de cerca de 21%. Essa perda de peso pode estar associada a uma perda de água das esferas para o meio. Como as esferas possuem uma quantidade menor de sal em composição, em comparação com o meio, pode-se supor que o meio salino teve maior afinidade com uma parcela de água. Outra explicação pode estar associada a uma dissolução natural da composição de alginato de cálcio das esferas. Duas réplicas do tratamento de 5% de BM e uma réplica do tratamento de 3% tiveram as esferas completamente dissolvidas, não sendo possível recuperá-las.

O tamanho inicial das esferas produzidas estão de acordo com o que é comumente observado na literatura, onde tipicamente esferas de 2-5mm são produzidas (PARTOVINIA; RASEKH, 2018). No entanto, Ausheva et al. (2008) observou que a biodegradação reduz com o aumento de tamanho das partículas de alginato, possivelmente limitando a difusão de substrato nas esferas (AUSHEVA *et al.*, 2008). Portanto, a perda de tamanho das esferas durante a biorremediação pode ser favorável para aumento de difusão de substrato nas esferas, contribuindo para biorremediação mais eficaz.

A redução do tamanho das esferas foi observada também através das imagens de MEV, onde de maneira geral, as esferas reduziram de um diâmetro inicial de 4mm para um diâmetro de aproximadamente 2 mm após 40 dias de ensaio de biorremediação. Outras diferenças também são observadas, como aumento de poros na superfície e rugosidade aparente. As imagens de MEV, evidenciadas na Figura 5.10, mostram as principais diferenças morfológicas vistas nas esferas com diferentes composições de BM.

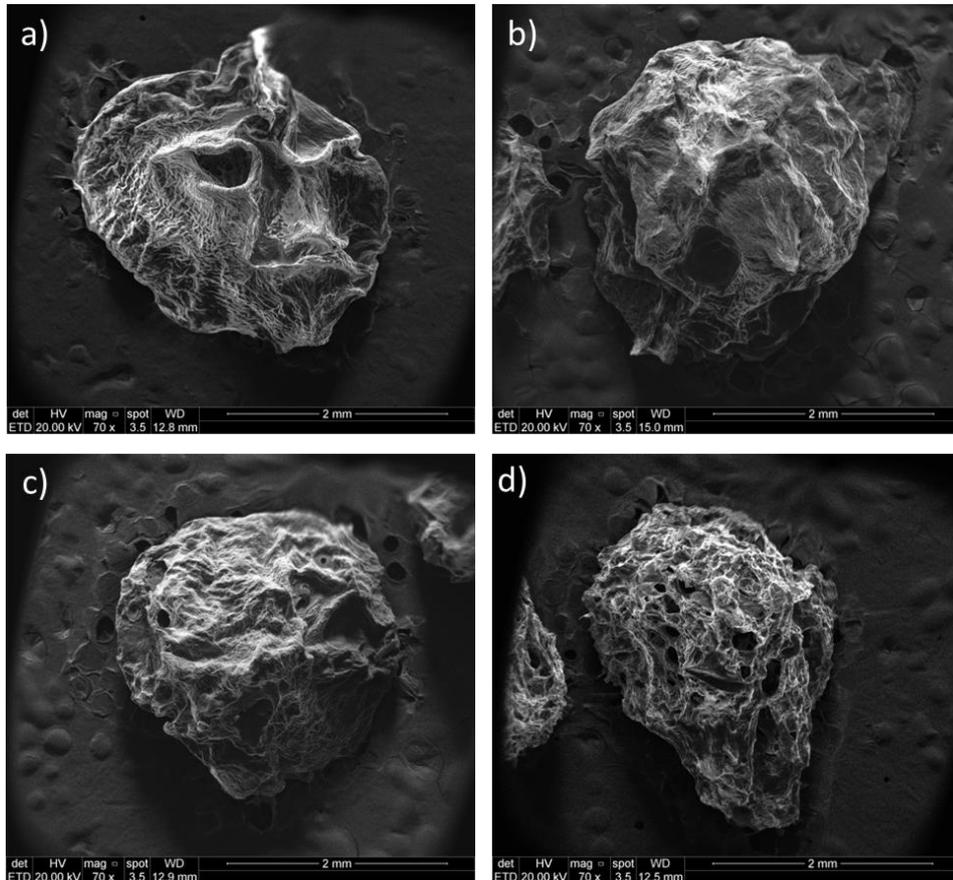


Figura 5.10 - Imagens de MEV das esferas após 40 dias do ensaio de biorremediação sendo os tratamentos a) CS, b) CS0%, c) S0,75% e d) S5%, todas com magnificação de 80x.

As esferas da Figura 5.10a e 5.10b, mostram esferas de aspecto morfológico de poucos poros, e aparência mais suave, em comparação com as esferas das imagens da Figura 5.10c e 5.10d. O aparente aumento de poros e rugosidade das esferas, notado em maior grau na esfera da Figura 5.10d, com tratamento S5%, mostra que possivelmente pode estar associado a uma maior concentração de BM na composição da esfera. Com maior crescimento microbiano, e consequentemente maior consumo de nutrientes mais disponíveis, pode-se ter criado maiores espaços internos para crescimento dos poros. Tal abertura pode também facilitar acesso de meio e dos compostos de hidrocarbonetos solúveis no meio, assim como ajudar na liberação de microrganismo no meio. A superfície das esferas CS e CS0% são similares ao observado na literatura com imagens de microscopia de esferas de alginato (COVARRUBIAS *et al.*, 2012; FARIA *et al.*, 2021; ZVULUNOV; RADIAN, 2021).

Outro ponto observado, foi que o aparente crescimento microbiano foi mais evidenciado, por meio de imagens, próximos a fragmentos de BM nas esferas, o que também pode contribuir para maior atividade microbiológica nos tratamentos de maior concentração de BM. A Figura 5.11 mostra locais das esferas onde foi possível evidenciar estruturas condizentes com crescimento microbiano.

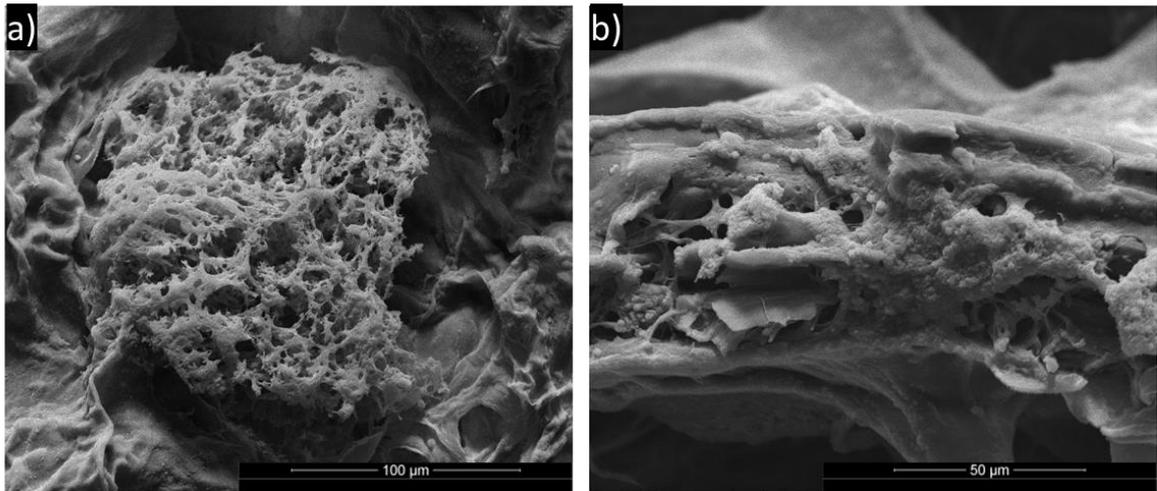


Figura 5.11 - Imagens de MEV das esferas após 40 dias de ensaio de biorremediação sendo os tratamentos a) S3% e b) S0,25%, com magnificações de 1200x e 2000x, respectivamente.

Nota-se que o crescimento dos microrganismos observados tende a aparecer perto de estruturas identificadas como estruturas lignocelulósica, condizentes com o BM. A Figura 5.11b, com maior magnificação, mostram formas de aproximadamente $1\mu\text{m}$, que pode estar associado os microrganismos. Também foi observado em diversas imagens, incluindo da parte interna das esferas, a presença de sais. Esses sais estão associados ao meio salino sintético usado, evidenciando que houve troca de meio com a parte interna das esferas, possivelmente através dos poros. A morfologia do crescimento microbiano observado na Figura 5.11a é similar ao já observado por Darah (2015), em cultivo de *E. aerogenes* em esferas de alginato de cálcio para produção de poligalacturonase (DARAH; NISHA; LIM, 2015).

No primeiro dia, quase todos tratamentos ainda permaneciam com aspecto translúcido, mas ao final de 40 dias, apenas o tratamento CS ainda permanecia com o mesmo aspecto translúcido, o restante já estava com aparência de turbidez amarelada. O pH inicial, para todos os tratamentos, foi de 7,58. Ao final do ensaio de biorremediação de 40 dias, todos tratamentos aparentavam uma aproximação de

neutralidade de pH. A Figura 5.12 Mostra a média de pH dos tratamentos ao final do experimento, com respectivos desvios.

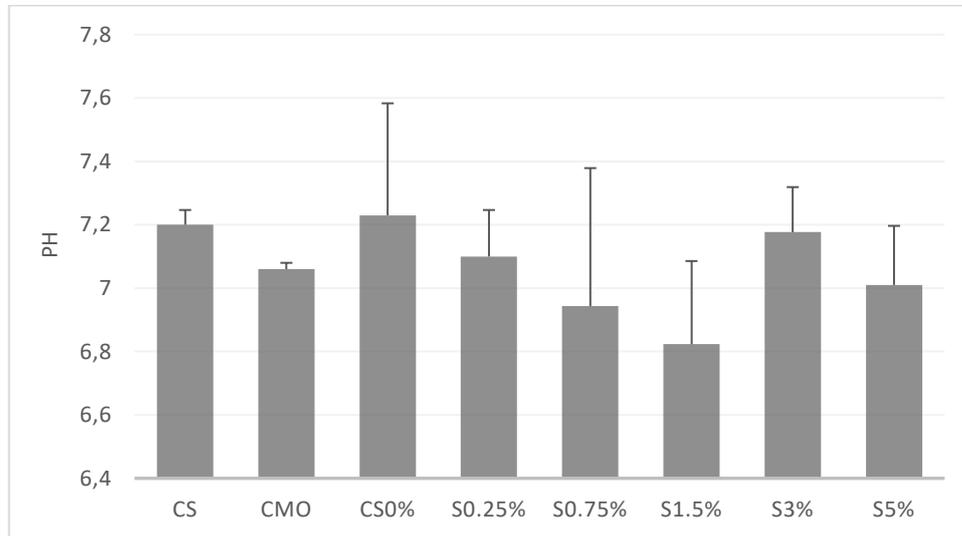


Figura 5.12 - Resultado de pH do meio após 40 dias de ensaio de biorremediação para os tratamentos CS, CMO, CS0%, S0,25%, S0,75%, S1,5%, S3% e S5%.

As diferenças de pH não foram significativas em teste de Tuckey, com confiança $<0,05$. O maior valor de pH registrado foi de 7,59 para uma réplica do tratamento de CS0% e o menor registrado foi de 6,29 para uma réplica do tratamento S1,5%. O pH do meio pode interferir em fatores essenciais para a biorremediação, como atividade, metabolismo, atividade enzimática e transporte de nutrientes (AL-HAWASH *et al.*, 2018). A leve redução do pH do meio em biorremediação de contaminação de petróleo em meio salino já foi observada por outros autores (PARTOVINIA; RASEKH, 2018; PEREIRA *et al.*, 2019). A capacidade de tamponamento da água do mar, semelhantemente ao meio salino sintético, atinge um mínimo de pH 7,5, refletindo a capacidade de tamponamento do sistema marinho de resistir a mudanças (JURY *et al.*, 2013). O tamponamento do meio salino pode explicar a baixa redução de pH nos meios de cultivo durante o ensaio de biorremediação.

O resultado ao final foi visto em concentração de sólidos contidos nas amostras, representando a concentração de sólidos finos e solúveis no meio. A figura 5.13 apresenta os resultados de concentração de sólidos em suspensão dos meios após 40 dias de ensaio de biorremediação.

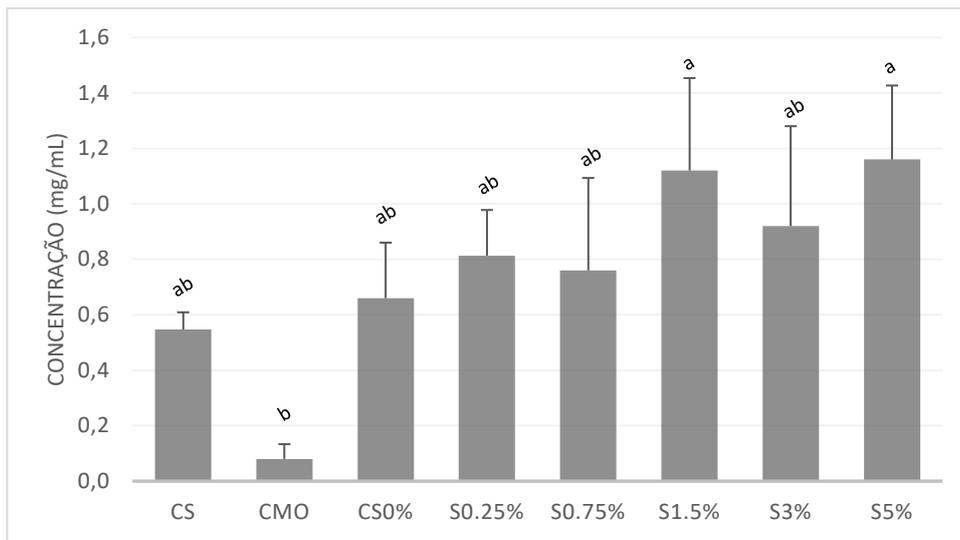


Figura 5.13 - Resultado de concentração de biomassa (sólidos em suspensão) no meio após 40 dias de ensaio de biorremediação para os tratamentos CS, CMO, CS0%, S0,25%, S0,75%, S1,5%, S3% e S5%.

A concentração obtida no tratamento CS corrobora com o que foi visto para perda de peso de esferas, onde cerca de 20% do peso foi perdido no tratamento. Grande parte dessa perda pode estar associada a migração de água de dentro da esfera para fora, por equilíbrio osmótico do meio. No entanto, parte pode ter sido dissolvida, liberando alginato no meio. Essa concentração observada pode estar associada a essa perda natural de alginato das esferas. Com uma concentração final média de cerca de 0,55 mg/mL, havendo cerca de 50mL de meio aquoso, pode-se pensar que havia aproximadamente 27 mg de sólidos recuperados na centrifugação. Caso seja assumido que esses sólidos sejam alginato, isso representaria cerca de 50% do alginato inicialmente colocado nas esferas no tratamento (1% de 5g de esferas). Já o resultado obtido pelo tratamento CMO mostra, possivelmente, a quantidade de biomassa de microrganismos que pode ser encontrada no meio, visto que seria o tratamento com microrganismos livres. Pela turbidez, aparenta ter tido atividade microbiana no meio deste tratamento. Assim, os tratamentos contendo esferas e microrganismos apresentam valores maiores que a soma dos tratamentos controle, tanto de microrganismos quanto somente de esferas. Portanto, a associação de maiores concentrações de BM nas esferas parece promover tanto a perda de peso da esfera (alginato) quanto a quantidade de biomassa de microrganismos.

5.2.2. Resultados da fração orgânica do ensaio de biorremediação

O petróleo é uma mistura extremamente complexa de hidrocarbonetos (alifáticos e aromáticos) e não-hidrocarbonetos, como compostos de enxofre, nitrogênio, oxigênio e vários traços de metais (PHILP, 1985). Os hidrocarbonetos alifáticos saturados podem representar cerca de 60% do petróleo. Os resultados da análise por GC-FID da composição dos extratos do petróleo bruto usado mostram que a faixa de alcanos saturados de cadeia média C8-C18 representam cerca de 62% do total (C8-C27). A faixa de alifáticos de cadeia longa (C19 a C27) representam cerca de 30%, enquanto os compostos isoprenóides identificados (pristano e fitano), correspondem a do total de alifáticos 4% e 3,8% respectivamente (Tabela 5.1). Os principais hidrocarbonetos alifáticos estudados também são observados no perfil cromatográfico na Figura 5.14.

Tabela 5.1 - Composição e concentração de hidrocarbonetos do petróleo cru usado no experimento como fonte contaminante.

Hidrocarboneto	Nº de Carbonos	Concentração	%
Alifático		(ng/µL)	
Octano	C8 ^a	150,1	1,2
Nonano	C9 ^a	247,7	1,9
Decano	C10 ^a	706,0	5,5
Undecano	C11 ^a	915,2	7,2
Dodecano	C12 ^a	799,5	6,3
Tridecano	C13 ^a	1160,6	9,1
Tetradecano	C14 ^a	1152,7	9,1
Pentadecano	C15 ^a	882,0	6,9
Hexadecano	C16 ^a	670,7	5,3
Heptadecano	C17 ^a	501,5	3,9
Pristano	C19 ^b	512,9	4,0
Octadecano	C18 ^a	733,8	5,8
Fitano	C20 ^b	483,4	3,8
Nonadecano	C19 ^a	598,5	4,7
Eicosano	C20	518,0	4,1
Heneicosano	C21 ^a	455,9	3,6

Docosano	C22 ^a	426,1	3,3
Tricosano	C23 ^a	364,1	2,9
Tetracosano	C24 ^a	326,9	2,6
Pentacosano	C25 ^a	376,3	3,0
Hexacosano	C26 ^a	333,6	2,6
Heptacosano	C27 ^a	419,4	3,3
TOTAL		12734,7	100,0

^a Hidrocarbonetos alifáticos saturados (alcanos) sem ramificações

^b Hidrocarbonetos alifáticos saturados (alcanos) ramificados

A Figura 5.14 apresenta o perfil cromatográfico da fração de hidrocarbonetos alifáticos extraídos do petróleo cru usado no ensaio de biorremediação. Cada pico identificado (C_n) representa um respectivo hidrocarboneto alifático não ramificado, com exceção dos isoprenóides pristano e fitano, identificados pelo nome. Picos não identificados fazem parte da UCM (*Unresolved Complex Mixture*).

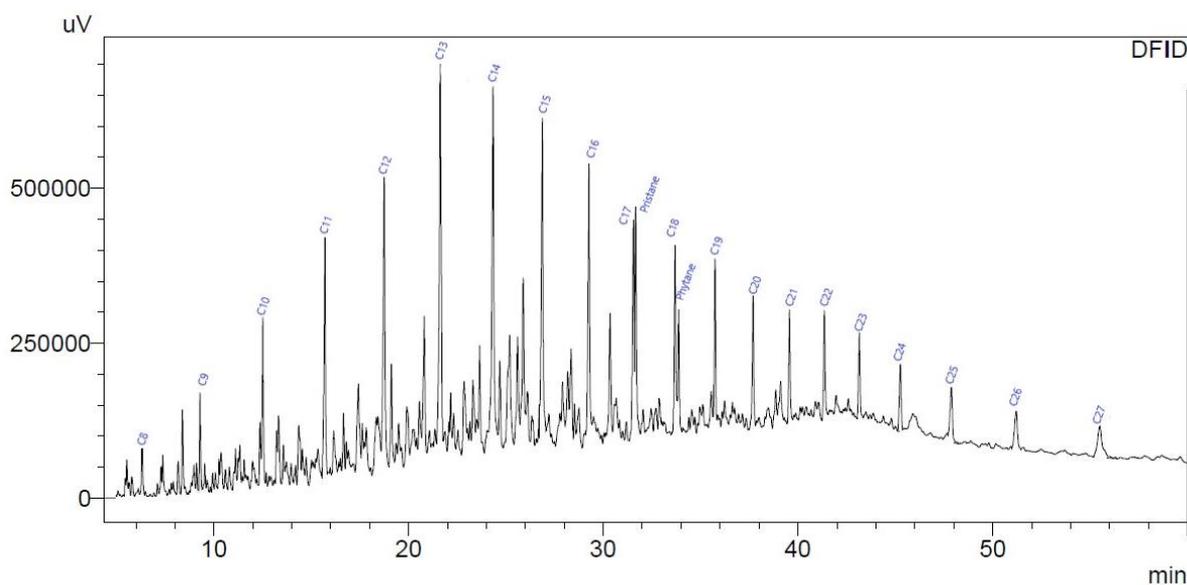


Figura 5.14 - Perfil cromatográfico da fração de hidrocarbonetos alifáticos extraídos do petróleo cru usado no ensaio de biorremediação.

As concentrações obtidas através das análises de cromatografia do petróleo cru (Tabela 5.1) foram usadas como concentração inicial dos hidrocarbonetos alifáticos e base de cálculo para estimar os percentuais de biodegradação. A Figura 5.15 mostra os resultados de degradação dos hidrocarbonetos alifáticos, por grupos,

sendo o primeiro uma média geral, o segundo a média de alcanos de cadeia curta o terceiro a média de alcanos de cadeia longa e o último a média de pristano e fitano, que foram analisados por GC-FID.

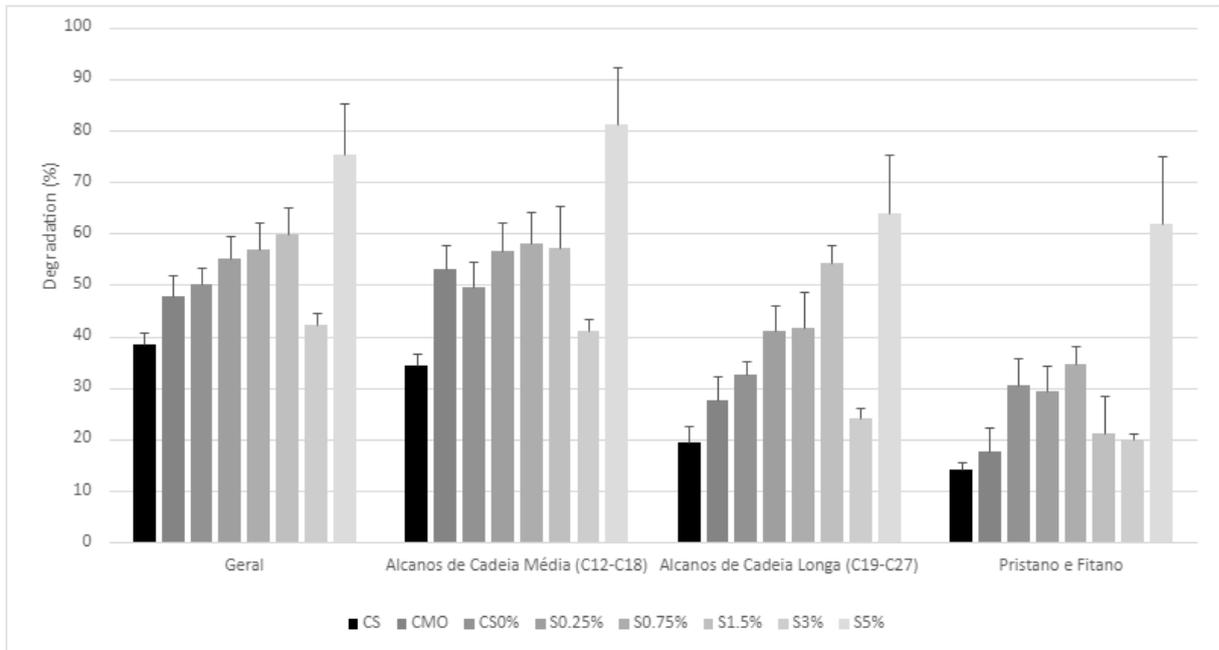


Figura 5.15 - Resultados de degradação dos hidrocarbonetos alifáticos por grupos: geral, alcanos de cadeia curta, alcanos de cadeia longa e pristano e fitano, para os tratamentos CS, CMO, CS0%, S0,25%, S0,75%, S1,5%, S3% e S5%.

De forma geral, a média dos resultados de degradação para o tratamento de S5% são estatisticamente diferentes da média dos resultados dos tratamentos CS, CMO e S3%. Os resultados dos grupos de média geral e média de alcanos do C19 ao C27 mostram uma tendência de que o aumento de concentração de MB nas esferas parece favorecer a biodegradação dos hidrocarbonetos alifáticos, com exceção do tratamento S3%. Os resultados do tratamento CS para todos os grupos mostram que houve uma degradação natural dos hidrocarbonetos alifáticos, sendo mais significativa em alcanos de cadeia média, reduzindo o percentual de degradação para alcanos de cadeia longa e sendo os resultados mais baixos para Fitano e Pristano. Essa degradação mais significativa em alcanos de menor peso molecular e complexidade, reduzindo conforme aumenta o peso molecular e complexidade (ramificação), já foi observada e documentada (PEREIRA *et al.*, 2019; WAIKHOM *et al.*, 2020).

Analisando os resultados de degradação do C12 ao C18 (alcanos de cadeia média), nota-se que há menor degradação “natural”, que seria evidenciada pelo tratamento CS. Os resultados de degradação dessa faixa de compostos foram de aproximadamente 34%, 53%, 49%, 56%, 58%, 57%, 41% e 81% para os tratamentos CS, CMO, CS0%, S0,25%, S0,75%, S1,5%, S3% e S5% respectivamente. Os resultados de degradação possuem diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação aos tratamentos, com as letras assinalando os grupos estatísticos que pertencem (a-b). Em geral, os resultados de degradação parecem gerar um padrão, onde a maior quantidade de BM na composição das esferas permite maior degradação em 40 dias de ensaio, com exceção do tratamento de S3%, que reduz significativamente a degradação dos hidrocarbonetos alifáticos. O tratamento com maior percentual de biodegradação foi o tratamento S5%, com percentual médio geral de 75% e percentuais médios de 81%, 64% e 61% para hidrocarbonetos de cadeia média (C12 até C18), hidrocarbonetos de cadeia longa (C19 até C27) e pristano e fitano, respectivamente. Os resultados obtidos neste ensaio são semelhantes aos encontrados na literatura para biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos em meio salino (AL-HAWASH *et al.*, 2018; DELLAGNEZZE *et al.*, 2014; DENG *et al.*, 2014; KHANPOUR-ALIKELAYEH *et al.*, 2021; KOK KEE *et al.*, 2015; KUNIHURO *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2019; WAIKHOM *et al.*, 2020).

Pela natureza da biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo, existe uma ordem preferencial de consumo, ou degradação de compostos. Primeiramente, os compostos os alcanos lineares não ramificados são degradados, em seguida, os alcanos de cadeia linear ramificada. Alcenos de cadeia ramificada são degradados depois e por fim os compostos monoaromáticos, cicloalcanos, poliaromáticos e asfaltenos (AL-HAWASH *et al.*, 2018; PEREIRA *et al.*, 2019; WAIKHOM *et al.*, 2020). De maneira geral, a taxa de biodegradação aumenta com a diminuição do peso molecular e complexidade da estrutura química do hidrocarboneto. A biodegradação dos hidrocarbonetos em meio aquoso salino é ditada pela solubilidade do composto no meio. Como, de maneira geral, os hidrocarbonetos alifáticos de menor cadeia possuem maior solubilidade, entende-se que há maior potencial de biodegradação desses compostos em comparação com hidrocarbonetos alifáticos de cadeia longa. A Figura 5.16 apresenta as porcentagens de degradação dos hidrocarbonetos alifáticos

(C8 até C27) após 40 dias de ensaio de biorremediação para os tratamentos estudados (CS, CMO, CS0%, S0,25%, S0,75%, S1,5%, S3% e S5%).

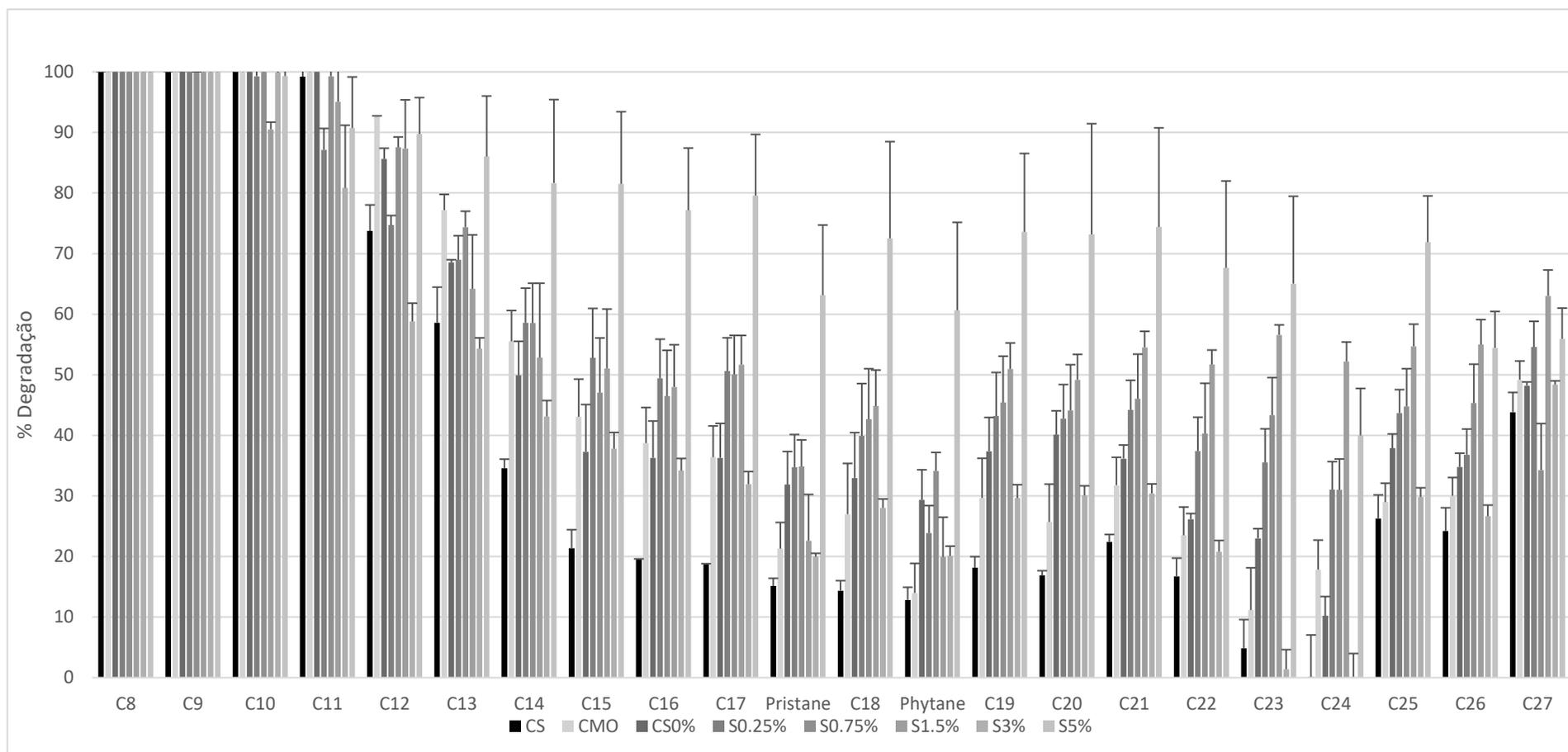


Figura 5.16 - Percentual de degradação de hidrocarbonetos alifáticos, do C8 até C27 incluindo pristano e fitano, após 40 dias do ensaio de biorremediação para os tratamentos CS, CMO, CS0%, S0,25%, S0,75%, S1,5%, S3% e S5%.

Nota-se que dentro do grupo de alifáticos de cadeia média (C8 a C18), os hidrocarbonetos do C8 ao C11 tiveram percentuais de degradação perto de 100%, para o período do ensaio, para quase todos os tratamentos. Isso pode estar associado a uma degradação natural de compostos de cadeia menor, visto que havia agitação, incidência parcial de luz solar e temperaturas de 25 °C em média. Ainda, hidrocarbonetos alcanos de menor peso molecular possuem maior solubilidade, facilitando a degradação dos mesmos (PEREIRA *et al.*, 2019). Tais fatores podem ter contribuído para uma degradação natural desses compostos. Rocha *et al.* (2011), em ensaio similar de biorremediação de 20 dias, observou que alcanos de C7 até C11 não possuíam diferenças em percentuais de degradação, visto que degradavam completamente em sistemas abióticos.

Da mesma forma que é possível ver a maior biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos de cadeia média (C8 até C18), percebe-se que os hidrocarbonetos de cadeia longa (C19 até C27) têm menores resultados de degradação. Isso pode ser devido à baixa biodisponibilidade deles no meio, baixa solubilidade e alta recalcitrância, em comparação com hidrocarbonetos de menor peso molecular. Os resultados que apresentaram menores porcentagens de degradação, no geral, foram referentes aos compostos pristano e fitano. Possivelmente, tal fato se deve às suas estruturas químicas moleculares, já que os alcanos ramificados possuem maior recalcitrância a biodegradação em comparação com demais hidrocarbonetos alifáticos estudados (DELLAGNEZZE *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2019). A presença de ramificações ou grupo funcional aceptor de elétrons dificulta o contato com o sítio ativo da enzima, dessa forma impedindo a reação (ROCHA; PEDREGOSA; LABORDA, 2011). No entanto, tanto para o pristano quanto para o fitano, o tratamento com maior composição de BM, S5%, apresentou percentuais de biodegradação mais significativos, com média acima de 60% depois de 40 dias de ensaio de biorremediação. Ainda, o mesmo tratamento mostrou os maiores resultados de percentuais médios de biorremediação para hidrocarbonetos alifáticos de média e longa cadeia.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados mostram que há a possibilidade de uso do bagaço de malte como material de reforço e nutriente para esferas de alginato de cálcio. Sua incorporação foi realizada com sucesso, evidenciado pelas imagens de MEV e resultados preliminares tanto de crescimento quanto de ensaio mecânico de compressão.

Os resultados de crescimento microbiológico em meio salino sintético com análise em espectrofotômetro sugerem que há uma melhora de crescimento inicial, nas primeiras 48h, para esferas de alginato com maiores composições de BM (3 e 5%). Os resultados também mostraram que concentrações abaixo de 1,5% de BM nas esferas mostraram resultados mais baixos de crescimento inicial comparados ao microrganismo livre (uso do consórcio diretamente no meio).

A resistência mecânica das esferas de alginato são, pelo que consta da análise do ensaio de compressão, afetadas pela composição de bagaço de malte. O aumento de concentração de BM em esferas de alginato tende a causar aumento do módulo de elasticidade, sendo o tratamento com 3% de BM (398 kPa) o maior resultado observado para a resistência mecânica a compressão. Os tratamentos de 5% (312 kPa) de BM em esferas teve pior resultado que 3%, mesmo assim maior que os demais (0, 0,25, 0,75 e 1,5%, com 270, 198, 265 e 273 kPa respectivamente).

A presença do consórcio comercial de microrganismos utilizados neste trabalho, tanto livremente em meio salino sintético, quanto encapsulados em esferas de alginato de cálcio, favoreceu a biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos de C12 a C27, assim como pristano e fitano. O uso do consórcio de microrganismos não gerou diferenças significativas nos resultados da biorremediação, em um ensaio de 40 dias, comparando seu uso livre e encapsulado em esferas sem a presença de BM. No entanto, para a biorremediação de hidrocarbonetos de maior peso molecular (C18 a C17), além de pristano e fitano, houve um aumento relativo no percentual de biodegradação para o tratamento com microrganismos encapsulados.

A incorporação de BM nas esferas pareceu favorecer a porcentagem de biorremediação, principalmente para hidrocarbonetos alifáticos de médio e alto peso molecular (C12 a C27), bem como para pristano e fitano. Para estes tratamentos contendo BM, aquele contendo 5% de concentração de BM na composição das esferas pareceu apresentar os melhores resultados de biodegradação para

hidrocarbonetos alifáticos de C12 a C27, bem como para os isoprenóides pristano e fitano. Desta forma, pode-se observar que a adição de BM como material nutriente favorece a biorremediação de hidrocarbonetos alifáticos de petróleo, sendo a maior concentração de biomassa testada o tratamento que apresentou os melhores resultados. O tratamento contendo 5% de BM apresentou um percentual médio global de biorremediação de 75% e percentuais médios de 81%, 64% e 61% para hidrocarbonetos de cadeia média (C12 a C18), e hidrocarbonetos de cadeia longa (C19 a C27) e isoprenóides (pristano e fitano), respectivamente.

7. TRABALHOS FUTUROS

Avalia-se que para o presente trabalho, além de melhora nos resultados de biodegradação de compostos alifáticos do petróleo pelo melhoramento de crescimento inicial dos microrganismos, também seja possível melhoramento de propriedades mecânicas das esferas com a inserção de nanocelulose na produção de esferas de alginato. Essa inserção poderá ser feita usando modelo estatístico de design composto central (CCD), usando diferentes fatores (%nanocelulose, %alginato, % Bagaço de malte) e diferentes níveis de composição para cada, obtendo ao final uma resposta de ensaio dinâmico mecânico de compressão para avaliação dos fatores que mais contribuem para resistência do material final.

Ainda, conforme observado no trabalho, durante o ensaio de biorremediação as esferas possuem tendência de permanecer ao fundo, o que pode ser um problema para uso de esferas de alginato em biorremediação *in situ*. Tal problema já foi abordado por Luo *et al* (2021), que utilizou proso millet (painço) como material nutriente e material flutuante, permitindo maior contato entre microrganismos e a contaminação de petróleo que tende a permanecer na superfície. Desta forma, também será necessário, em um trabalho futuro, realizar a produção das esferas com algum material que possa fornecer flutuabilidade para o produto, permitindo maior interface entre os microrganismos e o local contaminado com hidrocarbonetos alifáticos de petróleo.

APOIO

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

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABIOYE, O. P.; AGAMUTHU, P.; ABDUL AZIZ, A. R. Biodegradation of Used Motor Oil in Soil Using Organic Waste Amendments. **Biotechnology Research International**, [s. l.], v. 2012, p. 1–8, 2012.

AKMAZ, S. *et al.* The structural characterization of saturate, aromatic, resin, and asphaltene fractions of Batiraman crude oil. **Petroleum Science and Technology**, [s. l.], v. 29, n. 2, p. 160–171, 2011.

AL-HAWASH, Adnan B. *et al.* Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. **Egyptian Journal of Aquatic Research**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 71–76, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.001>.

ALIYU, S; BALA, M. Brewer's spent grain: A review of its potentials and applications. **African Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 10, n. 3, p. 324–331, 2013. Disponível em: <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/92219>.

ANDERSEN, S. I.; SPEIGHT, J. G. Petroleum resins: Separation, character, and role in petroleum. **Petroleum Science and Technology**, [s. l.], v. 19, n. 1–2, p. 1–34, 2001.

ANGELIM, Alysson Lira *et al.* An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosan beads. **Journal of Environmental Management**, [s. l.], v. 127, p. 10–17, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.04.014>.

AUSHEVA, Kh A. *et al.* Development of a bacterial preparation based on immobilized cells. **Theoretical Foundations of Chemical Engineering**, [s. l.], v. 42, n. 5, p. 767–773, 2008.

AZUBUIKE, Christopher Chibueze; CHIKERE, Chioma Blaise; OKPOKWASILI, Gideon Chijioke. Bioremediation techniques—classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 32, n. 11, 2016.

BACHMANN, Suyanne Angie Lunelli; CALVETE, Tatiana; FÉRIS, Liliana Amaral. Potential applications of brewery spent grain: Critical an overview. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [s. l.], v. 10, n. 1, 2022.

BAYAT, Zeynab; HASSANSHAHIAN, Mehdi; CAPPELLO, Simone. Immobilization of Microbes for Bioremediation of Crude Oil Polluted Environments: A Mini Review. **The open microbiology journal**, [s. l.], v. 9, p. 48–54, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26668662%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4676050>.

BICKERSTAFF, GORDON, F. **Immobilization of Enzymes and Cells**. [S. l.: s. n.], 1997.

BIDWELL, J. P., SPOTTE, S. Artificial seawaters. Formulas and methods. **Boston: Jones and Bartlett publishers**, [s. l.], p. 350, 1985.

BOOPATHY, R. Factors limiting bioremediation technologies. **Bioresource Technology**, [s.

l.], v. 74, n. 1, p. 63–67, 2000.

BOROLE, Abhijeet P.; HAMILTON, Choo Y. Chapter 5 Energy Production from Food Industry. **Emerging Environmental Technologies, Vol II**, [*s. l.*], p. 97–113, 2010.

CASSIDY, M. B.; LEE, H.; TREVORS, J. T. Environmental applications of immobilized microbial cells: A review. **Journal of Industrial Microbiology**, [*s. l.*], v. 16, n. 2, p. 79–101, 1996.

CHAMBERS, D. M. *et al.* 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 Net. **Environmental Science and Technology**, [*s. l.*], v. 52, n. 1, p. 308–316, 2018.

CHAN, Eng Seng *et al.* Effect of formulation of alginate beads on their mechanical behavior and stiffness. **Particuology**, [*s. l.*], v. 9, n. 3, p. 228–234, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.partic.2010.12.002>.

COSTA, Maria J. *et al.* Physicochemical properties of alginate-based films: Effect of ionic crosslinking and mannuronic and guluronic acid ratio. **Food Hydrocolloids**, [*s. l.*], v. 81, p. 442–448, 2018.

COVARRUBIAS, Sergio A. *et al.* Alginate beads provide a beneficial physical barrier against native microorganisms in wastewater treated with immobilized bacteria and microalgae. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [*s. l.*], v. 93, n. 6, p. 2669–2680, 2012.

CUI, Chen *et al.* Molecular Representation of the Petroleum Gasoline Fraction. **Energy and Fuels**, [*s. l.*], v. 32, n. 2, p. 1525–1533, 2018.

DABIRI, Seyed Mohammad Hossein *et al.* New in-situ synthesized hydrogel composite based on alginate and brushite as a potential pH sensitive drug delivery system. **Carbohydrate Polymers**, [*s. l.*], v. 177, p. 324–333, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.08.046>.

DARAH, I.; NISHA, M.; LIM, Sheh Hong. Polygalacturonase Production by Calcium Alginate Immobilized Enterobacter aerogenes NBO2 Cells. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [*s. l.*], v. 175, n. 5, p. 2629–2636, 2015.

DE JONG, Ed; JUNGMEIER, Gerfried. Chapter 1 - Biorefinery Concepts in Comparison to Petrochemical Refineries A2 - Pandey, Ashok. *In*: HÖFER, Rainer *et al.* (org.). Amsterdam: Elsevier, 2015. p. 3–33. *E-book*. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978044463453500001X>.

DELLAGNEZZE, Bruna Martins *et al.* Bioremediation potential of microorganisms derived from petroleum reservoirs. **Marine Pollution Bulletin**, [*s. l.*], v. 89, n. 1–2, p. 191–200, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.10.003>.

DEMIRBAS, Ayhan. Biorefineries: Current activities and future developments. **Energy Conversion and Management**, [*s. l.*], v. 50, n. 11, p. 2782–2801, 2009. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196890409002519>. Acesso em: 15 jul.

2014.

DENG, Mao Cheng *et al.* Isolation and characterization of a novel hydrocarbon-degrading bacterium *Achromobacter* sp. HZ01 from the crude oil-contaminated seawater at the Daya Bay, southern China. **Marine Pollution Bulletin**, [s. l.], v. 83, n. 1, p. 79–86, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.04.018>.

DZIOŃEK, Anna; WOJCIESZYŃSKA, Danuta; GUZIK, Urszula. Natural carriers in bioremediation: A review. **Electronic Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 23, p. 28–36, 2016.

EICHLER, Paulo *et al.* BIOMETHANOL PRODUCTION VIA GASIFICATION OF LIGNOCELLULOSIC BIOMASS. **Química Nova**, [s. l.], v. 38, n. 6, p. 828–835, 2015. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/v38n6a12.pdf>.

EICHLER, Paulo *et al.* Lipase production by *Aspergillus brasiliensis* in solid-state cultivation of malt bagasse in different bioreactors configurations. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [s. l.], v. 92, p. 1–15, 2020.

EL-MOHDY, H. L. Abd. Radiation-induced degradation of sodium alginate and its plant growth promotion effect. **Arabian Journal of Chemistry**, [s. l.], v. 10, p. S431–S438, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.10.003>.

EŞ, Ismail; VIEIRA, José Daniel Gonçalves; AMARAL, André Corrêa. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 99, n. 5, p. 2065–2082, 2015.

FARIA, Douglas José. **Biorremediação Em Derramamento De Petróleo Com Ênfase Na Técnica De Encapsulamento De Micro-Organismos Consorciados**. 2019. 122 f. - Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, [s. l.], 2019. Disponível em: <https://repositorio.pucrs.br/dspace/bitstream/10923/16459/1/000497239-Texto%2Bcompleto-0.pdf>.

FARIA, Douglas. **Biorremediação em derramamento de petróleo com ênfase na técnica de encapsulamento de microrganismos consorciados**. 2019. [s. l.], 2019.

FARIA, Douglas *et al.* Production and analysis of capsules containing microorganisms consortiated for future application in petroleum bioremediation. **Biodegradation**, [s. l.], v. 9, 2021.

GARCÍA, Araceli *et al.* The nanocellulose biorefinery: woody versus herbaceous agricultural wastes for NCC production. **Cellulose**, [s. l.], v. 24, n. 2, p. 693–704, 2017.

GAYLARDE, Claire Christine; BELLINASSO, Maria De Lourdes; MANFIO, Gilson Paulo. Biorremediação: Aspectos Biológicos e Técnicos da Biorremediação de Xenobióticos. **Biociência e Desenvolvimento**, [s. l.], p. 36–43, 2005. Disponível em: http://www.biociencia.com.br/revista/bio34/biorremediacao_34.pdf.

GERACI, J. R.; AUBIN, D. J. Synthesis of Effects of Oil. [s. l.], n. 14, 1988.

GILDE, Kailen; PINCKNEY, James L. Sublethal Effects of Crude Oil on the Community Structure of Estuarine Phytoplankton. **Estuaries and Coasts**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 853–861,

2012.

GLOBO. Cerveja contribuiu com 2,1% do PIB brasileiro em 2021. [s. l.], 2022. Disponível em: <https://valorinveste.globo.com/mercados/brasil-e-politica/noticia/2022/03/05/cerveja-contribuiu-com-21-pontos-percentuais-do-pib-brasileiro-em-2021.ghtml>.

GUO, Ting *et al.* Mechanical and drug release properties of alginate beads reinforced with cellulose. **Journal of Applied Polymer Science**, [s. l.], v. 134, n. 8, p. 1–9, 2017.

IBAMA. **Registro de Dispersantes**. [S. l.], 2022. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/registros/quimicos-e-biologicos/dispersantes-quimicos#lista-produtos-registrados>.

JURY, Christopher P. *et al.* Buffer capacity, ecosystem feedbacks, and seawater chemistry under global change. **Water (Switzerland)**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 1303–1325, 2013.

KALGHATGI, Gautam. Is it really the end of internal combustion engines and petroleum in transport?. **Applied Energy**, [s. l.], v. 225, n. February, p. 965–974, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2018.05.076>.

KAWAGUTI, Haroldo Yukio; SATO, Hélia Harumi. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. **Química Nova**, [s. l.], v. 31, n. 1, p. 134–143, 2008.

KHANPOUR-ALIKELAYEH, Elham *et al.* Enhanced biodegradation of light crude oil by immobilized *Bacillus licheniformis* in fabricated alginate beads through electrospray technique. **Environmental Monitoring and Assessment**, [s. l.], v. 193, n. 6, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09104-z>.

KLEIN, J.; STOCK, J.; VORLOP, K. D. Pore size and properties of spherical Ca-alginate biocatalysts. **European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 18, n. 2, p. 86–91, 1983.

KOK KEE, W. *et al.* Self-immobilised bacterial consortium culture as ready-to-use seed for crude oil bioremediation under various saline conditions and seawater. **International Journal of Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 12, n. 7, p. 2253–2262, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s13762-014-0619-7>.

KUNIHIRO, Namio *et al.* Isolation and characterization of *Rhodococcus* sp. strains TMP2 and T12 that degrade 2,6,10,14-tetramethylpentadecane (pristane) at moderately low temperatures. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 115, n. 2, p. 129–136, 2005.

KUZHAEVA, Alena; BERLINSKII, Igor. Effects of oil pollution on the environment. **International Multidisciplinary Scientific GeoConference Surveying Geology and Mining Ecology Management, SGEM**, [s. l.], v. 18, n. 5.1, p. 313–320, 2018.

LEE, Kangseok *et al.* Dual ionic crosslinked interpenetrating network of alginate-cellulose beads with enhanced mechanical properties for biocompatible encapsulation. **Cellulose**, [s. l.], v. 24, n. 11, p. 4963–4979, 2017.

LIN, Chen *et al.* Biodegradation of naphthalene using a functional biomaterial based on

immobilized *Bacillus fusiformis* (BFN). **Biochemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 90, p. 1–7, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2014.05.003>.

LIN, Ning; BRUZZESE, Cécile; DUFRESNE, Alain. TEMPO-oxidized nanocellulose participating as crosslinking aid for alginate-based sponges. **ACS Applied Materials and Interfaces**, [s. l.], v. 4, n. 9, p. 4948–4959, 2012.

LIU, Jun *et al.* Alginate Oligosaccharides: Production, Biological Activities, and Potential Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 1859–1881, 2019.

MOHAMMED, Nishil *et al.* Cellulose nanocrystal–alginate hydrogel beads as novel adsorbents for organic dyes in aqueous solutions. **Cellulose**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 3725–3738, 2015.

MOHAN, S. Venkata *et al.* Waste Biorefinery: A New Paradigm for a Sustainable Bioelectro Economy. **Trends in Biotechnology**, [s. l.], v. 34, n. 11, p. 852–855, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.06.006>.

MUSSATTO, S. I.; DRAGONE, G.; ROBERTO, I. C. Brewers' spent grain: Generation, characteristics and potential applications. **Journal of Cereal Science**, [s. l.], v. 43, n. 1, p. 1–14, 2006.

NEAMAH, Ali Ibrahim. Separation of the Petroleum System. **The Hilltop Review**, [s. l.], v. 7, n. 1, 2014.

OBUEKWE, C. O.; AL-MUTTAWA, Esraa M. Self-immobilized bacterial cultures with potential for application as ready-to-use seeds for petroleum bioremediation. **Biotechnology Letters**, [s. l.], v. 23, n. 13, p. 1025–1032, 2001.

OGUGBUE, Chimezie Jason; MBAKWEM-ANIEBO, Chiaka; SOLOMON, Leera. Efficacy of brewery spent grain and rabbit droppings on enhanced ex situ bioremediation of an aged crude oil contaminated soil. Efficacy of brewery spent grain and rabbit droppings on enhanced ex situ bioremediation of an aged crude oil contaminated soil. [s. l.], v. 5, n. April, p. 27–39, 2017.

OLLIVIER, Bernard; MAGOT, Michel. **Petroleum Microbiology**. [S. l.: s. n.], 2005.

OUWERX, C. *et al.* Physico-chemical properties and rheology of alginate gel beads formed with various divalent cations. **Polymer Gels and Networks**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 393–408, 1998.

PALA, Danielle M. *et al.* A suitable model to describe bioremediation of a petroleum-contaminated soil. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s. l.], v. 58, n. 3–4, p. 254–260, 2006.

PARTOVINIA, Ali; RASEKH, Behnam. Review of the immobilized microbial cell systems for bioremediation of petroleum hydrocarbons polluted environments. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 1–38, 2018.

PATRICK, Alexandre *et al.* Técnicas de limpeza de vazamentos de petróleo em alto mar. **Cadernos de Graduação - Ciências Exatas e Tecnológicas**, [s. l.], v. 1, n. 15, p. 75–86, 2012.

PAYNE, Jerry F. Critique of “Petroleum and Marine Fishes: A Review of Uptake Disposition and Effects”. **Environmental Science and Technology**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 370–372, 1982.

PENA, Paulo Gilvane Lopes *et al.* Derramamento de óleo bruto na costa brasileira em 2019: emergência em saúde pública em questão. **Cadernos de saúde pública**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. e00231019, 2020.

PEREIRA, Evandro *et al.* Biodegradation of aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater by autochthonous microorganisms. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s. l.], v. 145, n. July, p. 104789, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2019.104789>.

PEREIRA, J. E. S. **PROSPECCÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ISOLADOS MICROBIANOS PARA A BIORREMEDIAÇÃO DE AMBIENTES MARINHOS CONTAMINADOS POR PETRÓLEO E MISTURAS DE ÓLEO DIESEL/BIODIESEL** José. 2018. 30–55 f. [s. l.], 2018.

PERULLINI, Mercedes *et al.* Alginate/porous silica matrices for the encapsulation of living organisms: tunable properties for biosensors, modular bioreactors, and bioremediation devices. **Open Material Sciences**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 3–12, 2015.

PHILP, R. P. **Petroleum Formation and Occurrence**. [S. l.: s. n.], 1985-. ISSN 0096-3941.v. 66

QIAO, Fangli *et al.* Modelling oil trajectories and potentially contaminated areas from the Sanchi oil spill. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 685, p. 856–866, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.255>.

RAVINDRAN, Rajeev *et al.* A review on bioconversion of agro-industrial wastes to industrially important enzymes. **Bioengineering**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 1–20, 2018.

REUTERS. Column: Oil prices soar even as consumption remains below trend. [s. l.], 2021. Disponível em: <https://www.reuters.com/business/energy/oil-prices-soar-even-consumption-remains-below-trend-kemp-2021-06-25/>.

ROCHA, Carlos A.; PEDREGOSA, Ana M.; LABORDA, Fernando. Biosurfactant-mediated biodegradation of straight and methyl-branched alkanes by pseudomonas aeruginosa ATCC 55925. **AMB Express**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1–10, 2011.

ROY, Ajoy *et al.* Biostimulation and bioaugmentation of native microbial community accelerated bioremediation of oil refinery sludge. **Bioresource Technology**, [s. l.], v. 253, n. January, p. 22–32, 2018.

SANTOS, Fernando *et al.* By-products of the sugarcane industry. In: SUGARCANE BIREFINERY, TECHNOLOGY AND PERSPECTIVES. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 21–48. *E-book*. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128142363000020>.

SILVÉRIO, Gabriela Barros. **PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA ASSOCIADA À INTERAÇÃO ELETROSTÁTICA COM CONCENTRADO PROTEICO DE SOJA**. 2018. 85 f. - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, [s. l.],

2018.

STOUT, A. Scott; WANG, Zhendi. **Oil Spill Environmental Forensics Case Studies**. [S. l.: s. n.], 2018.

TAHSEEN, Razia *et al.* Rhamnolipids and nutrients boost remediation of crude oil-contaminated soil by enhancing bacterial colonization and metabolic activities. **International Biodeterioration and Biodegradation**, [s. l.], v. 115, p. 192–198, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.08.010>.

TAO, Xue Qin *et al.* Rapid degradation of phenanthrene by using *Sphingomonas* sp. GY2B immobilized in calcium alginate gel beads. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. 2470–2480, 2009.

TERRASAN, C.R.F.; CARMONA, E.C. Solid-state fermentation of brewer's spent grain for xylanolytic enzymes production by *penicillium janczewskii* and analyses of the fermented substrate | Fermentação em estado sólido com bagaço de cevada para produção de enzimas xilanolíticas por *penicilli*. **Bioscience Journal**, [s. l.], v. 31, n. 6, p. 1826–1836, 2015.

THIAGO, Rocha dos Santos Mathias; PEDRO, Paulo Moretzsohn de Mello; ELIANA, Flavia Camporese Srvulo. Solid wastes in brewing process: A review. **Journal of Brewing and Distilling**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1–9, 2014. Disponível em: <http://academicjournals.org/journal/JBD/article-abstract/0E6313746212>.

TOMOVIĆ, Nataša S. *et al.* Uticaj brzine kompresije i procenta deformacije na mehaničke karakteristike kalcijum alginatnih čestica. **Chemical Industry and Chemical Engineering Quarterly**, [s. l.], v. 21, n. 3, p. 411–417, 2015.

VOO, Wan Ping *et al.* Calcium alginate hydrogel beads with high stiffness and extended dissolution behaviour. **European Polymer Journal**, [s. l.], v. 75, p. 343–353, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.12.029>.

WAIKHOM, David *et al.* Role of Microbes in Petroleum Hydrocarbon Degradation in the Aquatic Environment: A Review. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 2990–2993, 2020.

WANG, Zhen Yu *et al.* Biodegradation of Crude Oil in Contaminated Soils by Free and Immobilized Microorganisms. **Pedosphere**, [s. l.], v. 22, n. 5, p. 717–725, 2012. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160\(12\)60057-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1002-0160(12)60057-5).

WANG, Long Feng; SHANKAR, Shiv; RHIM, Jong Whan. Properties of alginate-based films reinforced with cellulose fibers and cellulose nanowhiskers isolated from mulberry pulp. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 63, p. 201–208, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.08.041>.

XIROS, Charilaos; CHRISTAKOPOULOS, Paul. Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by a *Fusarium oxysporum* consolidated system. **Biotechnology for Biofuels**, [s. l.], v. 2, p. 1–12, 2009.

XUE, Jianliang *et al.* Study on the degradation performance and kinetics of immobilized cells in straw-alginate beads in marine environment. **Bioresource Technology**, [s. l.], p. 88–94,

2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.02.019>.

ZINJARDE, Smita S.; PANT, Aditi. Crude oil degradation by free and immobilized cells of *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 755–763, 2000. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10934520009377000>.

ZVULUNOV, Yael; RADIAN, Adi. Alginate Composites Reinforced with Polyelectrolytes and Clay for Improved Adsorption and Bioremediation of Formaldehyde from Water. **ACS ES&T Water**, [s. l.], v. 1, n. 8, p. 1837–1848, 2021.

9. ANEXO

A1 – Ficha técnica do consórcio comercial obtido através da Enzilimp.



NOME DO PRODUTO: ENZILIMP®

APLICAÇÃO: HC - HIDROCARBONETOS

ENZILIMP é uma mistura de culturas bacterianas especialmente desenhadas para degradar as frações leves resultantes da destilação do petróleo, bem como as frações de hidrocarbonetos mais pesadas normalmente associadas aos óleos combustíveis n° 4, n° 5 e n° 6, óleo cru e piche de carvão. Essas culturas são de ocorrência natural, seletivamente adaptadas e tolerantes a altas concentrações de contaminantes.

Benefícios:

- Descontamina solo e água subterrânea contendo hidrocarbonos resultantes do vazamento subterrâneo de tanques de armazenagem, vazamentos em tubulações de transferência e derramamentos;
- Elimina ou reduz alguns danos ambientais através da biodegradação da pluma de contaminação;
- Degrada rapidamente todos os componentes orgânicos principais dos óleos combustíveis n° 4, n° 5 e n° 6, óleo cru e piche de carvão;
- Pode tolerar concentrações de petróleo inibitórias, que para muitas populações endógenas pode ser um fator limitante.

Vantagens:

- Remedia com o mínimo de dano local.
- Fornece uma técnica natural e ecologicamente correta para a remediação.
- Aumenta a degradação de hidrocarbonetos de petróleo em sistemas de tratamento de água residual biológica.

Características do produto:

Contagem de bactérias	> 1,5 x 10 ⁸ UFC/grama
Estabilidade	Perda máxima de 1,0 log/ano quando armazenado conforme recomendado
Aparência	Pó marrom claro
Odor	Semelhante ao fermento

UFC: unidades formadoras de colônias



NOME DO PRODUTO: ENZILIMP®

APLICAÇÃO: HC - HIDROCARBONETOS

Embalagens disponíveis:

- Barricas de papelão com capacidade para 3, 10 e 20 kg.

Preparação do produto:

Para os efluentes tóxicos ou tempos curtos de retenção, a reidratação/inoculação em recipiente apropriado durante 30 – 90 minutos antes da adição a um sistema é recomendada usando a proporção de 1 kg de produto para 20 litros de água (30% afluente x 70% de água). Para melhores resultados, a temperatura da água de mistura deve estar entre 20 a 30°C.

Para tratamento de solo contaminado, é utilizado de forma mais adequada quando for aplicado a uma superfície antes de trabalhar o próprio solo. As taxas de dosagem para o produto variam com base na concentração da contaminação a ser atacada e no tipo de solo. Como regra geral, a dosagem estará entre 600 gramas por metro cúbico (líquidos) ou metro quadrado (solos) até 1.200 gramas por metro cúbico ou metro quadrado. Recomendamos usar o Enzilimp HC nos solos e águas em que o contaminante a ser atacado seja composto por uma variedade de destilados petrolíferos.

Condições ideais para aplicação:

As bactérias do **ENZILIMP** atuam dentro de uma faixa de pH de 7,0 – 9,0, com ótimo desempenho tipicamente próximo de 7,0. A temperatura do efluente afeta a atividade com uma duplicação aproximada na taxa de crescimento máximo por cada aumento de 10°C na temperatura até um limite superior aproximado de 40°C. Uma atividade muito baixa pode ser esperada abaixo de 5°C.

Armazenamento e manuseio:

Amazemar em local seco e fresco. Lavar inteiramente as mãos com água morna com sabão após o manuseio. Evitar contato com os olhos.

MILLENNIUM TECNOLOGIA AMBIENTAL LTDA.

Av. A. J. Renner, 1426 – Humaitá – Porto Alegre / RS

fone: (51) 30700700 fax: (51) 30700700 – CEP: 90200-000

Site: www.enzilimp.com.br

e-mail: enzilimp@enzilimp.com.br

10. APENDICE

A1 – Composição do meio Salino Sintético

- Cloreto de Sódio 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 Potásio 0,027 g.L⁻¹
- Cloreto de Estrôncio 0,02 g.L⁻¹
- Sulfato de Manganês 0,004 g.L⁻¹
- Molibdato de Sódio 0,001 g.L⁻¹

A2 – Mapa das médias de temperatura da superfície do mar na costa brasileira, conforme NOAA (*Image provided by Physical Sciences Division, Earth System Research Laboratory, NOAA, Boulder, Colorado, from their Web site at <http://www.esrl.noaa.gov/psd/>*).

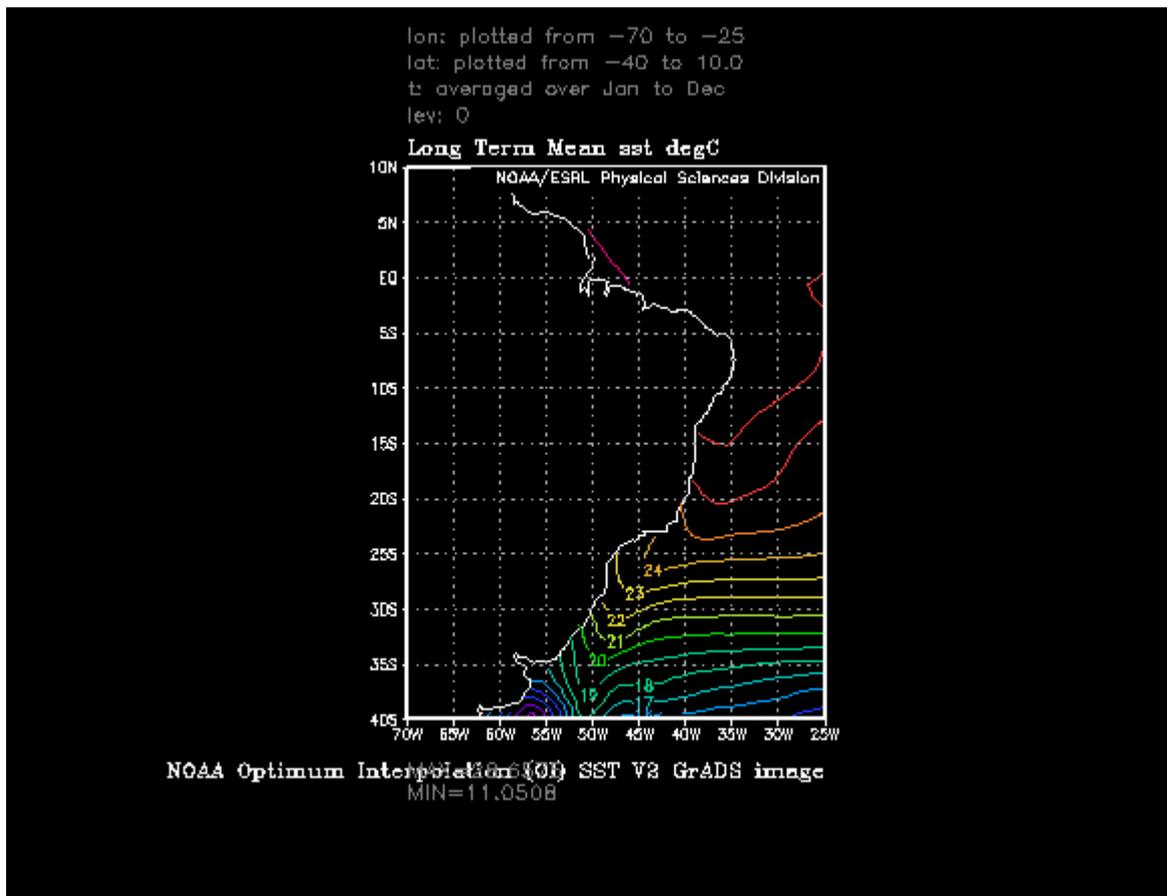


Figura A2 – Mapa das médias de temperatura da superfície do mar na costa brasileira, conforme NOAA.

A3 – Caracterização físico-química do bagaço de malte utilizado neste trabalho (EICHLER *et al.*, 2020).

Table II. Physico-chemical characterization of the spent malt bagasse used in this work.

Composition (% components in dry basis)	
Moisture	76.56 ± 0.94*
Lipids	4.00 ± 0.39
Proteins	15.06 ± 2.27
Ashes	3.64 ± 0.09
Cellulose	24.32 ± 0.08
Hemicellulose	22.27 ± 0.05
Soluble Lignin	3.79 ± 0.01
Insoluble Lignin	18.87 ± 3.30

*Standard deviations for composition.

Figura A3 – Caracterização físico-química do bagaço de malte utilizado neste trabalho.