UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS – RIO CLARO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(MICROBIOLOGIA APLICADA)

BIODEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DO PETRÓLEO COM A APLICAÇÃO DE BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Bacillus subtilis*

RENATO NALLIN MONTAGNOLLI

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Rio Claro - SP
Março - 2011

BIODEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DO PETRÓLEO COM A APLICAÇÃO DE BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Bacillus subtilis*

RENATO NALLIN MONTAGNOLLI

Orientador: Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada).

Rio Claro – SP

Março/2011

620.1122 Montagnolli, Renato Nallin
M758b Biodegradação de derivados do petróleo com a aplicação de biossurfactante produzido por Bacillus subtilis / Renato Nallin Montagnolli. - Rio Claro : [s.n.], 2011
245 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Edério Dino Bidóia

1. Biodegradação. 2. Biorremediação. 3. Hidrocarbonetos. 4. Respirometria. 5. Colorimetria. 6. Toxicidade. I. Título.

Ficha Catalográfica elaborada pela STATI - Biblioteca da UNESP
Campus de Rio Claro/SP

unesp **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

CAMPUS DE RIO CLARO

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE RIO CLARO

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: BIODEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DO PETRÓLEO COM A APLICAÇÃO DE BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR Bacillus subtilis

AUTOR: RENATO NALLIN MONTAGNOLLI

ORIENTADOR: Prof. Dr. EDÉRIO DINO BIDÓIA

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM CIENCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA) , pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. EDÉRIO DINO BIDÓIA
Departamento de Bioquimica e Microbiologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Prof. Dr. EDSON APARECIDO ABDUL NOUR
Depto de Saneamento e Ambiente / Faculdade de Engenharia Civil, Arquitetura e Urbanismo - UNICAMP

Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro

Data da realização: 16 de março de 2011.

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais: Marli e Décio, meu irmão Ricardo e meus tios Mariza e Durval por todo apoio durante a minha vida.

Ao Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia, pela orientação e confiança, que permitiram a realização desse trabalho.

À Universidade Estadual Paulista (UNESP), e a todo o corpo docente que têm construído e participado da minha formação ao longo de seis anos.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro concedido.

Ao Departamento de Bioquímica e Microbiologia, e a todos os amigos e colegas de laboratório: Chal, Grazy, Burns, Érica, César, Angela, Vivis, Paula, Tati, Alex, Roberta, Paulo e Fabrício. Pessoas que eu fico feliz por conviver todos os dias e espero construir uma amizade ainda maior a cada dia.

Ao todos os técnicos do departamento, e principalmente ao Beto, pela atenção e muitas ajudas nos meus experimentos; à Fatima pela paciência e informações fundamentais para realização desse trabalho, e à Lu, por todo o carinho e ajudas com as soluções e reagentes.

Às pessoas que são parte importante da minha vida todos os dias: Minhoca, Paula e Mangá. Também a todos os colegas e amigos dos tempos de Alpha, que eu tive o

prazer de conviver e conhecer ao longo da graduação: Momo, Confirma, Biga, Xaxim, Franco, Sombra, Playmobil, Larinha, Carlos, Rafa e Maíra.

Às amizades de Campinas, Jasmin e Flávia, por todo apoio durante muitos anos. Aos não tão presentes ultimamente, mas não menos importantes: Isa, Marcelo e Bruno.

Ao *Bacillus subtilis*, que apesar de um início conturbado de relação, decidiu finalmente trabalhar como deveria, permitindo a realização desse trabalho.

Enfim, a todos as pessoas que estiveram em minha vida me ajudando a crescer e me tornar a cada dia uma pessoa melhor. Muito obrigado!

“Der Stolz mit Ahnen und Wissen verbunden liegt wie ein blendendes Nebel über die Augen und Sinne der Menschen, so täuschen sie über den Wert der Existenz.”

(O orgulho associado ao conhecimento e às sensações paira como uma névoa sobre os olhos e sentidos dos homens, desviando deles a atenção sobre o valor da existência)

Friedrich Wilhelm Nietzsche

RESUMO

A biodegradação tem sido há muito tempo um dos principais campos de pesquisa em microbiologia, cuja utilidade inclui a biodegradação de substâncias orgânicas e inorgânicas. Microrganismos podem ser ótimas ferramentas de remoção de poluentes em solo, água e sedimentos pelas suas inúmeras vantagens sobre outros processos. Para a limpeza de ambientes com hidrocarbonetos pela biorremediação deve-se explorar a habilidade dos microrganismos e compreender a maneira pela qual o processo ocorre em diferentes derivados do petróleo. Existem estudos que propõem a biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos pela inoculação de microrganismos com potencial biodegradador e a adição de biossurfactantes. O presente trabalho estudou a biodegradação de diferentes derivados do petróleo com a proposta de aprimorar o processo pelo uso de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*. Também foi avaliada a toxicidade das substâncias antes e depois da biodegradação. Os biossurfactantes produzidos foram adicionados aos ensaios de biodegradação de diferentes tipos de derivados do petróleo, incluindo óleo cru, compostos fenólicos, querosene, gasolina e óleos lubrificantes automotivos sintéticos e usados. Foram utilizados também, como comparação, óleos vegetais de soja e biodiesel. O estudo foi desenvolvido utilizando a técnica de respirometria a qual monitora a formação de CO_2. Também foi utilizada a técnica de colorimetria pela análise da coloração do indicador redox DCPIP. Assim, a partir dos dados obtidos foram observados os diferentes perfis de biodegradação das diferentes substâncias, a fim de obter uma descrição de como a aplicação de biossurfactante produzido por *B. subtilis* afeta a biodegradação dos derivados do petróleo. Observou-se que a biodegradação dos derivados do petróleo ocorreu pela ação de consórcio de microrganismos e pela presença de *B. subtilis*. A aplicação do biossurfactante produzido por *B. subtilis* nos ensaios gerou uma maior biodegradação, principalmente no petróleo cru e em óleos lubrificantes automotivos. O fenol, por sua vez, foi o derivado do petróleo menos biodegradado. Foi possível modelar matematicamente e prever o comportamento de biodegradação das substâncias estudadas. Com a adição do biossurfactante produzido, somada à pré-seleção de um consórcio microbiano e a adição de *B. subtilis* aos ensaios de biodegradação ocorreu à emulsificação e uma maior biodegradação das substâncias estudadas. Contudo, a biodegradação produziu na maior parte dos ensaios produtos de biodegradação mais tóxicos aos organismos-teste (alface e pepino) do que a substância original, embora a aplicação do biossurfactante à biodegradação provoque um menor aumento da toxicidade. Para os testes de toxicidade, foi observado que a alface foi menos sensível que o pepino.

Palavras-chave: biorremediação, hidrocarbonetos, respirometria, colorimetria, toxicidade

ABSTRACT

Biodegradation has been for a long time a main field of study in microbiology whose application includes organic and inorganic substances biodegradation. Microorganisms can be great pollutant removal tools in soil, water and sediments due to their advantages compared to other processes. In order to accomplish hydrocarbon-polluted environments cleanup by bioremediation, the microorganisms' capabilities must be exploited and studied, so then information on different petroleum byproducts can be achieved. Some studies propose environmental biorremediation not only by hydrocarbon-degrading microorganisms' insertion, but also by adding biossurfactants. In this work, different petroleum byproducts biodegradation was studied, aiming a biodegradation improvement through inclusion of a *Bacillus subtilis* produced biosurfactant. Biosurfactant production was also evaluated, as well as the substances toxicity before and after biodegradation. The biossurfactant produced was added to biodegradation assays of many different substances: crude oil, phenolic compounds, kerosene, gasoline and automotive lubricant oils. As a comparison, vegetable soy oils and biodiesel had their biodegradation performance evaluated. This study was developed by using the respirometric technique which is capable of evaluate CO_2 production during biodegradation. Also, another biodegradation monitoring technique was used with a redox dye and colorimetry. Thus, from data obtained, different biodegradation profiles were estabilished and a precise description on how the biossurfactant affects petroleum byproducts biodegradation could be designed. It was observed that biodegradation occurred through microorganism consortium and *B. subtilis*. Also, the biossurfactant application yielded a better biodegradation. The mathematical modeling of the biodegradation process was also possible. A higher emulsification from biossurfactant addition was observed on all assays, as it improved biodegradation. However, the biodegradation also yielded in most cases toxic metabolites and substances, which were even more toxic than the original substances. Yet even then, biossurfactants application caused less toxic biodegradation residuals.

Keywords: bioremediation, biodegradation, biosurfactant, petroleum byproducts, *Bacillus subtilis*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Hidrocarbonetos representativos na composição do petróleo. Tetradecano (um n-alcano), pristano (um alcano ramificado), metilciclopentano, ciclohexano e hopano estão presentes na fração saturada do óleo cru. Os outros compostos são da fração aromática (HARAYAMA, 1999)..... 29

Figura 2 – Quantidade de petróleo utilizada mundialmente em BTU (unidade térmica britânica do sistema imperial, sendo 1 J = 9.478×10^{-4} BTU) de acordo com a Energy Information Association, 2001..... 32

Figura 3 – Derivados do petróleo e suas aplicações (Adaptado de Ren et al., 2009)..... 35

Figura 4 – Quadro comparativo dos diferentes tipos de óleos lubrificantes automotivos (Adaptado de MMA, 2006)..... 37

Figura 5 – Modos de contaminação por petróleo durante produção, transporte, uso e descarte (Adaptado de Fetter, 1993)..... 43

Figura 6 – Imagem de satélite da região afetada pelo derramamento de petróleo pela Deepwater Horizon 46

Figura 7 – Fontes de contaminação dos oceanos em 1985 de acordo com o Conselho Nacional de Pesquisas dos Estados Unidos (NRC, 1985)..... 47

Figura 8 – Biodegradabilidade dos componentes do petróleo (Adaptado de Prince, 2007)..... 57

Figura 9 – Estrutura dos biossurfactantes e produção de micelas (Adaptado de Wilson, 2000)..... 63

Figura 10 – Molécula de surfactina (Adaptado de Kell et al., 2007)..... 68

Figura 11 – Frascos incubados a 35°C em incubadora Shaker Solab com agitação a 180 rpm para crescimento de *B. subtillis* e produção de biossurfactante..... 71

Figura 12 – Esquema da separação de biomassa e sobrenadante após crescimento de *B. subtilis* em BHI + Mg..... 72

Figura 13 – Tensiômetro de bancada Krüss modelo K6 (esquerda) e detalhe do anel de platina-irídio na superfície do liquido no qual a tensão superficial é medida..... 73

Figura 14 – Esquema da precipitação ácida..... 74

Figura 15 – Esquema da extração e ressolubilização..... 75

Figura 16 – Montagem dos testes para medida do índice de emulsificação
(E_{24})..... 76

Figura 17 – Sacola plástica para obtenção do inóculo contendo partes iguais de petróleo cru, óleos lubrificantes, óleos vegetais, biodiesel, querosene, diesel, gasolina e fenol antes de ser enterrada..... 78

Figura 18 – Esquema de um respirômetro de Bartha (CETESB, 1990). A: Tampa da cânula, B: Cânula (diâmetro de 1 a 2 mm). C: Rolha de borracha. D: Braço lateral (diâmetro de 40 mm; altura de 100 mm). E: Solução de KOH. F: Meio aquoso com a substância analisada. G: Frasco erlenmeyer (250 mL). H: Válvula. I: Suporte (lã de vidro ou algodão). J: Filtro de cal sodada (diâmetro de 15 mm; altura de 40 mm). 79

Figura 19 – Reação do 2,6-diclorofenol-indofenol como aceptor de elétrons. A mudança na ligação dupla entre o nitrogênio e carbono altera a estrutura da molécula (Adaptado de Vernon e Zaugg, 1960)..... 86

Figura 20 – Montagem dos ensaios colorimétricos..... 88

Figura 21 - Espectrofotômetro Hach Odyssey DR-2500 onde foi medida a absorbância nos ensaios colorimétricos..... 89

Figura 22 – Esquema dos testes de toxicidade realizados..... 91

Figura 23 – Montagem dos ensaios de toxicidade..... 92

Figura 24 – Semente de pepino e estruturas medidas..... 93

Figura 25 – Micrografia de cultura de *B. subtilis* em BHI enriquecido com magnésio após coloração de Gram..... 96

Figura 26 – Contagem em placa de UFC da menos diluída (esquerda) para mais diluída (direita)..... 96

Figura 27 – Biomassa de *B. subtilis* em Caldo BHI enriquecido com magnésio..... 98

Figura 28 – Rendimento de surfactante produzido por *B. subtilis* e tensão superficial em Caldo BHI enriquecido com magnésio..... 98

Figura 29 – Formação de espuma em meio BHI + Mg após produção de biossurfactante..... 99

Figura 30 – Índice de emulsificação (E_{24}) para as substâncias testadas, sendo: petróleo (1), óleo lubrificante (2), lubrificante usado (3), diesel (4), querosene (5), gasolina (6), óleo vegetal (7), vegetal usado (8) e biodiesel (9)..... 101

Figura 31 – Produção semanal de CO_2 nos ensaios respirométricos S00 (Controle), S01 (Petróleo), S02 (Óleo lubrificante), S03 (Óleo lubrificante usado), S04 (Óleo Diesel), S05 (Gasolina), S06 (Querosene), S07 (Fenol), S08 (Óleo de soja), S09 (Óleo de soja usado) e S10 (Biodiesel B100) com e sem biossurfactante. Uma regressão polinomial de 2ª ordem (Apêndice 8.2.4.) foi traçada a fim de facilitar a visualização da biodegradação semanal..... 103

Figura 32 – Produção acumulada de CO_2 nos ensaios respirométricos S00 (Controle), S01 (Petróleo), S02 (Óleo lubrificante), S03 (Óleo lubrificante usado), S04 (Óleo Diesel), S05 (Gasolina), S06 (Querosene), S07 (Fenol), S08 (Óleo de soja), S09 (Óleo de soja usado) e S10 (Biodiesel B100) com e sem biossurfactante..... 107

Figura 33 – Produção semanal de CO_2 em função do tempo de biodegradação ajustada ao modelo de Membré et al. (1996) em S00 (Controle), S01 (Petróleo), S02 (Óleo lubrificante), S03 (Óleo lubrificante usado), S04 (Óleo Diesel), S05 (Gasolina), S06 (Querosene), S07 (Fenol), S08 (Óleo de soja), S09 (Óleo de soja usado) e S10 (Biodiesel B100) com e sem biossurfactante..... 110

Figura 34 – Produção acumulada de CO_2 em função do tempo de biodegradação ajustada ao modelo de Schmidt et al. (1985) em S00 (Controle), S01 (Petróleo), S02 (Óleo lubrificante), S03 (Óleo lubrificante usado), S04 (Óleo Diesel), S05 (Gasolina), S06 (Querosene), S07 (Fenol), S08 (Óleo de soja), S09 (Óleo de soja usado) e S10 (Biodiesel B100) com e sem biossurfactante..... 117

Figura 35 – Comparação entre os valores de tempo final de biodegradação fornecidos pelos dois modelos (BmaxT e BRminT) em S00 (Controle), S01 (Petróleo), S02 (Óleo lubrificante), S03 (Óleo lubrificante usado), S04 (Óleo Diesel), S05 (Gasolina), S06 (Querosene), S07 (Fenol), S08 (Óleo de soja), S09 (Óleo de soja usado) e S10 (Biodiesel B100) com e sem biossurfactante..... 124

Figura 36– Escala de tons de vermelho adotada no teste F..... 125

Figura 37 – Descoloração do indicador DCPIP nos ensaios contendo biodiesel (A10, B10 e S10). Da esquerda para a direita nos tubos de ensaio estão contidos caldo BH, C0, C1, C2, C3, A10, B10 e S10. O tempo de captura das imagens foi de 4 h (a), 46 h (b), 52 (c) e 88 h (d).. 128

Figura 38 – Espectro de absorbância do DCPIP..... 129

Figura 39 – Descoloração do indicador DCPIP analisada por espectrofotometria no comprimento de 600 nm nos ensaios controle (C0, C1, C2 e C3), apenas substrato (A1 a A10), substrato + *B. subtilis* (B1 a B10) e substrato + *B. subtilis* + biossurfactante (S1 a S10)..... 130

Figura 40 – Porcentagem de inibição do metabolismo de *B. subtilis* em diferentes substâncias, sendo petróleo (1), lubrificante sintético (2), 140

lubrificante usado (3), diesel (4), gasolina (5), querosene (6), fenol (7), óleo vegetal (8), óleo vegetal usado (9) e biodiesel (10).....

Figura 41 – Porcentagem média de germinação e porcentagem de inibição para alface, submetidas a diferentes substâncias, sendo petróleo (1), lubrificante sintético (2), lubrificante usado (3), diesel (4), gasolina (5), querosene (6), fenol (7), óleo vegetal (8), óleo vegetal usado (9) e biodiesel (10)..... 143

Figura 42 – Comprimento médio da raiz e hipocótilo em alface, submetidas a diferentes substâncias, sendo petróleo (1), lubrificante sintético (2), lubrificante usado (3), diesel (4), gasolina (5), querosene (6), fenol (7), óleo vegetal (8), óleo vegetal usado (9) e biodiesel (10)..... 144

Figura 43 – Porcentagem de inibição do crescimento de raiz e hipocótilo para alface, submetidas a diferentes substâncias, sendo petróleo (1), lubrificante sintético (2), lubrificante usado (3), diesel (4), gasolina (5), querosene (6), fenol (7), óleo vegetal (8), óleo vegetal usado (9) e biodiesel (10)..... 146

Figura 44 – Porcentagem média de germinação e porcentagem de inibição para pepino, submetidas a diferentes substâncias, sendo petróleo (1), lubrificante sintético (2), lubrificante usado (3), diesel (4), gasolina (5), querosene (6), fenol (7), óleo vegetal (8), óleo vegetal usado (9) e biodiesel (10)..... 147

Figura 45 – Comprimento médio da raiz e hipocótilo em alface, submetidas a diferentes substâncias, sendo petróleo (1), lubrificante sintético (2), lubrificante usado (3), diesel (4), gasolina (5), querosene (6), fenol (7), óleo vegetal (8), óleo vegetal usado (9) e biodiesel..... 148

Figura 46 – Porcentagem de inibição do crescimento de raiz e hipocótilo para alface, submetidas a diferentes substâncias, sendo petróleo (1), lubrificante sintético (2), lubrificante usado (3), diesel (4), gasolina (5), querosene (6), fenol (7), óleo vegetal (8), óleo vegetal usado (9) e biodiesel (10)..... 149

Figura 47 – Germinação de sementes de pepino (esquerda) e alface (direita) em meio contendo petróleo 1% v/v..... 154

Figura 48 – Biodegradação de óleo vegetal usado acompanhado pela descoloração do DCPIP. Da esquerda para a direita nos tubos de ensaio estão contidos caldo BH, C0, C1, C2, C3, A9, B9 e S9. O tempo de captura das imagens foi indicado acima das imagens..... 241

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Frações de destilação do Petróleo (adaptado de EPA, 2003) 36

Tabela 2 – Entrada de petróleo em ambientes marinhos (NRC, 1985).... 45

Tabela 3 – Custo das tecnologias de biorremediação (Adaptado de EPA, 2003)..... 51

Tabela 4 – Gêneros biodegradadores de hidrocarbonetos (Adaptado de Bartha e Bosset, 1984)..... 59

Tabela 5 – Biossurfactantes por microrganismos (Adaptado de Banat, 1994)..... 67

Tabela 6 – Meios de cultura utilizados para crescimento de *B. subtilis*.... 71

Tabela 7 – Ensaios de respirometria realizados..... 81

Tabela 8 – Ensaios colorimétricos realizados..... 87

Tabela 9 – Contagem em placa de UFC de *B. subtilis* a partir de caldo BHI com magnésio..... 97

Tabela 10 – Biomassa de *B. subtilis* após 48 h..... 97

Tabela 11 – Produção acumulada de CO_2 nos ensaios respirométricos após 147 dias..... 108

Tabela 12 – Dados de Taxa Máxima de Biodegradação (BRmax) e o Tempo da Taxa Máxima de Biodegradação (BRmaxT) dos modelos matemáticos sobre a respirometria e produção semanal de CO_2..... 115

Tabela 13 – Dados de Máxima Biodegradação Prevista (Bmax), Tempo de Máxima Biodegradação prevista (BmaxT) e R^2 do modelo matemático aplicado sobre a respirometria e produção acumulada de CO_2 em S00 (Controle), S01 (Petróleo), S02 (Óleo lubrificante), S03 (Óleo lubrificante usado), S04 (Óleo Diesel), S05 (Gasolina), S06 (Querosene), S07 (Fenol), S08 (Óleo de soja), S09 (Óleo de soja usado) e S10 (Biodiesel B100) com e sem biossurfactante..... 121

Tabela 14 – Comparação das curvas de produção semanal de CO_2 pelo teste F..... 126

Tabela 15 – Comparação das curvas de produção acumulada de CO_2 pelo teste F..... 126

Tabela 16 – Condutividade e pH do conteúdo dos respirômetros após o tempo de biodegradação..... 151

Tabela 17 – Resumo da biodegradabilidade e toxicidade das substâncias estudadas..... 157

Tabela 18 – Peso dos frascos durante medição de biomassa em BHI + Mg de 0 h a 48 h..... 206

Tabela 19 – Produção de biomassa em BHI + Mg de 0 h a 48 h..... 207

Tabela 20 – Peso dos frascos durante medição de biomassa em BHI + Mg de 48 h a 168 h..... 207

Tabela 21 – Produção de biomassa em BHI + Mg de 0 h a 48 h..... 208

Tabela 22 – Peso dos frascos durante medição de produção de biossurfactante em BHI + Mg de 0h a 48 h..... 208

Tabela 23 – Produção de biossurfactante em BHI + Mg de 0h a 48 h..... 209

Tabela 24 – Peso dos frascos durante medição de produção de biossurfactante em BHI + Mg de 48h a 168 h..... 209

Tabela 25 – Produção de biossurfactante em BHI + Mg de 0h a 48 h..... 209

Tabela 26 – Tensão superficial do meio BHI + Mg na produção de biossurfactante em $mN.m^{-1}$..... 210

Tabela 27 – Medidas de índice de emulsificação (E_{24}) nas substâncias em %..... 210

Tabela 28 – Volume de HCl titulado para Branco, S0, S0-S, S1 e S1-S em mL..... 211

Tabela 29 – Volume de HCl titulado para S2, S2-S, S3, S3-S, S4 e S4-S em mL..... 211

Tabela 30 – Volume de HCl titulado para S5, S5-S, S6, S6-S, S7 e S7-S em mL..... 212

Tabela 31 – Volume de HCl titulado para S8, S8-S, S9, S9-S, S10 e S10-S em mL..... 212

Tabela 32 – CO_2 semanal calculado para S0, S0-S, S1, S1-S, S2, S2-S, S3 e S3-S em mL..... 213

Tabela 33 – CO_2 semanal calculado para S4, S4-S, S5, S5-S, S6, S6-S, S7 e S7-S em mL..... 213

Tabela 34 – CO_2 semanal calculado para S8, S8-S, S9, S9-S, S10, S10-S em mL..... 214

Tabela 35 – Desvio padrão do CO_2 semanal calculado para S0, S0-S, S1, S1-S, S2, S2-S, S3 e S3-S em mL..... 214

Tabela 36 – Desvio padrão do CO_2 semanal calculado para S4, S4-S, S5, S5-S, S6, S6-S, S7 e S7-S em mL..... 215

Tabela 37 – Desvio padrão do CO_2 semanal calculado para S8, S8-S, S9, S9-S, S10, S10-S em mL..... 215

Tabela 38 – CO_2 acumulado calculado para S0 a S5-S em mL..... 216

Tabela 39 – CO_2 acumulado calculado para S6 a S10-S em mL..... 216

Tabela 40 – Equações correspondentes à regressão linear da Figura 31 217

Tabela 41 – Parâmetros ajustados ao modelo de Membré et al. (1996) na Figura 33..... 217

Tabela 42 – Parâmetros ajustados ao modelo de Schmidt et al. (1985) na Figura 34..... 218

Tabela 43 – Concentração de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios colorimétricos controle..... 219

Tabela 44 – Concentração de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios colorimétricos contendo petróleo..... 220

Tabela 45 – Concentração de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios colorimétricos contendo óleo lubrificante sintético..... 221

Tabela 46 – Concentração de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios colorimétricos contendo óleo lubrificante usado..... 222

Tabela 47 – Concentração de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios colorimétricos contendo diesel..... 223

Tabela 48 – Concentração de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios colorimétricos contendo gasolina..... 224

Tabela 49 – Concentração de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios colorimétricos contendo querosene..... 225

Tabela 50 – Concentração de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios colorimétricos contendo fenol..... 226

Tabela 51 – Concentração de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios colorimétricos contendo óleo vegetal..... 227

Tabela 52 – Concentração de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios colorimétricos contendo óleo vegetal usado..... 228

Tabela 53 – Concentração de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios colorimétricos contendo biodiesel..... 229

Tabela 54 – Concentração média de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios controle..... 230

Tabela 55 – Concentração média de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios contendo petróleo..... 231

Tabela 56 – Concentração média de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios contendo óleo lubrificante..... 232

Tabela 57 – Concentração média de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios contendo óleo lubrificante usado..... 233

Tabela 58 – Concentração média de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios contendo diesel..... 234

Tabela 59 – Concentração média de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios contendo gasolina..... 235

Tabela 60 – Concentração média de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios contendo querosene..... 236

Tabela 61 – Concentração média de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios contendo fenol..... 237

Tabela 62 – Concentração média de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios contendo óleo vegetal..... 238

Tabela 63 – Concentração média de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios contendo óleo vegetal usado..... 239

Tabela 64 – Concentração média de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios contendo biodiesel..... 240

Tabela 65 – Porcentagem de inibição do crescimento de *B. subtilis* pelo uso do ToxTrak..... 242

Tabela 66 – Toxicidade para alface antes da biodegradação..... 242

Tabela 67 – Toxicidade para alface depois da biodegradação sem biossurfactante..... 243

Tabela 68 – Toxicidade para alface depois da biodegradação com biossurfactante..... 243

Tabela 69 – Toxicidade para pepino antes da biodegradação..... 244

Tabela 70 – Toxicidade para pepino depois da biodegradação sem biossurfactante..... 244

Tabela 71 – Toxicidade para pepino depois da biodegradação com biossurfactante..... 245

LISTA DE ABREVIAÇÕES

Meios de cultura	
CN	Caldo Nutriente
BHI	Caldo Brain Heart Infusion
NA	Caldo Nutrient Agar
BH	Caldo Bushnell Haas
PCI	Meio Plate Count Agar
Emulsificação	
E_{24}	Indice de emulsificação
H_{em}	Altura da região emulsificada
H_s	Altura total da solução
Respirometria	
B	CO_2 Produzido
Bmax	Produção máxima de CO_2
Bo	Produção inicial de CO_2
r	Taxa máxima de produção especifica para determinado óleo
t	Tempo
K1	Constante de aumento de produção
K2	Constante de diminuição de produção
m1	Taxa de aumento na produção de CO_2
m2	Taxa de diminuição na produção de CO_2
S0-10	Ensaios respirométricos sem biossurfactante
S0-10S	Ensaios respirométricos com biossurfactante

Colorimetria	
C0	Ensaios contendo DCPIP + caldo BH
C1	Ensaios contendo DCPIP + caldo BH + *B. subtilis*
C2	Ensaios contendo DCPIP + caldo BH + biossurfactante
C3	Ensaios contendo DCPIP + caldo BH + *B. subtilis* + biossurfactante
A1-10	Ensaios contendo DCPIP + caldo BH + substância
B1-10	Ensaios contendo DCPIP + caldo BH + substância + *B. subtilis*
S1-10	Ensaios contendo DCPIP + caldo BH + substância + *B. subtilis* + biossurf.
Toxicidade	
%G	Porcentagem de germinação
%I	Porcentagem de inibição
SGa	Número total de sementes germinadas
SGt	Número total de sementes na placa de petri
SGc	Número total de sementes germinadas no controle negativo
CMc	Comprimento médio da raiz ou hipocótilo no controle negativo
Ca	Comprimento médio da amostra analisada
ΔA_a	Variação da absorbância da amostra durante tempo do teste
ΔA_c	Variação da absorbância do controle durante o tempo do teste
Outras Abreviações	
HPLC	Cromatografia liquida de alta pressão
DBO	Demanda bioquimica de oxigênio
TBHQ	Tert-butilhidroquinona
DCPIP	2,6 diclorofenol-indofenol
UFC	Unidade formadora de colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 22

2. OBJETIVOS..... 27

2.1. Objetivo geral..... 27

2.2. Objetivos específicos..... 27

3. REVISÃO DA LITERATURA..... 28

3.1. Petróleo..... 28

3.2. Histórico e importância..... 30

3.3. Refino do petróleo e derivados..... 34

3.3.1 Óleos lubrificantes..... 36

3.3.2. Diesel..... 39

3.3.3. Gasolina..... 39

3.3.4. Fenol..... 40

3.4. Impacto ambiental do petróleo..... 41

3.4.1. Acidentes recentes de grandes proporções..... 45

3.4.2. Toxicidade do petróleo..... 47

3.5. Biorremediação..... 49

3.6. Biodegradação..... 52

3.6.1 Bioaumentação e bioestimulação..... 54

3.6.2. Biodegradação de hidrocarbonetos..... 55

3.6.3. Fatores da biodegradação..... 60

3.7. Biossurfactantes..... 61

3.7.1. Biodisponibilidade..... 61

3.7.2. Propriedades dos biossurfactantes..... 62

3.7.3. Vantagens sobre surfactantes sintéticos..... 64

3.7.4. Produção e aplicação..... 64
3.8. *B. subtilis* e a surfactina..... 67
4. METODOLOGIA..... 70
4.1. Produção de biossurfactante..... 70
4.1.1. Preparo e seleção dos meios de cultura..... 70
4.1.2. Determinação de biomassa..... 72
4.1.3. Medida de tensão superficial..... 73
4.1.4. Rendimento do surfactante..... 74
4.1.5. Extração e ressolubilização..... 74
4.1.6. Teste de emulsificação E_{24}..... 75
4.2. Respirometria..... 76
4.2.1. Preparo dos reagentes..... 76
4.2.2. Preparo do inóculo..... 77
4.2.3. Montagem dos ensaios..... 78
4.2.4. Acompanhamento da biodegradação..... 82
4.2.5. Modelagem matemática..... 83
4.2.6. Análise estatística dos dados..... 85
4.3. Colorimetria..... 85
4.3.1. Preparo dos reagentes..... 86
4.3.2. Preparo do inóculo..... 87
4.3.3. Montagem dos ensaios..... 87
4.3.4. Acompanhamento da biodegradação..... 88
4.3.4.1. Medidas qualitativas..... 89
4.3.4.2. Medidas quantitativas..... 89
4.4. Toxicidade..... 90
4.4.1. Toxicidade em sementes de alface e pepino..... 90
4.4.1.1. Germinação..... 90

4.4.1.2. Crescimento de raiz e hipocótilo..... 93
4.4.2. Toxicidade em *B. subtilis* pelo método ToxTrak..... 94
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES..... 96
5.1. Produção de biossurfactante..... 96
5.1.1. Contagem de microrganismos em placa e Gram..... 96
5.1.2. Crescimento de biomassa..... 97
5.1.3. Rendimento de surfactante e tensão superficial..... 98
5.1.4. Indice de emulsificação E_{24}..... 100
5.2. Respirometria..... 102
5.2.1. Produção de CO_2..... 102
5.2.1.1. CO_2 semanal..... 102
5.2.1.2. CO_2 acumulado..... 106
5.2.2. Modelagem matemática..... 109
5.2.2.1. CO_2 semanal..... 109
5.2.2.2. CO_2 acumulado..... 116
5.2.2.3. Comparação entre os modelos propostos..... 123
5.2.3. Análise estatística pelo Teste F..... 125
5.3. Colorimetria..... 127
5.3.1. Resultados qualitativos..... 127
5.3.2. Resultados quantitativos..... 129
5.4. Discussões sobre biodegradação..... 133
5.4.1. Biodegradação de derivados do petróleo..... 133
5.4.2. Biossurfactantes e biodegradação..... 137
5.5. Toxicidade..... 139
5.5.1. Toxicidade para *B. subtilis*..... 139
5.5.2. Toxicidade para sementes..... 142

5.5.2.1. Toxicidade para alface..... 142
5.5.2.2. Toxicidade para pepino..... 147
5.5.3. Discussões sobre toxicidade..... 150
6. CONCLUSÃO..... 158
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 159
8. APÊNDICES..... 206
8.1. Dados de produção de biossurfactante..... 206
8.1.1. Biomassa..... 206
8.1.2. Rendimento de biossurfactante..... 208
8.1.3. Tensão superficial..... 210
8.1.4. Emulsificação..... 210
8.2. Dados de respirometria..... 211
8.2.1. Titulação..... 211
8.2.2. Respirometria semanal..... 213
8.2.3. Respirometria acumulada..... 216
8.2.4. Parâmetros dos modelos matemáticos..... 217
8.3. Dados de colorimetria..... 219
8.3.1. Concentração de DCPIP..... 219
8.3.2. Acompanhamento fotográfico..... 241
8.4. Dados de toxicidade..... 242
8.4.1. ToxTrak com *B. subtilis*..... 242
8.4.2. Toxicidade para sementes de alface..... 242
8.4.3. Toxicidade para sementes de pepino..... 244

BIODEGRADAÇÃO DE DERIVADOS DO PETRÓLEO COM A APLICAÇÃO DE BIOSSURFACTANTE PRODUZIDO POR *Bacillus subtilis*

Orientador: Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Aluno: Renato Nallin Montagnolli

Rio Claro – SP

Março/2011

1. INTRODUÇÃO

A exploração, transporte e consumo do petróleo e seus derivados causa a liberação dos hidrocarbonetos no ambiente. Essa liberação pode ocorrer em menores quantidades pelo descarte inadequado ou infiltrações nos sistemas de armazenamento, ou em grande escala por derramamentos acidentais nos navios petroleiros, plataformas de petróleo e dutos. Desde o início da exploração do petróleo no século XIX, e sua rápida aceitação como fonte de energia a muitas invenções, o petróleo e seus derivados, tem recebido uma crescente demanda, o que aumentou bastante a quantidade e a circulação desse composto no ambiente (PALA et al., 2006). O petróleo é um liquido viscoso que contém milhares de compostos formados, principalmente, por carbono e hidrogênio. A produção mundial de petróleo atinge 3 bilhões de toneladas anuais e metade dessa quantidade é transportada pelo mar. Estima-se que mais de 2 milhões de toneladas são perdidas anualmente por acidentes na manipulação com petróleo (READMAN et al., 1992). E, assim, a presença de hidrocarbonetos no ambiente pode levar a sérios problemas ambientais (OKOH, 2006; OLUWOLE et al., 2005).

A remoção mecânica dos hidrocarbonetos do ambiente é feita por metodologias caras, lentas e pouco eficientes (MANDRI e LIN, 2007). A biorremediação aparece como uma alternativa para total remoção dos hidrocarbonetos ambientes por não apresentar tais problemas. A aplicação de processos biotecnológicos de biorremediação envolvendo microrganismos é um campo de estudos crescente, dado o potencial de solução dos problemas ambientais causados por contaminantes. O uso da biodegradação na biorremediação de ambientes aquáticos é bastante estudado devido à sua aplicação em acidentes envolvendo o descarte de petróleo e derivados no ambiente, cujo destino final é quase sempre os corpos d’água. O destino do petróleo e sua biodegradação foi

investigado por muitos estudos em áreas costeiras (READMAN et al., 1996), sedimentos de estuários (OUDOT et al., 1998) e até mesmo nas condições marinhas do ártico (GARRETT et al., 2003).

A aplicação de tecnologias de biorremediação foi introduzida na década de 80 como uma alternativa às metodologias convencionais que envolviam escavação, aterro, bombeamento, tratamento e adição de materiais absorventes. Além disso, a biorremediação é considerada pela literatura como um método simples e mais seguro (STALLWOOD et al., 2005; KARHU et al., 2009).

A biodegradação tem sido há muito tempo um dos principais campos de pesquisa em microbiologia, cuja utilidade inclui a biodegradação de substâncias orgânicas e inorgânicas. Microrganismos podem ser ótimas ferramentas de remoção de poluentes em solo, água e sedimentos pelas suas inúmeras vantagens sobre outros processos (NANO et al., 2003; MORELLI et al., 2005; DEMNEROVA et al., 2005), na transformação e degradação de substâncias. Sendo assim, microrganismos de potencial biorremediador podem ser empregados na restauração de águas contaminadas com, por exemplo, derivados do petróleo.

O petróleo é uma mistura complexa de hidrocarbonetos e outros compostos orgânicos, incluindo alguns constituintes organometálicos, principalmente, envolvendo vanádio e zinco. O petróleo recolhido de diferentes áreas varia bastante em sua composição e propriedades físico-químicas. Reconhecidos como substratos de crescimento microbiano, os hidrocarbonetos sofrem alterações em sua estrutura molecular pela biotransformação a partir do metabolismo destes organismos (ATLAS e CERNIGLIA, 1995; EHRLICH, 1995; HEIDER et al., 1998; McCLAY et al., 2000).

Para a limpeza do ambiente pela biorremediação deve-se explorar a habilidade dos microrganismos, compreendendo-se a maneira pela qual o processo ocorre nos diferentes derivados do petróleo (VAN HAMME et al., 2003). Alguns estudos examinaram o efeito da temperatura, salinidade e nutrientes na cinética de biodegradação do petróleo (ATLAS, 1981). Também, há relatos acerca da biodegradação de elementos constituintes do petróleo, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos – HPAs – (JUHASZ e NAIDU, 2000; LI et al., 2008), compostos sulfurosos e nitrogenados (BENEDIK et al., 1998) e metabolismo anaeróbio de hidrocarbonetos (FRAZER et al., 1995).

A degradação total do petróleo é resultado da ação combinada de um consórcio microbiano, o qual se constitui de diferentes espécies com características bioquímicas específicas na decomposição dos compostos presentes no óleo (SOLANO-SERENA et al., 1999; OBAYORI et al., 2009). Organismos isolados geralmente têm um alcance limitado para metabolizar substratos complexos, entretanto, alguns gêneros apresentam um bom desempenho na biodegradação de hidrocarbonetos e são frequentemente encontrados em ambientes contaminados, tais como: *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Micrococcus*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Arthrobacter*, *Alcanivorax Mycobacterium*, *Rhodococcus* e *Actinobacter* (NADARAJAH et al., 2002; OKOH e TREJO-HERNANDEZ, 2006; JACQUES et al., 2008).

Grandes acidentes catastróficos com petroleiros têm atraído a atenção pública para o destino dos hidrocarbonetos de petróleo em ambientes marinhos. Em resposta a esta preocupação, a investigação sobre a biodegradação de petróleo em ambientes naturais tem sido intensificada. Os estudos de Atlas e Bartha (1992) e Bragg et al. (1994) demonstraram que as concentrações disponíveis de nitrogênio e fósforo em água do mar são fatores que influenciam no crescimento de microrganismos degradadores de hidrocarbonetos. Assim, a adição destes elementos estimula a biodegradação do petróleo (CHAINEAU et al., 2005).

Muitos derramamentos de óleo no mar causam poluição da costa. A primeira tentativa expressiva de limpeza do litoral poluído pelo aumentando da atividade microbiana foi feita em 1989, após o derrame do Exxon Valdez. A alternativa foi proposta após o tratamento físico pela lavagem com água em alta pressão. Nutrientes foram aplicados nas praias poluídas para acelerar o crescimento e atividade da microbiota local. Duas a três semanas mais tarde, as praias que tinham sido tratados com nutrientes tornaram-se significativamente mais limpas do que os da área controle, sem adição de nutrientes (PRITCHARD e COSTA, 1991). No entanto, era difícil avaliar o efeito do tratamento devido à heterogeneidade da contaminação do óleo das amostras.

Existem estudos que propõem a biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos pela inoculação de microrganismos com potencial biodegradador e a adição de biossurfactantes (ATLAS e BARTHA, 1992; BANAT,

1994). Biossurfactantes são um grupo de substâncias tensoativas produzidas por microrganismos, capazes de reduzir a tensão superficial de misturas aquosas de hidrocarbonetos. Na presença dessas moléculas são formadas micelas nas quais os hidrocarbonetos se solubilizam em água. As propriedades dos biossurfactantes são estudadas em vários estudos (COOPER E GOLDBERG, 1987; ROSENBERG e RON, 1997; HAFERBURG et al., 1986; GEORGIOU et al., 1992). Em geral, a estrutura de um hidrocarboneto inclui uma porção hidrofílica composta de aminoácidos ou polissacarídeos. A porção hidrofóbica é geralmente composta de ácidos graxos saturados ou insaturados (GEORGIOU et al., 1992). Surfactante é uma palavra derivada da contração da expressão “surface active agent”. A concentração mínima na qual ocorre a formação de micelas chama-se concentração micelar crítica (CMC), uma importante característica de um surfactante. É a partir dessa concentração que a tensão superficial atinge seu valor mínimo, independentemente do aumento da quantidade de surfactante.

Estas propriedades tornam os biossurfactantes adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases. A produção mundial de surfactantes excede 3 milhões de t/ano, cuja utilização se concentra nas indústrias de petróleo, de cosméticos, de produtos de higiene e de limpeza (BANAT et al., 2000), sendo este último o setor que utiliza a maior parte dos surfactantes produzidos como matéria-prima para fabricação de detergentes de uso doméstico (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

O interesse mundial nos biossurfactantes tem aumentado pela sua equivalência às substâncias sintéticas. Os biossurfactantes são produzidos, em sua maioria, por microrganismos capazes de biodegradarem hidrocarbonetos. Contudo alguns biossurfactantes só conseguem ser produzidos na presença de compostos solúveis em água (COOPER et al., 1981; PALEJWALA e DESAI, 1989). Biossurfactantes de *Pseudomonas aeruginosa* foram testados para remoção da contaminação por óleo no acidente com o Exxon Valdez no Alasca. Em seu experimento, Harvey et al. (1990) observaram que amostras contendo uma solução 1% do biossurfactante tiveram uma remoção do óleo por microrganismos três vezes mais eficiente do que ensaios controle contendo água. Tais resultados demonstram a habilidade dos biossurfactantes na remoção de poluentes ambientais oleosos,

atuando como facilitadores da captação desses substratos pelos microrganismos (BANAT, 1994).

Outros experimentos conseguiram acelerar o processo de biodegradação de óleo em sedimentos *in situ* a partir da adição de microrganismos com potencial biodegradante e produtores de biossurfactantes (RADWAN et al., 1998). Muitas técnicas foram desenvolvidas envolvendo o uso de populações microbianas e a introdução de nutrientes para estimular a produção de biossurfactantes e uso dos hidrocarbonetos como substrato (MULLER-HURTIG et al., 1993). Algumas indústrias utilizam os biossurfactantes como alternativa aos surfactantes sintéticos utilizados na recuperação de óleos nos reservatórios pelo fato de serem biodegradáveis e de menor custo de produção.

A baixa toxicidade dos biossurfactantes e a possibilidade de serem biodegradados os tornam vantajosos quando comparados a compostos sintéticos, podendo tornar-se substitutos dos emulsificantes convencionais, sendo apropriados para aplicação no ambiente (LIN, 1996). Existem algumas evidências que indicam a produção de biossurfactantes, sendo que uma delas é a presença de espuma e emulsões. Arima et al. (1968) descobriram a existência de um novo composto produzido por Bacillus subtilis, o qual foi denominado surfactina devido à sua grande atividade superficial. Apesar da elucidação de diversas propriedades da surfactina na década de 60, somente nos anos 80 chamou a atenção de diversos pesquisadores como uma alternativa atraente para substituir os surfactantes sintéticos, os quais podem ser mais danosos ao ambiente (MAIER, 2003). Surfactantes produzidos por diferentes linhagens de Bacillus subtilis, além de serem obtidos por processos menos agressivos sob o ponto de vista ambiental, apresentaram efeitos significativos na biodegradação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos (CUBITTO et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2000).

O presente trabalho estudou a biodegradação de diferentes derivados do petróleo com a proposta de aprimorar o processo pelo uso de biossurfactante produzido por *Bacillus subtilis*. Também foi avaliada a produção do biossurfactante e toxicidade das substâncias antes e depois da biodegradação.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Esse estudo teve como objetivo a biodegradação de petróleo e derivados pela aplicação de um biossurfactante produzido pelo *Bacillus subtilis* e a avaliação da toxicidade dos produtos de biodegradação.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito do biossurfactante produzido por *B. subtilis* na biodegradação de efluentes aquosos simulados de diferentes tipos de derivados do petróleo, incluindo óleo cru, compostos fenólicos, querosene, gasolina e óleos lubrificantes automotivos minerais e antes e após seu uso por veículos.

- Propor modelos matemáticos que descrevam como a aplicação de biossurfactante atua na biodegradação.

- Comparar da biodegradação dos hidrocarbonetos à dos óleos vegetais de soja e biodiesel.

- Analisar a produção de biossurfactantes por *B. subtilis*.

- Avaliar a toxicidade dos produtos da biodegradação em organismos-teste e a sensibilidade destes organismos para uso como bio-indicadores.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Petróleo

O petróleo e todos seus derivados têm como componentes principais os hidrocarbonetos. O petróleo e substâncias associadas estão presentes no subsolo terrestre como sólidos, líquidos e gases. O óleo cru presente na crosta terrestre é uma mistura complexa de compostos naturais de carbono e hidrogênio. Componentes do petróleo podem ser separados por cromatografia de absorção em quatro frações: saturados, aromaticos, resinas e asfalteno. Cada uma dessas frações contém uma enorme variedade de compostos (KARLSEN e LARTER, 1991). Os hidrocarbonetos saturados são hidrocarbonetos que não apresentam duplas ligações. Eles são subdivididos em categorias de acordo com suas estruturas químicas, se distribuindo em alcanos (parafinas) e cicloalcanos (naftenos). Os alcanos podem apresentar tanto uma cadeia carbônica linear quanto cadeias ramificadas.

Os cicloalcanos podem apresentar um ou mais anéis carbônicos em sua formula (geralmente ciclopentanos e ciclohexanos). A maioria dos cicloalcanos em petróleo possui um radical alquil formado pela remoção de um átomo de hidrogênio de um hidrocarboneto saturado (Figura 1). Os aromáticos apresentam um ou mais anéis aromáticos em sua fórmula. O benzeno é o mais simples dos anéis aromáticos (Figura 1). Em geral, existem mais hidrocarbonetos aromáticos com radical alquil em petróleo cru do que aromáticos não alquilados (MATAR e HATCH, 1994).

Diferentemente às frações de hidrocarbonetos saturados e aromáticos, tanto a resina quanto o asfalteno apresentam componentes polares que não são hidrocarbonetos. Além de carbono e hidrogênio existem dentre seus componentes traços de nitrogênio, enxofre e oxigênio. Esses constituintes menores do petróleo estão presentes em menos de 3% de sua composição (HUNT, 1996). Tais substâncias se complexam com metais pesados. Asfaltenos apresentam alto peso molecular e são insolúveis em solventes como o n-heptano. As resinas apresentam compostos heterocíclicos, ácidos e sulfóxidos solúveis em n-heptano (HARAYAMA, 1999).

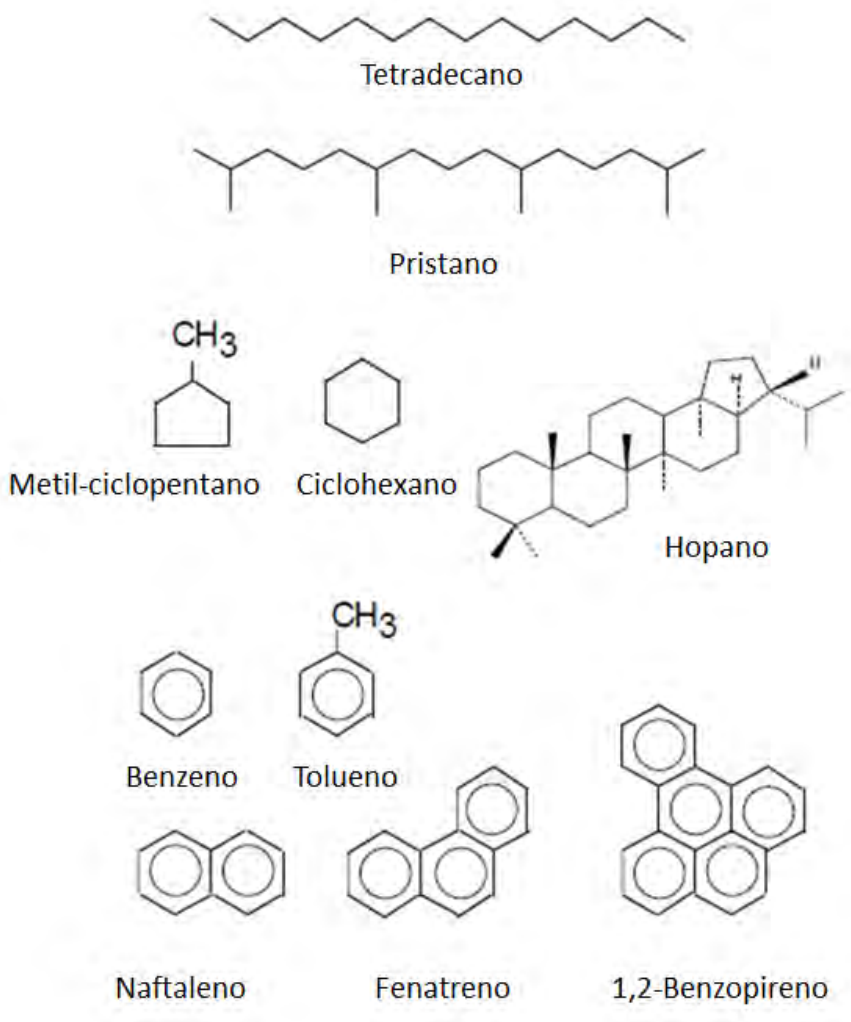


Figura 1 – Hidrocarbonetos representativos na composição do petróleo. Tetradecano (um n-alcano), pristano (um alcano ramificado), metilciclopentano, ciclohexano e hopano estão presentes na fração saturada do óleo cru. Os outros compostos são da fração aromática (HARAYAMA, 1999).

A maioria dos estudos sobre a composição do petróleo foi feita por uma combinação de espectrometria de massa e cromatografia gasosa. De acordo com Killops e Al-Juboori (1990), o uso dessas metodologias é incapaz de detectar compostos de pesos moleculares muito altos e por isso as frações mais pesadas do petróleo ainda são descritas em poucos detalhes. Além disso, a composição de muitos alcanos ramificados e seus numerosos isômeros não foi determinada pelas técnicas usuais. Propõe-se que outras técnicas como espectrometria em ultravioleta e infravermelho sejam acopladas a técnicas cromatográficas para uma melhor caracterização do petróleo.

A composição do petróleo não é absoluta e varia em cada local de onde ele é encontrado. Com relação ao grau de diferenciação do petróleo, a indústria classifica como óleo convencional e óleo não convencional. Óleos convencionais podem ser mais explorados, refinados e produzidos de maneira simples de acordo com as técnicas de refino já existentes, sem que grandes adaptações sejam necessárias. Já os óleos considerados não convencionais, como os óleos muito pesados e “tar sands” (combinação de argila, areia, água, betume e óleo) necessitam de adaptações especiais para serem explorados como recursos naturais (TISSOT e WELTE, 1978).

Várias frações do petróleo são produzidas pelo refino do petróleo, usualmente denominado óleo cru. O refino é essencialmente uma destilação fracionada em que diferentes frações são retiradas ao longo de uma coluna (conforme 3.3). Algumas substâncias que não são encontradas no petróleo orginalmente, como os alcenos, são também produzidas durante esse processo de produção e refino.

3.2. Histórico e importância

A origem do petróleo relaciona-se com a decomposição da matéria orgânica por microrganismos em condições extremas que não permitam sua oxidação completa. A interação de condições termo-químicas apropriadas e microbiológicas são condições para o processo de formação do petróleo na crosta terrestre (OLLIVIER & MAGOT, 2005).

Os registros mais antigos da utilização do petróleo datam da Antiguidade, onde este era obtido de liberações naturais na superfície. Marco Polo descreveu a substância em 1291 como combustível para lâmpadas (TESTA e WINEGARDNER, 2000). No século XIX, nativos americanos utilizavam o óleo cru encontrado nas cavernas e rios como algo medicinal (EIA, 2001). A exploração comercial do petróleo começou a partir de 1859 com a primeira perfuração de um poço na Pensilvânia, Estados Unidos, por Edwin L. Drake.

A produção comercial do petróleo nos Estados Unidos só começou em 1859, com a produção de querosene a ser utilizado em lâmpadas. Ao longo do século XIX surgiu o motor a combustão interna, que passou a ser utilizado em larga escala, causando assim um forte impulso na indústria petrolífera. Após esses eventos o petróleo se tornou a principal fonte de energia da época até a atualidade, provocando o desenvolvimento econômico de muitos países (THOMAS et al., 2001). No século seguinte o enfoque principal passou a ser a gasolina, com a invenção e popularização do automóvel. Em 1930 passou a se desenvolver o mercado do óleo de aquecimento. No ano 2000, 85% da energia utilizada mundialmente vieram de combustíveis fósseis, sendo a produção de óleo responsável por suprir 40% dessa demanda (EDWARDS, 2001).

De acordo com o Ministério de Minas e Energia (MME, 2009) em 2007 o petróleo e gás natural corresponderam a 54,9% da matriz energética mundial (Figura 2). Junto com o carvão mineral, as principais fontes fósseis representam 80,9%, com forte potencial de geração de efluentes a base de hidrocarbonetos e consequente impacto sobre o ambiente.

A demanda mundial por petróleo é crescente. De 1970 para 1999 a produção primária de energia cresceu 76% no mundo todo com a utilização de combustíveis fósseis (petróleo, gás natural e carvão), sendo essas fontes de energia responsáveis por mais de 80% da energia mundial. A produção mundial de petróleo atingiu os 68 milhões de barris por dia no ano 2000 (EIA, 2001). Essa dependência do mundo no petróleo é associada a problemas ambientais como o aquecimento global e a diminuição da qualidade do ar em centros urbanos.

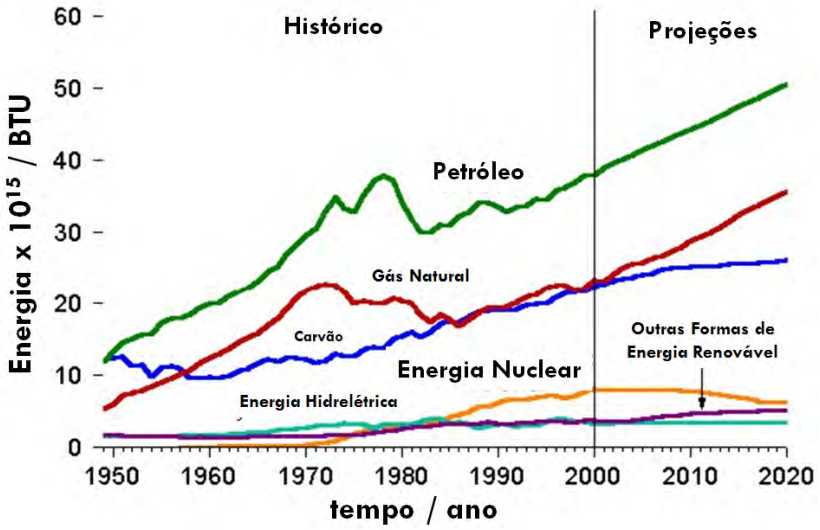


Figura 2 – Quantidade de petróleo utilizada mundialmente em BTU (unidade térmica britânica do sistema imperial, sendo 1 J = 9.478×10^{-4} BTU) de acordo com a Energy Information Association, 2001.

O petróleo é valorizado como fonte energia não apenas por sua alta densidade energética em BTUs, como também pela facilidade de transporte. A demanda mundial por óleo cru tem aumentado continuamente devido ao aumento populacional e industrialização nos países em desenvolvimento. Combinados, esses fatores causam um aumento de 1,5% na demanda anual de petróleo. Estima-se que em 2030 a demanda chegue a 38 bilhões de barris. Conforme a demanda aumenta, as reservas de óleo diminuem. Ao invés de buscar fontes alternativas de energia, recursos são investidos em melhorias na prospecção e tecnologias de recuperação do petróleo mais eficientes. Fontes antes inexploráveis como as “tar sands” estão se tornando cada vez mais importantes (TISSOT e WELTE, 1978).

Existem teorias que indicam um declínio da produção de petróleo no mundo pela exaustão das reservas encontradas. A mais famosa dessas teorias é a de HUBBERT (1956), no qual se determina que exista um pico de produção seguido de um declínio na mesma proporção. Essa teoria sugere uma exaustão total das reservas de petróleo em todo o mundo. Existe uma série de controvérsias envolvendo agências internacionais e membros da OPEC sobre o fato do mundo já ter atingido esse pico de produção (RUDOLF, 2010).

Existe uma grande dificuldade em prever o pico de produção máxima de petróleo em cada região. Nem mesmo relatórios oficiais permitem uma discussão detalhada acerca do tema, já que as empresas responsáveis pela produção do petróleo costumam declarar valores superiores de produção pela competição por maior participação no mercado global (MASON, 2010). De acordo com os relatórios da Agência Internacional de Energia (IEA, 2009), a produção de petróleo mundial atingiu seu máximo em 2006. Com base no fato de que praticamente todos os setores econômicos dependem do petróleo, sérias consequências e mudanças são esperadas nos mercados globais.

As distribuições de reservas petrolíferas de onde o petróleo é extraído não estão distribuídas igualmente pelo mundo. Esse fato reflete nos níveis divergentes de produção de petróleo entre as nações no mundo. Dos cerca de 70 bilhões de barris de petróleo produzidos, 12% são pela Arábia Saudita; seguidos pela Rússia responsável por 9% dessa produção; e os Estados Unidos, responsáveis por 8% dessa produção (EIA, 2001). Petróleo e gás são atualmente explorados e produzidos em praticamente todos os biomas do mundo, incluindo florestas tropicais, desertos do Oriente Médio, regiões do Ártico e profundezas oceânicas. A complexa natureza e extensão da indústria petrolífera fazem com que qualquer acidente e vazamento afetem de muitas maneiras os ambientes.

O petróleo e seus derivados são uma grande fonte de energia. Como resultado da atividade humana em grande escala associada a essa substância, vazamentos acidentais e perdas ocorrem regularmente durante a exploração, produção, refino, transporte e estoque dos produtos (WARD et al., 2003). A quantidade estimada de perda apenas de óleo cru para o ambiente é de 600.000 ±200.000 toneladas por ano (KVENVOLDEN e COOPER, 2003). Entretanto, existem relatórios que indicam até 0,1% da produção mundial total seja perdida para o ambiente (CPDP, 2010).

Existe a geração de poluentes pela indústria do petróleo e gás natural das etapas de exploração até a distribuição dos produtos comercializáveis. Por esse motivo, tem havido um grande investimento na elaboração de processos de prevenção aos lançamentos inadequados de material no meio ambiente, assim como pesquisas relacionadas com o tratamento de seus resíduos. A maior

motivação para mitigação e controle do aporte de óleo no meio ambiente é a ampliação da margem de lucro, diminuindo os custos relacionados com a imagem negativa e com o pagamento de multas pela indústria (OLIVEIRA e FRANÇA, 2004).

3.3. Refino do petróleo e derivados

O petróleo em sua forma natural possui uso limitado, contudo, com o processamento do óleo cru pelo refino é possível criar a vasta diversidade de produtos e derivados encontrados atualmente. O processo de refino resulta em hidrocarbonetos de diferentes composições. Uma refinaria converte o petróleo cru por processos que envolvem etapas de destilação, extração, catálise e purificação. Os componentes químicos são separados pelas suas diferentes propriedades físico-químicas, e assim geram produtos de diferentes composições (NRC, 1985). Os tipos e produtos produzidos a partir do refino do óleo cru estão ilustrados na Figura 3.

A gasolina, por exemplo, é uma das frações mais leves do petróleo, contendo os hidrocarbonetos mais leves (geralmente C_4 a C_8), enquanto que os combustíveis utilizados em navios são uma mistura de resíduos de destilação, cujo ponto de ebulição é muito alto e apresenta assim os componentes mais pesados. De acordo com NRC (1985), não apenas os derivados apresentam componentes variados, com também apresentam diversos efeitos ambientais quando liberados na atmosfera, solo ou corpos d’água.

Figura 3 – Derivados do petróleo e suas aplicações (Adaptado de Ren et al., 2009).

Devido à diferença de suas temperaturas de ebulição, os componentes podem ser facilmente separados por um processo de destilação fracionada. Primeiramente o petróleo na base da coluna é aquecido com vapor de alta pressão para temperaturas de cerca de 600°C. A mistura entra em ebulição e entra no fundo da coluna de destilação fracionada cheia de bandejas ou placas com muitos orifícios ou proteções para bolhas a fim de permitir a passagem do vapor. As placas aumentam o tempo de contato entre o vapor e os líquidos na coluna e coletam os líquidos que se formam em diferentes pontos da coluna. Devido ao gradiente de temperatura da coluna (mais quente embaixo, mais frio em cima) o vapor sobe pela coluna e conforme o vapor sobe pelas placas da coluna, ele esfria. Quando uma substância na forma de vapor atinge uma altura em que a temperatura da coluna é igual ao ponto de ebulição da substância, ela condensa e gera um produto de destilação (FREUDENRICH, 2001). A substância com o menor ponto de ebulição irá se condensar no ponto mais alto da coluna. Já as substâncias com pontos de ebulição maiores condensarão em partes inferiores da coluna (Tabela 1).

Tabela 1 - Frações de destilação do Petróleo (adaptado de EPA, 2003)

Fração	Cadeia carbônica	Ponto de ebulição
Gás (Butano, Propano)	$C_1 – C_4$	< 32,2°C
Gasolina	$C_5 – C_{12}$	32,2 – 104,4 °C
Nafta e Combustíveis de Avião	$C_{11} – C_{13}$	104,4 – 157,2 °C
Querosene	$C_{10} – C_{13}$	157,2 – 232,2 °C
Diesel	$C_{10} – C_{20}$	232,2 – 343,3 °C
Óleos lubrificantes	$C_{19} – C_{40}$	343,3 – 426,7 °C
Residuais (Ceras e Alfalto)	$> C_{40}$	> 426,7 °C

Dessa forma os derivados de petróleo são obtidos. As frações líquidas recolhidas podem passar por condensadores, onde serão resfriadas ainda mais, e depois ir para tanques de armazenamento ou passar por outros processos químicos, térmicos ou catalíticos. Poucos compostos já saem da coluna de destilação prontos para serem comercializados. Muitos deles devem ser processados quimicamente para criar outras frações. Por exemplo, apenas 40% do petróleo bruto destilado é gasolina. No entanto, a gasolina é um dos principais produtos fabricados pelas empresas de petróleo. Em vez de destilar continuamente grandes quantidades de petróleo bruto, essas empresas utilizam processos químicos para produzir gasolina a partir de outras frações que saem da coluna de destilação. É este processo que garante uma porção maior de gasolina em cada barril de petróleo bruto (FREUDENRICH, 2001).

Outras substâncias, por sua vez passam por processos que envolvem a divisão de grandes cadeias de hidrocarbonetos em pedaços menores (craqueamento); combinação de pedaços menores para criar outros maiores (reforma); ou rearranjando vários pedaços para fazer os hidrocarbonetos desejados (alquilação).

3.3.1 Óleos lubrificantes

A lubrificação por óleos lubrificantes automotivos é capaz de tornar maior a autonomia e a duração dos motores. Existem muitos tipos de óleos lubrificantes automotivos, conforme esquematizados na Figura 4 (MMA, 2006). A classificação é

dada em decorrência de diferenças no processo de produção ou até mesmo a origem da matéria prima básica constituinte.

Figura 4 – Quadro comparativo dos diferentes tipos de óleos lubrificantes automotivos (Adaptado de MMA, 2006).

Sobre os óleos lubrificantes, podem ser citadas ainda mais algumas propriedades, dentre elas a viscosidade, medida automotivo pela velocidade de escoamento do óleo, sendo esta uma variável dependente da temperatura; o índice de viscosidade, que mede exatamente a variação da viscosidade com a temperatura; e a densidade, indicada pela massa de um volume de óleo lubrificante automotivo a uma determinada temperatura (TAVARES, 2006).

O SAE (Society of Automotive Engineers) definiu aos lubrificantes um índice que classifica os óleos lubrificantes a partir de sua viscosidade, indicada por um número. Quanto maior este número, mais viscoso é o lubrificante. Ocorre a partir disso uma divisão em três categorias: (i) Óleos lubrificantes de Verão: SAE 20, 30, 40, 50, 60; (ii) Óleos lubrificantes de Inverno: SAE 0W, 5W, 10W, 15W, 20W, 25W e; (iii) Óleos lubrificantes multiviscosos (inverno e verão): SAE 20W-40, 20W-50, 15W-50.

Os óleos lubrificantes derivados de pétróleo consistem de moléculas contendo 18 a 40 átomos de carbono em três conformações básicas de hidrocarbonetos: parafinas, aromáticos e ciclo-parafinas. Estes óleos contêm também pequenas quantidades de heteroátomos, como enxofre, nitrogênio e oxigênio. O óleo lubrificante deve ser ao mesmo tempo viscoso o suficiente para manter determinados equipamentos em funcionamento, e o mais fluido possível para conduzir calor e reduzir a perda de energia pelo arrasto causado pela viscosidade.

Deve ser estável sobre estresse oxidativo e calor, com uma baixa volatilidade. Além disso, os óleos lubrificantes devem ser capazes de dissolver aditivos, mas serem inertes em contato com metais (MOURA et al., 2007).

Os óleos lubrificantes derivam primariamente de petróleo cru e são utilizados desde a lubrificação de rolamentos até refrigeração em motores automobilísticos, sistemas hidráulicos e maquinário industrial (AMUND, 1996). O óleo cru sofre mudanças consideráveis na composição durante a migração primária. Somente uma pequena quantidade do betume, total disperso e mobilizado, é transferida para as rochas-reservatório e ainda uma melhor quantidade é acumulada nos poros (TISSOT et al., 1978). E um estudo de Bartz (1998) revelou que cerca de 1% de todo petróleo consumido é usado para produzir lubrificantes (Figura 3).

O comportamento ambiental dos lubrificantes são bases para o desenvolvimento de novos fluidos (EISENTRAEGER et al., 2002). Pesquisas com lubrificantes biodegradáveis estão emergindo como uma das prioridades no campo da lubrificação, portanto, lubrificantes de menor impacto ambiental tem-se tornado uma alternativa comercializável inteligente (BASU et al., 1998; GOYAN et al.,1998). Dentre esses, destacam-se os óleos vegetais destinados à lubrificação de peças, pois são mais biodegradáveis e possuem menor custo quando comparados até mesmo aos óleos lubrificantes sintéticos, além de obviamente apresentar um aceitável desempenho como lubrificante (ANON, 1994).

Moura et al. (2007) determinaram que o óleo lubrificante se torna inadequado à utilização após prolongados períodos de uso. Os óleos usados costumam ficar saturados de subprodutos de uma deterioração parcial, como por exemplo: compostos aromáticos polinucleares e oxigenados, resinas, aditivos, metais pesados e contaminantes em geral. Além da utilização, foi determinado que microrganismos, principalmente bactérias e fungos, são capazes de tornar o uso de óleos lubrificantes inviável. Isso ocorre pelo fato desses organismos obterem em ambientes contendo óleo uma fonte de substâncias orgânicas destinadas à nutrição, biodegradando resíduos potencialmente tóxicos através da metabolização desses compostos.

3.3.2. Diesel

O óleo diesel comercial, mesmo sendo um produto derivado do petróleo, ainda apresenta em sua composição uma mistura complexa de hidrocarbonetos. Sua composição depende da origem do óleo cru utilizado no processo de destilação e das misturas adicionadas na sua formulação final. Em seu estudo da composição do óleo diesel, Penet et al. (2004) determinaram por HPLC uma abundância de componentes saturados (64%), incluindo cicloalcanos e cadeias ramificadas. Encontraram também mono-aromáticos em maior quantidade que os di-aromáticos e dos tri-aromáticos.

A biodegradação do oleo diesel é bastante debatida pelo fato de ser um produto intermediário da destilação. A mineralização do diesel foi apresentada como completa em culturas liquidas aeradas (GEERDINK et al., 1996) e incompleta em frascos sem agitação (OLSON et al., 1999). Sua biodegradação em solo é incompleta (GALLEGO et al., 2001). Sua baixa biodegradabilidade é comumente associada a limitações na transferência de hidrocarbonetos ou na quantidade insuficiente de oxigênio do meio. Além disso, muitos estudos de biodegradação dessa susbtância foram feitos em sistemas abertos que promoviam o desaparecimento da substância por volatilização (SONG et al., 1990).

3.3.3. Gasolina

A gasolina é composta basicamente de hidrocarbonetos e baixas concentrações de oxigenatos (compostos contendo oxigênio). Os componentes da gasolina são anéis aromáticos, alcenos e saturados, formados por cadeias que variam de 4 a 12 carbonos (STREVA et al., 2011). Na gasolina também estão presentes baixas concentrações de compostos sulfurados, nitrogênio e metais, responsáveis por causar uma instabilidade ao composto. Antioxidantes e são adicionados à gasolina. De acordo com a Agência Nacional do Petróleo (ANP), no Brasil é permitido adicionar 20-25% de etanol por volume de gasolina. Existem também variantes comercializadas como “aditivada” pela presença de detergentes

ou “Premium” pela alta octanagem (alta concentração de cadeias contendo 8 carbonos).

A composição da gasolina é conhecida por afetar seu próprio processo oxidativo. Zanier (1998) avaliou a estabilidade termo-oxidativa da gasolina e observou altas quantidades de alcenos suscetíveis à oxidação. Metais como o cobre também colaboram para processos oxidativos na gasolina, acelerando-os e fazendo com que a gasolina oxidada se torne mais densa (PEREIRA e PASA, 2005).

3.3.4. Fenol

Fenol (ácido carbólico) é uma função orgânica caracterizada por uma ou mais hidroxilas ligadas a um anel aromático. Apesar de possuir um grupo hidroxila característico de um álcool, o fenol é mais ácido que este, pois possui uma estrutura de ressonância que estabiliza a base conjugada. São obtidos principalmente através da extração de óleos a partir do alcatrão de hulha (MERCK, 1976). Fenol também é o nome usual do fenol mais simples, que consiste em uma hidroxila ligada ao anel benzênico. Outros nomes para a mesma substância incluem: benzenol; ácido carbólico; ácido fênico, ácido fenílico; hidroxibenzeno; monohidroxibenzeno. Geralmente os fenóis são sólidos, cristalinos, tóxicos, cáusticos e pouco solúveis em água.

Os efluentes industriais são formados por uma grande variedade de substâncias e compostos inorgânicos e/ou orgânicos, que podem ser altamente perigosos quando dispostos de maneira inadequada no meio ambiente. Dentre esta ampla gama de poluentes, os compostos fenólicos vêm chamando a atenção devido à grande quantidade e diversidade de espécies com alto potencial deletério a biota aquática (HOUK, 1992).

Fenol e compostos fenólicos estão entre as formas químicas poluidoras mais comumente encontradas em efluentes industriais. Estes compostos são encontrados nos efluentes de uma grande variedade de indústrias, originários dos processos de produção de plásticos, corantes, tintas, antioxidantes, polímeros sintéticos, papel; e também de indústrias ligadas à carvoaria, resinas poliméricas, farmacêuticas, têxtil, solventes, petroquímicas e refinarias de petróleo (KOJIMA et al., 1995).

O fenol, um dos contaminantes oxigenados presentes em efluentes industriais, é uma substância incolor e cristalina usada como desinfetante e na produção de várias resinas poliméricas. Por ser muito solúvel em água, constitui-se em um sério contaminante para o meio ambiente (MATATOV-MEYTAL e SHEINTUCH, 1997).

3.4. Impacto ambiental do petróleo

A produção mundial de óleo cru é de mais de 3 bilhões de toneladas ao ano e metade disso é transportada pelo mar, tornando os mares e oceanos bastante vulneráveis a acidentes com derramamentos. Acidentes com navios são geralmente exemplificados pelo desastre ocorrido com o Exxon Valdez no Alasca, por ter afetado seriamente toda a biota marinha e costeira da região. A extração de petróleo em plataformas marítimas são também fontes de contaminação. Estima-se que mais de 2 milhoes de toneladas de petróleo são perdidas pela indústria no mar (HARAYAMA, 1999).

O petróleo derramado flutua e alastra-se progressivamente, formando extensas manchas negras de efeitos altamente destruidores. Além dos seus efeitos imediatos e bem evidentes, há também os efeitos em longo prazo, com repercussões não menos graves. Quando as marés negras atingem as zonas costeiras colocam em risco a fauna e flora pela intoxicação de peixes, moluscos e mamíferos, representando um perigo para o homem através da cadeia alimentar. Há também consequências econômicas e sociais, com prejuízos à atividade pesqueira e pelo forte impacto negativo na atividade turística, já que os resíduos petrolíferos, de difícil remoção, impedem por muito tempo a utilização das praias (KORTE e BOEDEFELD, 1978; STARK et al., 2003; JIANG et al., 2010).

Acidentes com petróleo tem se tornado um fenômeno cada vez mais comum e frequente na atualidade, sempre com sérias consequências para o ambiente e para a sociedade (SHAW, 1992). Os problemas com petróleo não são decorrentes apenas de grandes vazamentos ambientais acidentais com navios ou plataformas de petróleo. Os resíduos oleosos de refinarias como o resíduo de sistemas de separação ou mesmo a acumulação nos tanques de estocagem tem sido um

problema, já que processos de descontaminação do solo e água são proibitivamente caros, demorados e parcialmente efetivos (VASUDEVAN e RAJARAM, 2001). Assim, o tratamento de ambientes com hidrocarbonetos ainda representa um grande desafio na atualidade (RAHMAN et al., 2003).

Os problemas ambientais associados ao petróleo e derivados também surgem do descarte e estocagem inadequados (TAM e BYER, 2002). Existem muitos lugares contaminados com petróleo que podem afetar a saúde pública ou o balanço dos ecossistemas locais, comprometendo o futuro do desenvolvimento econômico da região afetada (Figura 5).

O uso incorreto dos derivados do petróleo também faz com que os produtos se separem e se insiram no ambiente. A combustão incompleta da gasolina no motor de um automóvel leva a dispersão dos compostos na atmosfera. Compostos gasosos na exaustão de um barco a motor permitem a mistura e transporte das substâncias em corpos d'água. Esses são exemplos de uma contaminação crônica de baixa intensidade. Já a liberação concentrada dos compostos no ambiente geralmente está associada a acidentes no transporte ou armazenamento, como ocorrido em Exxon Valdez, cujo derramamento tinha uma extensão de 750 km que afetaram 1.750 km da costa (WOLFE et al., 1994). O descarte inadequado de 13% dos óleos lubrificantes libera também cerca de 642 milhões de litros no ambiente (EPA, 2003).

Existe também o manuseio inadequado em postos de combustível no abastecimento de automóveis. Os hidrocarbonetos são, frequentemente, liberados acidentalmente no ambiente devido ao abastecimento descuidado ou pela falta de manutenção (associada com a baixa fiscalização) dos tanques subterrâneos. A recomendação para perdas durante o abastecimento é a contenção do liquido por canaletas instaladas nos postos. O problema torna-se mais sério com relação aos vazamentos de tanques subterrâneos, em que a perda é pequena, porém contínua e prolongada. São nesses casos que a contaminação da água subterrânea ocorre (RAHMAN et al., 2002).

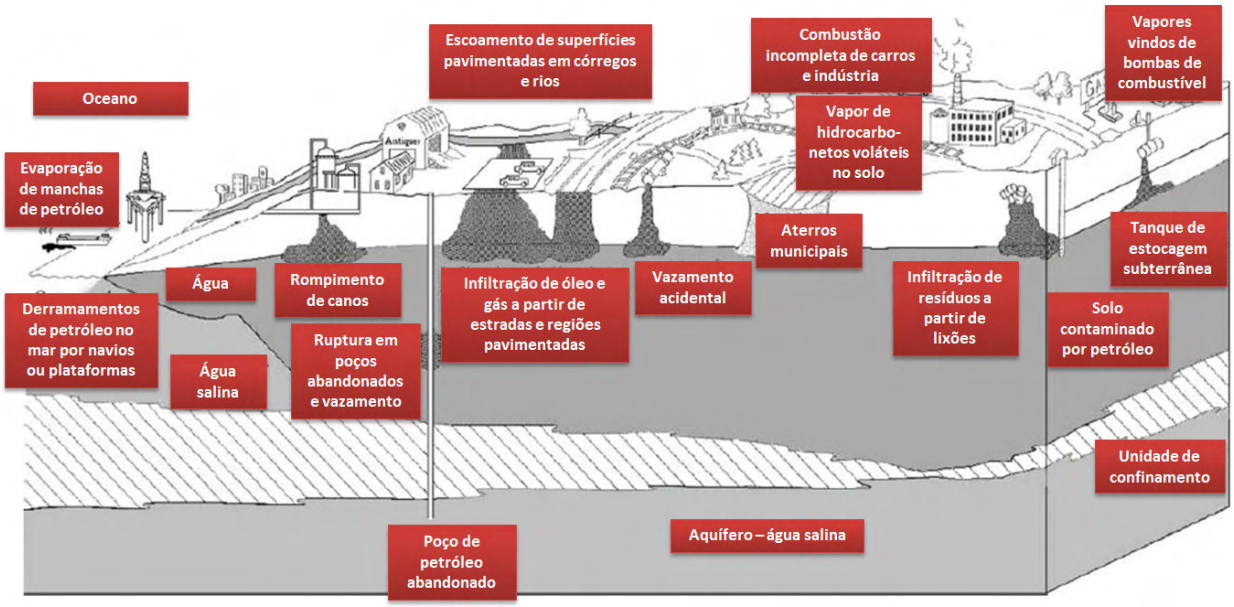


Figura 5 – Modos de contaminação por petróleo durante produção, transporte, uso e descarte (Adaptado de Fetter, 1993).

A migração dos contaminantes de petróleo para o subsolo, por exemplo, ocorre como qualquer líquido afetado pela gravidade, penetrando camadas profundas. Ao longo da migração vertical do petróleo existe também um espalhamento vertical devido às forças de capilaridade (SCHWILLE, 1988). Conforme o petróleo penetra no solo vão sendo preenchidos poros por efeitos de tensão superficial. Em adição à migração no subsolo, os derivados do petróleo também se volatilizam e contaminam o ar da região afetada (MERCER e COHEN, 1990). Ao atingir reservas subterrâneas de àgua, os contaminantes continuam a se espalhar, dando sequencia a uma complicada distribuição em meio heterogêneo (PINDER e ABRIOLA, 1986). Os componentes solúveis presentes no petróleo cru, ou derivados irão se dissolver e migrar por gradientes hidráulicos (MACKAY et al., 1985). A fase dissolvida desperta preocupação por conseguir dispersar-se por longas distâncias e contaminar fontes de água potável (PANDAY et al., 1995).

Deve ser considerado também o impacto ambiental dos hidrocarbonetos voláteis. Grande parte das estatísticas considera somente perdas liquidas e sólidas durante refino, transporte e armazenamento. Os componentes voláteis costumam se dissipar na atmosfera e chegam via correntes de ar a áreas muito distantes do foco

de contaminação inicial (PRINCE, 1993). Squillace et al. (1996) detectaram frequentemente compostos voláteis originados de derramamentos de hidrocarbonetos na atmosfera de centros urbanos.

Os hidrocarbonetos voláteis chegam também a afetar em menores proporções a geosfera pela sorção em sedimentos e a biosfera pela bioacumulação. As frações pesadas por sua vez impactam mais diretamente os sedimentos e organismos (ABRAJANO et al., 1993).

3.4.1. Acidentes recentes de grandes proporções

Exemplos recentes de acidentes com petróleo são o derrame de meio milhão de litros de combustível em janeiro de 2001 nas Ilhas Galápagos; o derrame de 4 milhões de litros de petróleo da Refinaria Getúlio Vargas no município de Araucária, no Paraná, em julho de 2000; e o vazamento de 1,3 milhões de litros de combustível em janeiro do mesmo ano na Baía de Guanabara, Rio de Janeiro. Essas evidências tornam urgente o desenvolvimento de tecnologias para diminuir o impacto ambiental ocasionado por esses acidentes, sendo a biorremediação um dos métodos mais estudados atualmente (CETESB, 2001).

Gallego et al. (2006) estudaram a atenuação natural e biorremediação no caso do Prestige e sua contaminação da costa da Espanha. O destino dos hidrocarbonetos foi altamente afetado por vários fatores, como a heterogeneidade do óleo, processos de degradação natural e atividade microbiana. A biodegradação de porções pesadas do combustível foi efetiva durante os primeiros meses, contudo, diminuindo substâncialmente nos anos subsequentes. Dois anos depois, o ambiente sem qualquer remediação ainda apresentava 50% a mais de hidrocarbonetos, principalmente aromáticos. A fração mais afetada por processos de biodegradação foram as resinas e asfaltenos.

Embora alguns hidrocarbonetos do petróleo em ecossistemas originem-se de fontes naturas, grande parte da contaminação desses ambientes é decorrente de atividades antropogênicas. O alcance dessas contaminações é geralmente difícil de estimar, entretanto acidentes ilustram as consequências da liberação em larga escala dos hidrocarbonetos. Acidentes envolvendo navios e vazamentos de dutos

chamam a atenção do público para essa problemática (MARGESIN e SCHINNER, 1997). A Tabela 2 estabelece a estimativa de petróleo e derivados introduzidos em ambientes marinhos.

Tabela 2 – Entrada de petróleo em ambientes marinhos (NRC, 1985)

Fonte	Quantidade (em milhões de toneladas por ano)
Fontes naturais	2,00
Plataformas de petróleo	0,06
Transporte	2,62
Atmosfera	0,05
Resíduos urbanos	3,12

Embora o transporte e produção do petróleo tenham se intensificado nos últimos anos, a perda para o ambiente só não se tornou maior devido a normas bastante restritas para as operações relacionadas aos hidrocarbonetos. De acordo com essas normas, as empresas responsáveis pelo manuseio do petróleo em todas as suas etapas conseguiram diminuir drasticamente o despejo operacional e acidental no mar dessas substâncias (DEPPE, 2005).

O derramamento provocado pela explosão da Deepwater Horizon da Britsh Petróleo ocorreu no Golfo do México por três meses de 2010. O impacto ainda continua até atualmente, mesmo depois que o vazamento foi contido. Este é considerado o maior vazamento acidental marinho da indústria do petróleo (ROBERTSON e KRAUSS, 2010). O derramamento foi proveniente de um duto de petróleo no solo subaquático desde 20 de abril de 2010. O vazamento só foi contido em 15 de julho do mesmo ano após 4,9 milhões de barris (1 barril é igual a 159 L) fossem lançados ao oceano, na taxa de 53.000 barris por dia, visíveis por imagens de satélite (Figura 6). Em 19 de setembro o acidente foi declarado oficialmente encerrado.

Figura 6 – Imagem de satélite da região afetada pelo derramamento de petróleo pela Deepwater Horizon.

Mesmo assim o derramamento ainda tem causado sérios danos ambientais, além de consequências sócio-econômicas. Em novembro de 2010 a pesca de camarão local foi suspensa pela localização de óleo em redes de pesca, atingindo uma extensão de 11.000 km². A costa da Louisiana impactada pelo óleo teve sua extensão aumentada de 459 para 512 km. Até hoje são encontradas poças de óleo ao longo da costa afetada, afetando o crescimento da biota costeira (TANGLEY, 2010).

Considerada atualmente como o pior desastre ambiental enfrentado pelos Estados Unidos (BBC, 2010), o vazamento chegou a ser 20 vezes maior que o ocorrido em Exxon Valdez. Mesmo assim, os danos à região foram atenuados em comparação com o desastre ocorrido no Alasca, pois o clima mais quente e o fato da fonte de vazamento ter sido subaquática afetaram menos a área. Fatores como a toxicidade do petróleo, depleção do oxigênio e o uso de surfactantes químicos são apontadas como causas dos problemas associados ao vazamento (FROOMKIN, 2010). Em novembro de 2010 foram contados 6.814 animais, afetados diretamente

por esse desastre ambiental, em sua maioria aves e tartarugas marinhas (FWS, 2010).

Uma atenção especial deve ser dada para evitar que alcanos de cadeias longas sejam derramados nos oceanos devidos à conhecida persistência desses hidrocarbonetos nos ecossistemas. Já em 1985, milhões de galões de óleo já adentravam os oceanos (Figura 7) a cada ano. Muitos efluentes industriais contendo poluentes orgânicos hidrofóbicos são liberados em água e só começaram a ser tratados adequadamente em estações específicas em 1990, conforme reportado por Forstner (1990).

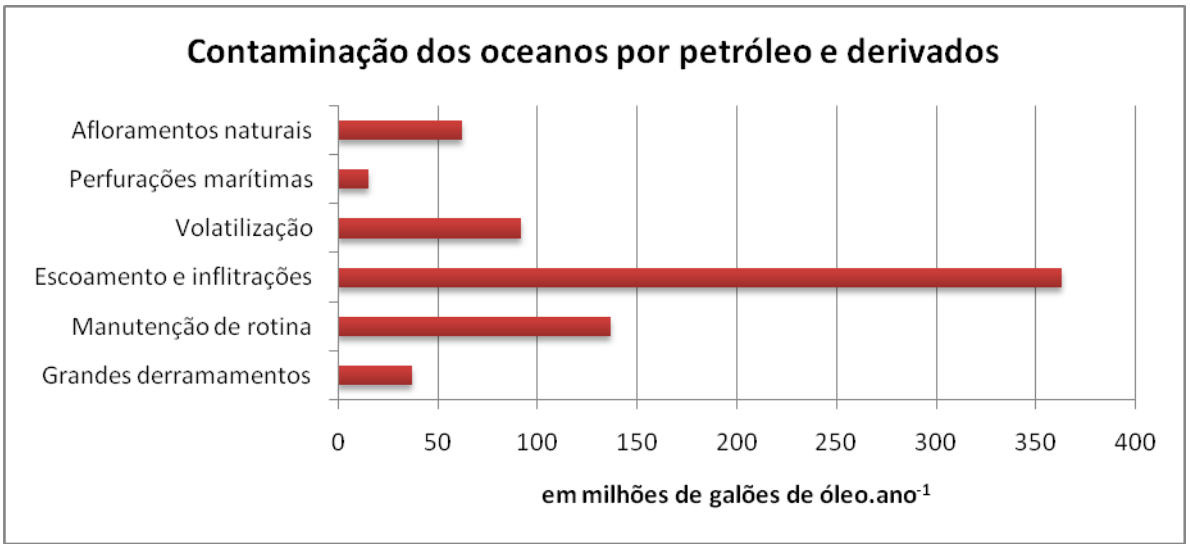


Figura 7 – Fontes de contaminação dos oceanos em 1985 de acordo com o Conselho Nacional de Pesquisas dos Estados Unidos (NRC, 1985).

3.4.2. Toxicidade do petróleo

Conforme já discutido, a exploração do petróleo, seu transporte e consumo resultam em derramamentos acidentais que liberam hidrocarbonetos no ambiente (OKOH, 2006; OLUWOLE et al., 2005). Contudo, durante as etapas de refino existem resíduos cujos componentes não são apenas tóxicos o animais e plantas do ambiente, mas apresentam potencial carcinogênico para a população local afetada.

Resíduos gerados em refinarias são tóxicos devido à presença de altas concentrações de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH). A toxicidade de

persistência desses compostos é conhecida de muitos estudos (WAKE, 2005). Os resíduos de refinaria de petróleo apresentam uma vasta seleção de substâncias perigosas e alta toxicidade. Foi observada uma diminuição na produtividade de alga (bastante importante na cadeia alimentar) de corpos d'água que recebiam efluentes de refinaria (PARDESHI e PATIL, 2008).

Ademais, a descarga de matéria orgânica proveniente de óleo cru contendo hidrocarbonetos resulta num excesso de consumo do oxigênio por bactérias na tentativa de oxidar os poluentes. Os microrganismos no processo de biodegradação consomem o oxigênio mais rapidamente do que ele se dissolve do ar para a água. Dessa forma, o oxigênio dissolvido em ambientes aquáticos cai para valores inferiores a 2 $mg.L^{-1}$, o mínimo necessário para sustentação da vida normal naqueles ambientes (ATTIOGBE et al., 2007). A falta de oxigênio afeta as formas de vida mais complexas.

Resíduos olesos tendem a se agregar a canos e às paredes de esgoto, causando odores ruins e promovendo a corrosão química e microbiológica onde se aderem. Eles também se aderem a canos e acabam obstruindo filtros (XU e ZHU, 2004).

Os compostos fenólicos, por sua vez, apresentam ameaças ao ambiente devido à sua extrema toxicidade (KAVITHA e PALANIVELU, 2004), estabilidade, bioacumulação e persistência. Em geral são carcinogênicos e causam danos consideráveis à saúde humana quando atingem corpos d'agua (YANG et al., 2008).

Componentes do petróleo como nitrogênio e enxofre são altamente tóxicos, principalmente na forma de amônia e sulfato de hidrogênio, respectivamente (ATLAS e BUYUKGUNGOR, 2008). Em meio aquoso, o H_2S existe em equilíbrio como HS^- e S^{2-}. Sulfeto possui uma alta demanda de oxigênio, o que contribui para a depleção do oxigênio (2 mol de O_2 por litro). A degradação da qualidade da água pela adição de resíduos de refinaria e hidrocarbonetos do petróleo deve por isso promover uma mobilização de agências e órgãos reguladores que estabeleçam mais rigor na concentração dessas substâncias no ambiente (POULTON et al., 2002).

Devido à persistência dos hidrocarbonetos, a chance para contaminação dos corpos d'água é alta. A toxicidade do óleo cru para humanos inclui necrose e

congestão do fígado, degeneração de gordura e dissociação de hepatócitos (KHAN e RYAN, 1991). Pássaros e outros animais em áreas contaminadas por petróleo apresentam emulsões negras no trato digestório com odor de petróleo. Isso leva a diminuição da absorção dos nutrientes, causando a morte de muitos animais dessa forma. Dentre outros sintomas de contaminação por óleo cru se incluem ruptura de capilares e hemorragia, necrose renal, anemia e dissociação hepatocelular. Os aromáticos em óleo cru apresentam também efeitos adversos na microbiota local por ter sido demonstrado a inibição do crescimento de células em casos de contaminação por essa substância (SIKKEMA et al., 1995).

3.5. Biorremediação

O uso de microrganismos e seu potencial biodegradante em áreas contaminadas para despoluição ambiental foram denominados como biorremediação. O uso do prefixo “bio” neste caso permite que se entenda o vocábulo como sendo: a ciência voltada a remediação através dos seres vivos. Entretanto, o termo não traduz com exatidão, aquilo a que é voltada a biorremediação. Restritivamente, a biorremediação fica circunscrita à ação de microrganismos. Assim, têm-se, como definição apropriada: “a busca, através do estudo, monitoramento e aplicação da propriedade biodegradativa dos microrganismos à remediação ambiental”.

As técnicas de biorremediação podem ser realizadas no local do derrame (in *situ*) ou fora deste (ex *situ*), envolvendo inúmeros procedimentos tais como: biorremediação passiva, bioventilação, “landfarming”, compostagem, bioaumentação e bioestimulação; segundo Pereira e Lemos (2004). Porém, é de extrema importância usar certos critérios na opção por biorremediação, pois se deve levar em conta a complexidade do ambiente e a concentração e complexidade dos contaminantes (LANDIS e YU, 1995).

A técnica de biorremediação *in situ* é considerada atualmente uma alternativa promissora ao utilizar microrganismos na limpeza de compostos tóxicos pela diminuição da concentração de determinados poluentes. A compreensão da importância desse processo é grande em casos como derramamentos de produtos

como o petróleo no mar ou rios, além de fornecer melhores alternativas no descarte de produtos potencialmente poluentes (ROSA e TRIGUIS, 2007).

Os microrganismos em sistemas hídricos geralmente vivem na interface óleo-água, de onde eles atacam as moléculas do óleo (BROCK e MADINGAN, 1991); e como demonstrado por Zobell (1969), a oxidação microbiana é maior quando as moléculas de hidrocarboneto estão em íntimo contato com a água, papel realizado por surfactantes.

Em contraste com os tratamentos físicos convencionais de separação da área contaminada e seus respectivos contaminantes, sem que ocorra destruição (parcial ou total do poluente), geralmente mediante altos custos e muitas limitações, os processos biológicos de biorremediação representam tecnologias limpas de descontaminação promissoras, principalmente pela simplicidade e custo-efetividade se comparado com alternativas (ALEXANDER, 1994). Assim, a tendência no Brasil é o desenvolvimento de processos biológicos de tratamento de baixo custo, que permitam a sua utilização em larga escala, atendendo as necessidades de preservação ambiental e de saúde publica, além da preservação dos recursos naturais (VAZOLLER, 2004).

A biorremediação ocorre simplesmente durante consumo dos contaminantes pelos microrganismos como fonte de energia e geração de biomassa. Essa habilidade acaba se constituindo numa poderosa arma de defesa ambiental, passível de ser potencializada. A biorremediação surgiu como uma tecnologia alternativa de remediação de locais impactados com poluentes orgânicos e se baseia na utilização de populações microbianas que possuem a habilidade de modificar ou decompor determinados poluentes (CUNHA, 1996). De acordo com Kataoka (2003), a biorremediação, por ser baseada nas atividades metabólicas dos microrganismos, possui certas vantagens, pois, como os agentes poluentes quando são de natureza orgânica, dispõem dos microrganismos que representam o principal e mais econômico caminho para minimizar os efeitos adversos provocados no meio ambiente quando estes são introduzidos.

Para a agência de proteção ambiental dos Estados Unidos (EPA, 2003), um fator importante na seleção da tecnologia de biorremediação é o custo. Não apenas o custo do tratamendo deve ser avaliado, como também dos trabalhos preparatórios

em escala laboratorial (Tabela 3). O custo de estudos piloto foi avaliado em até 500.000 dólares, considerando custos com materiais, mão-de-obra e transporte. O trabalho preparatório é essencial para que o tratamento seja permanente e reduza significativamente a quantidade do resíduo a ser tratado. O tratamento com "landfarming", por exemplo, é recomendado quando existe uma área extensa disponível, as concentrações de óleo não passam de 5% e o tempo de tratamento necessário não é curto (McMILLEN, 2002 *apud* EPA, 2003).

Tabela 3 – Custo das tecnologias de biorremediação (Adaptado de EPA, 2003)

Tecnologia de Tratamento	**Custo (US$.m^{-3})**
Lavagem	215,81 – 326,98
Aterramento	85,01 - 686,67
Incineração	52,31 – 1177,15
Extração por solventes	11,17 – 490,48
Encapsulação	523,18 – 850,16
Biorremediação natural	3,92 – 65,39
Tratamento do solo	52,31 – 117,71
Tratamento ex-situ	170,03
Biorremediação induzida por microrganismos	22,23 – 215,81

A tecnologia de uso mais comum para a remediação de solos envolvem o uso da remoção e tratamento mecânico dos poluentes, como o aterramento, lavagem e dispersão. Isso torna as técnicas caras, trabalhosas e dificilmente é alcançada a decomposição completa dos contaminantes.

Existem duas categorias dentre as opções que dependem da biodegradação como ferramenta de limpeza do ambiente: a biorremediação passiva, que requer monitoramento, mas nenhuma ação (i), ou soluções ativas que requeiram alteração química ou física do ambiente a ser tratado, de modo a aprimorar ou estimular o processo local de biodegradação. Independentemente do processo escolhido, a taxa de biodegradação é uma informação essencial para escolhas preliminares de remediação e monitoramento do processo (BAKER et al., 1994).

3.6. Biodegradação

Biodegradação é o processo pelo qual substâncias são quebradas por processos enzimáticos de organismos vivos. O termo é geralmente utilizado em trabalhos associados à ecologia, gerenciamento de resíduos e biorremediação. Material orgânico pode ser biodegradado aerobiamente ou anaerobiamente. Um termo relacionado à biodegradação é a biomineralização na qual a matéria orgânica e degradada e convertida a minerais (DIAZ, 2008).

Metodologias mecânicas e químicas para redução da poluição por hidrocarbonetos são sempre caras, lentas e invasivas ào ambiente (MANDRI e LIN, 2007). Dessa forma, a biorremediação pela biodegradação se mostra bastante eficiente como método a ser adotado.

A biodegradação consiste na eliminação de compostos orgânicos em um ecossistema pela atividade metabólica dos organismos presentes no local onde está a substância a ser biodegradada. Em teoria, se o processo for 100% eficiente, os produtos finais da biodegradação serão apenas dióxido de carbono e água. A biodegradabilidade e a toxicidade são dois critérios básicos para se determinar o comportamento de substâncias no ambiente. Por isso, alguns autores determinam escalas de intensidade de biodegradação.

Para Aluyor et al. (2009) a biodegradação refere-se à mínima transformação que altera as características físico químicas de uma molécula. A produção de intermediários metabólicos pode por sua vez produzir substâncias mais tóxicas que o substrato original. A mineralização é considerada o objetivo final da biodegradação, que só é atingido quando um microrganismo utiliza totalmente o substrato, resultando na produção de $CO_{2,}$ $CH_{4,}$ sais minerais e água.

Para Pitter e Chudoba (1990), a biodegradação pode ser primária, ambientalmente viável e definitiva. A intensidade da biodegradação pode ser influenciada por diversos fatores como os nutrientes, oxigênio, pH, composição, concentração e biodisponibilidade do contaminante. A biorremediação surge como uma alternativa de acelerar a ocorrência natural da biodegradação ao eliminar os fatores limitantes do processo (ALLARD e NEILSON, 1997).

A EPA (2003) leva em conta apenas as concentrações de hidrocarbonetos totais de petróleo (HTP) como determinação da biodegradação e escolha do tratamento aplicado. Por exemplo, se um óleo apresenta valores baixos de HTP devido ao intemperismo sofrido no local afetado e poucos hidrocarbonetos biodegradáveis restantes, logo a substância não é passível de biorremediação e deve ser tratada de outras maneiras (como a remoção física e incineração). O mesmo tratamento ocorre na presença de cadeias muito longas e pesadas de hidrocarbonetos. Produtos de petróleo como os asfaltenos e resinas não são candidatos para tratamento de biorremediação utilizando a biodegradação.

Vários métodos existem para testar a biodegradabilidade das substâncias. A biodegradabilidade é conhecida ao seguir os parâmetros indicativos do consumo da substância estudada pelos microrganismos. Isso pode ser detectado pela produção de compostos básicos resultantes da mineralização da amostra. Existem vários métodos que abrangem a medição da quantidade de dióxido de carbono: medições da perda de carbono dissolvido em água para o caso de substâncias solúveis, alteração nas bandas de infravermelho em hidrocarbonetos e consumo de oxigênio pela atividade dos microrganismos conhecido como demanda bioquímica de oxigênio ou DBO (ALUYOR et al., 2009).

Cicloalcanos e hopanos (compostos carbônicos pentacíclicos) são freqüentemente usados como padrões quantitativos por serem resistentes à biodegradação. Usando hopanos como padrão, foi demonstrado que a aplicação de nutrientes para estimular o crescimento de microrganismos aumentou significativamente à taxa de biodegradação do petróleo, e que cerca de a metade do composto foi removida no prazo de três meses após a aplicação de nutrientes (PRINCE, 1993; FRONTERA-SUAU et al., 2002). Ademais, a introdução de microrganismos ou consórcios microbianos adaptados aos hidrocarbonetos específicos foi eficaz para aumentar a biodegradação de hidrocarbonetos (COATES et al., 1997).

3.6.1 Bioaumentação e bioestimulação

Existem duas aproximações possíveis na otimização da biodegradação para que o as chances de sucesso na descontaminação da área biorremediada aumente: a bioaumentação (i), que consiste na adição de bactérias com potencial biodegradador de petróleo conhecido para suplementar a microbiota local; e a bioestimulação (ii), que consiste no aprimoramento do crescimento da microbiota local adicionando substâncias que promovam o crescimento (com nutrientes) ou consumo do substrato a ser tratado (como surfactantes).

Utilizando processos de bioestimulação e bioaumentação pode-se otimizar a biodegradação de compostos. O petróleo, ao ser derramado no mar, se dispersa sobre a superfície da água e está sujeito a muitas modificações. Este processo de intemperismo é, principalmente, devido à evaporação das frações de baixo peso molecular, à dissolução dos componentes solúveis, à mistura das gotículas de óleo com água do mar, à oxidação fotoquímica e à biodegradação. Esses componentes de petróleo com ponto de ebulição abaixo de 250°C estão sujeitas a evaporação (HARAYAMA et al., 1999).

Os microrganismos são formados da combinação de elementos que são os componentes de seu material genético, moléculas estruturais, enzimas e plasma intracelular. O metabolismo microbiano e o crescimento são dependentes da disponibilidade de nutrientes essenciais (ALEXANDER, 1994).

Devido à grande diversidade de bactérias, a proporção de elementos nutricionais requeridos para crescimento varia muito, sendo carbono, hidrogênio, enxofre, nitrogênio e fósforo os principais elementos necessários. Os compostos orgânicos biodegradáveis são fontes de carbono que os microrganismos podem utilizar como recurso energético para o crescimento. Outros nutrientes (cálcio, nitrogênio, fósforo, etc.) são geralmente encontrados em concentrações adequadas em muitos solos (PELTOLA et al., 2006).

Fontes de nutrientes devem ser usadas em concentrações limitadas para que não haja inibição do crescimento microbiano e nem aumento do custo do processo. As fontes mais comuns de nutrientes são sais de fósforo e nitrogênio encontrados em fertilizantes agrícolas, e até mesmo em subprodutos da indústria petroquímica. A

adição de nutrientes é feita de modo a se estabelecer relações carbono e nitrogênio (C:N) e/ou carbono e fósforo (C:P) adequadas à biodegradação (HAMDI, et al., 2007). No entanto, uma adição descontrolada pode promover a eutrofização do local, contribuindo para o desequilíbrio ambiental. As relações C:N e C:P são variáveis de processo importantes para verificar a disponibilidade desses nutrientes essenciais para as atividades metabólicas dos microrganismos.

Os macronutrientes são os compostos requeridos em grande quantidade pelas células microbianas como carbono, oxigênio, nitrogênio, potássio, cálcio, magnésio fósforo e enxofre (RISER-ROBERT, 1998). O monitoramento desses nutrientes, em especial fósforo, nitrogênio e carbono, é importante para avaliar o desempenho do bioprocesso de degradação (BENTO et al., 2005). O nitrogênio é precursor de vias metabólicas para formação de aminoácidos, peptídeos ou peptonas (OLLIVIER & MAGOT, 2005). O fósforo é assimilado pelos microrganismos sob a forma de ânion fosfato, o qual é importante por fazer parte de moléculas como DNA (ácido desoxirribonucléico), RNA (ácido ribonucléico), fosfolipídios, NAD, FAD, coenzima A e de algumas vitaminas (MADIGAN et al., 2008).

Marin et al. (2005) descrevem que a quantificação de enzimas dos ciclos do carbono (β-glucosidase), nitrogênio (urease e protease) e fósforo (fosfatase) são medidas importantes para estimar a atividade microbiana, assim como avaliar o grau de contaminação da área impactada.

3.6.2. Biodegradação de hidrocarbonetos

A biodegradação de hidrocarbonetos do petróleo já foi estudada de diversas maneiras. Existem estudos sobre a degradação de derivados pesados do petróleo (LAMBERTS et al., 2008). Os combustíveis leves por sua vez receberam menor atenção (HAWLE-AMBROSH et al., 2007). A biodegradação do petróleo foi estudada até em ambientes árticos (GARRET et al., 2003) mostrando que baixas temperaturas retardam a biodegradação, embora mesmo assim o perfil de biodegradação tenha se mantido o mesmo que em ambientes mais quentes. Sendo degradados primeiro os alcanos e posteriormente outras substâncias. A sequência

de biodegradação das substâncias foi organizada por Prince (2007), conforme Figura 8.

A biodegradação por microrganismos é o melhor mecanismo para remoção de hidrocarbonetos poluentes do ambiente. O reconhecimento de derivados do petróleo aromáticos sofrendo biodegradação em sedimentos marinhos foi feito por Jones et al. (1970). Eles estudaram a biodegradação de aromáticos em sedimentos marinhos que ocorria extensamente por microrganismos. A biodegradação desses compostos se deu mesmo antes que qualquer degradação de alcanos pudesse ter ocorrido. Isso ocorreu porque foram encontrados gêneros de microrganismos específicos envolvidos na biodegradação de aromáticos, como *Arthrobacter, Burkholderia, Mycobacterium, Pseudomonas, Sphingomonas e Rhodococcus*.

A degradação microbiana de hidrocarbonetos do petróleo em um rio contaminado foi também observada na Nigéria por Adebusoye et al. (2007). Foram observados *Pseudomonas fluorescens, P. aeruginosa, Bacillus subtilis, Bacillus sp., Alcaligenes sp., Acinetobacter lwoffi, Flavobacterium sp., Micrococcus roseus e Corynebacterium* como organisomso capazes de metabolizar o óleo cru presente naquele local.

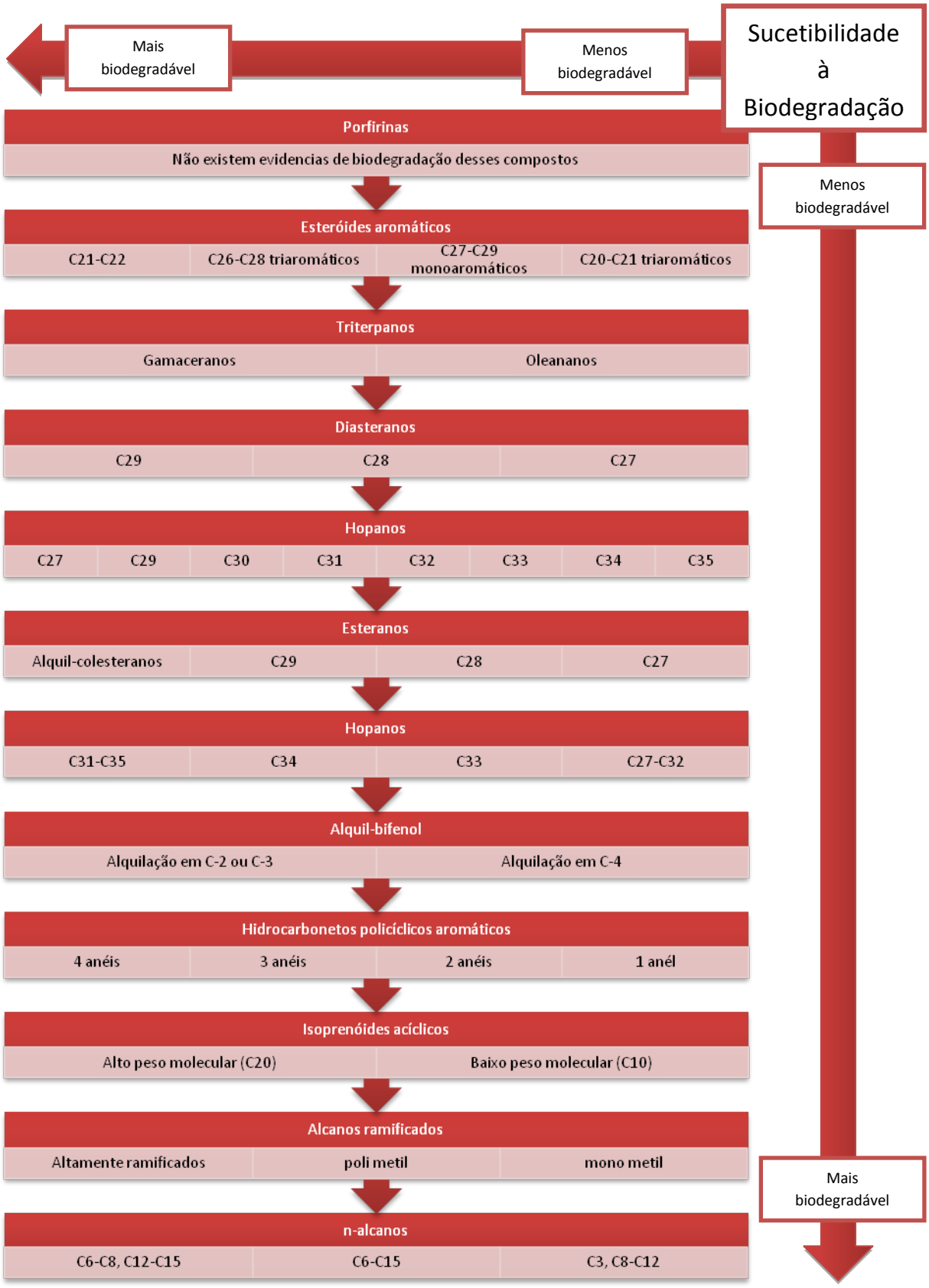


Figura 8 – Biodegradabilidade dos componentes do petróleo (Adaptado de Prince, 2007).

Os hidrocarbonetos são biodegradados primariamente por bactérias, leveduras e fungos. A eficiência de biodegradação varia de 6% a 82% (PINHOLT et al., 1979) em solo para fungos, 0,13% a 50% (HOLLAWAY et al., 1980) em solo para bactérias e de 0,003% a 100% (MULKINS-PHILLIPS e STEWART, 1974) para bactérias no mar. Muitos estudos ainda afirmam que populações mistas (ou consórcios) melhoram o desempenho geral e abrangência das capacidades enzimáticas necessárias para a degradação completa do petróleo tanto em solo (BARTHA e BOSSERT, 1984), água doce (COONEY, 1984) e ambiente marinhos (FLOODGATE, 1984).

Bactérias são os agentes mais ativos na biodegradação de petróleo e atuam como principais degradadores em casos de derramamentos de petróleo (RAHMAN et al., 2002; ROB et al., 2009). Várias bactérias são conhecidas por metabolizarem exclusivamente substratos compostos apenas de hidrocarbonetos (YAKIMOV et al., 2007). Bartha e Bosset (1984) indicaram 22 gêneros de bactérias e 31 gêneros de fungos capazes de biodegradar hidrocarbonetos (Tabela 4).

Dentre os vários estudos em busca de microrganismos capazes de metabolizar hidrocarbonetos, *Acinetobacter* foi considerado capaz de utilizar n-alcanos de comprimentode cadeia de C_{10} a C_{40} como única fonte de carbono (HOLST et al., 2007). Os gêneros de bactéria *Gordonia, Brevibacterium, Aeromicrobium, Dietzia, Burkholderia, Mycobacterium* isolados de solo contaminado com petróleo apresentaram potencial para degradação de hidrocarbonetos (CHAILLAN et al., 2004). A degradação de hidrocarbonetos poli-aromáticos por *Sphingomonas* foi encontrada por Daugulis e McCraken (2003). Alguns gêneros de fungo como *Amorphoteca* e *Neosartorya*, além das leveduras *Candida, Yarrowia* e *Pichia* foram também considerados bons biodegradadores de petróleo (CHAILLAN et al., 2004). Singh (2006) também encontrou em solo fungos com potencial biodegradador como: *Aspergillus*, *Cephalosporium* e *Pencillium*. Cerniglia et al. (1980) observaram que 9 cianobactérias, 5 algas verdes, 1 alga vermelha e 1 alga marrom era capaz de oxidar naftaleno. Todavia, não existem estudos que propõem a utilização de Protozoa na metabolização de hidrocarbonetos.

Tabela 4 – Gêneros biodegradadores de hidrocarbonetos (Adaptado de Bartha e Bosset, 1984)

Bactérias		**Fungos**			
		Actinomicetos	**Leveduras**	**Bolores**	
Achromobacter	*Gluconobacterium*	*Actinomyces*	*Candida*	*Acremonium*	*Graphium*
Acinetobacter	*Micrococcus*	*Endomyces*	*Debaromyces*	*Aspergillus*	*Humicola*
Aeromonas	*Mycobacterium*	*Nocardia*	*Rhodotorula*	*Aureobasidium*	*Mucor*
Agrobacterium	*Pastelleura*		*Yarrowia*	*Beauveria*	*Mortiella*
Alcaligeles	*Proteus*		*Piccia*	*Chrysosporium*	*Oxyorius*
Bacillus	*Pseudomonas*			*Cladosporium*	*Penicillium*
Brevibacterium	*Rhodoccocus*			*Colorospora*	*Phoma*
Chromobacterium	*Sarcina*			*Cryphonectria*	*Rhizopus*
Comamonas	*Streptomyces*			*Dendosporium*	*Spicaria*
Corynebacterium	*Vibrio*			*Fusairium*	*Trichoderma*
Flavobacterium	*Xantomonas*			*Geotrichium*	*Verticilium*

Sabe-se que os hidrocarbonetos podem ser degradados através de três vias metabólicas: respiração aeróbia, respiração anaeróbia e via fermentativa (RATLEDGE, 1994). Na via aeróbia, a primeira etapa da biodegradação consiste na oxidação do hidrocarboneto, que é promovida por enzimas oxigenases. Nesta via, o oxigênio é utilizado como aceptor final de elétrons e os produtos finais são, principalmente, CO_2 e H_2O. Se houver incorporação de uma molécula de oxigênio, a enzima chama-se monoxigenase, esta enzima é responsável pelo ataque de substituintes metil; possivelmente, é a via de degradação do tolueno e dos xilenos. Se houver incorporação de duas moléculas de oxigênio, a reação ocorre devido à dioxigenase, onde anéis aromáticos são atacados, sendo o benzeno, provavelmente, degradado por essa via metabólica.

Na respiração anaeróbia, substratos inorgânicos desempenham a função de aceptores finais de elétrons, onde o CO_2 é reduzido a metano, sulfato a sulfeto, nitrato a nitrogênio molecular ou íon amônio. Já a degradação por via fermentativa caracteriza-se por empregar os substratos fosforilados como aceptores finais de elétrons, resultando em compostos como CO_2, acetato, etanol, propionato e butirato (ENGLERT et al.,1993).

3.6.3. Fatores da biodegradação

Diversos fatores controlam a intensidade da degradação do petróleo. A biodegradação é um processo dinâmico, de condições, microbiota e componentes variáveis conforme o processo avança. Quando as condições são apropriadas, grandes volumes de óleo podem ser degradados em períodos de tempo relativamente curtos, principalmente, quando comparados aos processos geoquímicos que ocorreriam na ausência de microrganismos. As condições para que a biodegradação ocorra depende de muitos fatores.

São necessários aceptores de elétrons, como o oxigênio, nitratos, sulfatos ou mesmo dióxido de carbono para que a biodegradação seja completa. Conforme demonstrado por Haack e Bekins (2000), contaminações em aquíferos próximos à superfície são mais favoráveis devido à presença do oxigênio e outros agentes oxidantes. Isso foi observado também por Tang et al. (2005) ao adicionarem sulfato e nitrato no estimulo à biodegradação anaeróbia.

Somados aos aceptores de elétrons, os nutrientes essenciais devem estar presentes. Hidrocarbonetos são uma fonte bastante rica em carbono e energia, mas geralmente eles não provém todos os outros elementos essenciais para a manutenção da vida, como o nitrogênio, fósforo e metais. Esse fato pode ser limitante para a ocorrência da biodegradação. Procedimentos de biodegradação que superem tais limitações são boas maneiras de aplicar a biorremediação com sucesso em solo e derramamentos de óleo no mar (PRINCE e CLARK, 2004).

Aos microganimos deve ser promovido o acesso ao óleo. Componentes solúveis como o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) são bastante solúveis, contudo a maioria dos hidrocarbonetos onde a biodegradação deve ocorrer apresenta uma baixa solubilidade. A biodegradação ocorre mandatoriamente na interface óleo-água. Isso implica que para a ocorrência de biodegradação in situ é dependente desse contato. O aumento dessa superfície é uma ferramenta fundamental para maiores rendimentos na biodegradação de ambientes aquáticos (HUANG et al., 2004).

Outra condição para biodegradação é a presença de água (HOLDEN et al., 2001), desde que não seja muito salina para os microrganismos. A biodegradação

em experimentos de solo de McMILLEN et al. (1995) foi severamente inibida quando a condutividade do solo atingiu níveis próximos a 41 mS/cm, embora o inóculo utilizado não era halofílico e válido para o experimento proposto. Bactérias halofílicas podem degradar hidrocarbonetos na presença de vários sais, mas estima-se que a salinidade máxima para uma boa biodegradação esteja entre 0,08 a 3,5 M de sais, conforme experimentos com *Marinobacter hydrocarbonoclaticus* em NaCl por Gauthier et al. (1992).

A temperatura do ambiente em que ocorre a biodegradação deve se manter dentre dos limites suportados por organismos vivos. Embora nenhum hiper-termofílico tenha sido encontrado até agora com capacidades de biodegradação de petróleo e hidrocarbonetos derivados, termófilos extremos do gênero *Bacillus* e *Thermus* foram capazes de degradar aromáticos policíclicos em temperaturas de até 83°C (HAO et al., 2004). Com relação às baixas temperaturas, já foi observado por RIKE et al. (2003) a ocorrência de biodegradação em temperaturas inferiores a 0°C.

Por fim, o ambiente onde ocorrerá a biodegradação não pode ser estéril (WILHELMS et al., 2001) nem apresentar biocidas como H_2S, que em concentrações superiores a 5% é inibidor de redutores de sulfato anaeróbios, com potencial biodegradador (LABRENZ et al., 2000).

3.7. Biossurfactantes

3.7.1. Biodisponibilidade

Muitos resíduos, solos contaminados, assim como efluentes contaminados com hidrocarbonetos são pouco solúveis em água. A biodegradação desses poluentes é por isso bastante lenta. Diversas tentativas para superar a baixa bioavaliabilidade dessas substâncias têm sido criadas, como o uso de biossurfactantes (TIEHM et al., 1997), pré-tratamentos químicos, ozonização (KORNMÜLLER e WIESMANN, 1999) ou mesmo a simples elevação da temperatura. Em geral, para aumentar a disponibilidade das substâncias durante a biodegradação utiliza-se: aumentar a solubilidade dos poluentes hidrofóbicos,

diminuir a viscosidade da contaminação, aumentar a difusão dos poluentes consideravelmente rápido, aumentar a temperatura. Cumprindo essas etapas é possível aumentar a solubilidade dos poluentes e assim aumentar a sua biodisponibilidade para que o processo de biodegradação seja aprimorado. Em geral quanto maior a taxa de transferência de massa entre as substâncias maior a sua biodisponibilidade (FEITKENHAUER et al., 2003). Hidrocarbonetos emulsificados podem ter sua biodisponibilidade aumentada com o uso de biossurfactantes a fim de aumentar as taxas de biodegradação (TIEHM et al., 1997).

A mistura de óleo com água do mar ocorre em diversas formas. A dispersão das gotículas de óleo na coluna d'água é induzida pela ação das ondas, enquanto a emulsificação deste óleo ocorre quando ele encontra componentes emulsificantes. Após um grande derramamento de óleo, o tratamento em alguns casos é realizado com surfactantes que são capazes de reduzir a tensão interfacial entre petróleo e água. Consequentemente, as pequenas gotas formadas são dispersas na coluna d'água. Desta forma, já foi observado que o uso de surfactantes nestes casos facilita a ação dos microrganismos, aumentando a eficiência da biodegradação do petróleo (TJESSEN et al., 1984).

3.8.2. Propriedades dos biossurfactantes

Moléculas biológicas tensoativas são classificadas como biossurfactantes. Eles geralmente apresentam como estrutura glicolipídios, lipopeptídios, complexos polissacarídio-proteína, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídios neutros (DESAI e BANAT, 1997; DAS e MUKHERJEE, 2007). Elas também apresentam forte efeito na tensão interfacial de substâncias (LIN, 1996). Biossurfactantes apresentam várias vantagens comparadas às surfactantes sintéticos, como baixa concentração micelar crítica e alta biodegradabilidade. São assim idéias para aplicação no ambiente, como no caso da dispersão de substâncias oleosas na biorremediação de vazamentos de óleo (TIEHM, 1994; BERTRAND et al., 1994). Somado a isso, os biossurfactantes tem o potencial de substituir surfactantes sintéticos na indústria de alimentos, cosméticos, cuidados pessoais e com a saúde, e limpeza (SANDRIN et al., 1990).

Os biossurfactantes têm como propriedade a formação de microemulsões e micelas sejam formadas nas quais os hidrocarbonetos podem se solubilizar em água (ou água pode se solubilizar em hidrocarbonetos (Figura 9). Em geral, a estrutura de um biossurfactante apresenta uma porção hidrofílica composta de aminoácidos, peptídeos, ânions, cátions, monossacarídeos, dissacarídeos ou polissacarídeos. A porção hidrofóbica é composta por ácidos graxos saturados, insaturados ou hidroxilados (GEORGIOU et al., 1992); ou é composta por peptídeos hidrofóbicos.

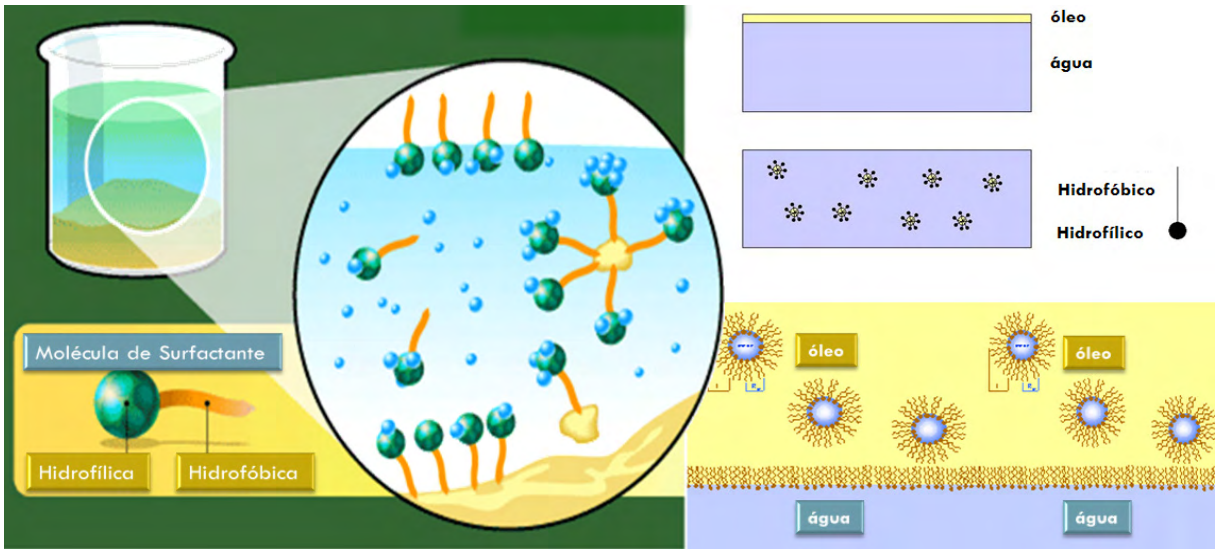


Figura 9 – Estrutura dos biossurfactantes e produção de micelas (Adaptado de Wilson, 2000).

Existe um crescente interesse mundial nos biossurfactantes por eles possuírem as mesmas habilidades dos surfactantes sintéticos (MORKES, 1993). A facilidade de produção dos biossurfactantes é de principal interesse. A produção espontânea de biossurfactantes é geralmente relacionada ao aproveitamento de hidrocarbonetos pelos organismos e são sintetizados primariamente por microrganismos degradadores de hidrocarbonetos. Alguns biossurfactantes, no entanto, são produzidos em meios com compostos solúveis em água, como glicose, sacarose, glicerol e etanol (PASSERI et al., 1992).

Foi também observado em alguns estudos com biossurfactante que tais compostos possuíam propriedades antibióticas capazes de romper a membrana de microrganismos competindo pelo mesmo substrato. Exemplos desses lipopeptídeos são aqueles produzidos por *B. subtilis*, os quais apresentam poderosas propriedades anti-fúngicas (SANDRIN et al., 1990). *Candida antarctica* e *Bacillus licheniformis* são

mais alguns microrganismos que apresentam potencial antibiótico, ambos com capacidade de inibir outras bactérias, fungos e leveduras (KITAMOTO et al., 1993).

3.8.3. Vantagens sobre surfactantes sintéticos

Surfactantes sintéticos têm sido utilizados na indústria do petróleo para ajudar a limpar derramamentos de petróleo, assim como aprimorar a recuperação de óleo de reservas de petróleo. Esses compostos, no entanto, não são biodegradáveis e podem ser bastante tóxicos ao ambiente. Em contrapartida, os biosurfactantes apresentam as mesmas propriedades emulsificantes com a vantagem de serem biodegradáveis e assim torna-se possível seu uso na mobilização de óleo cru, transporte de petróleo por dutos, manuseio de áreas afetadas por derramamentos de petróleo, controle da poluição por derivados de petróleo, limpeza de óleo em instalações de armazenamento e recuperação de óleo (SARKAR et al., 2005).

Ainda assim, mesmo com o crescente interesse nos biossurfactantes, esses compostos não são capazes de competir economicamente com os surfactantes sintéticos. A produção de biossurfactantes é muito menos economicamente viável do que as metodologias já padronizadas de produção dos surfactantes químicos. Para reduzir os custos de produção dos biossurfactantes é necessária a investigação de metodologias de produção, assim como diferentes rotas metabólicas precisam ser propostas. Todos esses estudos visam o aumento no rendimento e acumulação do produto produzido pelos microrganismos. Para isso é necessário o desenvolvimento associado da engenharia de processos ao crescimento de microrganismos produtores de biossurfactantes (MERCADE e MANRESA, 1994). A escolha de materiais brutos e substratos baratos é fundamental para a redução de custos do processo, pois eles são responsáveis por 50% do custo do produto final, além de representar economia no tratamento dos resíduos (MAKKAR e CAMEOTRA, 1997).

3.8.4. Produção e aplicação

O mercado mundial dos surfactantes possui alto valor e chegar a movimentar quantias de aproximadamente US$ 9,4 bilhões por ano. Acredita-se que a demanda

por surfactantes aumente a uma taxa de 35% ao ano. Os surfactantes sintetizados atualmente são quimicamente derivados do petróleo em sua maioria. Entretanto, o interesse por biossurfactantes tem aumentado nos últimos anos, devido às suas diversidades, características para o auxílio ambiental, a possibilidade de produção através de fermentações e suas potenciais aplicações em áreas como a proteção ambiental, recuperação de resíduos de óleos, cuidados à saúde e indústrias de processamento de alimentos (KIM et al., 2000).

Os custos de produção são o maior obstáculo no uso de biossurfactantes. O alto custo dos processos faz com que essas substâncias ainda não sejam capazes de competir economicamente com os surfactantes químicos no mercado (DAVIS et al., 1999). A limpeza de locais marítimos e terrestres contaminados por derramamento de petróleo, remoção da borra oleosa de tanques de estocagem, remoção de metais pesados de solos e córregos contaminados, assim como um aumento geral nos processos de recuperação de óleo de reservatórios, são possíveis aplicações para os biossurfactantes (VAN DYKE et al., 1991).

Biossurfactantes formam diversas estruturas tais como micelas, vesículas esféricas ou irregulares, estruturas lamelares, entre outras (CHAMPION et al., 1995). Eles se acumulam em interfaces apresentando diferentes polaridades, em especial óleo/água, ar/água, e são agentes umectantes em superfícies sólidas (água/sólido). Sua importância econômica deriva dessa capacidade de reduzir a tensão superficial pelo remanejamento molecular, através do acúmulo na superfície de compostos insolúveis, influenciando as ligações de hidrogênio e outras interações hidrofóbicas-hidrofílicas, aumentando a área superficial destes, levando a um aumento da biodisponibilidade e conseqüente biodegradabilidade (BARATHI e VASUDEVAN, 2001).

Em comum com todas as moléculas que atuam em superfícies, os biossurfactantes contêm um ou mais grupos lipofílicos e hidrofílicos. Os grupamentos lipofílicos podem ser uma proteína ou um peptídio, apresentando partes hidrofóbicas ou cadeias carbonadas de 10 a 18 carbonos. Já os grupos hidrofílicos são ésteres, hidróxi, fosfato, carboxila ou carboidratos (MORIKAWA, 1993). Todos os biossurfactantes submetidos a diferentes condições e em diferentes sistemas mostram habilidade de reduzir a tensão superficial e interfacial de misturas

óleo/água. Além disso, com o uso de biossurfactantes ocorre uma pequena mudança na viscosidade das substâncias que pode ser notada devido à utilização de hidrocarbonetos parafínicos, isoparafinas, cicloalcanos e hidrocarbonetos policíclicos (KOSARIC e CAIRNS, 1987).

Conforme a Tabela 5, os principais tipos de biossurfactantes podem ser divididos em lipossacarídios, lipopeptídios, glicolipídios, fosfolipídios, ácidos graxos e lipídios neutros (KOSARIC e CAIRNS, 1987). Existem diferentes categorias de biossurfactantes sendo que os glicolipídios dividem-se em trealose, soforolipídios ou raminolipídios, em geral envolvidos na assimilação de hidrocarbonetos de baixa polaridade por microrganismos. HOLMBERG (2001) define glicolipídios como hidróxi-ácidos graxos ligados a uma molécula de açúcar através de uma ligação glicosídica, enquadrando nessa classe somente os raminolipídios e os soforolipídios. Classifica a trealose como um acil-poliol, cuja diferença para os glicolipídios é que o ácido graxo está ligado a um dissacarídio através de uma ligação éster. Entretanto, a habilidade de promover a interação dos microrganismos aos hidrocarbonetos não é exclusiva desse grupo.

Tabela 5 - Biossurfactantes por microrganismos (Adaptado de Banat, 1994)

Biossurfactante		Microrganismo
Glicolipídios	Micolatos de trealose	*Rhodococcus erytropolis* *Arthrobacter paraffineus* *Mycobacterium phlei*
	Ésteres de trealose	*Mycobacterium fortitum* *Micromonospora* sp. *Mycobacterium paraffinicum* *Rhodococcus erytropolis*
	Micolados de mono-di e trissacarídios	*Corynebacterium diptheriae* *Mycobacterium smegmatis* *Arthrobacter* sp.
	Raminolipídios	*Pseudomonas* sp.
	Soforolipídios	*Torulopsis bombicola* *Torulopsis petrophilum* *Candida* sp.
Fosfolipídios e ácidos graxos	Fosfolipídios e ácidos graxos	*Candida* sp. *Corynebacterium* sp. *Micrococcus* sp. *Acinetobacter* sp.
	Ácidos graxos	*Thiobacillus thiooxidans* *Aspergillus* sp.
Lipopeptídios	Lipopeptídios e lipoproteínas	*Bacillus brevis* *Bacillus polymyxa* *Pseudomonas rubescens* *Thiobacillus thiooxidans*
	Surfactina	*Bacillus subtilis* *Bacilus licheniformis*
Poliméricos	Lipopolissacarídios	*Acinetobacter calcoaceticus* RAG-1
	Heteropolissacarídios	*Acinetobacter calcoaceticus* A1

3.8. *B. subtilis* e a surfactina

A surfactina (Figura 10) é um lipopeptídeo cíclico produzido por muitas cepas de *B. subtilis* e é um biossurfactante muito poderoso (SANDRIN et al., 1990; PEYPOUX et al., 1999). A molécula consiste de um lipopeptídeo cíclico ligado a ácidos graxos hidroxilados e a um heptapeptídeo (l-Glu-l-Leu-d-Leu-l-Val-l-Asp-d-Leu-l-Leu) (COOPER e GOLDBERG, 1987). A surfactina é considerado um biossurfactante bastante eficaz por ser capaz de diminuir a tensão superficial da água de 72 para 27 mN/m mesmo em concentrações muitos baixas (PEYPOUX et

al., 1999). Contudo, reconhece-se que 60% do seu custo de produção está associado à sua recuperação em “downstream processing” (KELLER et al., 2001). Do ponto de vista econômico, seu custo de produção, assim como a de outros biossurfactantes, é alto por necessitar de meios de cultivo específicos para geração de biomassa e, consequentemente, biossurfactante (DESAI e BANAT, 1997). A recuperação dos biossurfactante no caso da surfactina é possível pela precipitação ácida, separação de espuma ou uma combinação de ambos. Esses métodos costumam resultar em uma pureza razoável entre 50 a 60%, insuficiente para produção em larga escala industrial. Uma alternativa para aumentar a pureza é o uso de procedimentos de extração com solventes orgânicos. Na prática, vários solventes orgânicos já foram usados para esse propósito, como metanol, etanol, butanol, acetona, clorofórmio e diclorometano (DESAI e BANAT, 1997). A combinação mais efetiva de solventes seria o clorofórmio-metanol, entretanto o uso do clorofórmio pode causar sérios problemas à saúde humana (DAS e MUHRKEJEE, 2008). Assim, processos de baixo custo e pouco risco são preferíveis do ponto de vista industrial, mas ainda não aplicáveis em escala industriais, embora alguns estudos apontem para a recuperação do surfactante produzido por *B. subtilis* com solventes menos tóxicos como o n-hexano e etil-acetato (KUYUKINA et al., 2001).

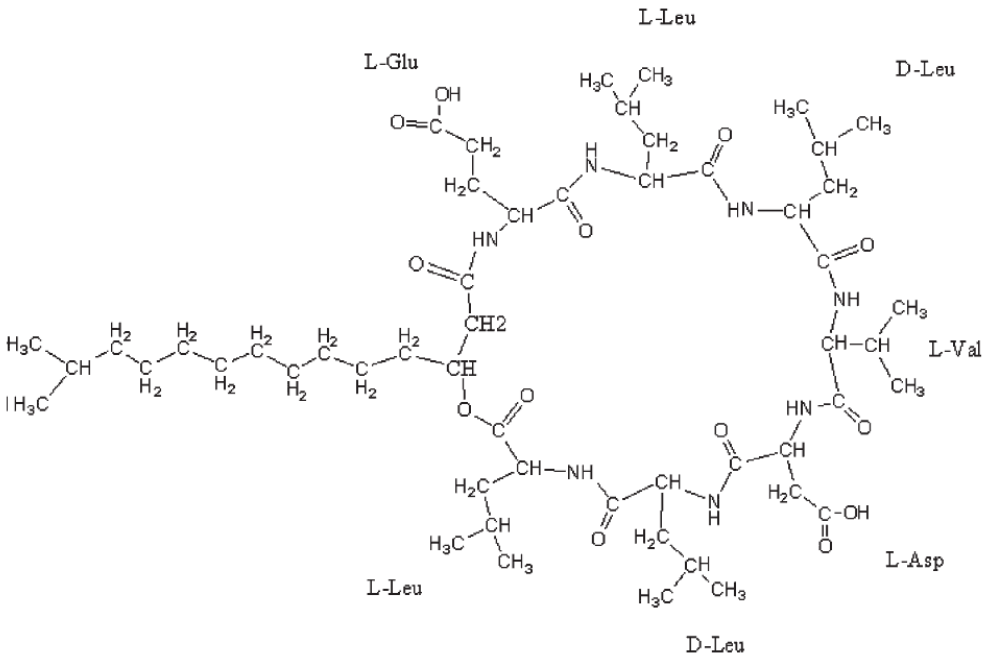


Figura 10 – Molécula de surfactina (Adaptado de Kell et al., 2007).

A surfactina ainda está associada a atividades fisiológicas antibióticas, antitumorais, e anti-HIV (PEYPOUX et al., 1994). Se o custo de produção da surfactina não fosse tão alto, a indústria poderia se beneficiar desse biossurfactante em setores que vão da agricultura à biorremediação. Diversos estudos demonstram a capacidade de emulsificação, produção de espuma e antiviral da surfactina (RAZAFINDRALAMBO et al., 1998). Existem propostas de tornar a surfactina um medicamento pela habilidade antiviral de diferenciar células virais de micoplamas (NISSEN et al., 1997).

A surfactina natural apresenta em suas propriedades físico-químicas devido a variações no tamanho da cadeia, à ligação do seu componente hidroxi ácido graxo e a substituições dos aminoácidos componentes do anel. Estas variações dependem da linhagem e das condições nutricionais e ambientais, mais do que de determinação genética (KOWALL et al., 1998).

A atividade biológica da surfactina depende tanto da composição de aminoácidos e da seqüência do peptídeo como da natureza da sua parte lipídica (KOWALL et al., 1998). As substituições de aminoácidos são responsáveis pelas mudanças significativas em suas propriedades causadas pela modificação da distribuição polar/apolar e/ou da acessibilidade de grupos carboxílicos a cátions. Estas modificações acarretam em diferenças na capacidade hemolítica, quelação de metais, CMC e atividade superficial (LANG, 2002).

Experimentos têm demonstrado que a surfactina é bastante estável quando submetida a diversas condições de pH. A acidificação da solução para pH igual a 2 eleva a tensão superficial para 62 mN/m, voltando para 27 mN/m com a neutralização, pH 6, mostrando a dependência das propriedades surfactantes da surfactina em relação ao pH. Isto se deve ao fato de que em meio ácido a surfactina precipita sem, contudo, ter sua estrutura alterada. Esta característica constitui em uma vantagem adicional, pois mesmo submetida a condições mais extremas de pH, há manutenção da estrutura química original (COSTA, 2005).

4. METODOLOGIA

Os procedimentos experimentais utilizados na obtenção dos resultados foram descritos nessa seção. Este trabalho tem sua metodologia dividida em três partes: a produção do biossurfactante, a biodegradação dos óleos com o biossurfactante produzido (avaliada por métodos respirométricos e colorimétricos) e a avaliação da toxicidade dos resíduos após a biodegradação.

4.1. Produção de biossurfactante

A produção de biossurfactante representa uma etapa importante nesse trabalho pelo fato de ser aplicada aos ensaios de biodegradação subsequentes.

4.1.1. Preparo e seleção dos meios de cultura

O microrganismo utilizado para a produção de surfactante foi o *Bacillus subtilis* ATCC 6633, originalmente conservado sob refrigeração (4°C) em meio Nutrient Agar (NA) de acordo com Difco (1984). O microrganismo foi reativado em meio Caldo Nutriente (CN), de acordo com a Tabela 6, por 24 h e inoculado (1 mL) em frascos erlenmeyer de 250 mL, cada um contendo 100 mL dos meios da Tabela 6. Os frascos foram incubados a 35°C emincubadora Shaker Solab com agitação a 180 rpm para quantificação do crescimento de *B. subtilis (*Figura 11). As pesagens foram realizadas com auxílio da balança analítica Sartorious BL201 S. Os reagentes utilizados na preparação dos meios eram das marcas Sigma, Synth, Vetec e Dinâmica todos PA. O caldo BHI utilizado foi o da marca Criterion.

Figura 11 – Frascos incubados a 35°C em incubadora Shaker Solab com agitação a 180 rpm para crescimento de *B. subtillis* e produção de biossurfactante.

Nesta primeira etapa foi selecionado o meio de cultura que mais produziu biomassa para dar prosseguimento às próximas etapas de produção de biossurfactante, admitindo que exista uma relação diretamente proporcional entre biomassa e produção de biossurfactante, conforme consta nos trabalhos de Vater (1986).

Tabela 6 – Meios de cultura utilizados para crescimento de *B. subtilis*

Meio líquidos e sólidos	Componentes e concentração
NA (Nutrient Agar)	3,0 $g.L^{-1}$ de extrato de carne, 5,0 $g.L^{-1}$ de peptona, 8,0 $g.L^{-1}$ de NaCl e 15 $g.L^{-1}$ de ágar
BH (Bushnell Haas) caldo	0,2 $g.L^{-1}$ de $MgSO_4$, 0,02 $g.L^{-1}$ de $CaCl_2$, 1,0 $g.L^{-1}$ de KH_2PO_4, 1,0 $g.L^{-1}$ de K_2HPO_4, 1,0 $g.L^{-1}$ de NH_4NO_3 e 0,05 $g.L^{-1}$ de $FeCl_3$
BH + Óleo caldo	0,2 $g.L^{-1}$ de $MgSO_4$, 0,02 $g.L^{-1}$ de $CaCl_2$, 1,0 $g.L^{-1}$ de KH_2PO_4, 1,0 $g.L^{-1}$ de K_2HPO_4, 1,0 $g.L^{-1}$ de NH_4NO_3, 0,05 $g.L^{-1}$ de $FeCl_3$ e 1mL de óleo
CN (Caldo nutriente)	3,0 $g.L^{-1}$ de extrato de carne, 5,0 $g.L^{-1}$ de peptona e 8,0 $g.L^{-1}$ de NaCl
BHI (Brain heart infusion) caldo	14,5 $g.L^{-1}$ de caseína, 10 $g.L^{-1}$ de infusão de coração e cérebro, 5 $g.L^{-1}$ de peptona, 3,0 $g.L^{-1}$ de NaCl, 2,5 $g.L^{-1}$ de Na_2HPO_4 e 2,0 $g.L^{-1}$ de glicose
BHI + Mg	14,5 $g.L^{-1}$ de caseína, 10 $g.L^{-1}$ de infusão de coração e cérebro, 5 $g.L^{-1}$ de peptona, 3,0 $g.L^{-1}$ de NaCl, 2,5 $g.L^{-1}$ de Na_2HPO_4, 2,0 $g.L^{-1}$ de glicose e 0,5 $g.L^{-1}$ de Mg

Uma alíquota de 1 mL dos meios foi retirada para contagem em placa utilizando o meio PCA (Plate Count Agar) de acordo com Difco (1984). Foi também feita coloração de Gram, para verificação do crescimento de *B. subtilis*.

4.1.2. Determinação de biomassa

Para determinação da biomassa foram preparados 18 frascos erlenmeyers contendo caldo BHI+Mg conforme 4.1.1 para o crescimento de *B. subtilis*. A cada 4 h um dos frascos erlenmeyer na incubadora Shaker Solab teve seu conteúdo retirado, seu volume foi transferido para tubos de centrifugação e centrifugado a 1,9 x 10^4 g (16000 rpm) por 30 min utilizando uma centrífuga MLW Modelo K24. Totalizando 12 frascos erlenmeyers nas primeiras 48 h, um frasco foi retirados a cada 4 h. Posteriormente, os 6 frascos restantes na incubadora Shaker Solab foram retirados a cada 24 h de forma que o último frasco foi retirado após 168 h do início do crescimento microbiano (Figura 12). Todos os frascos foram centrifugados e o sobrenadante retirado.

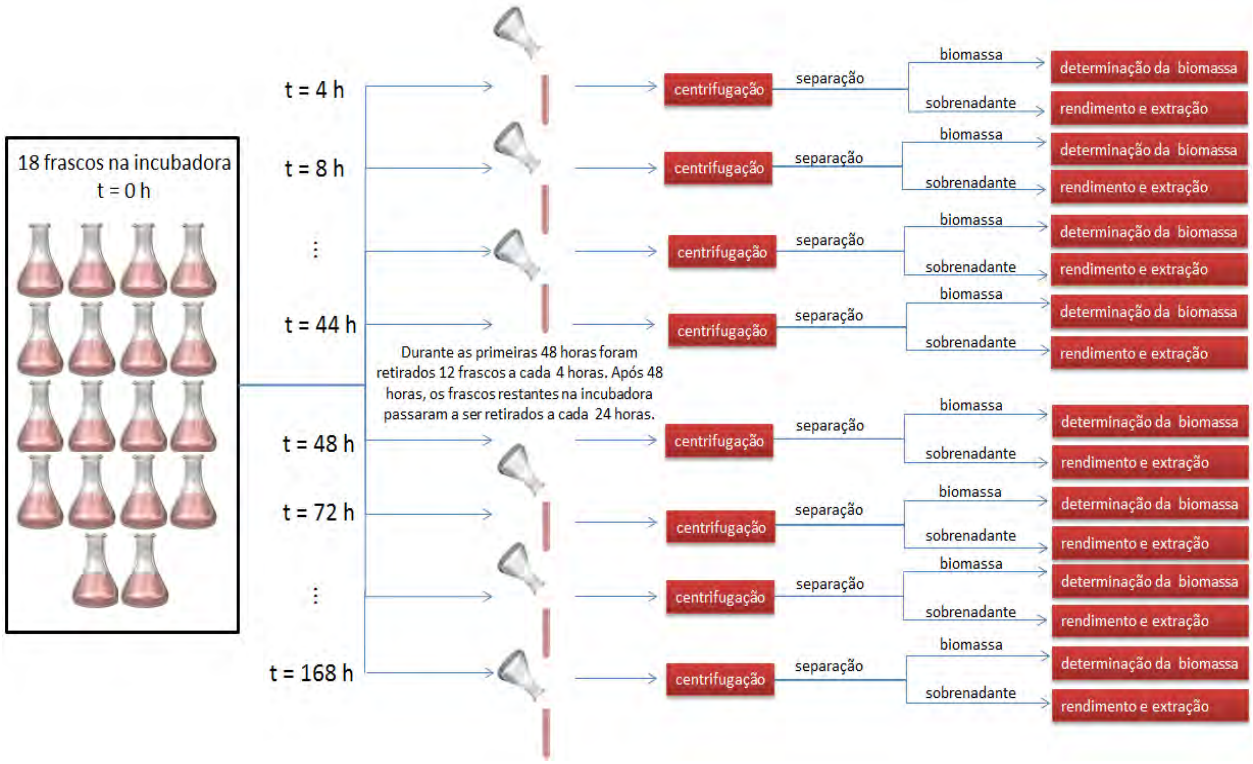


Figura 12 – Esquema da separação de biomassa e sobrenadante após crescimento de *B. subtilis* em BHI + Mg.

O processo de centrifugação foi necessário para extrair o surfactante intracelular. Desta forma, o sobrenadante dos tubos centrifugados apresentando biossurfactante foi coletado.

Os tubos da centrífuga de massa conhecida sem sobrenadante foram deixados em vácuo por 48 h para secagem e foi possível determinar a biomassa produzida.

4.1.3. Medida de tensão superficial

As medidas de tensão superficial em cada um dos tempos de retirada de frascos erlenmeyer foram obtidas com o uso do tensiômetro de bancada Krüss modelo K6 (Figura 13), que permite a leitura analógica pelo método de anel de platina-irídio de 6 cm de circunferência em um vaso de vidro com 50 mm de diâmetro onde foi colocada a amostra, com indicação direta em mN/m. Para que o equipamento funcione é aplicada uma força ao anel por um disco giratório. A força necessária para que o anel se desprenda no líquido é a tensão superficial do líquido analisado. As medidas de tensão superficial foram feitas diretamente nos sobrenadantes coletados após a centrifugação do meio de cultura contendo *B. subtilis*.

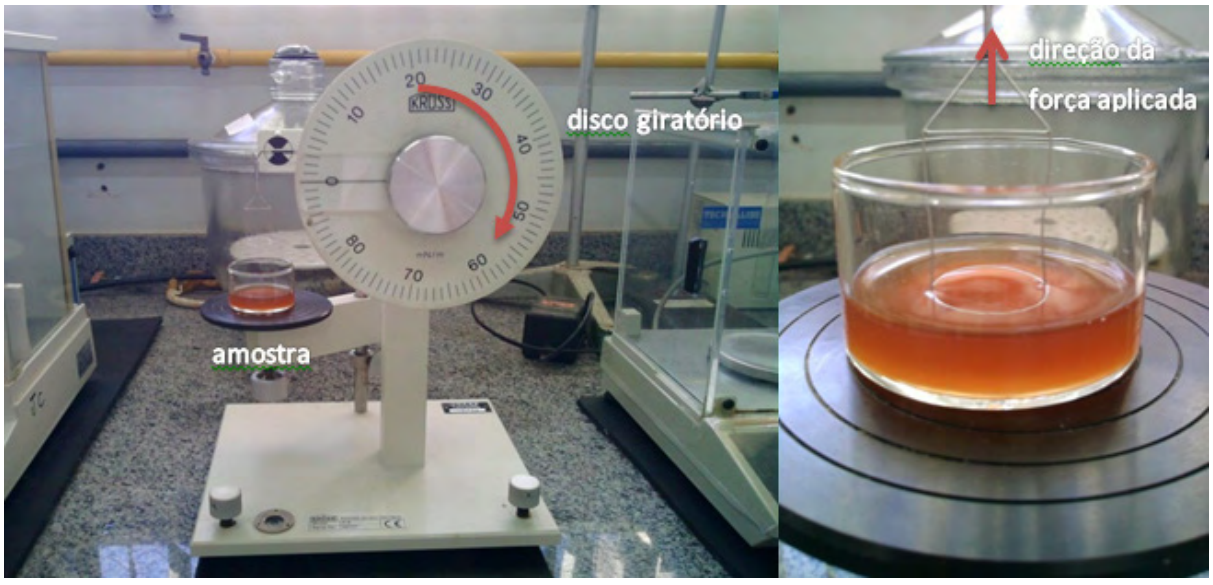


Figura 13 - Tensiômetro de bancada Krüss modelo K6 (esquerda) e detalhe do anel de platina-irídio na superfície do liquido no qual a tensão superficial é medida.

4.1.4. Rendimento do surfactante

O surfactante bruto foi isolado do caldo livre de células obtido em 4.1.2 através da precipitação ácida (QUEIROGA et al., 2003; NITSCHKE et al., 2004; DEHGHAN-NOUDEH et al., 2005) ao ajustar o pH para 2,0 utilizando HCl 6 M e mantendo o caldo a 4°C por 24 h. O precipitado formado contendo biossurfactante foi então coletado, centrifugado a 2100 g por 20 min, seco e pesado (Figura 14).

Figura 14– Esquema da precipitação ácida.

4.1.5. Extração e ressolubilização

Para extração do surfactante, foi adicionado 10 mL de solvente diclorometano ao “pellet” obtido em 4.1.4 e agitado de tubos Phoenix AP56 por 5 minutos. Após a solubilização do pellet, a fase orgânica foi retirada e colocada em capela sob aquecimento para evaporação do solvente. O pó branco amarelado resultante do “pellet” foi então ressolubilizado em água alcalinizada a pH 11,0 com NaOH 6 M e utilizado como surfactante (Figura 15). Esse procedimento garante uma sua pureza de 52% a 55% de acordo com os trabalhos de Chen e Juang (2007) e Gong et al. (2009), que analisaram a substância obtida a partir desse método por cromatografia líquida em alta pressão (HPLC).

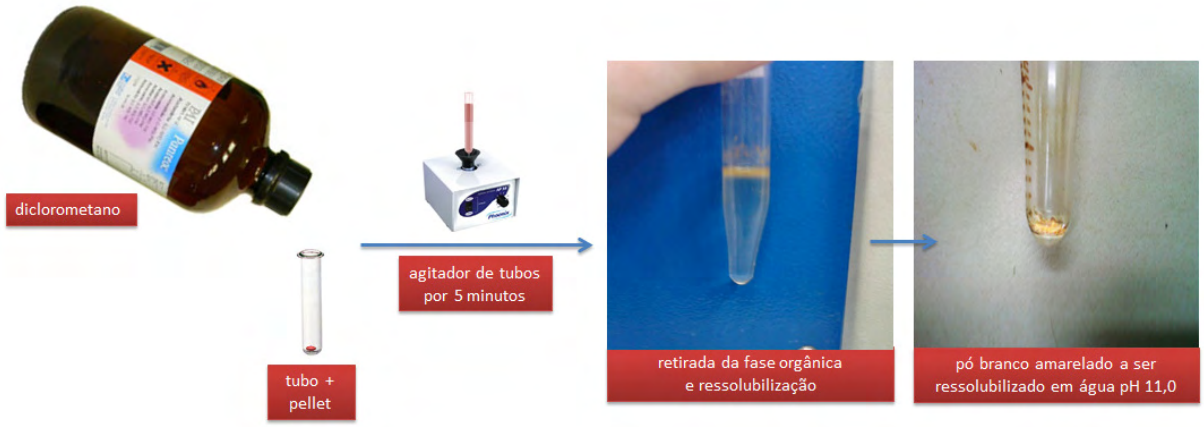


Figura 15 – Esquema da extração e ressolubilização.

4.1.6. Teste de Emulsificação E_{24}

Para investigar possíveis aplicações do biossurfactante obtido por *B. subtilis* procedeu-se um de atividade emulsificante. Uma emulsão é formada quando uma fase líquida é dispersa como gotas microscópicas em outra fase contínua líquida, sendo que as ambas as fases são imiscíveis entre si (DESAI e BANAT, 1997). Por esse motivo, não foi testada a atividade emulsificante em fenol, já que esta substância é solúvel no meio de cultivo onde estava o biossurfactante e por isso impossível de se observar alguma fase líquida imiscível. A capacidade de formar emulsões das diferentes substâncias analisadas nesse estudo (petróleo e derivados, óleos vegetais e biodiesel) em contato com o biossurfactante produzido foi medida pelo índice de emulsificação E_{24}.

O índice de emulsificação (E_{24}) foi medido pela adaptação do método incialmente descrito por Cooper e Goldenberg (1987), utilizado por Ilori et al. (2005). A atividade do biossurfactante em diferentes substâncias foi avaliada ao adicionar a tubos de ensaio 2 mL do meio de cultura fermentado por 48 h livre de células (centrifugado) obtido em 4.1.2 e 2 mL da substância a ser analisado (Figura 16). O índice de emulsificação foi calculado para as seguintes substâncias: petróleo cru, óleo lubrificante sintético, óleo lubrificante usado, óleo diesel, gasolina, querosene, fenol (80 $g.L^{-1}$), óleo de soja, óleo de soja usado e biodiesel B100. O teste foi realizado à temperatura de 25°C.

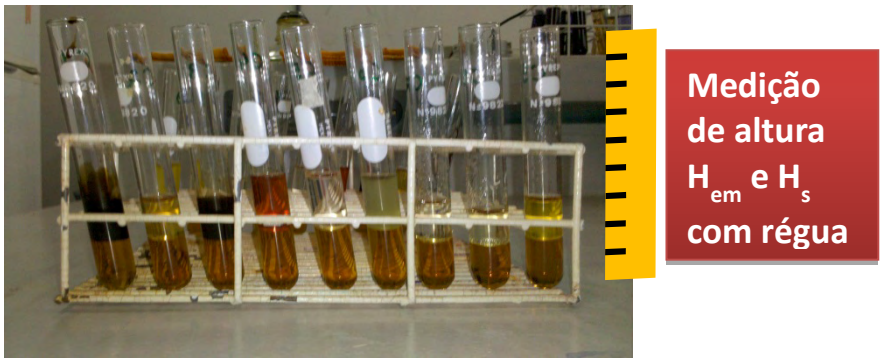


Figura 16 – Montagem dos testes para medida do índice de emulsificação (E_{24}).

O conteúdo dos frascos foi agitado em agitador de tubos (vórtex) por 1 min em alta rotação. Após 24 h calculou-se a razão entre a altura da região emulsificada e altura total (Equação 1), após medição com régua. O teste do índice de emulsificação foi realizado em duplicata.

$$E_{24} = \frac{H_{em}}{H_s} \times 100 \qquad (1)$$

sendo H_{em} a altura da região emulsificada e H_s a altura total da solução.

4.2. Respirometria

Neste estudo foi utilizada uma metodologia de respirometria de Bartha e Pramer (1965) adaptada ao meio aquoso. Utilizando-se essa metodologia é possível determinar informações a respeito das concentrações de CO_2 da atmosfera criada no interior do respirômetro como evidência indireta de biodegradação.

4.2.1. Preparo dos reagentes

Água destilada foi fervida durante 30 min, evidenciando a redução da solubilidade dos gases no líquido. Transcorrido este período, esperou-se o resfriamento para utilização da água na coleta de dados dos respirômetros. Para obtenção de uma solução 0,2 M de KOH (Synth PA) dissolveram-se 11,2 g de KOH em 1000 mL de água isenta de CO_2. Guardou-se a solução em recipiente plástico.

Padronizou-se, utilizando 100 mL de solução 0,200 N de ftalato ácido de potássio ($KHC_8H_4O_4$), com duas gotas de indicador vermelho de metila e calculou-se a normalidade real do KOH. Para obtenção de uma solução 0,1 M de HCl (Vetec PA) transferiu-se 8,5 mL de HCl concentrado para um balão volumétrico de 1000 mL e completou-se o volume com água destilada. Padronizou-se utilizando 100 mL de solução de carbonato de sódio 0,1 M, usando-se 2 gotas de alaranjado de metila como indicador, e calculando-se a normalidade real do HCl (Norma técnica L6.350 da CETESB (1990).

No preparo da solução 0,1 M de $BaCl_2$ (Synth PA), dissolveram-se 6,1 g de cloreto de bário e completou-se o volume para 500 mL com água destilada isenta de CO_2 e guardou-se em recipiente de plástico. Para a solução indicadora de fenolftaleína, dissolveram-se 0,2 g de fenolftaleína em 60 mL de etanol e completou-se com água destilada para 100 mL, sob agitação constante. A solução foi filtrada em algodão, quando houve formação de precipitado conforme Norma técnica L6.350 da CETESB (1990).

4.2.2. Preparo do inóculo

Os microrganismos capazes de biodegradação foram obtidos através da simulação da contaminação do solo em uma sacola plástica preenchido por 3 kg de solo, 50 mL de uma mistura contendo partes iguais de petróleo cru, óleos lubrificantes, óleos vegetais, biodiesel, querosene, diesel, gasolina e fenol (Figura 17). No inoculo foi adicionado 100 mL de água destilada. O recipiente foi então preenchido por pequenos furos de aproximadamente 1 mm de diâmetro, espaçados em 1 cm cada, a fim de permitir a troca de microrganismos entre o solo contendo óleo e o solo do meio externo. O preparo do inóculo foi uma adaptação da Norma técnica L6.350 da CETESB (1990).

Figura 17 – Sacola plástica para obtenção do inóculo contendo partes iguais de petróleo cru, óleos lubrificantes, óleos vegetais, biodiesel, querosene, diesel, gasolina e fenol antes de ser enterrada.

Após 15 dias, foi considerado que ocorreu uma seleção prévia de microrganismos, de acordo com a Norma técnica L6.350 da CETESB (1990). O solo foi então imerso em 1500 ml de água, definindo assim o “liquido base” do inóculo a ser usado e analisado pela respirometria de Bartha & Pramer (1965).

4.2.3. Montagem dos ensaios

O experimento foi conduzido em frascos de Bartha esquematizado na Figura 18. O respirômetro de Bartha e Pramer (1965) consiste em um sistema fechado, apresentando duas câmaras conectadas, onde ocorre a biodegradação do efluente em análise (Figura 18, indicada por G) e outra que possui a solução alcalina capaz de identificar o CO_2 produzido pela respiração microbiana (Figura 18, indicada por D).

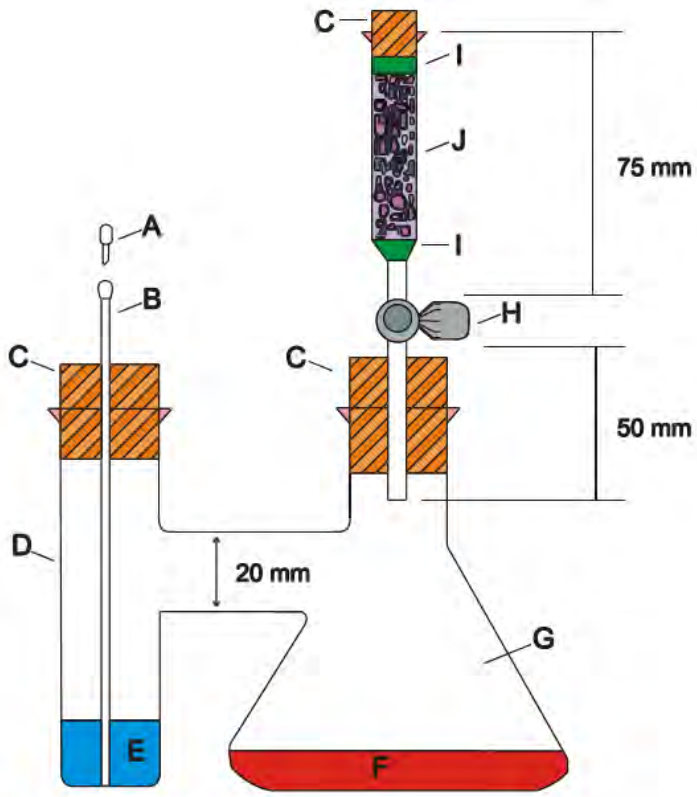


Figura 18 - Esquema de um respirômetro de Bartha (CETESB, 1990). A: Tampa da cânula, B: Cânula (diâmetro de 1 a 2 mm). C: Rolha de borracha. D: Braço lateral (diâmetro de 40 mm; altura de 100 mm). E: Solução de KOH. F: Meio aquoso com a substância analisada. G: Frasco erlenmeyer (250 mL). H: Válvula. I: Suporte (lã de vidro ou algodão). J: Filtro de cal sodada (diâmetro de 15 mm; altura de 40 mm).

A respirometria aplicada à biorremediação oferece uma série de vantagens por obter dados de produção de CO_2 difíceis de serem conseguidos por outras maneiras (GRAVES et al., 1991). Neste estudo foi utilizada uma metodologia de respirometria adaptada ao meio aquoso (LOPES e BIDOIA, 2009; MONTAGNOLLI et al., 2009). Utilizando-se essa metodologia é possível determinar informações a respeito das concentrações de CO_2 da atmosfera criada no interior do respirômetro. Com isso realiza-se a quantificação dos parâmetros sobre a biodegradação em um período de tempo (WU et al., 2004), envolvendo diferentes fases de adaptação, degradação ativa e encerramento da biodegradação. Essa informação pode então ser imediatamente relacionada à taxa de biodegradação e até mesmo a evolução da biomassa presente ao longo do tempo (FIÚZA et al., 2004).

Com os testes de respirometria, foi possível monitorar as taxas de evolução de CO_2. O CO_2 evoluído durante o processo de respiração pode ser capturado em uma solução de hidróxido de potássio (KOH) localizada no braço lateral ligado ao frasco respirométrico. A quantidade de dióxido de carbono (CO_2) absorvida foi então analisada por titulação do KOH residual com uma solução padrão de ácido clorídrico (HCl), após a adição do cloreto de bário ($BaCl_2$) para precipitar os íons carbonato. Os níveis de dióxido de carbono evoluído podem ser calculados e representados em função do tempo de incubação (BALBA et al., 1998). O processo pode ser esquematizado pelas Equações 2 a 6 abaixo:

Biodegradação da matéria orgânica (MA):

$$MA + O_2 \rightarrow H_2O + CO_2 \quad (2)$$

Absorção do CO_2 gerado:

$$2\ KOH + CO_2 \rightarrow K_2CO_3 + H_2O + KOH\ (excesso) \quad (3)$$

Cloreto de bário reage com o carbonato de potássio:

$$K_2CO_3 + BaCl_2 \rightarrow BaCO_3 + 2\ KCl \quad (4)$$

Titulação do excesso de KOH com HCl:

$$KOH\ (excesso) + HCl \rightarrow KCl + H_2O \quad (5)$$

Substâncias resultantes:

$$KCl + BaCO_3 + HCl\ (gota\ excesso) \quad (6)$$

Cada respirômetro contem um braço lateral, ao qual foi adicionado 10 mL de solução de KOH 0,2 N, para capturar o CO_2 liberado durante a biodegradação. Todos os respirômetros foram hermeticamente fechados e incubados em duplicata a 28ºC. O estudo foi constituído por 22 sistemas em duplicata, totalizando 44 respirômetros de Bartha, conforme Tabela 7. Todos os respirômetros contêm o meio líquido onde ocorreu a biodegradação denominado liquido base segundo 4.2.2.

As substâncias analisadas foram petróleo (REPLAN-SP), óleo lubrificante sintético (Lubrax SAE 5W-40), óleo lubrificante usado (mistura de óleos coletados em postos de Rio Claro e Campinas), óleo diesel (Aditivado Extra Diesel S-50 Petrobrás), gasolina (Premium Petrobrás - sem álcool), querosene (Búfalo – sem conservantes), fenol PA (Synth), óleo de soja (Lisa – sem conservantes), óleo de soja usado (mistura de óleos coletados em restaurantes de Rio Claro) e biodiesel (B100 - 10 ppm de antioxidante não tóxico TBHQ da Caramuru, São Simão - GO).

Tabela 7 – Ensaios de respirometria realizados

Ensaio	Substância analisada	Volume de líquido base	Volume de substância	Volume de biossurfactante
Controle S0	----------	99 mL	----------	----------
Controle S0-S	----------	99 mL	----------	1 mL
S01 aS10	* ver nota abaixo da tabela	99 mL	1 mL	----------
S01-S a S10-S	* ver nota abaixo da tabela	99 mL	1 mL	1 mL

*Sendo as substâncias a serem biodegradadas: petróleo cru (S01 e S01-S), óleo lubrificante sintético (S02 e S02-S), óleo lubrificante usado (S03 e S03-S), óleo diesel (S04 e S04-S), gasolina (S05 e S05-S), querosene (S06 e S06-S), fenol (80 g/L) (S07 e S07-S), óleo de soja (S08 e S08-S), óleo de soja usado (S09 e S09-S), biodiesel B100 (S10 e S10-S).

O biossurfactante utilizado foi aquele obtido conforme metodologia em 4.1.5. Sua concentração foi determinada e com isso foi feita uma diluição para se obter uma concentração de 1 $g.L^{-1}$, utilizada em todos os ensaios respirométricos que continham biossurfactantes (Controle S0-S, S01-S, S02-S, S03-S, S04-S, S05-S, S06-S, S07-S, S08-S, S09-S e S10-S).

4.2.4. Acompanhamento da biodegradação

Para cada respirômetro a biodegradação foi estabelecida pela determinação da quantidade de CO_2 produzido semanalmente e foi feita primeiramente preparando-se, para cada frasco de Bartha, um erlenmeyer de 100 mL com duas gotas de fenolftaleína e 1 mL da solução de cloreto de bário ($BaCl_2$ 0,1 M). Retirou-se a rolha de borracha abrindo-se a válvula do filtro de cal sodada (Vetec PA) para remoção de CO_2 do ar. Removeu-se a vedação da cânula do braço lateral do respirômetro e, com uma seringa de 10 mL, transferiu-se à solução de KOH 0,2 N do braço lateral para o erlenmeyer. Preencheu-se a seringa com 10 mL de água destilada e injetou-se no braço lateral do respirômetro para a lavagem e com esta mesma seringa a água de lavagem foi transferida para o erlenmeyer. Repetiu-se essa lavagem por mais duas vezes, completando-se até 30 mL. O conteúdo retirado do braço lateral do frasco de Bartha (Figura 18, indicado por E) foi titulado imediatamente com o conteúdo do erlenmeyer e HCl 0,1 M. Com a cânula do braço lateral aberta injetou-se ar comprimido com uma bomba de ar. O ar passou através do filtro de cal sodada, cuja função foi reter o CO_2 do ar introduzido, de forma a garantir a reoxigeração do sistema, sem permitir a entrada de CO_2. Por fim, adicionou-se 10 mL de uma solução de KOH 0,2 M no braço lateral e recolocou-se a vedação da cânula, fechando-se a válvula e recolocando-se a rolha de borracha no filtro de cal sodada. Após esses procedimentos, cada respirômetro foi colocado na estufa de incubação, até a próxima determinação do CO_2.

Como base de cálculo para a próxima determinação do CO_2 incorporado, foi preparada uma nova prova em branco contendo 10 mL de solução KOH 0,2 M, adicionado com seringa de 10 mL, e 2 gotas de fenolftaleína, 1 mL de solução de $BaCl_2$ 0,1 M e 30 mL de água destilada. A solução foi titulada com HCl 0,1 M, anotando-se a quantidade de ácido necessária para a viragem da fenolftaleína. O cálculo do CO_2 gerado foi feito de acordo com o volume gasto de HCl na titulação do KOH na Equação 7 abaixo:

$$GCO_2 = (A - B) * 50 * \theta_{HCl} * 0{,}044 \qquad (7)$$

onde:

GCO_2 = geração de gás carbônico;

A = volume de HCl 0,1 N gasto, em mL, na titulação do branco;

B = volume de HCl 0,1 N gasto, em mL, na titulação da amostra; 50 = fator para transformar equivalente em µmol de CO_2;

f(HCl) = fator do HCl 0,1 N;

0,044 = fator para transformar µmol em mg de CO_2.

4.2.5. Modelagem matemática

Os dados de produção de CO_2 foram usados no ajuste de modelos matemáticos que melhor descrevem o processo de biodegradação. A modelagem dos dados permite um melhor conhecimento da cinética de biodegradação, permitindo assim prever e otimizar o processo (KERNANSHANI et al., 2006). O uso de ferramentas matemáticas e estatísticas é uma maneira eficaz de descrever os parâmetros envolvidos na remoção de poluentes durante a biodegradação (PALA et al., 2006). A proposição de diferentes modelos de biodegradação para cada tipo de substância biodegradada permitiu determinar de que maneira os perfis de biodegradação variam para cada substância ao longo do processo de biodegradação.

Os dados foram analisados por ferramentas estatísticas no SYSTAT SIGMASTAT 10. A geração de gráficos foi feita pelos softwares MICROCAL ORIGIN 6.0 e SYSTAT SIGMAPLOT 10. A partir deles foram realizadas análises descritivas dos dados presentes no Apêndice 8.2. Para a modelagem dos dados e ajuste em equações foi utilizada a plataforma WOLFRAM MATHEMATICA 6 e o SYSTAT SIGMAPLOT 10.

Sobre os modelos utilizados, devem ser feitas duas considerações. Foi utilizado para cada tipo de respirometria (acumulada e semanal) um modelo diferente, já que a forma das curvas geradas nos dois casos difere bastante (i), e, além disso, uma série de modelos foi testada para cada caso, mas o critério para seleção do melhor modelo foi baseado na maior média de R^2 obtido entre os ajustes feitos (ii). A maioria dos modelos testados para ajuste foram aqueles que correspondem à cinética de crescimento de culturas microbianas.

O primeiro modelo proposto de melhor ajuste foi uma adaptação da equação logística de Schmidt et al. (1985), que foi usado inicialmente pelo autor para descrever o crescimento de microrganismos em meios de cultura (Equação 8). Tal equação foi testada por fornecer a previsão da máxima produção de CO_2 pelos microrganismos no processo de biodegradação.

$$B = Bmax/(1 + \left[\frac{Bmax - Bo}{Bo}\right] e^{-rt}) \quad (8)$$

onde:

B = CO_2 Produzido;

Bmax = Produção máxima de CO_2;

Bo = Produção inicial de CO_2;

r = Taxa máxima de produção especifica para determinado óleo;

t = Tempo.

Outro modelo foi ajustado para as curvas de respirometria semanal. Tais gráficos compreendem curvas mais complexas e exigiram, portanto, um modelo com maior quantidade de parâmetros. Foi utilizado o modelo proposto por Membré et al. (1996) para crescimento e morte de comunidades microbianas (Equação 9):

$$B = \left[\left(\left(\frac{1}{K1}\right) e^{-m1r}\right) + \left(\left(\frac{1}{K2}\right) e^{m2t}\right)\right]^{-1} \quad (9)$$

onde:

B = CO_2 Produzido;

K1 = Constante de Aumento de Produção;

K2 = Constante de Diminuição de Produção;

m1 = Taxa de Aumento na Produção de CO_2;

m2 = Taxa de Diminuição na Produção de CO_2;

t = Tempo.

Ambos os modelos foram criados para descrever o crescimento microbiano. Assumindo que exista uma correlação entre a dinâmica populacional de microrganismos e a produção de CO_2 semanal, esses modelos foram utilizados no conjunto de dados obtidos na respirometria.

4.2.6. Análise estatística dos dados

Os dados de produção de CO_2 de cada substância foram analisados estatisticamente quanto à semelhança do perfil de biodegradação. Para isso utilizado um teste que indicasse se um conjunto de dados, como por exemplo, os pontos que compõem a curva de biodegradação, são estatisticamente diferentes entre si. O teste F utilizado retorna a probabilidade de que um conjunto de dados de uma curva é significativamente diferente em um intervalo de 0 a 1. Esta função quantifica e determina se as curvas de duas amostras possuem variâncias diferentes. Por exemplo, a partir de resultados de testes fornecidos por diferentes tipos de óleos, é possível verificar se esses óleos têm de fato diferentes perfis de biodegradação a partir da diferente produção de CO_2.

4.3. Colorimetria

O indicador 2,6-diclorofenol-indofenol (DCPIP) da Vetec PA é um composto químico cuja cor se altera quando reduzido. Quando o indicador está oxidado sua coloração é azul, e quando reduzido é incolor. Hanson et al. (1993) aplicaram o DCPIP em caldo Bushnel Haas no monitoramento de degradação de óleo cru (petróleo) por bactérias.

A mudança de cor é devida à mudança na estrutura da molécula de DCPIP. O átomo de nitrogênio no centro da molécula é o aceptor de elétrons onde ocorre a mudança da ligação dupla entre nitrogênio e carbono para um ligação simples (Figura 19). A mudança na ligação faz com que uma alteração da molécula ocorra. Sendo assim, a redução causa a mudança de cor de azul escuro para incolor. Esta mudança de cor pode, no entanto, ser usada em uma série de reações em que ocorram trocas de elétrons como a biodegradação de compostos.

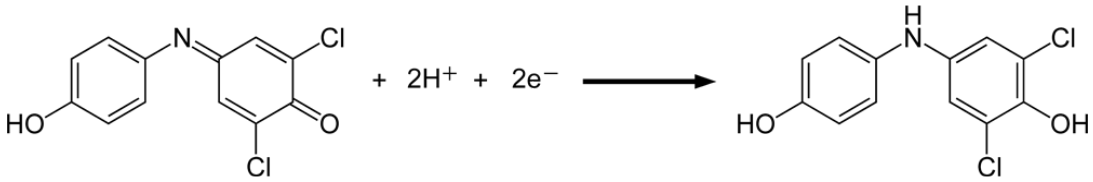


Figura 19 - Reação do 2,6-diclorofenol-indofenol como aceptor de elétrons. A mudança na ligação dupla entre o nitrogênio e carbono altera a estrutura da molécula (Adaptado de Vernon e Zaugg, 1960).

No experimento de Hanson et al. (1993), bactérias com alto potencial biodegradante de óleo cru foram capazes de tornar o meio incolor apenas após 24 h de incubação. Essa metodologia foi então adaptada para esse estudo e empregada para avaliar a biodegradação de diferentes derivados do petróleo, considerando o tempo necessário para a total descoloração como indicador de biodegradação do óleo, e mudanças na absorbância ao longo da biodegradação.

4.3.1. Preparo dos reagentes

Os reagentes utilizados foram o caldo BH (Tabela 6), o biossurfactante obtido em 4.1.5 e o indicador DCPIP 1,000 $g.L^{-1}$. Para o preparo da solução 1,000 $g.L^{-1}$ de DCPIP dissolveram-se 0,100 g de DCPIP em 100 mL de caldo BH, então homogeneizada e mantida em frasco âmbar protegida de luz.

Sobre o indicador DCPIP foi necessário estabelecer o comprimento de onda de maior absorbância, no qual foram feitas as medidas de absorbância ao longo da biodegradação, utilizando o espectrofotômetro UV-Vis Shimadzu 2401 PC, e uma reta padrão no comprimento de onda de maior absorbância feita pelo

espectrofotômetro Hach Odissey DR-2500 a partir de 5 diluições do indicador em caldo BH. Com isso foi possível determinar a quantidade de DCPIP em sua conformação azul presente em solução ao longo do processo de biodegradação.

4.3.2. Preparo do inóculo

Nos ensaios de biodegradação foi utilizado *B. subtilis* CCT 2576 conservado sob refrigeração (4°C) em meio Nutrient Agar (NA) de acordo com Difco (1984). O microrganismo foi reativado em caldo BHI enriquecido com magnésio (Tabela 6) por 24 h e inoculado (1 mL) em 100 mL de caldo BH (Tabela 6). Após 24 h em caldo BH a 35°C e agitação a 180 rpm o microrganismo foi inoculado nos ensaios de DCPIP conforme descrito na próxima seção.

4.3.3. Montagem dos ensaios

A colorimetria foi conduzida em tubos de ensaio com tampa, próprios para leitura no espectrofotômetro Hach Odissey DR-2500. As quantidades e substâncias inclusas nos ensaios colorimétricos seguem as concentrações da Tabela 8.

Tabela 8 – Ensaios colorimétricos realizados

Ensaio	**DCPIP**	**Caldo BH**	***B. subtilis***	**Substância a ser biodegradada***	**Surfactante (1 g.L^{-1})**
C0	400 µL	7,5 mL	----------	----------	----------
C1	400 µL	7,5 mL	100 µL	----------	----------
C2	400 µL	7,5 mL	----------	----------	100 µL
C3	400 µL	7,5 mL	100 µL	----------	100 µL
A1 a A10	400 µL	7,5 mL	----------	50 µL	----------
B1 a B10	400 µL	7,5 mL	100 µL	50 µL	----------
S1 a S10	400 µL	7,5 mL	100 µL	50 µL	100 µL

*Sendo as substâncias a serem biodegradadas: Petróleo cru (A1, B1 e S1), óleo lubrificante sintético (A2, B2 e S2), óleo lubrificante usado (A3, B3 e S3), óleo diesel (A4, B4 e S4), gasolina (A5, B5 e S5), querosene (A6, B6 e S6), fenol (80 g/L) (A7, B7 e S7), óleo de soja (A8, B8 e S8), óleo de soja usado (A9, B9 e S9) e biodiesel B100 (A10, B10 e S10).

Os tubos de ensaios foram feitos em triplicatas, totalizando 102 tubos de ensaio (Figura 20). Depois de montados, cada um dos tubos foi agitado em agitador de tubos Phoenix AP56 por 10 segundos e armazenados em incubadora com agitação a 35°C e 180 rpm.

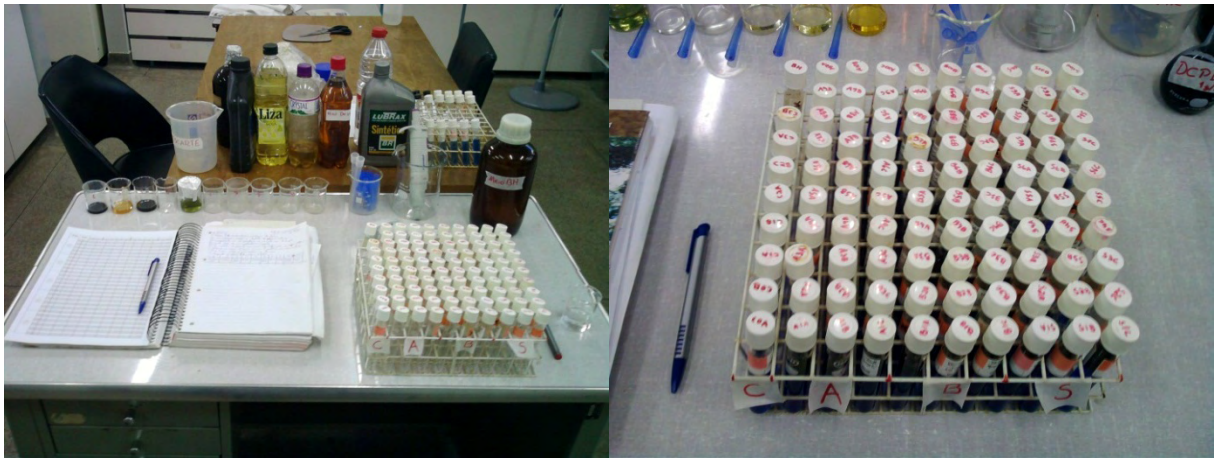


Figura 20 – Montagem dos ensaios colorimétricos.

Além desses ensaios foi testado também o uso do “bioscreening” Labsystem C para monitoramento da biodegradação e coloração do DCPIP. O ensaio foi feito em menores quantidades dado o tamanho dos poços da placa utilizada pelo equipamento, mas mantendo-se as proporções da Tabela 8. A limitação da técnica, entretanto, ocorre pelo fato da leitura ser feita por um feixe de luz de incidência vertical, o que não funciona com todos os tipos de substâncias como, por exemplo, o petróleo pelo fato de ficarem na parte de cima do líquido, impedindo o funcionamento adequado do aparelho. O espectrofotômetro Hach Odyssey DR 2500 faz suas leituras através de um feixe horizontal, incidente longe da camada de óleo presente em alguns ensaios.

4.3.4. Acompanhamento da biodegradação

A descoloração do DCPIP, que indica ocorrência do processo de biodegradação nos tubos, foi monitorada três vezes ao dia até o conteúdo dos tubos

se descolorisse totalmente. As coleta de dados foi feitas diariamente às 9:00 h, 15:00 h e 21:00 h.

4.3.4.1. Medidas qualitativas

A análise quantitativa foi feita por meio de fotografias devidamente organizadas em um banco de dados contendo as imagens. Todas as imagens foram capturadas seguindo um mesmo padrão de iluminação e ordenação dos tubos. Em todas as imagens estão os tubos controle (C0, C1, C2 e C3) e os tubos contendo a substância a ser biodegradada (A1 a 10, B1 a B10 e S1 a S10). As imagens estão armazenadas por tipo de substância e tempo de biodegradação. A partir delas observou-se o tempo necessário para a descoloração do corante DCPIP se completar.

4.3.4.2. Medidas quantitativas

As medidas quantitativas foram feitas com o uso do espectrofotômetro Hach Odyssey DR-2500 no comprimento de 600 nm em todos os tubos (Figura 21). Os tubos foram deixados por 10 min sem agitação antes do início das medições e não movimentados bruscamente para evitar qualquer turbulência do liquido, que pudessem alterar os resultados de absorbância obtidos.

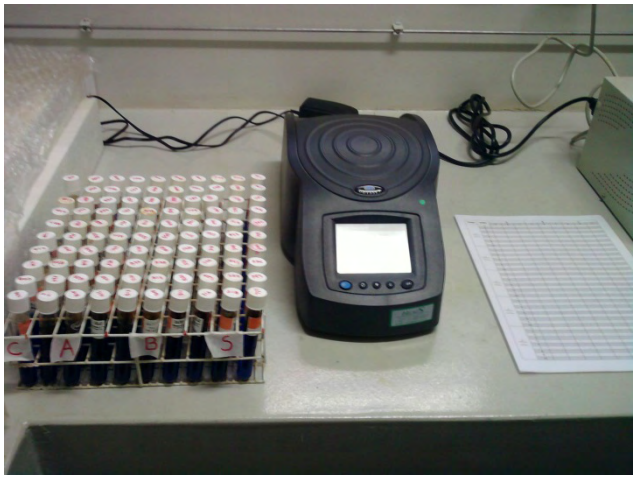


Figura 21 - Espectrofotômetro Hach Odyssey DR-2500 onde foi medida a absorbância nos ensaios colorimétricos.

4.4. Toxicidade

Os testes de toxicidade foram realizados com três organismos por metodologias padronizadas. Esse estudo baseou-se nas metodologias propostas por Morales et al. (2004), Dutka (1989) e Wang (1987). Foram feitos ensaios de toxicidade aguda para determinar intensidade de efeitos adversos observados e estabelecer uma comparação da toxicidade de uma substância com outras substâncias de toxicidade conhecida. O efeito dos diferentes derivados do petróleo e demais substâncias avaliadas nesse estudo tiveram sua toxicidade testado para três organimos-teste: *Cucumis sativus* (pepino), *Lactuca sativa* (alface) e *B. subtilis*.

4.4.1. Toxicidade em sementes de alface e pepino

Os ensaios de toxicidade das espécies vegetais foram avaliados pela germinação de sementes, desenvolvimento da raiz e hipocótilo. As sementes foram adquiridas de um mesmo fornecedor (TopSeed), de mesmo lote e livre de defensivos químicos agrícolas. Para os ensaios de toxicidade não foram utilizadas diluições das amostras de cada substância, mas sim foi testada a toxicidade da mesma solução contida nos frascos de Bartha (Tabela 7 – seção 4.2.3) antes e depois do processo de biodegradação. Foi também medido o pH e condutividade do conteúdo dos respirômetros com os equipamentos Digimed DMPH-2 e Technopon CA150, respectivamente.

4.4.1.1. Germinação

A germinação é um fenômeno biológico da retomada do crescimento do embrião, com o subsequente rompimento do tegumento pela radícula. Do ponto de vista fisiológico, germinar é simplesmente sair do repouso e entrar em atividade metabólica (NASSIF et al., 1998), desde que satisfeitas as condições internas e ambientais necessárias para que o organismos possa se desenvolver. Qualquer alteração nesses parâmetros por substâncias tóxicas podem afetar no desenvolvimento do tecido vegetal (AYERS e WESTCOT, 1999).

Para os testes de germinação, foi colocado em cada placa de petri um papel de filtro. Sobre o papel de filtro foi adicionado 4 ml da solução testada e certificou-se a inexistência de bolhas de ar durante o preparo das placas. A solução testada foi o meio aquoso com substância presente nos frascos de Bartha (Figura 7f), antes e depois de serem biodegradadas. Foi testada também a toxicidade das substâncias biodegradadas com biossurfactante e sem biossurfactante (Figura 22). As sementes foram colocadas em seguida sobre o papel de filtro com a solução testada. Nos ensaios com *Lactuca sativa* foram colocadas 20 sementes. Nos ensaios com *Cucumis sativus*, devido ao grande tamanho das sementes, foram colocadas 8 sementes em cada placa de petri. Os experimentos foram conduzidos em duplicata para cada substância testada (Figura 22).

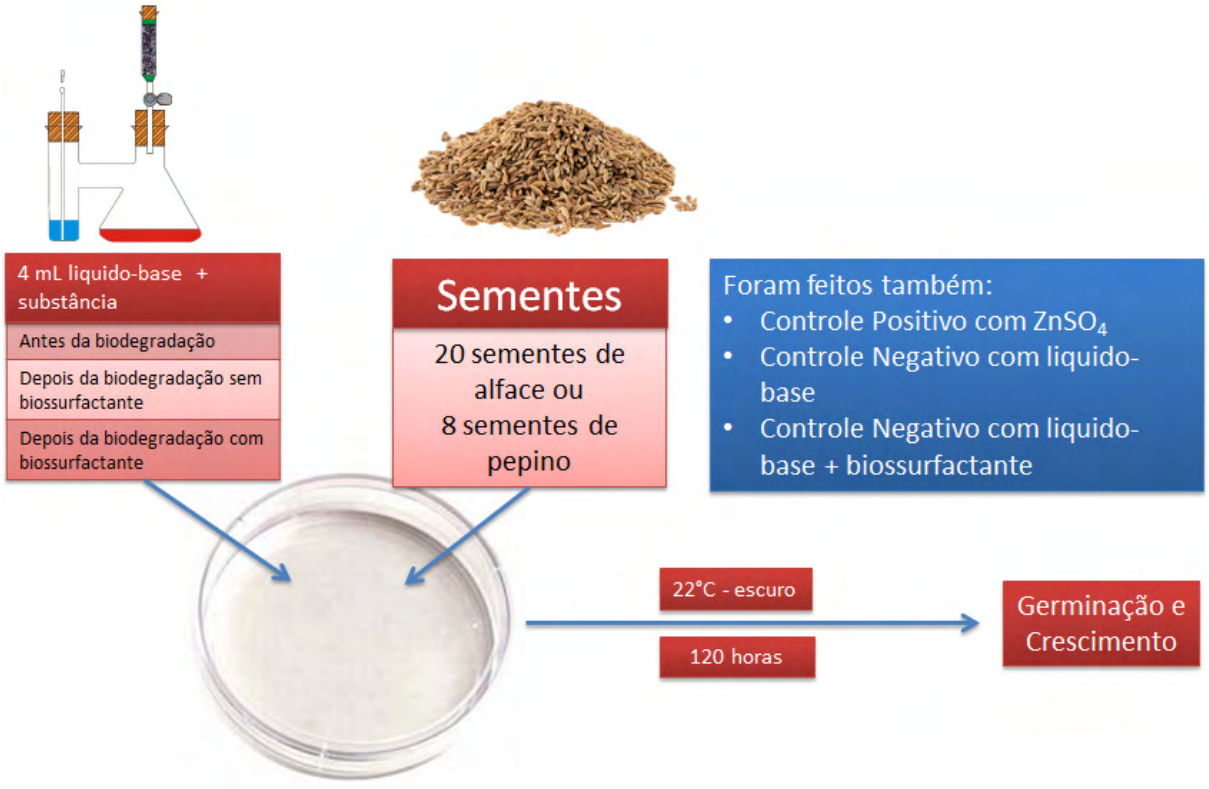


Figura 22 – Esquema dos testes de toxicidade realizados.

As placas foram cobertas com filme plástico (Figura 23) a fim de não perder umidade, e cobertas por papel escuro. As placas foram incubadas em câmara climática (incubadora BOD) a 22 ± 1ºC, ao abrigo da luz por 120 h.

Para esse teste também foram feitos em duplicata dois controles negativos compostos pelo mesmo “líquido-base” utilizado nos ensaios controle dos frascos de Bartha (Controle S0 e S0-S da Tabela 2 – seção 4.2.3). Como controle positivo foi utilizada solução de 0,05 N de $ZnSO_4$ (Synth PA) também em duplicata.

Figura 23 – Montagem dos ensaios de toxicidade.

A contagem de sementes germinadas foi realizada após 120 h, sendo consideradas germinadas as sementes que apresentassem 2 mm de protrusão da radícula. Os dados obtidos nos ensaios foram utilizados para calcular a porcentagem de germinação (%G) dada por Labouriau e Agudo (1987) conforme a Equação 10 e a porcentagem de inibição (%I) dada por Santos e Rezende (2008) conforme a Equação 11.

$$\%G = \frac{SGa}{SGt} \times 100 \quad (10)$$

$$\%I = [1 - \left(\frac{SGc - SGa}{SGc}\right)] \times 100 \quad (11)$$

onde:

SGa = o número total de sementes germinadas;

SGt= número total de sementes na placa de petri;

SGc= numero total de sementes germinadas no controle negativo.

Os dados foram analisados estatisticamente e as médias de germinação foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade conforme Sokal e Rohfl (1995) após a transformação dos dados percentuais %G em arco seno (SNEDECOR, 1962; LABOURIAU, 1983; PIMENTEL e GOMES, 1987) conforme a Equação 12. A transformação dos valores foi feita para normalizar o conjunto de dados e permitir a aplicação do teste estatístico.

$$Valor\ transformado = arco\ seno\ (\%G)^{0,5} \quad (12)$$

A porcentagem de germinação foi transformada apenas para os testes de Tukey, porém nas Figuras e Tabelas são apresentadas as porcentagens médias originais.

4.4.1.2. Crescimento de raiz e hipocótilo

A realização dos testes de toxicidade ao desenvolvimento da raiz e hipocótilo seguiu os procedimentos descritos por Morales (2004) e foram feitos com as mesmas placas montadas em 4.4.1.1. Entretanto, nesse caso, após 120 h as placas foram submetidas ao congelamento em freezer. Este procedimento, além de interromper o crescimento das plântulas de modo uniforme, facilita as medições pela diminuição da rigidez dos tecidos vegetais, evitando possíveis quebras das plântulas durante a realização das medições. Para cada plântula foram tomadas medidas da raiz e hipocótilo (Figura 24).

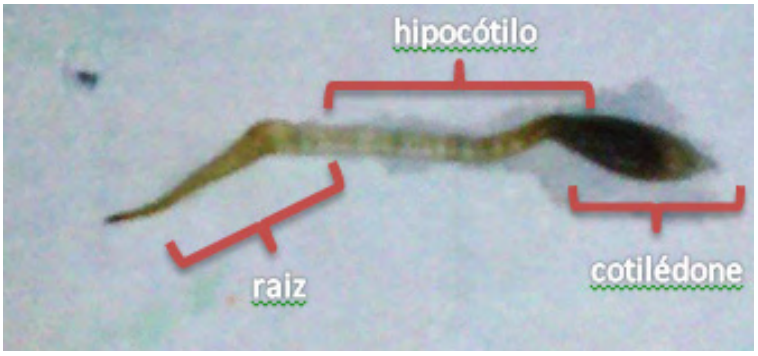


Figura 24 – Semente de pepino e estruturas medidas.

O conjunto de medidas da raiz e hipocótilo permitiu a observação da influência da exposição à substância testada no crescimento do tecido vegetal após 120 h pela observação do comprimento e %I (Equação 13).

$$\%I = [1 - \left(\frac{CMc - Ca}{CMc}\right)] \times 100 \quad (13)$$

onde:

CMc = comprimento médio da raiz ou hipocótilo no controle negativo;

Ca = comprimento médio da amostra analisada.

4.4.2. Toxicidade em B. subtilis pelo método ToxTrak

O organismo-teste empregado foi o mesmo *B. subtilis* utilizado na produção de biossurfactante e nos ensaios colorimétricos com indicador DCPIP. A porcentagem de inibição celular indicando toxicidade foi determinada através da metodologia abordada pelo kit comercial “ToxTrack Toxicity Test” fabricado pela Hach Company, utilizando o espectrofotômetro Hach Odyssey – modelo DR/2500 (Method 10017).

Este método é baseado na redução da resazurina, um corante indicador redox, pela respiração bacteriana, como o DCPIP empregado em 4.3. Contudo, nos tubos de ensaio contendo a amostra, a resazurina e células de *B. subtilis* (obtidas em 4.1.1.) existia também um catalisador químico adicionado com a finalidade de diminuir o tempo de reação, permitindo uma rápida análise da toxicidade da substância, ao invés do monitoramento da biodegradação. As concentrações do ensaio foram iguais às utilizadas em 4.4.3., exceto que o indicador utilizado foi a resazurina e foi adicionado também duas gotas do catalizador.

Quando a resazurina é reduzida, sua coloração altera de azul para rosa. No entanto, substâncias tóxicas podem impedir a taxa de redução deste corante através da inibição celular. Deste modo, variações na coloração da mistura pela redução da

resazurina foram mensuradas em espectrofotômetro a 603 nm após 60 min. Por meio destas leituras a porcentagem de inibição (%I) para as diferentes amostras foram obtidas conforme Equação 14.

$$\%I = [1 - \frac{\Delta A_a}{\Delta A_c}] \times 100 \quad (14)$$

onde:

ΔA_a= variação da absorbância da amostra durante tempo do teste;

ΔA_c= variação da absorbância do controle durante o tempo do teste.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Produção de biossurfactante

5.1.1. Contagem de microrganismos em placa e coloração de Gram

A partir do caldo BHI enriquecido com magnésio utilizado na produção de surfactante, foi retirada uma amostra no tempo de 48 h para preparo de lâmina e coloração de Gram, a fim de verificar a presença de *B. subtilis*, um microrganismo Gram-positivo (Figura 25), nos meios de cultivo utilizados no procedimento experimental.

Figura 25 – Micrografia de cultura de *B. subtilis* em BHI enriquecido com magnésio após coloração de Gram.

Diluições em série do caldo BHI enriquecido com magnésio foram feitas para determinação do número de unidades formadoras de colônia (UFC). Os resultados de contagem em placa (Figura 26) estão na Tabela 9.

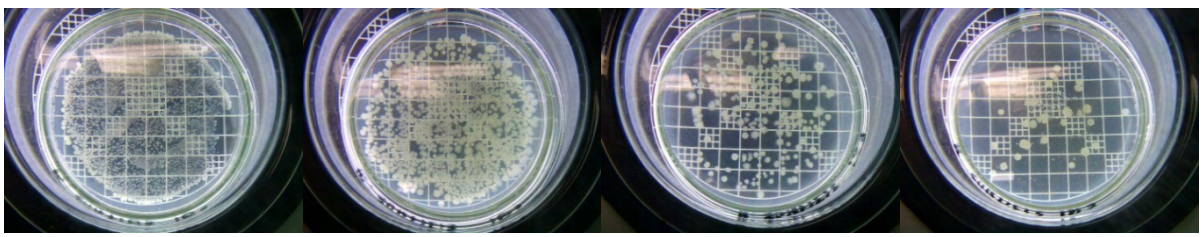


Figura 26– Contagem em placa de UFC da menos diluída (esquerda) para mais diluída (direita).

Tabela 9 – Contagem em placa de UFC de *B. subtilis* a partir de caldo BHI com magnésio

Diluição	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Média	UFC.ml^{-1}
10^1	Muitos	Muitos	Muitos	Muitos	Muitos
10^2	Muitos	Muitos	Muitos	Muitos	Muitos
10^3	1560	1782	1823	1722	1722 x 10^3
10^4	245	176	306	242	242 x 10^4
10^5	23	22	33	26	26 x 10^5
10^6	1	3	2	2	2 x 10^6
10^7	0	0	0	0	0

Assim, a contagem média de *B. subtilis* em BHI + Mg foi de 2,5x10^6 UFC.mL^{-1}.

5.1.2. Crescimento de biomassa

O crescimento de *B. subtilis* foi estudado em diversos meios de cultura líquidos (Tabela 10).

Tabela 10 – Biomassa de *B. subtilis* após 48 h

Meio	Biomassa (g.L^{-1})
BH (Bushnell Haas)	1,7155
BH + Óleo	0,6721
CN (Caldo nutriente)	5,7403
BHI (Brain heart infusion)	9,3498
BHI + Mg	11,9525

De acordo com a Tabela 10 observou-se uma maior produção de biomassa em caldo BHI enriquecido com Mg (BHI + Mg). No caldo BH o crescimento de *B. subtilis* foi cerca de 10 vezes menor comparado ao meio BHI + Mg. Notou-se também que ao acrescentar petróleo e derivados no meio salino BH como fonte de carbono, existe uma produção ainda menor de biomassa de *B. subtilis.* Por apresentar maior biomassa após 48 h, o meio de cultura escolhido para produção de biossurfactante foi o BHI + Mg. A curva de crescimento de *B. subtilis* nesse meio foi monitorada por 168 h (Figura 27).

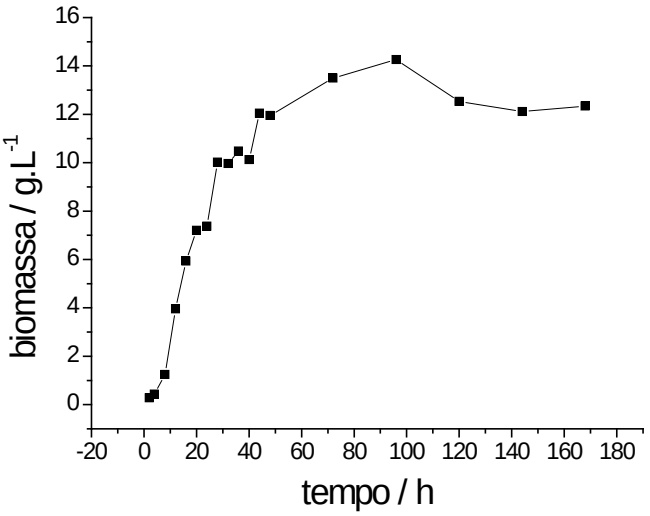


Figura 27 – Biomassa de *B. subtilis* em Caldo BHI enriquecido com magnésio.

O crescimento de *B. subtilis* em Caldo BHI + Mg observado na Figura 27 atinge seu máximo após 100 h de fermentação.

5.1.3. Rendimento de surfactante e tensão superficial

O rendimento de biossurfactante e a tensão superficial do meio em função do tempo estão na Figura 28.

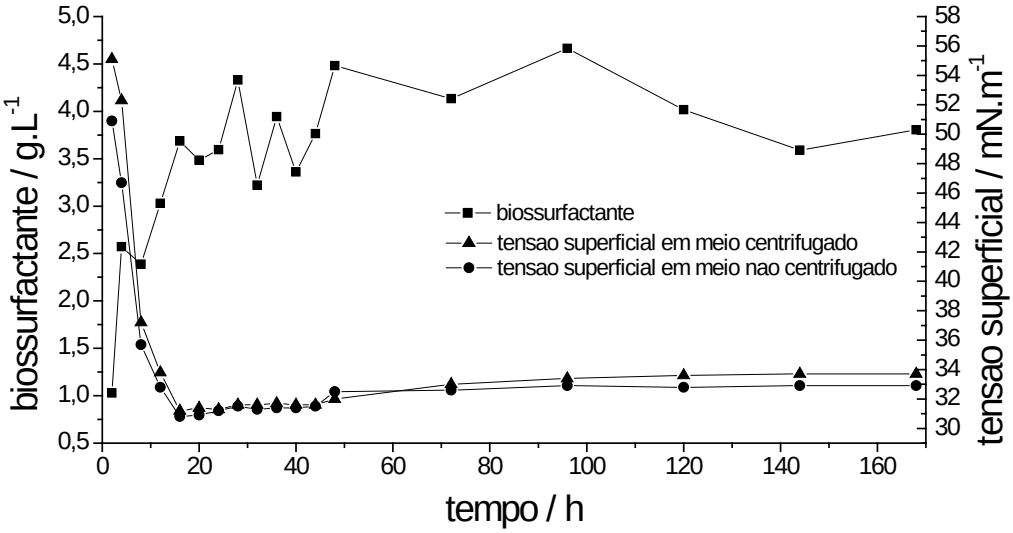


Figura 28 – Rendimento de surfactante produzido por *B. subtilis* e tensão superficial em Caldo BHI enriquecido com magnésio.

A tensão superficial do meio sem biossurfactante é de 56,0 $mN.m^{-1}$. Observou-se a diminuição da tensão superficial do meio de cultura para 30,9 $mN.m^{-1}$ após 16 h, o que é uma evidencia da produção de biossurfactante (QUEIROGA et al., 2003). Foi observada no próprio meio de cultivo a formação de espuma iridescente como evidência da presença de biossurfactante (Figura 29).

Figura 29 – Formação de espuma em meio BHI + Mg após produção de biossurfactante.

Não foi observada uma diferença estatisticamente significativa (P = 0,223, teste-t) entre a tensão superficial dos meios de cultivo contendo biomassa e a tensão superficial dos meios cuja biomassa foi removida por centrifugação.

Observou-se que a concentração micelar crítica (CMC) é atingida antes da produção máxima de biossurfactante (4,330 $g.L^{-1}$) nas primeiras 48 h. Em outras palavras, a produção de biossurfactante aumentou, mas a tensão superficial atinge um valor mínimo e constante que independe da variação de concentração de

biossurfactante no meio de cultura. Na Figura 28 observa-se que ocorre uma diminuição da concentração de biossurfactante após 100 h.

Foi observado que *B. subtilis* não apresentou um crescimento nem uma produção de biossurfactante elevados quando comparados aos outros meios de cultura testados (Tabela 10) em presença de hidrocarbonetos conforme já havia sido apontado por Cooper et al. (1981). Esse fato representa o contrário do que sugere o restante da literatura para outros microrganismos produtores de biossurfactantes, como a *Pseudomonas* sp., que tendem a ter sua produção de biossurfactante estimulada próximo a resíduos oleosos e hidrocarbonetos (UYSAL e TURKMAN, 2011). *B. licheniformis* JF-2 também não tem seu crescimento inibido em presença de hidrocarbonetos (JAVAHERI et al., 1985).

O uso do meio de cultivo com maior crescimento de biomassa foi baseado em vários estudos que indicaram um maior rendimento de biossurfactante em maior biomassa (VATER, 1986; GONG et al., 2009). Alguns estudos, no entanto, afirmam que em algumas situações, como a adição de hexadecano, observa-se uma inibição da produção de biossurfactante por *B. subtilis*, embora a biomassa aumente (HAFERBURG et al., 1986).

Embora não cresça em meios de cultivo contendo hidrocarbonetos, há discussões na literatura que propõem a aplicação *in situ* de *B. subtilis* no tratamento de oceanos contaminados com hidrocarbonetos (BARROS et al., 2007). A literatura refere-se ao biossurfactante do *B. subtilis* como surfactina. Este biossurfactante é considerado um dos mais eficientes surfactantes para a diminuição da tensão superficial e interfacial de líquidos (DAS e MUKHERJEE, 2007).

5.1.4. Indice de emulsificação E_{24}

Na Figura 30 está a porcentagem de emulsificação resultantes do E_{24}. Todas as substâncias avaliadas foram emulsionadas pelo biossurfactante em maior proporção do que os ensaios controle sem biossurfactante. Os dados correspondentes dos ensaios estão no Apêndice 8.1.4. A aplicação do biossurfactante apresentou grande efeito na emulsificação principalmente no petróleo (1), diesel (4), querosene (5), óleo vegetal (7) e óleo vegetal usado (8). O

maior índice de emulsificação foi obtido com óleo de soja (37,50% ± 3,12%), enquanto o menor índice foi com gasolina (16,50% ± 2,56%). A maior emulsificação dos óleos vegetais comparada à menor emulsificação do petróleo foi obtida em estudo semelhante por Nitschke e Pastore (2003).

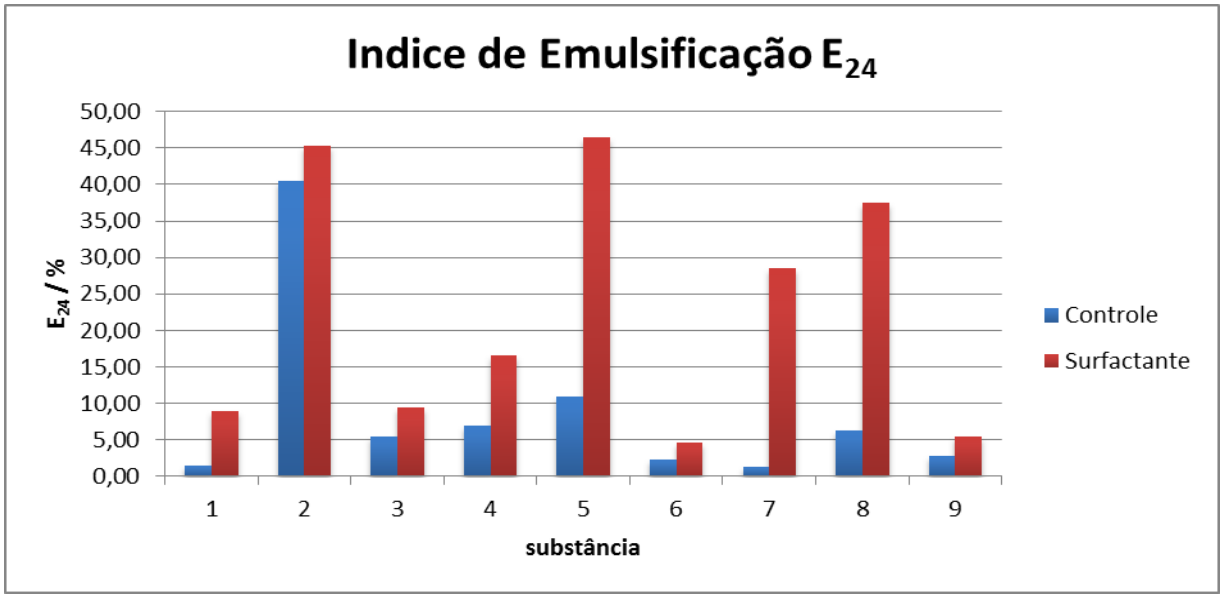


Figura 30 – Índice de emulsificação (E_{24}) para as substâncias testadas, sendo: petróleo (1), óleo lubrificante (2), lubrificante usado (3), diesel (4), querosene (5), gasolina (6), óleo vegetal (7), vegetal usado (8) e biodiesel (9).

Em seu estudo de emulsificação com óleos vegetais, Rocha et al. (2007) observaram uma alta atividade emulsificante do óleo vegetal comparada a hidrocarbonetos como querosene e gasolina, corroborando assim os dados encontrados nesse estudo. Além disso, a maioria dos surfactantes de origem microbiana são específicos, solubilizando ou emulsionando hidrocarbonetos diferentes de forma distinta (ILORI et al., 2005), o que explicaria a diversidade de valores E_{24} encontrados para cada substância. O índice de emulsificação varia de acordo com a viscosidade, tamanho das gotas, razão do volume das fases, temperatura, pH, tempo de emulsão, agitação e diferença de densidade das substâncias testadas (SINGH et al., 2007).

A baixa diferença na emulsificação de alguns substratos comparados ao controle (como no óleo lubrificante novo (2) e usado (3), gasolina (6) e biodiesel (9) ocorre pela inabilidade do surfactante específico produzido por *B. subtilis* em estabilizar as gotas microscópicas das duas fases líquidas (OBAYORI et al., 2009).

Ainda assim, o fato do biossurfactante ter um efeito positivo em aumentar a emulsificação em todos os ensaios estudados representou um efeito positivo para maiores taxas de biodegradação (conforme 5.2).

Por outro lado, a emulsificação do petróleo e derivados também é responsável pela perda de rendimentos nos vários estágios da exploração, produção e recuperação do petróleo e derivados (MANNING e THOMPSON, 1995). O conhecimento acerca da emulsificação de diversas substâncias é importante para a definição de processos de emulsificantes na indústria petrolífera. Tais processos são aplicados, por exemplo, na recuperação do óleo das emulsões de oleodutos (LEE, 1999).

5.2. Respirometria

Com a técnica de respirometria, a produção de CO_2 a partir da biodegradação de petróleo, derivados do petróleo, óleos vegetais e biodiesel foram calculadas e representada em função do tempo de biodegradação em ensaios com ou sem o biossurfactante produzido. Na Figura 31 está a produção semanal de CO_2 em cada um dos sistemas estudados. Na Figura 32 estão os resultados de CO_2 acumulado, ou seja, a somatória do total de CO_2 gerado por cada um dos sistemas em duplicatas ao longo do tempo.

A partir desses dados é possível observar quais dos efluentes aquosos simulados contendo derivados do petróleo e os ensaios de óleos vegetais foram mais biodegradados, e quanto CO_2 foi liberado dos sistemas durante e ao término do monitoramento da biodegradação. Assim, pode-se discutir sobre as causas e os fatores que fazem com que a biodegradação das diferentes substâncias ocorre.

5.2.1. Produção de CO_2

5.2.1.1. CO_2 semanal

A produção semanal de CO_2 pelos óleos pode ser observada na Figura 5. Os dados correspondentes podem ser vistos no Apêndice 8.2.

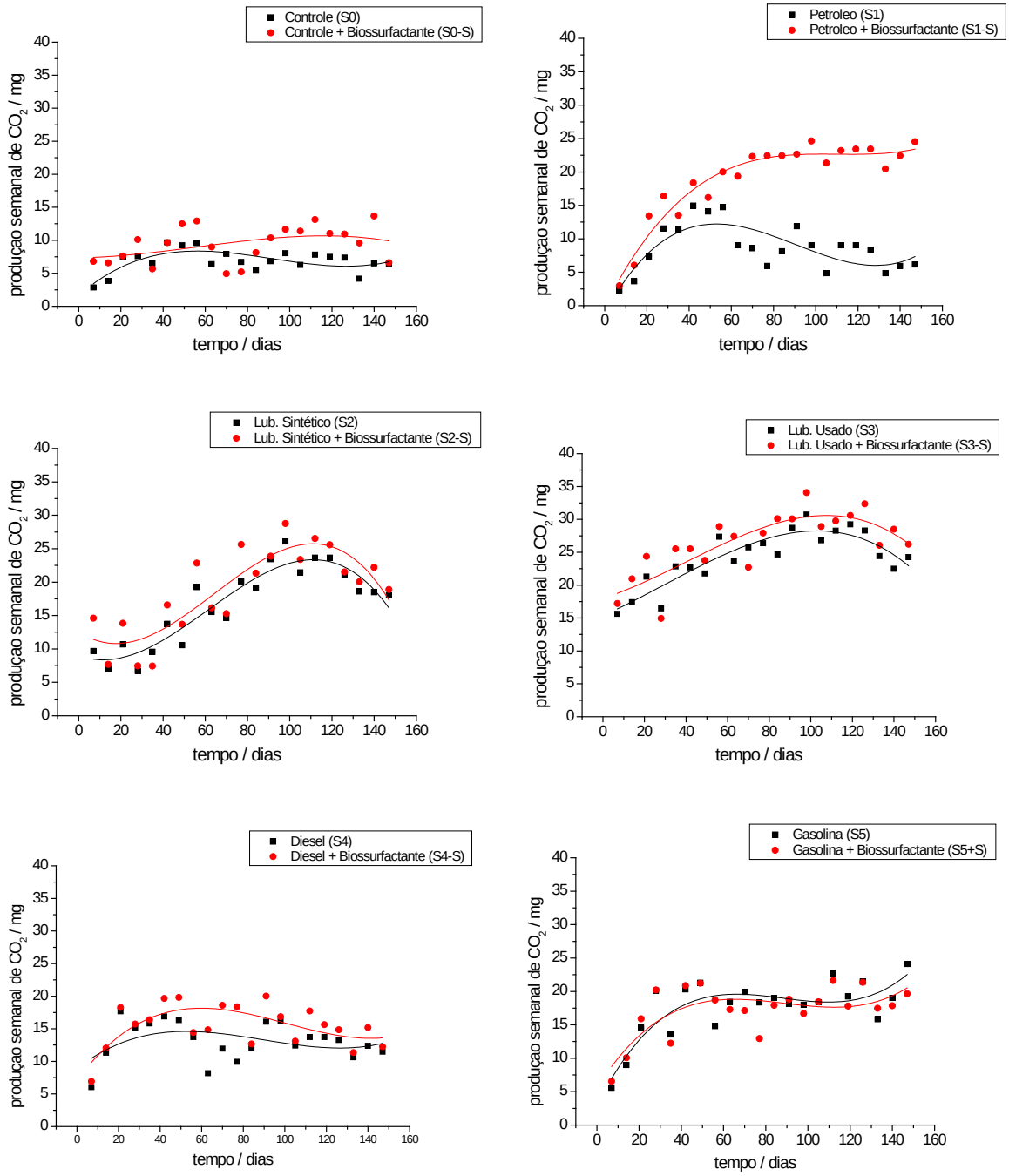


Figura 31 – Produção semanal de CO_2 nos ensaios respirométricos S00 (Controle), S01 (Petróleo), S02 (Óleo lubrificante), S03 (Óleo lubrificante usado), S04 (Óleo Diesel), S05 (Gasolina), S06 (Querosene), S07 (Fenol), S08 (Óleo de soja), S09 (Óleo de soja usado) e S10 (Biodiesel B100) com e sem biossurfactante. Uma regressão polinomial de 2ª ordem (Apêndice 8.2.4.) foi traçada a fim de facilitar a visualização da biodegradação semanal.

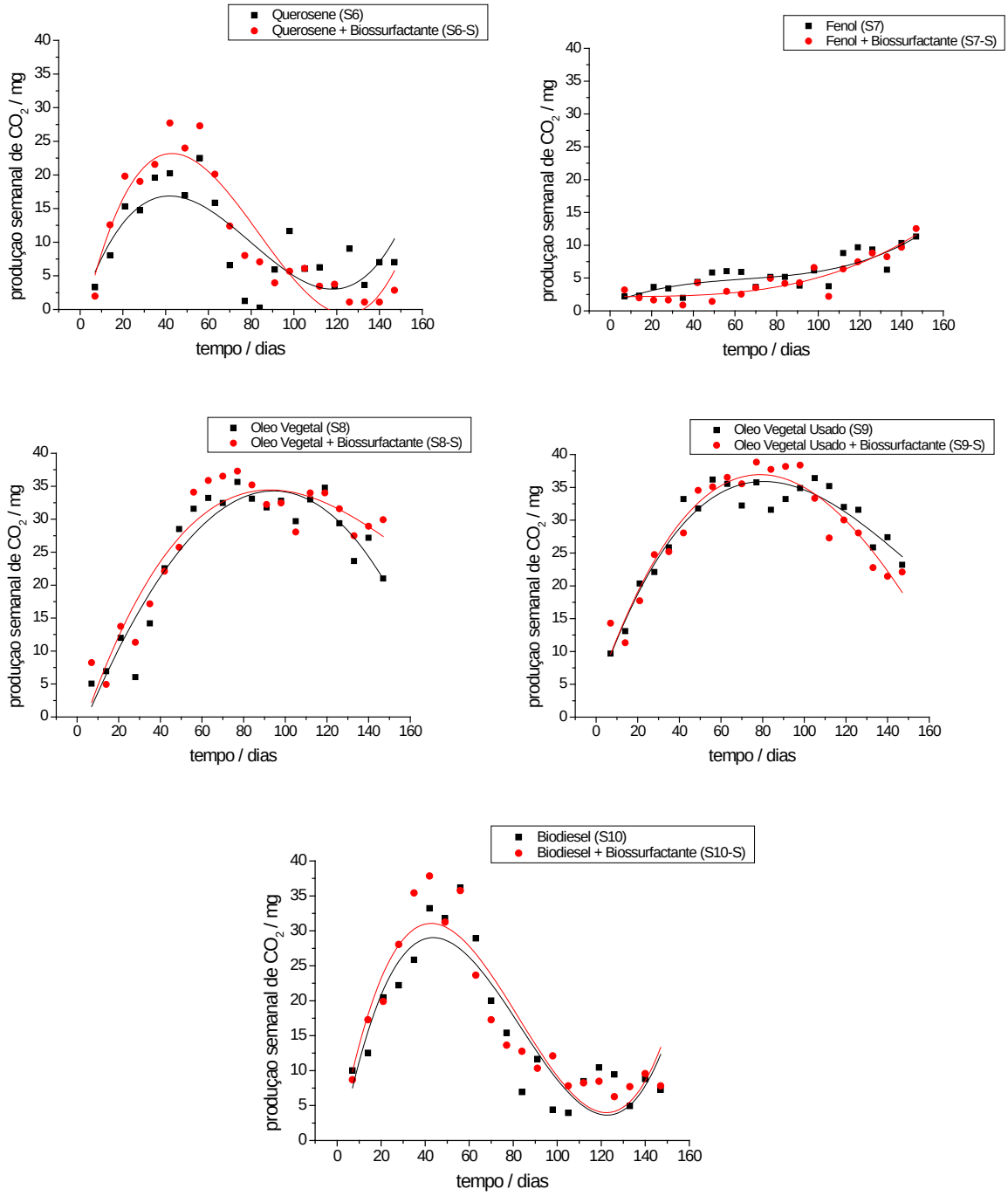


Figura 31 (Continuação) – Produção semanal de CO_2 nos ensaios respirométricos S00 (Controle), S01 (Petróleo), S02 (Óleo lubrificante), S03 (Óleo lubrificante usado), S04 (Óleo Diesel), S05 (Gasolina), S06 (Querosene), S07 (Fenol), S08 (Óleo de soja), S09 (Óleo de soja usado) e S10 (Biodiesel B100) com e sem biossurfactante. Uma regressão polinomial de 2ª ordem (Apêndice 8.2.4.) foi traçada a fim de facilitar a visualização da biodegradação semanal.

Diferentes curvas de produção semanal de CO_2 foram observadas para as diferentes substâncias. Os ensaios controle S0 e S0-S apresentaram uma produção semanal de CO_2 muito baixa (em média 8,1 mg de CO_2) quando comparada aos outros ensaios, com exceção dos ensaios S7 e S7-S. Por não conter nenhum outro substrato além da matéria orgânica do solo utilizado no preparo do liquido base presente em todos os respirômetros era esperado que o controle apresentasse a menor produção de CO_2.

Contudo, o ensaio de menor produção de CO_2 não foram os controles S0 e S0-S, mas sim, foram os ensaios S7 e S7-S contendo fenol. A produção de CO_2 nos respirômetros contendo essa substância foi ainda menor que a dos ensaios controle, em média 5,2 ± 0,8 mg de CO_2. Isso pode ter ocorrido por uma menor disponibilidade de substrato na concentração de fenol utilizada (100 $mg.L^{-1}$). Outra possibilidade pode ser a dificuldade de metabolizar o substrato fenólico pelos microrganismos presentes nos respirômetros, já que após 120 dias, observou-se um aumento da produção semanal de CO_2 que pode ser proveniente da biodegradação do fenol. A baixa biodegradação do fenol pode estar relacionada ao efeito tóxico do composto (conforme 5.4.).

Os ensaios contendo biodiesel (S10 e S10-S) apresentaram uma produção de CO_2 inicialmente bastante alta, atingindo um máximo de 35,2 ± 2,3 mg em S10 e 37,8 ± 3,7 mg em S10-S. Entretanto, a produção bastante alta de CO_2 não se manteve constante ao longo de toda a duração do experimento. Após 60 dias, a produção semanal de CO_2 apresentou uma grande queda. O mesmo perfil de produção semanal de CO_2 foi observado nos ensaios de biodegradação do querosene S06 e S06-S. Assim como em S10 e S10-S, uma produção máxima de CO_2 ocorreu em S06 (22,5 ± 1,4 mg) e S06-S (27,6 ± 3,3 mg).

Após 120 dias de biodegradação a produção de CO_2 apresentou um declínio em S1, S2, S2-S, S3, S3-S, S8, S8-S, S9 e S9-S.

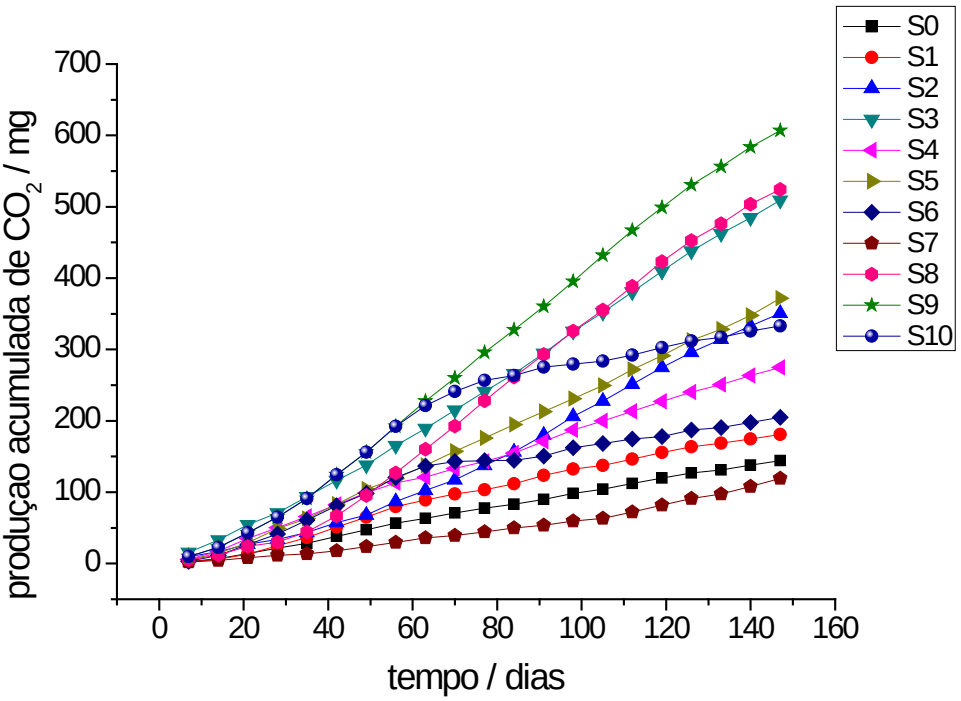
Sobre a influência do biossurfactante produzido nos ensaios de respirometria, observou-se que a adição dele no ensaio controle S0-S causou um leve aumento na produção de CO_2, possivelmente, relacionada à degradação do composto pelo consórcio de microrganismos presente nos respirômetros. Em geral, a adição de biossurfactante nos outros ensaios aumentou a produção semanal de CO_2, com

exceção de S5-S e S7-S. A adição de biossurfactante nesses ensaios causou uma média de produção semanal de CO_2 8,3% maior comparada aos ensaios sem biossurfactante. Observou-se também que a adição de biossurfactante aumentou em 137,5% a produção semanal média de CO_2 ao longo do experimento para os ensaios S1-S contendo petróleo, quando comparado ao ensaio S1 (sem adição de biossurfactante).

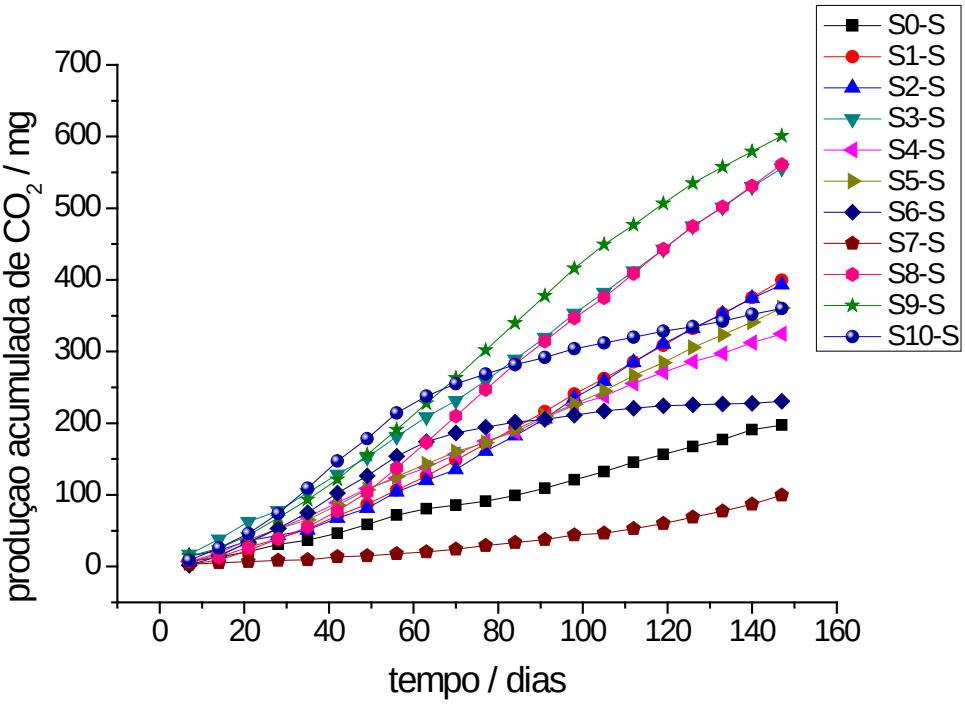
É possível observar na Figura 31 que a biodegradação atinge valores maiores em menos tempo quando o biossurfactante está presente em S1-S, S2-S, S5-S e S8-S. A presença de biossurfactante nesses ensaios fez com que uma produção maior de CO_2 ocorresse mais rapidamente.

5.2.1.2. CO_2 acumulado

A produção acumulada de CO_2 soma todo o CO_2 produzido nos frascos respirométricos ao longo de todo o processo de biodegradação. A produção acumulada de CO_2 pode ser observada na Figura 32 e na Tabela 11. Os dados correspondentes podem ser vistos no Apêndice 8.2.



(a)



(b)

Figura 32 – Produção acumulada de CO_2 nos ensaios respirométricos S00 (Controle), S01 (Petróleo), S02 (Óleo lubrificante), S03 (Óleo lubrificante usado), S04 (Óleo Diesel), S05 (Gasolina), S06 (Querosene), S07 (Fenol), S08 (Óleo de soja), S09 (Óleo de soja usado) e S10 (Biodiesel B100) com (b) e sem (a) biossurfactante.

Na Tabela 11 estão em ordem decrescente de produção acumulada de CO_2 os valores de CO_2 acumulados.

Conforme observado na Tabela 11, os ensaios de maior produção total de CO_2 foram aqueles que receberam a adição de biossurfactante em comparação com os que não continham biossurfactante. Os óleos vegetais novos (S8 e S8-S) e usados (S9 e S9-S) e o lubrificante usado (S3 e S3-S) foram os maiores produtores de CO_2 ao longo da biodegradação, enquanto que o querosene (S6 e S6-S) e petróleo sem biossurfactante (S1) produziram os menores valores acumulados de CO_2. O ensaio contendo fenol (S7) apresentou valores ainda menores que o controle quanto à produção total de CO_2.

Tabela 11– Produção acumulada de CO_2 nos ensaios respirométricos após 147 dias

Ensaio	Descrição	CO_2 acumulado (mg)
S9-S	Óleo vegetal usado	607,1 ± 12,2
S9	Óleo vegetal usado	601,2 ± 9,2
S8-S	Óleo vegetal	560,9 ± 7,7
S3-S	Óleo lubrificante usado	551,8 ± 8,2
S8	Óleo vegetal	524,5 ± 9,1
S3	Óleo lubrificante usado	509,1 ± 2,3
S1-S	Petróleo cru	399,6 ± 6,0
S2-S	Óleo lubrificante	393,3 ± 2,9
S5	Gasolina	371,7 ± 2,8
S5-S	Gasolina	360,7 ± 1,7
S10-S	Biodiesel	359,8 ± 7,3
S2	Óleo lubrificante	350,9 ± 6,5
S10	Biodiesel	333,0 ± 3,5
S4-S	Óleo diesel	324,7 ± 8,6
S4	Óleo diesel	274,9 ±12,2
S6-S	Querosene	230,7 ± 3,9
S6	Querosene	204,8 ± 7,0
S0-S	Controle	197,4 ± 9,8
S1	Petróleo	180,7 ± 4,6
S0	Controle	144,1 ± 4,5
S7	Fenol	119,2 ± 8,9
S7-S	Fenol	99,4 ± 4,0

Notou-se que a presença de biossurfactante em petróleo cru aumenta muito a produção acumulada de CO_2, que é de 399,6 ± 6,0 mg após 147 dias. Os ensaios

de respirometria contendo petróleo sem biossurfactante produziram um total de 180 ± 4,6 mg de CO_2 após 147 dias, sendo este um valor bastante próximo ao dos ensaios controle S0. A adição de biossurfactante no petróleo estimulou o processo de biodegradação. Com exceção dos ensaios contendo gasolina (S5 e S5-S) e fenol (S7 e S7-S), todos os outros ensaios contendo biossurfactante, quando comparados aos seus equivalentes sem biossurfactante apresentaram uma produção acumulada de CO_2 maior.

O uso dos biossurfactantes nos ensaios respirométricos teve de ser extensamente ajustado para que a coleta dos dados funcionasse corretamente. Em um primeiro teste com os respirômetros foi colocado o biossurfactante resultante da primeira centrifugação. Esse caldo utilizado, embora livre de células, ainda possuía muitos nutrientes, além do próprio surfactante, o que fez com que o as culturas testadas nos efluentes simulados produzissem níveis muito altos de CO_2, não sendo possível o monitoramento semanal da produção de CO_2. Assim, os ensaios foram descartados e foi utilizados o biossurfactante após procedimento de extração e ressuspendido em água pH 11,0.

5.2.2. Modelagem matemática

A observação de padrões na distribuição dos dados de produção de CO_2 ao longo do tempo nas Figuras 31 e 32 permitiu a proposição de modelos matemáticos sobre o processo de biodegradação nos respirômetros capazes de descrever e prever parâmetros da cinética de biodegradação das substâncias estudadas.

5.2.2.1. CO_2 Semanal

A Figura 33 mostra o ajuste das curvas experimentais da Figura 31 utilizando o modelo de Membré et al. (1996), cujos parâmetros obtidos no ajuste ao modelo encontram-se no Apêndice 8.2. Os parâmetros apresentados na Tabela 12 mostram os valores de Dados de Taxa Máxima de Bidegradação (BRmax) e Tempo de Término da Biodegradação (BRminT). Na Figura 33 encontra-se também o índice de correlação (R^2) que demonstra a adequação do ajuste dos dados ao modelo. A

equação do modelo utilizado (Equação 9) consiste de duas partes, sendo que uma delas descreve o crescimento e a outra o declínio da curva.

Foi observado que ao longo do tempo os ensaios respirométricos atingiam um máximo de produção de CO_2 seguidos de um declínio na produção do mesmo. A partir do ajuste aos dados foi possível prever o comportamento cinético esperado de cada tipo de óleo nas suas respectivas taxas de produção semanal de CO_2 durante o processo de biodegradação.

O valor da taxa máxima de biodegradação, denominado BRmax, consiste no pico máximo da curva da Figura 33. O tempo de pico dessa produção, denominado BRmaxT, é obtido pelo modelo. Na Figura 33, o eixo do tempo foi estendido para 400 dias, superior ao intervalo de tempo de 180 dias utilizado para coleta de dados nos respirômetros. Assim, utilizou-se o modelo para prever a cinética de produção de CO_2 caso os ensaios fossem monitorados até 400 dias de biodegradação. Em alguns casos em que o modelo apresentou valores altos de correlação ao ajuste dos dados (R^2>0,8) foi feita a determinação do término estimado da biodegradação nos ensaios (BRminT), ou seja, o tempo em que a produção semanal de CO_2 atingiria valores bastante baixos.

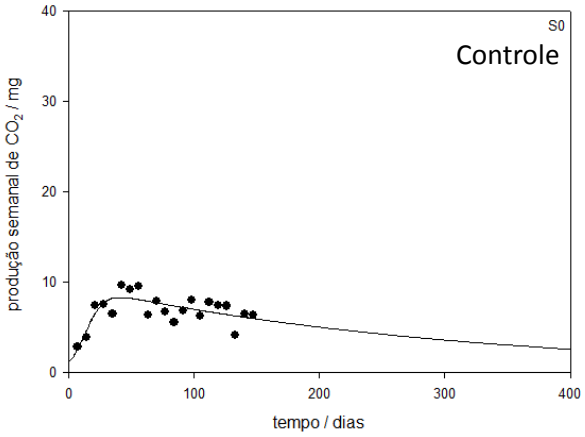


Figura 33 - Produção semanal de CO_2 em função do tempo de biodegradação ajustada ao modelo de Membré et al. (1996) em S00 (Controle), S01 (Petróleo), S02 (Óleo lubrificante), S03 (Óleo lubrificante usado), S04 (Óleo Diesel), S05 (Gasolina), S06 (Querosene), S07 (Fenol), S08 (Óleo de soja), S09 (Óleo de soja usado) e S10 (Biodiesel B100) com e sem biossurfactante.

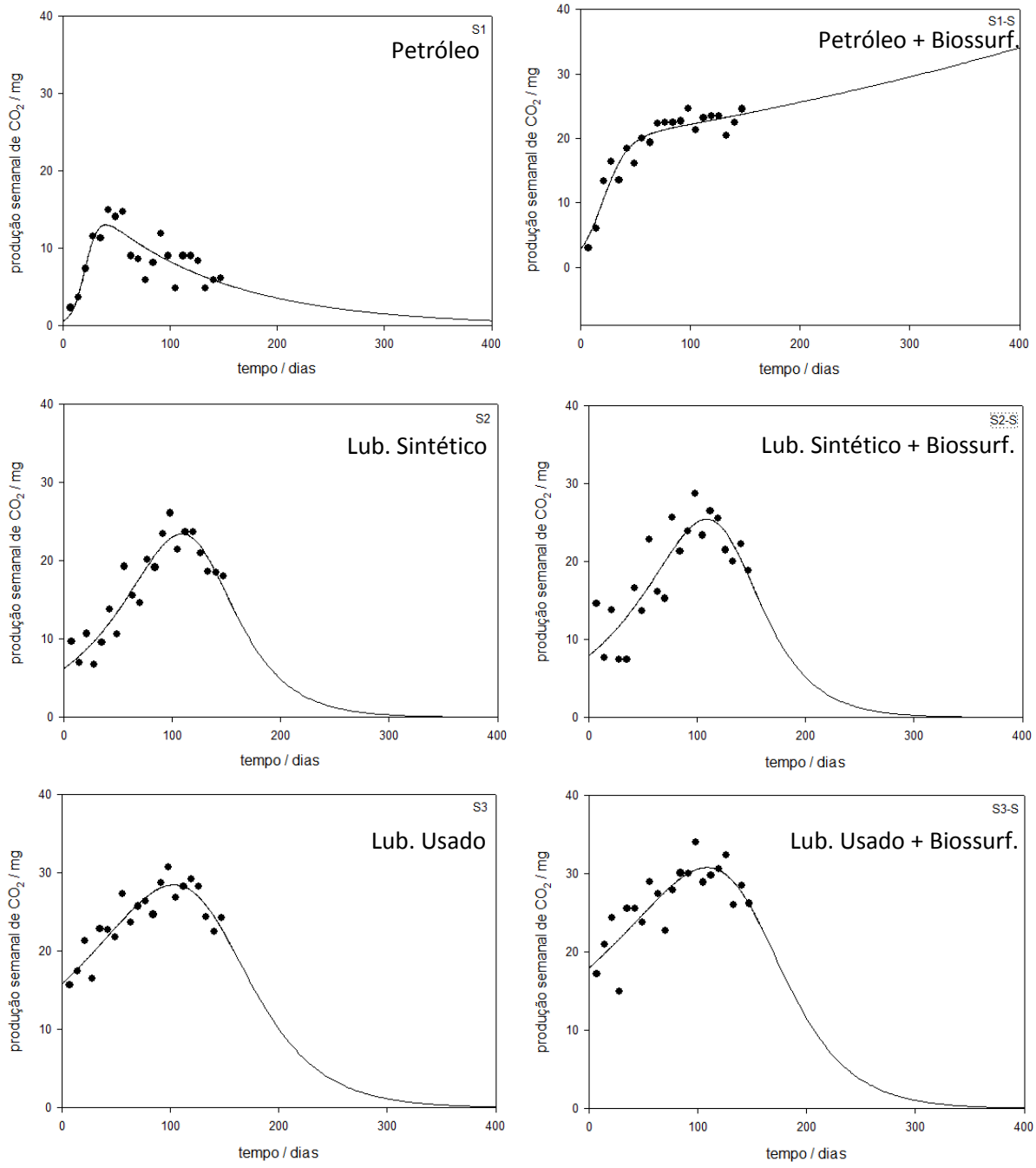


Figura 33 (Continuação) - Produção semanal de CO_2 em função do tempo de biodegradação ajustada ao modelo de Membré et al. (1996) em S00 (Controle), S01 (Petróleo), S02 (Óleo lubrificante), S03 (Óleo lubrificante usado), S04 (Óleo Diesel), S05 (Gasolina), S06 (Querosene), S07 (Fenol), S08 (Óleo de soja), S09 (Óleo de soja usado) e S10 (Biodiesel B100) com e sem biossurfactante.

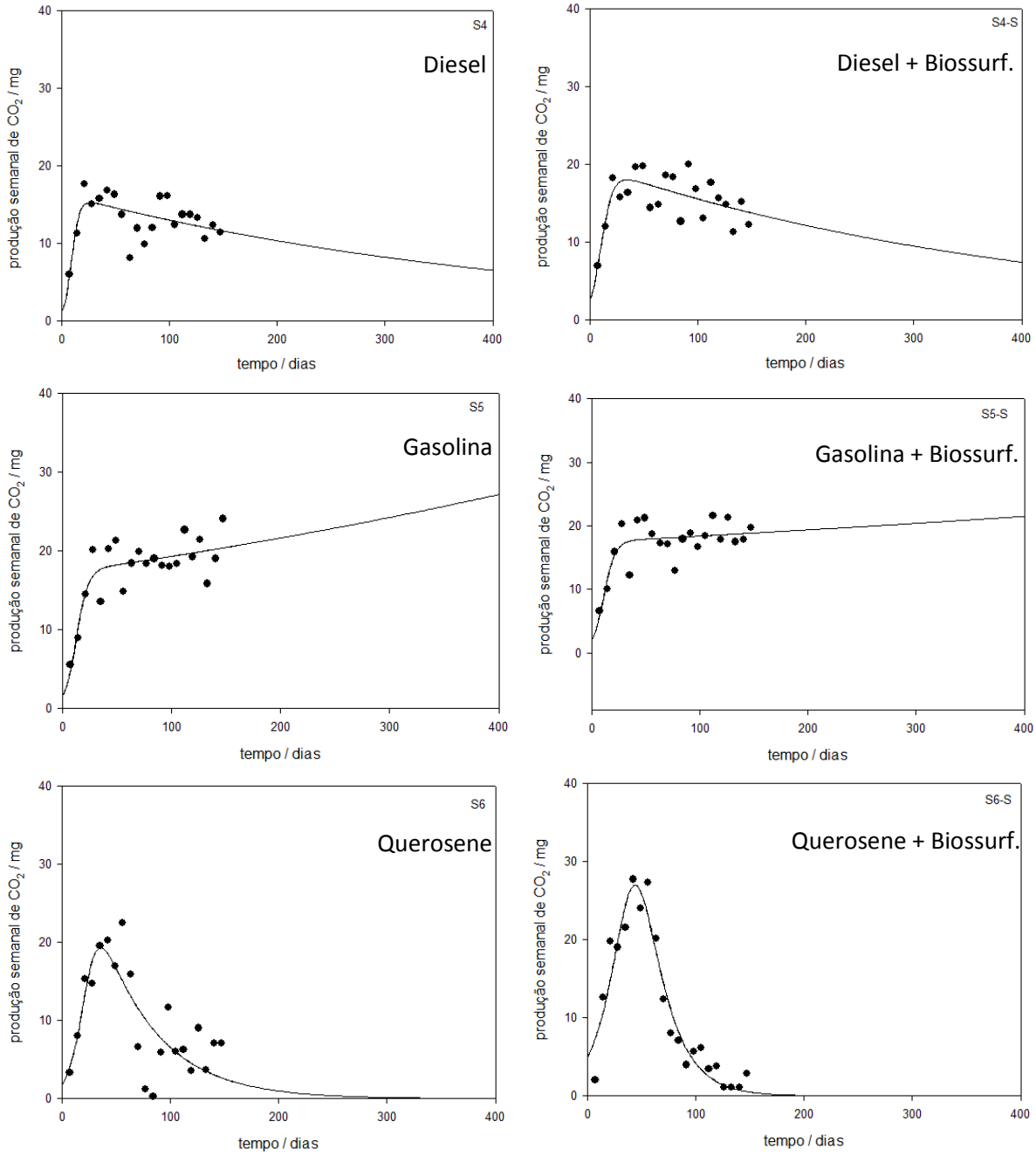


Figura 33 (Continuação) - Produção semanal de CO_2 em função do tempo de biodegradação ajustada ao modelo de Membré et al. (1996) em S00 (Controle), S01 (Petróleo), S02 (Óleo lubrificante), S03 (Óleo lubrificante usado), S04 (Óleo Diesel), S05 (Gasolina), S06 (Querosene), S07 (Fenol), S08 (Óleo de soja), S09 (Óleo de soja usado) e S10 (Biodiesel B100) com e sem biossurfactante.

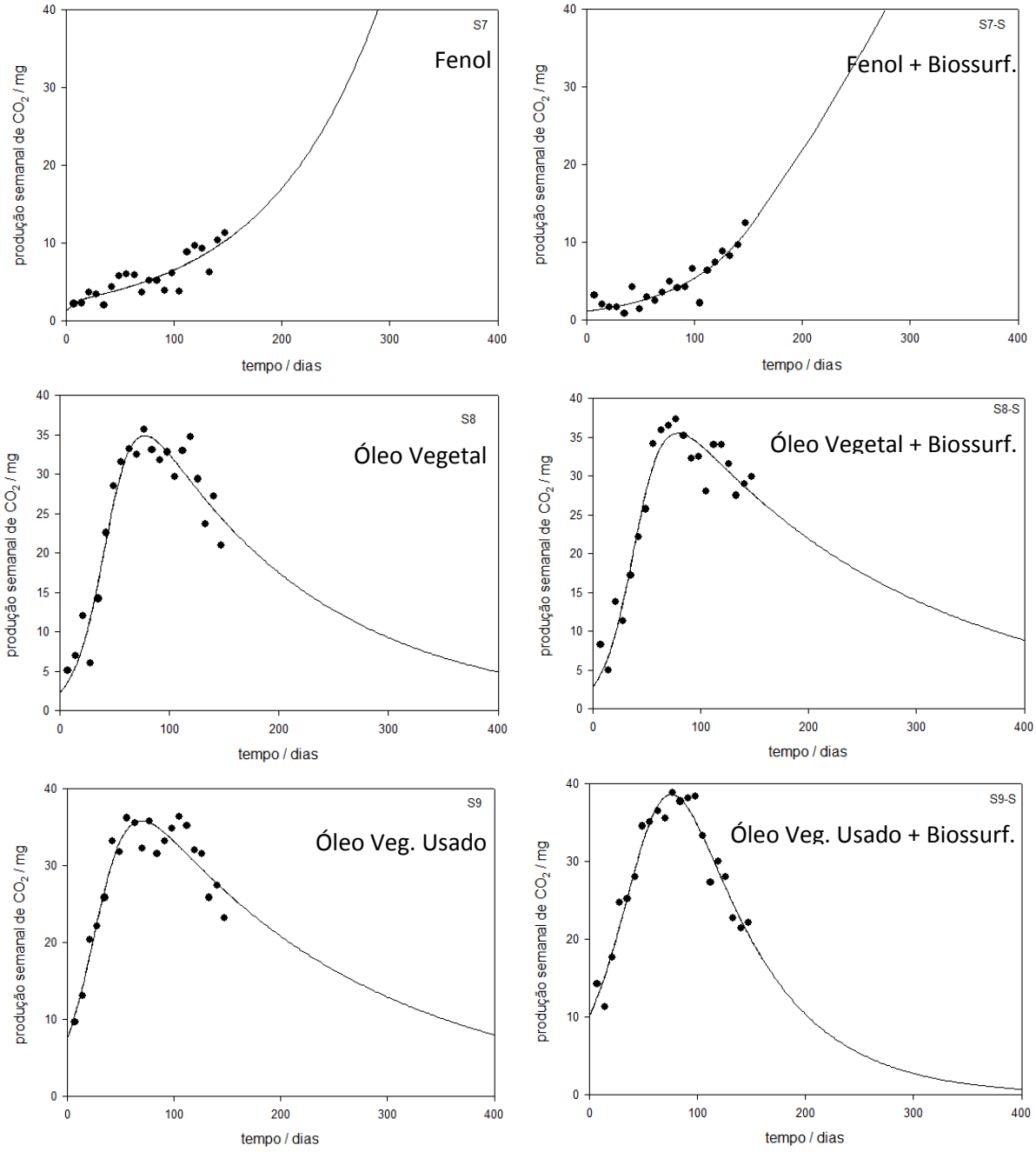


Figura 33 (Continuação) - Produção semanal de CO_2 em função do tempo de biodegradação ajustada ao modelo de Membré et al. (1996) em S00 (Controle), S01 (Petróleo), S02 (Óleo lubrificante), S03 (Óleo lubrificante usado), S04 (Óleo Diesel), S05 (Gasolina), S06 (Querosene), S07 (Fenol), S08 (Óleo de soja), S09 (Óleo de soja usado) e S10 (Biodiesel B100) com e sem biossurfactante.

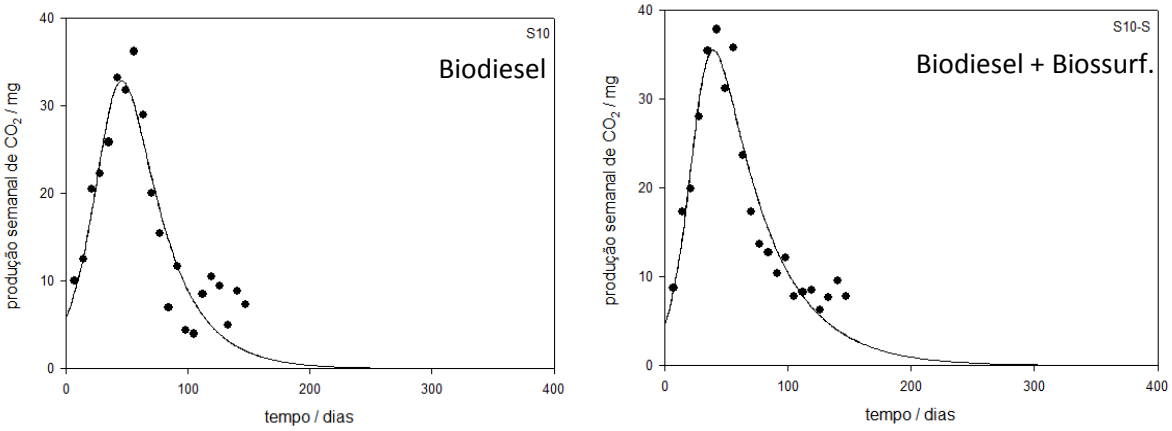


Figura 33 (Continuação) - Produção semanal de CO_2 em função do tempo de biodegradação ajustada ao modelo de Membré et al. (1996) em S00 (Controle), S01 (Petróleo), S02 (Óleo lubrificante), S03 (Óleo lubrificante usado), S04 (Óleo Diesel), S05 (Gasolina), S06 (Querosene), S07 (Fenol), S08 (Óleo de soja), S09 (Óleo de soja usado) e S10 (Biodiesel B100) com e sem biossurfactante.

Dentre os conjuntos de dados de produção semanal de CO_2, o único em que o software utilizado não conseguiu ajustar ao modelo foi o ensaio S0-S. Após cerca de 1 milhão de iterações dos parâmetros no ajuste ao modelo, o R^2 ainda apresentava valores inferiores a 0,2538. Isso pode ter ocorrido pelo fato da produção de CO_2 nesses ensaios terem sido aleatórios o suficiente para não seguirem uma tendência ajustável a esse modelo (Figura 31 e 33).

O modelo foi considerado inadequado para o caso dos ensaios S1-S, S5, S5-S, S7 e S7-S. A inadequação ocorre por não haver declínio na produção de CO_2 ao longo do tempo. Nesses casos o modelo indica que a produção de CO_2 é contínua e crescente. Tal afirmação é absurda e incoerente com a realidade, já que seria necessária uma quantidade infinita de matéria orgânica nos respirômetros para que isso ocorresse. O ajuste inadequado se deve ao fato dos pontos não indicarem uma tendência à diminuição da produção de CO_2 após os 180 dias de monitoramento da produção de CO_2. Sendo assim, o modelo não é valido para descrever com precisão a cinética de biodegradação dessas substâncias.

Contudo, para o restante os ensaios em que o modelo se ajustou satisfatoriamente, alguns parâmetros de interesse podem ser identificados conforme a Tabela 12 abaixo. Dentre todos os ensaios em que ocorreu o ajuste ao modelo, apenas S4 e S4-S apresentaram índices de correlação R^2 inferiores a 0,75.

Tabela 12 - Dados de Taxa Máxima de Biodegradação (BRmax) e o Tempo da Taxa Máxima de Biodegradação (BRmaxT) dos modelos matemáticos sobre a respirometria e produção semanal de CO_2

Ensaio	**BRmax** (mg.semana^{-1})	**BRmax T** (dias)	**R^2**
S0	8,89	42,09	0,7649
S0-S	*	*	*
S1	12,32	38,65	0,8362
S1-S	**	**	0,9545
S2	23,74	109,05	0,9322
S2-S	25,43	109,67	0,8529
S3	28,74	103,43	0,8986
S3-S	30,78	109,80	0,8211
S4	15,12	25,56	0,5714
S4-S	17,01	33,97	0,6519
S5	**	**	0,8465
S5-S	**	**	0,7837
S6	19,57	35,89	0,7741
S6-S	26,75	43,22	0,9616
S7	**	**	0,8478
S7-S	**	**	0,9199
S8	34,89	77,97	0,9644
S8-S	35,87	79,98	0,9686
S9	35,51	69,33	0,9540
S9-S	38,12	76,53	0,9710
S10	32,01	45,22	0,9218
S10-S	35,34	38,12	0,9562

*Não ocorreu ajuste aos dados desses ensaios.

**Não ocorreu ajuste apresentando esses valores.

Com base nos parâmetros apresentados no modelo, os ensaios com óleos vegetais e biodiesel (S8, S8-S, S9, S9-S, S10 e S10-S) foram os que atingiram um maior valor de produção máxima de CO_2, seguidos dos ensaios de biodegradação de óleo lubrificante usado (S3 e S3-S). Além disso, ao analisar o BRmaxT desses ensaios observou-se que os ensaios contendo óleos vegetais produzem um máximo

de CO_2 semanal em menos tempo que os ensaios contendo óleos lubrificantes, o que pode indicar uma maior afinidade e adaptação dos microrganismos aos ensaios com BRmaxT menor.

Observou-se também que a presença de biossurfactantes fez com que a produção de CO_2 fosse aumentada durante a biodegradação por facilitar o acesso à matéria orgânica presente no substrato aos microrganismos. Com isso foi possível uma maior biodegradação, conforme reportado também nos estudos de Christofi e Ivshina (2002) e de Calvo et al. (2008). O ensaio controle (S0) por sua vez apresentou a menor produção máxima de CO_2 por não possuir nenhum substrato além daquele presente no “liquido-base”.

Outro efeito dos biossurfactantes na produção semanal de CO_2 foi a alteração do BRmaxT nos ensaios em que ele estava presente. Com exceção dos ensaios contendo biodiesel (S10 e S10-S) observou-se que com a adição de biossurfactante a produção de CO_2 atingisse seu máximo em um tempo maior. Esperava-se que a presença do biossurfactante acelerasse o processo de biodegradação e isso não foi descrito pelo modelo nos dados observados. Entretanto, uma possível explicação é que com a maior disponibilidade de matéria orgânica nos respirômetros, conforme BRmax de valores superiores nesses ensaios, tenha sido possível metabolizar o substrato por mais tempo. Algumas referências determinam que a adição de biossurfactantes tende a diminuir o tempo necessário para que a biodegradação se complete (KOSARIC, 2001). Contudo, a adição de biossurfactantes pode promover a aparição de substratos antes indisponíveis pela emulsificação e solubilização da fase oleosa, aumentando assim o tempo total de biodegradação Norman et al. (2002).

5.2.2.2. CO_2 acumulado

Foi visto nos pontos dos gráficos da Figura 32 a ocorrência de um padrão de distribuição próximo ao linear ou exponencial. Sendo assim, foi possível desenvolver modelos matemáticos que se ajustaram aos dados. A Figura 34 a seguir contém a representação de todos os ajustes feitos na Equação 8 de acordo com o modelo de Schmidt et al. (1985). Foi observada uma tendência à desaceleração da produção

acumulada de CO_2 após 100 dias de biodegradação (Figura 32). Por esse motivo foi dada preferência a um modelo logístico não linear ao invés de um modelo linear dentre os modelos testados, pois um modelo linear não se adaptaria com precisão a todos os casos observados. Com a adoção desse modelo foi possível obter valores de R^2 acima de 0,99 em todos os ajustes.

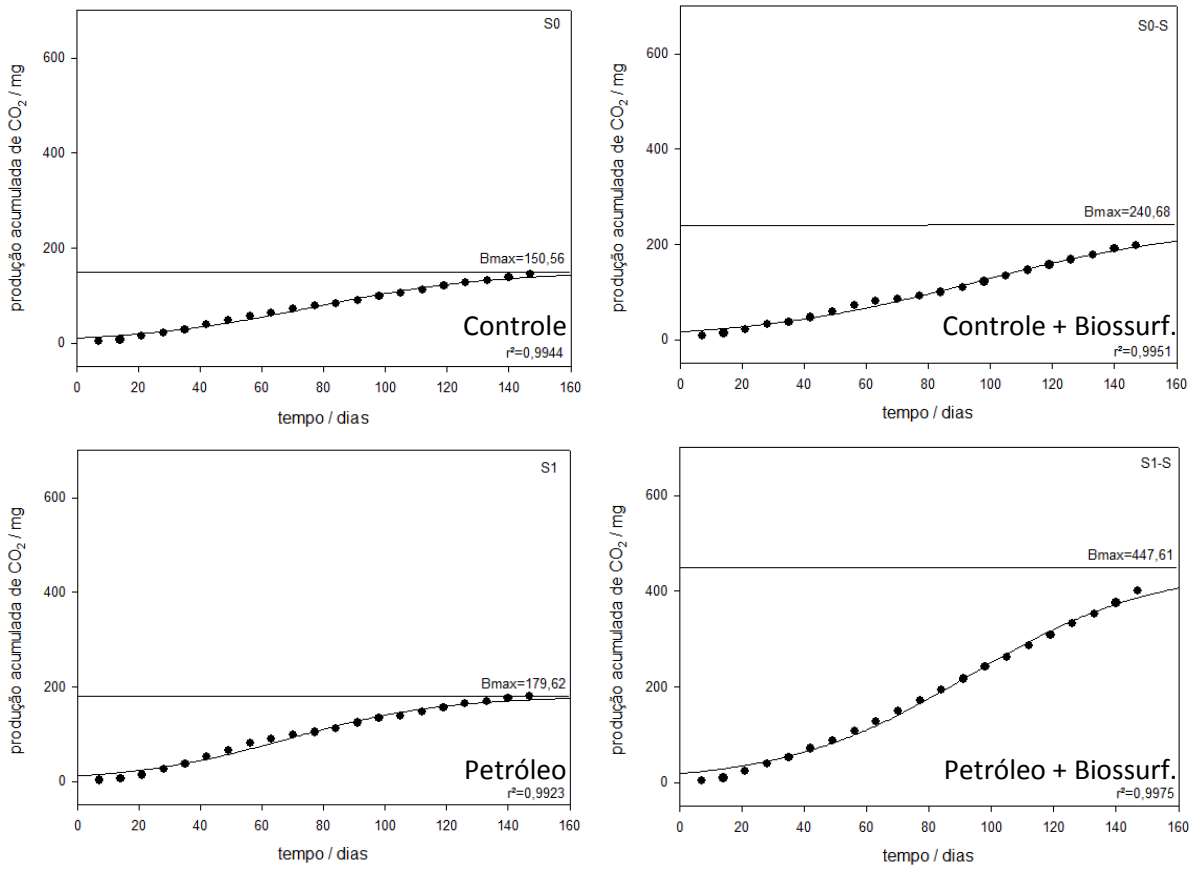


Figura 34 – Produção acumulada de CO_2 em função do tempo de biodegradação ajustada ao modelo de Schmidt et al. (1985) em S00 (Controle), S01 (Petróleo), S02 (Óleo lubrificante), S03 (Óleo lubrificante usado), S04 (Óleo Diesel), S05 (Gasolina), S06 (Querosene), S07 (Fenol), S08 (Óleo de soja), S09 (Óleo de soja usado) e S10 (Biodiesel B100) com e sem biossurfactante.

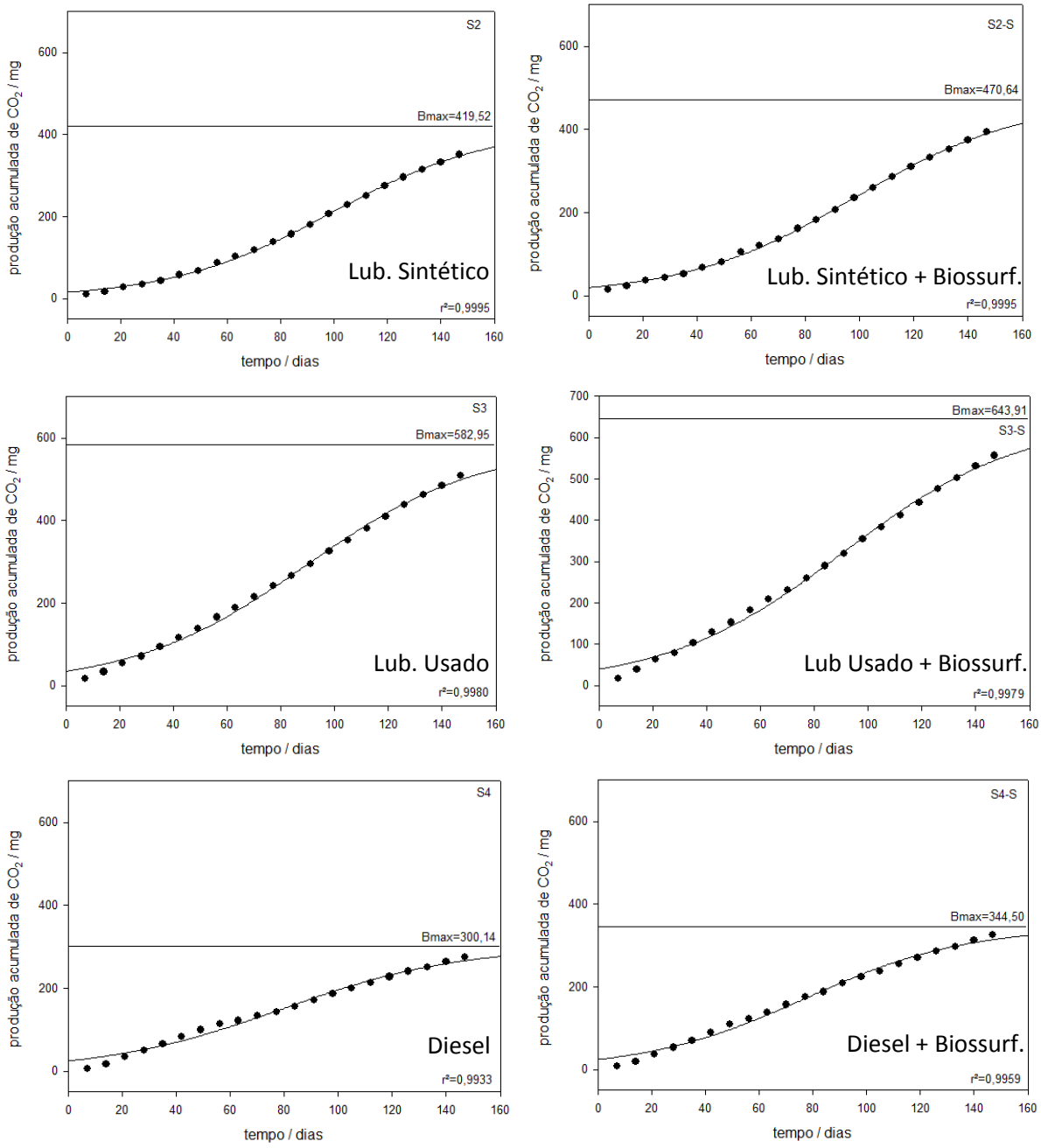


Figura 34 (Continuação) – Produção acumulada de CO_2 em função do tempo de biodegradação ajustada ao modelo de Schmidt et al. (1985) em S00 (Controle), S01 (Petróleo), S02 (Óleo lubrificante), S03 (Óleo lubrificante usado), S04 (Óleo Diesel), S05 (Gasolina), S06 (Querosene), S07 (Fenol), S08 (Óleo de soja), S09 (Óleo de soja usado) e S10 (Biodiesel B100) com e sem biossurfactante.

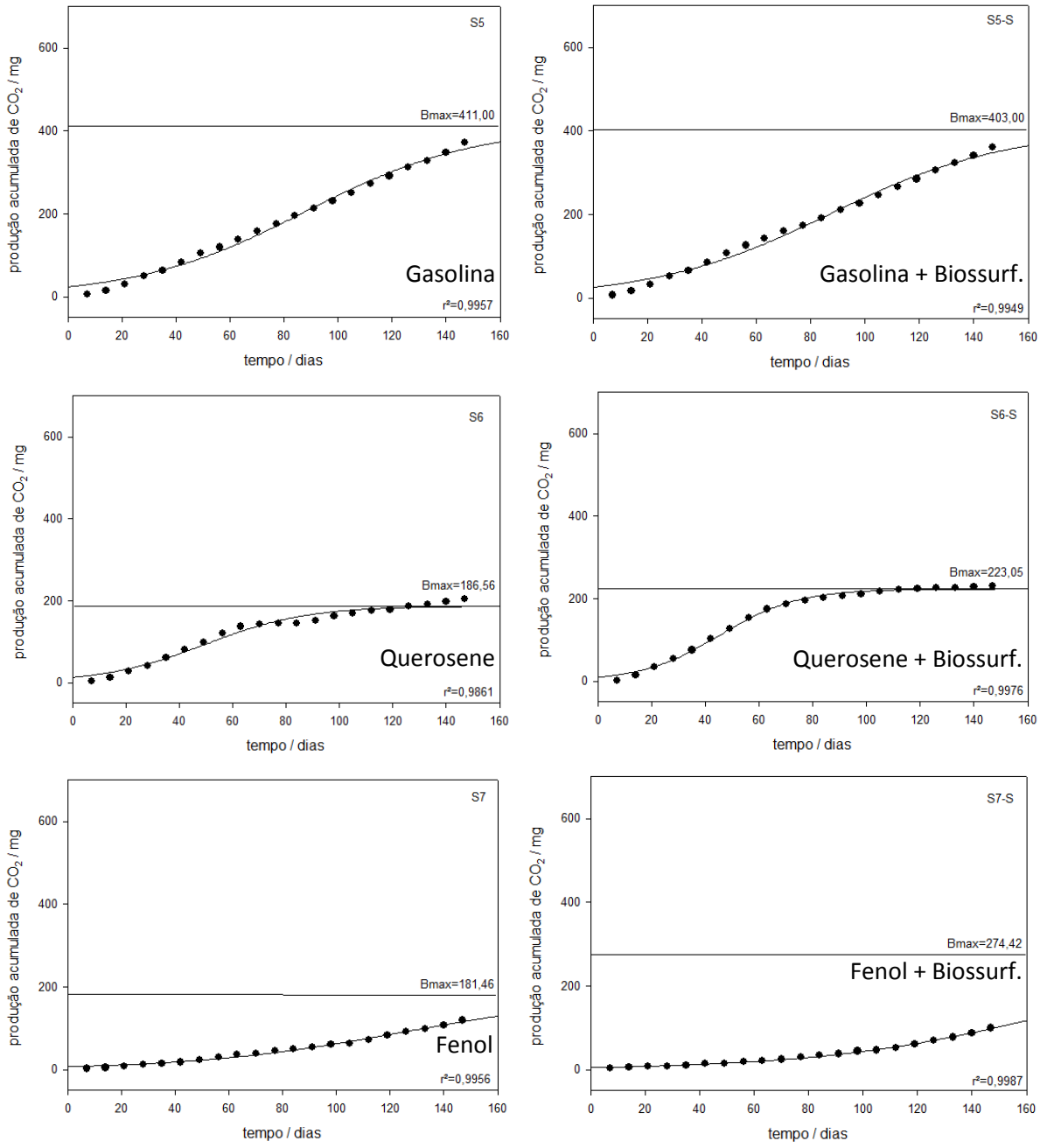


Figura 34 (Continuação) – Produção acumulada de CO_2 em função do tempo de biodegradação ajustada ao modelo de Schmidt et al. (1985) em S00 (Controle), S01 (Petróleo), S02 (Óleo lubrificante), S03 (Óleo lubrificante usado), S04 (Óleo Diesel), S05 (Gasolina), S06 (Querosene), S07 (Fenol), S08 (Óleo de soja), S09 (Óleo de soja usado) e S10 (Biodiesel B100) com e sem biossurfactante.

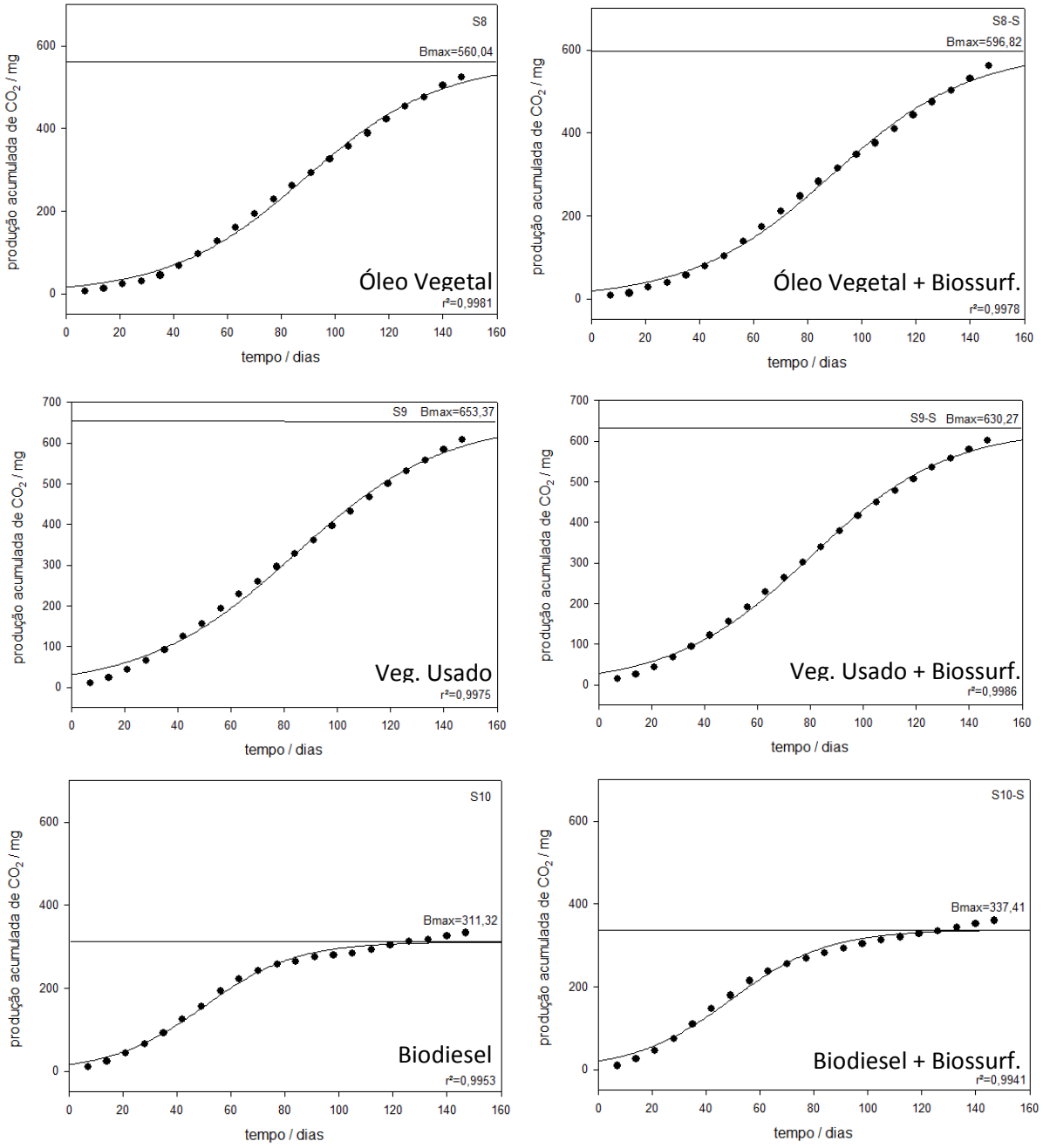


Figura 34 (Continuação) – Produção acumulada de CO_2 em função do tempo de biodegradação ajustada ao modelo de Schmidt et al. (1985) em S00 (Controle), S01 (Petróleo), S02 (Óleo lubrificante), S03 (Óleo lubrificante usado), S04 (Óleo Diesel), S05 (Gasolina), S06 (Querosene), S07 (Fenol), S08 (Óleo de soja), S09 (Óleo de soja usado) e S10 (Biodiesel B100) com e sem biossurfactante.

Com o ajuste dos dados ao modelo de Schmidt et al. (1985), os parâmetros apresentados na Tabela 13 são os valores de Máxima Biodegradação Prevista (Bmax), Tempo de Máxima Biodegradação Prevista (BmaxT) obtidos a partir do ajuste das curvas dos dados experimentais (Figura 34). A partir disso é possível prever o máximo possível de CO_2 que seria produzido a partir de cada substância cuja biodegradação foi analisada.

Tabela 13 - Dados de Máxima Biodegradação Prevista (Bmax), Tempo de Máxima Biodegradação prevista (BmaxT) e R^2 do modelo matemático aplicado sobre a respirometria e produção acumulada de CO_2 em S00 (Controle), S01 (Petróleo), S02 (Óleo lubrificante), S03 (Óleo lubrificante usado), S04 (Óleo Diesel), S05 (Gasolina), S06 (Querosene), S07 (Fenol), S08 (Óleo de soja), S09 (Óleo de soja usado) e S10 (Biodiesel B100) com e sem biossurfactante.

Ensaio	**Bmax** (mg)	**BmaxT** (dias)	**R^2**
S0	150,56	200,01	0,9944
S0-S	240,68	300,57	0,9951
S1	179,62	162,76	0,9923
S1-S	447,61	212,68	0,9975
S2	419,52	212,69	0,9995
S2-S	470,64	221,17	0,9995
S3	582,95	257,20	0,9980
S3-S	643,91	276,82	0,9979
S4	300,14	271,42	0,9933
S4-S	344,50	295,39	0,9959
S5	411,00	285,21	0,9957
S5-S	403,00	290,41	0,9949
S6	186,56	121,81	0,9861
S6-S	223,05	106,05	0,9976
S7	181,46	336,24	0,9956
S7-S	274,42	417,16	0,9987
S8	560,04	347,97	0,9981
S8-S	596,82	459,41	0,9978
S9	653,37	371,81	0,9975
S9-S	630,27	251,32	0,9986
S10	311,32	120,32	0,9953
S10-S	337,41	136,00	0,9941

Dentre os parâmetros previstos está o máximo de produção de CO_2 (Bmax) que pode ser esperado a partir das substâncias testadas até que o processo de

biodegradação pelos microrganismos termine. O valor de Bmax é estabelecido quando a curva gerada pelo modelo se estabiliza e não ocorre mais aumento significativo no parâmetro B (produção acumulada de CO_2) ao longo do tempo. Foi considerado como aumento significativo valores de B<0,99 x Bmax. A Figura 34 representa o ajuste dos dados ao modelo, onde a linha Bmax indica o valor máximo que a curva ajustada alcançará. O tempo para que isso ocorra tende ao infinito, logo, foi considerado que o tempo para que a produção de CO_2 se encerre como B=0,99 x Bmax.

A análise dos valores de Bmax nos diferentes tipos de óleos indica que ocorre uma maior produção de CO_2 total esperada nos óleos vegetais (novo e usado) e no óleo lubrificante usado. Na Tabela 13 observa-se ainda que a média de produção total de CO_2 esperada (Bmax) nesses sistemas é 3,05 vezes maior do que a média dos controles.

Os ensaios em que menos CO_2 total será produzido ao longo da biodegradação são S0, S0-S, S7 e S7-S. Mesmo que os ensaios S7 e S7-S contendo fenol apresentem uma Bmax menor em relação às demais substâncias, pode-se esperar que uma quantidade superior à dos ensaios controle seja gerada a partir dessa substância, sobretudo devido ao aumento de produção de CO_2 observada após 120 dias de experimento. A adaptação de uma comunidade microbiana ao fenol a partir de um inóculo previamente adaptado a outros substratos foi possível conforme apresentada por Shimp e Pfaender (1987). Uma prolongada exposição desses microrganismos ao fenol em meio aquoso, assim como ocorrido nos frascos respirométricos do presente estudo, pode levar a uma biodegradação tardia de compostos aromáticos como m-cresol, m-aminofenol e p-clorofenol. Esse fato também foi observado por González et al. (2001) ao submeter uma cepa de *Pseudomonas* sp. ao fenol em biorreatores. Tais resultados demonstram a versatilidade de microrganismos na biodegradação de diferentes substâncias.

Ao analisar o tempo que se leva para que o valor de Bmax seja alcançado algumas informações interessantes podem ser obtidas. Nota-se que nas substâncias contendo biossurfactante, o processo de biodegradação se estende por mais tempo em todas as substâncias analisadas (exceto em S05-S e S09-S). Logo, a presença de biossurfactante promove uma mineralização mais completa quando o substrato é

utilizado pelos microrganismos. De acordo com o modelo proposto, algumas substâncias, como o fenol (S07 e S07-S) e o óleo vegetal (S8 e S8-S) seguem biodegradando por cerca de um ano (336, 417, 347 e 459 dias, respectivamente) até que a produção de CO_2 se encerre. Uma grande diferença foi observada nos valores de Bmax do petróleo cru sem biossurfactante (179,62 mg de CO_2 em S0) e com biossurfactante (447,61 mg de CO_2 em S0-S). Portanto, a aplicação de biossurfactante foi eficiente em promover uma maior biodegradação de grande parte das substâncias testadas.

5.2.2.3. Comparação entre os modelos propostos

A validação dos modelos pode ser feita quando ambos os ajustes atinjam resultados coerentes e semelhantes em um dos parâmetros estimados (HILLS e TRUCANO, 1999). Foi observado que assim como a inclinação da curva diminuía ao longo do tempo na produção acumulada de CO_2, diminuía também a produção semanal de CO_2. Também, o final da biodegradação é esperado quando a produção acumulada de CO_2 atinja o valor de Bmax no caso do modelo de Membré et al. (1996) e quando a produção semanal de CO_2 atinja valores reduzidos no caso do modelo de Schmidt et al. (1985). Com base nisso foi proposta a possibilidade de comparar os parâmetros dos dois modelos e assim determinar se ambos os modelos foram precisos em determinar o tempo final de biodegradação.

Sendo assim, o parâmetro do tempo final do processo de biodegradação foi analisado nos dois modelos propostos. Para isso foi feita a comparação entre BmaxT do modelo de Membré et al. (1996), cuja a obtenção foi explicada em 5.2.2.2. e o tempo de Menor Taxa de Biodegradação (BRminT) no modelo de Schmidt et al. (1985), em que foi considerado o tempo em que a produção CO_2 semanal foi inferior a 5 mg. Ambos os parâmetros indicam o final da biodegradação e a podem ser observados na Figura 35.

Não ocorreu comparação com os modelos correspondentes aos ensaios: S0-S, S1-S, S5, S5-S, S7 e S7-S, pois o ajuste do modelo de Membré et al. (1996) a esses dados foi inadequado ao cálculo do tempo final de biodegradação esperado, retornando um valor de tempo negativo. Todavia, para a grande maioria dos dados

ajustados foi verificada que o parâmetro de tempo para a produção acumulada máxima e total de CO_2 (BmaxT) e a baixa produção semanal de CO_2 gerado semanalmente nos respirômetros (BRminT) produziram resultados bastante semelhantes. Em geral, os valores de BmaxT são um pouco acima daqueles previstos por BRminT. Mesmo assim, estes resultados são suficientemente próximos (SZABÓ, 2007) e confiáveis ao indicar a mesma situação, que no caso corresponde ao término da biodegradação.

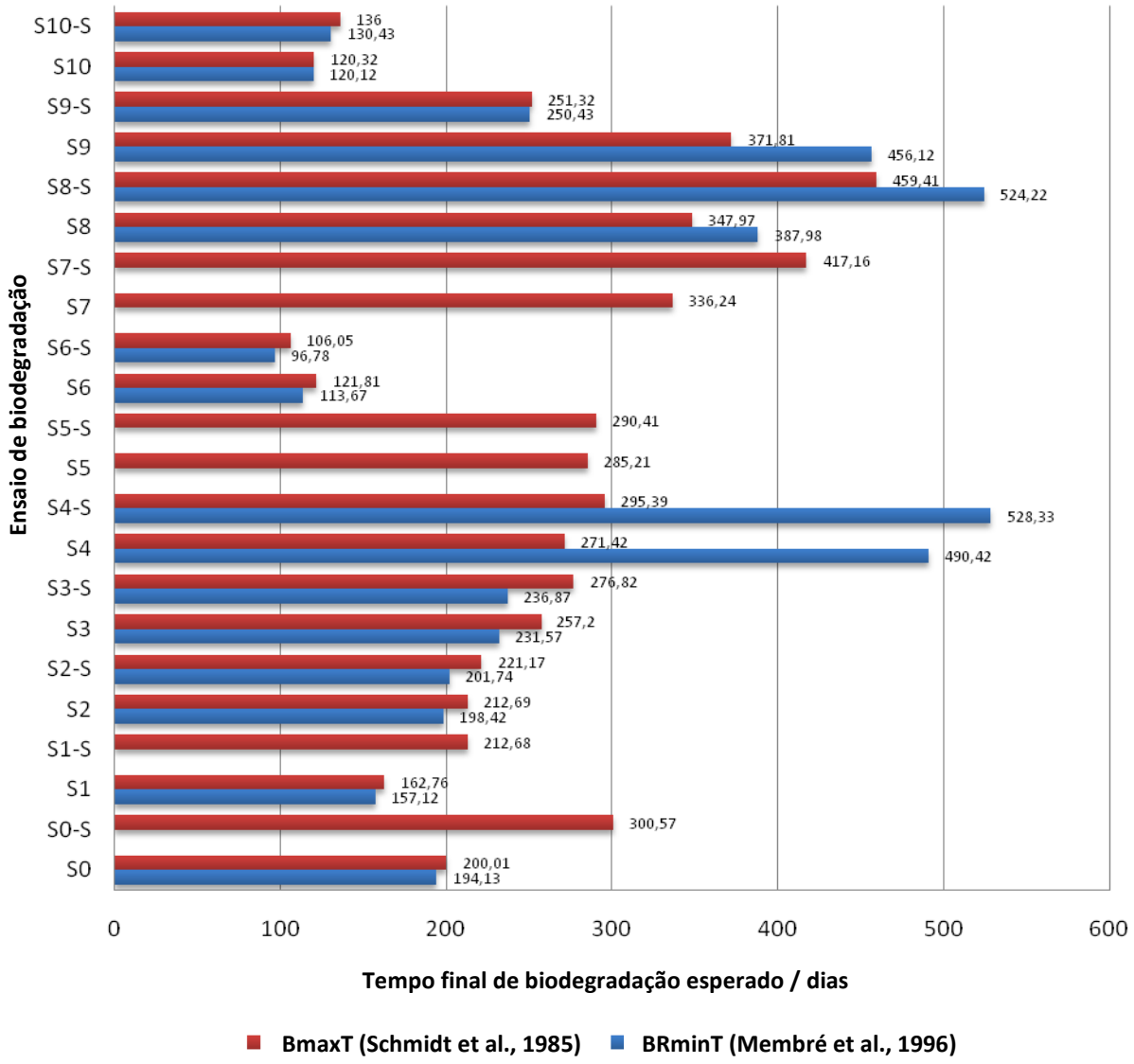


Figura 35 - Comparação entre os valores de tempo final de biodegradação fornecidos pelos dois modelos (BmaxT e BRminT) em S00 (Controle), S01 (Petróleo), S02 (Óleo lubrificante), S03 (Óleo lubrificante usado), S04 (Óleo Diesel), S05 (Gasolina), S06 (Querosene), S07 (Fenol), S08 (Óleo de soja), S09 (Óleo de soja usado) e S10 (Biodiesel B100) com e sem biossurfactante.

Especificamente nos ensaios S4 e S4-S ocorreu uma grande diferença entre os valores estimados. Uma provável causa para a imprecisão dos dados entre os dois modelos é que o índice de correlação R^2 correspondente à modelagem da respirometria semanal desses sistemas foi bastante baixo (0,5714 e 0,6519 respectivamente), justificando assim a baixa precisão em determinar o tempo final de biodegradação de maneira coincidente entre os dois modelos.

Outra grande diferença foi observada nos ensaios S8 e S8-S. Nota-se que esses ensaios possuem os tempos maiores para a ocorrência completa da biodegradação. A partir disso, pode-se considerar que em processos muito longos de biodegradação a capacidade de determinar com precisão e coerência o tempo final de biodegradação entre os dois modelos é menor. Entretanto, a maior parte dos ensaios respirométricos se ajustou com precisão e confiabilidade suficiente para prever o comportamento das substâncias em experimentos de respirometria de Bartha nas especificações desse estudo.

5.2.3. Análise estatística pelo Teste F

O teste F foi adotado para determinar se as curvas de biodegradação da produção semanal e acumulada de CO_2 (Figuras 31 e 32, respectivamente) foram estatisticamente diferentes ao nível de significância 0,05. Para facilitar a visualização da semelhança foi utilizada uma escala de tons do branco ao vermelho (Figura 36), sendo que o branco indica menor semelhança entre perfis de biodegradação e o vermelho significa máxima semelhança entre os conjuntos de dados. O valor retornado no interior das células da tabela indica a probabilidade das curvas serem estatisticamente iguais.

1,000	0,800	0,600	0,400	0,200	0,000

Figura 36– Escala de tons de vermelho adotada no teste F.

Na Tabela 14 estão apresentados os valores obtidos no Teste F em todos os conjuntos de dados de respirometria semanal.

Tabela 14 – Comparação das curvas de produção semanal de CO_2 pelo teste F

Teste F – Respirometria Semanal

	S0	S0-S	S1	S1-S	S2	S2-S	S3	S3-S	S4	S4-S	S5	S5-S	S6	S6-S	S7	S7-S	S8	S8-S	S9	S9-S	S10	S10-S
S0	1,000	0,054	0,003	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,006	0,000	0,001	0,000	0,000	0,045	0,011	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S0-S	0,054	1,000	0,252	0,001	0,001	0,000	0,065	0,018	0,708	0,395	0,041	0,126	0,000	0,000	0,940	0,516	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S1	0,003	0,252	1,000	0,028	0,029	0,011	0,472	0,211	0,438	0,765	0,357	0,696	0,008	0,000	0,284	0,616	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000
S1-S	0,000	0,001	0,028	1,000	0,996	0,709	0,133	0,330	0,004	0,013	0,192	0,069	0,613	0,045	0,001	0,008	0,000	0,024	0,262	0,135	0,016	0,011
S2	0,000	0,001	0,029	0,996	1,000	0,705	0,134	0,333	0,004	0,014	0,194	0,070	0,610	0,045	0,002	0,008	0,018	0,023	0,260	0,133	0,016	0,011
S2-S	0,000	0,000	0,011	0,709	0,705	1,000	0,063	0,180	0,001	0,005	0,096	0,030	0,895	0,100	0,000	0,003	0,044	0,056	0,451	0,258	0,040	0,029
S3	0,000	0,065	0,472	0,133	0,134	0,063	1,000	0,590	0,138	0,310	0,838	0,743	0,047	0,001	0,076	0,225	0,000	0,000	0,010	0,003	0,000	0,000
S3-S	0,000	0,018	0,211	0,330	0,333	0,180	0,590	1,000	0,045	0,123	0,737	0,387	0,142	0,004	0,022	0,082	0,001	0,002	0,039	0,015	0,001	0,001
S4	0,022	0,708	0,438	0,004	0,004	0,001	0,138	0,045	1,000	0,633	0,093	0,245	0,001	0,000	0,764	0,783	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S4-S	0,006	0,395	0,765	0,013	0,014	0,005	0,310	0,123	0,633	1,000	0,224	0,490	0,003	0,000	0,438	0,840	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S5	0,000	0,041	0,357	0,192	0,194	0,096	0,838	0,737	0,093	0,224	1,000	0,595	0,073	0,001	0,049	0,157	0,000	0,001	0,017	0,006	0,000	0,000
S5-S	0,001	0,126	0,696	0,069	0,070	0,030	0,743	0,387	0,245	0,490	0,595	1,000	0,021	0,000	0,145	0,373	0,000	0,000	0,004	0,001	0,000	0,000
S6	0,000	0,000	0,008	0,613	0,610	0,895	0,047	0,142	0,001	0,003	0,073	0,021	1,000	0,130	0,000	0,002	0,059	0,075	0,535	0,317	0,054	0,039
S6-S	0,000	0,000	0,000	0,045	0,045	0,100	0,001	0,004	0,000	0,000	0,001	0,000	0,130	1,000	0,000	0,000	0,699	0,783	0,366	0,600	0,669	0,567
S7	0,045	0,940	0,284	0,001	0,002	0,000	0,076	0,022	0,764	0,438	0,049	0,145	0,000	0,000	1,000	0,565	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S7-S	0,011	0,516	0,616	0,008	0,008	0,003	0,225	0,082	0,783	0,840	0,157	0,373	0,002	0,000	0,565	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S8	0,000	0,000	0,000	0,018	0,018	0,044	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,059	0,699	0,000	0,000	1,000	0,912	0,199	0,364	0,967	0,852
S8-S	0,000	0,000	0,000	0,024	0,023	0,056	0,000	0,002	0,000	0,000	0,001	0,000	0,075	0,783	0,000	0,000	0,912	1,000	0,240	0,425	0,879	0,766
S9	0,000	0,000	0,001	0,262	0,260	0,451	0,010	0,039	0,000	0,000	0,017	0,004	0,535	0,366	0,000	0,000	0,199	0,240	1,000	0,702	0,185	0,143
S9-S	0,000	0,000	0,000	0,135	0,133	0,258	0,003	0,015	0,000	0,000	0,006	0,001	0,317	0,600	0,000	0,000	0,364	0,425	0,702	1,000	0,343	0,275
S10	0,000	0,000	0,000	0,016	0,016	0,040	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,054	0,669	0,000	0,000	0,967	0,879	0,185	0,343	1,000	0,885
S10-S	0,000	0,000	0,000	0,011	0,011	0,029	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,039	0,567	0,000	0,000	0,852	0,766	0,143	0,275	0,885	1,000

Na Tabela 15 estão apresentados os valores obtidos no Teste F em todos os conjuntos de dados de respirometria acumulada.

Tabela 15 – Comparação das curvas de produção acumulada de CO_2 pelo teste F

Teste F – Respirometria Acumulada

	S0	S0-S	S1	S1-S	S2	S2-S	S3	S3-S	S4	S4-S	S5	S5-S	S6	S6-S	S7	S7-S	S8	S8-S	S9	S9-S	S10	S10-S
S0	1,000	0,212	0,251	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,001	0,000	0,000	0,132	0,018	0,291	0,048	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S0-S	0,212	1,000	0,919	0,001	0,007	0,002	0,000	0,000	0,152	0,024	0,005	0,008	0,791	0,243	0,023	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,011	0,005
S1	0,251	0,919	1,000	0,001	0,005	0,001	0,000	0,000	0,126	0,019	0,004	0,006	0,714	0,205	0,030	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,009	0,004
S1-S	0,000	0,001	0,001	1,000	0,580	0,923	0,355	0,204	0,059	0,295	0,637	0,524	0,003	0,032	0,000	0,000	0,000	0,101	0,059	0,055	0,453	0,639
S2	0,000	0,007	0,005	0,580	1,000	0,647	0,142	0,071	0,177	0,619	0,936	0,933	0,013	0,106	0,000	0,000	0,048	0,030	0,016	0,015	0,842	0,933
S2-S	0,000	0,002	0,001	0,923	0,647	1,000	0,308	0,172	0,073	0,341	0,706	0,588	0,004	0,040	0,000	0,000	0,124	0,083	0,047	0,045	0,512	0,709
S3	0,000	0,000	0,000	0,355	0,142	0,308	1,000	0,726	0,006	0,051	0,165	0,121	0,000	0,003	0,000	0,000	0,596	0,466	0,323	0,310	0,097	0,166
S3-S	0,000	0,000	0,000	0,204	0,071	0,172	0,726	1,000	0,002	0,023	0,084	0,059	0,000	0,001	0,000	0,000	0,857	0,704	0,522	0,505	0,046	0,084
S4	0,009	0,152	0,126	0,059	0,177	0,073	0,006	0,002	1,000	0,390	0,153	0,205	0,241	0,787	0,000	0,000	0,001	0,001	0,000	0,000	0,248	0,152
S4-S	0,001	0,024	0,019	0,295	0,619	0,341	0,051	0,023	0,390	1,000	0,563	0,679	0,045	0,259	0,000	0,000	0,014	0,008	0,004	0,004	0,765	0,561
S5	0,000	0,005	0,004	0,637	0,936	0,706	0,165	0,084	0,153	0,563	1,000	0,869	0,011	0,091	0,000	0,000	0,057	0,036	0,019	0,018	0,780	0,997
S5-S	0,000	0,008	0,006	0,524	0,933	0,588	0,121	0,059	0,205	0,679	0,869	1,000	0,016	0,125	0,000	0,000	0,039	0,025	0,013	0,012	0,909	0,866
S6	0,132	0,791	0,714	0,003	0,013	0,004	0,000	0,000	0,241	0,045	0,011	0,016	1,000	0,365	0,012	0,001	0,000	0,000	0,000	0,000	0,022	0,011
S6-S	0,018	0,243	0,205	0,032	0,106	0,040	0,003	0,001	0,787	0,259	0,091	0,125	0,365	1,000	0,001	0,000	0,001	0,000	0,000	0,000	0,155	0,090
S7	0,291	0,023	0,030	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,012	0,001	1,000	0,346	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S7-S	0,048	0,002	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,346	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
S8	0,000	0,000	0,000	0,148	0,048	0,124	0,596	0,857	0,001	0,014	0,057	0,039	0,000	0,001	0,000	0,000	1,000	0,841	0,645	0,626	0,030	0,057
S8-S	0,000	0,000	0,000	0,101	0,030	0,083	0,466	0,704	0,001	0,008	0,036	0,025	0,000	0,000	0,000	0,000	0,841	1,000	0,794	0,774	0,018	0,037
S9	0,000	0,000	0,000	0,059	0,016	0,047	0,323	0,522	0,000	0,004	0,019	0,013	0,000	0,000	0,000	0,000	0,645	0,794	1,000	0,978	0,009	0,020
S9-S	0,000	0,000	0,000	0,055	0,015	0,045	0,310	0,505	0,000	0,004	0,018	0,012	0,000	0,000	0,000	0,000	0,626	0,774	0,978	1,000	0,009	0,018
S10	0,000	0,011	0,009	0,453	0,842	0,512	0,097	0,046	0,248	0,765	0,780	0,909	0,022	0,155	0,000	0,000	0,030	0,018	0,009	0,009	1,000	0,777
S10-S	0,000	0,005	0,004	0,639	0,933	0,709	0,166	0,084	0,152	0,561	0,997	0,866	0,011	0,090	0,000	0,000	0,057	0,037	0,020	0,018	0,777	1,000

Conforme observado nas Tabelas 14 e 15 acima existe uma divisão diagonal com valores de F = 1,000. Isso ocorre porque estão sendo comparados conjuntos de dados idênticos. Em consequência disso, o valor retornado pelo teste F será sempre 1, já que existe 100% de probabilidade dos dados serem iguais, pois eles são de fato idênticos.

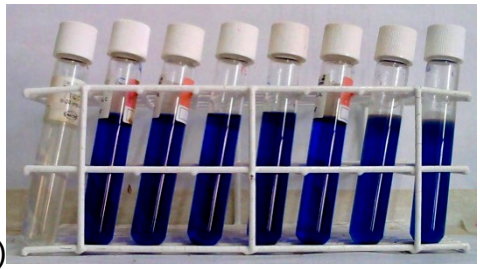
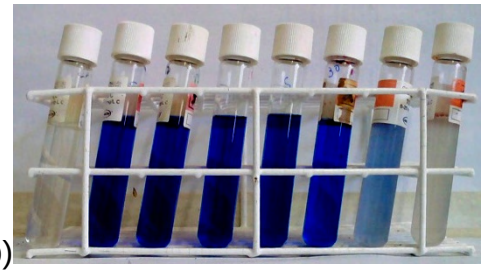
O teste F quantificou uma comparação entre as curvas de biodegradação de diferentes substâncias que não foi evidenciada apenas pela observação das Figuras 31 e 32. Com a observação da Tabela 14, nota-se uma semelhança entre o perfil de biodegradação semanal de óleos vegetais (S8, S8-S, S9 e S9-S) com o biodiesel (S10 e S10-S). Outra semelhança que, embora não apontada pela modelagem matemática, foi a semelhança do perfil de biodegradação semanal do fenol (S7 e S7-S) com o ensaio controle contendo biossurfactante (S0-S), dada a baixa produção de CO_2 em ambos os ensaios. Já na Tabela 15 pode-se observar que a produção acumulada de CO_2 nos respirômetros contendo óleo lubrificante (S2) e gasolina (S5) ocorre de maneira semelhante à do biodiesel (S10).

5.3. Colorimetria

A análise respirométrica da seção 5.2 permitiu quantificar por técnicas indiretas a produção de CO_2 gerada pelo metabolismo de microrganismos. Para os resultados dessa sessão foi utilizada a técnica de colorimetria, na qual a biodegradação foi indiretamente estimada pela mudança de cor do indicador DCPIP e pela análise de absorbância do espectro de luz azul em 600 nm representada em função do tempo de biodegradação.

5.3.1. Resultados qualitativos

A descoloração do indicador DCPIP é visível ao longo do tempo conforme a Figura 37.

(a)  (b) 

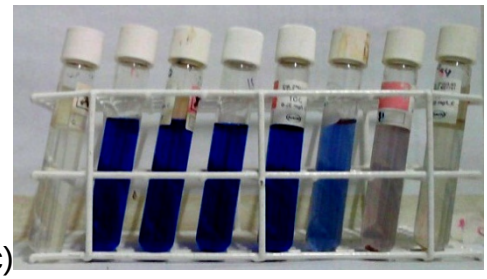
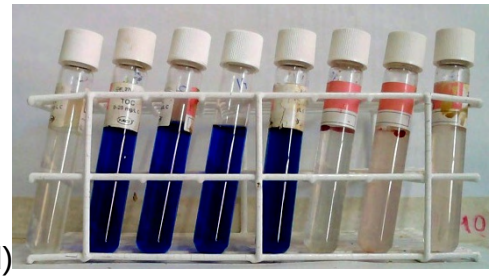
(c)  (d) 

Figura 37 – Descoloração do indicador DCPIP nos ensaios contendo biodiesel (A10, B10 e S10). Da esquerda para a direita nos tubos de ensaio estão contidos caldo BH, C0, C1, C2, C3, A10, B10 e S10. O tempo de captura das imagens foi de 4 h (a), 46 h (b), 52 (c) e 88 h (d).

A Figura 37 ilustra a biodegradação do biodiesel nos ensaios A10, B10 e S10. Nem todos os ensaios de biodegradação seguiram a sequência observada na Figura 37. Em geral, os ensaios de biodegradação que seguiram a sequência da Figura 37 e que continham biossurfactante e *B. subtilis* (S) foram mais rapidamente biodegradados, seguidos pelo ensaio contendo somente o substrato e *B. subtilis* (B). Os ensaios contendo fenol (A7, B7 e C7) e querosene (A6, B6 e S6) não apresentaram mudança de coloração ao término do experimento, embora os ensaios B6 e S6 tenham diminuído a intensidade da coloração em 40 h e retomado a coloração original em 70 h.

Em longo prazo, ocorreu também a biodegradação dos ensaios que não foram inoculados com *B. subtilis* (A), exceto em A5 e A1. Isso ocorreu porque a execução dos experimentos colorimétricos em ambiente estéril é inviável e, assim, os óleos passaram a ser consumidos por microrganismos previamente presentes na substância ou no tubo de ensaio. O procedimento de autoclavagem poderia alterar as propriedades físico-químicas dos óleos e do próprio indicador DCPIP.

5.3.2. Resultados quantitativos

A análise da absorbância por espectrofotometria dos ensaios de biodegradação resultou nas curvas da Figura 39. Os valores de absorbância foram convertidos para concentração de DCPIP pela reta padrão (r^2 = 0,989), correspondente à Equação 15.

$$[DCPIP] = 0{,}1632 * Abs + 0{,}0027 \quad (15)$$

onde:

[DCPIP] = concentração de DCPIP;

A = absorbância no comprimento de 600 nm.

A confecção da reta padrão foi obtida pela leitura de absorbância em cinco diluições sucessivas do indicador em 0,1778 $mg.L^{-1}$, 0,1422 $mg.L^{-1}$, 0,1066 $mg.L^{-1}$, 0,0711 $mg.L^{-1}$ e 0,0355 $mg.L^{-1}$. O comprimento de máxima absorbância do DCPIP em 600 nm foi obtido por espectrofotometria UV-Vis (Figura 38).

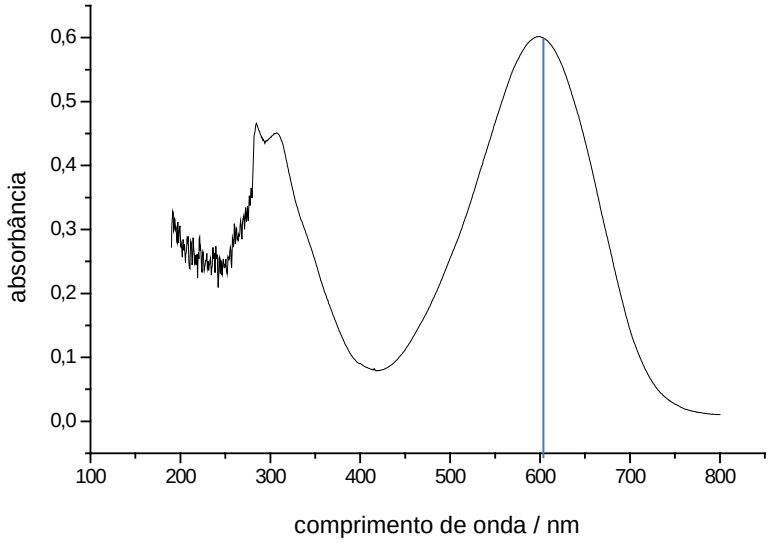


Figura 38 – Espectro de absorbância do DCPIP.

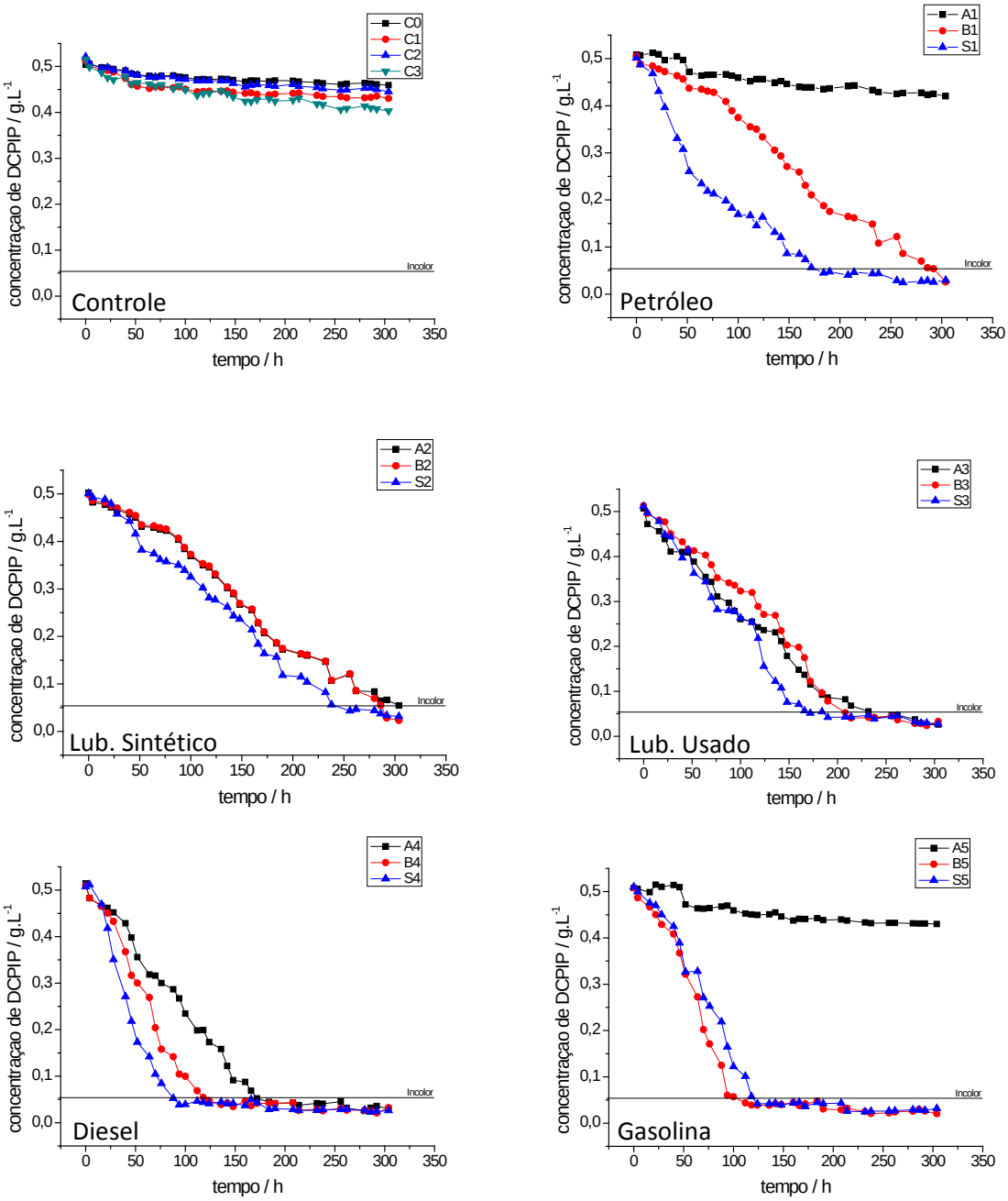


Figura 39 – Descoloração do indicador DCPIP analisada por espectrofotometria no comprimento de 600 nm nos ensaios controle (C0, C1, C2 e C3), apenas substrato (A1 a A10), substrato + *B. subtilis* (B1 a B10) e substrato + *B. subtilis* + biossurfactante (S1 a S10).

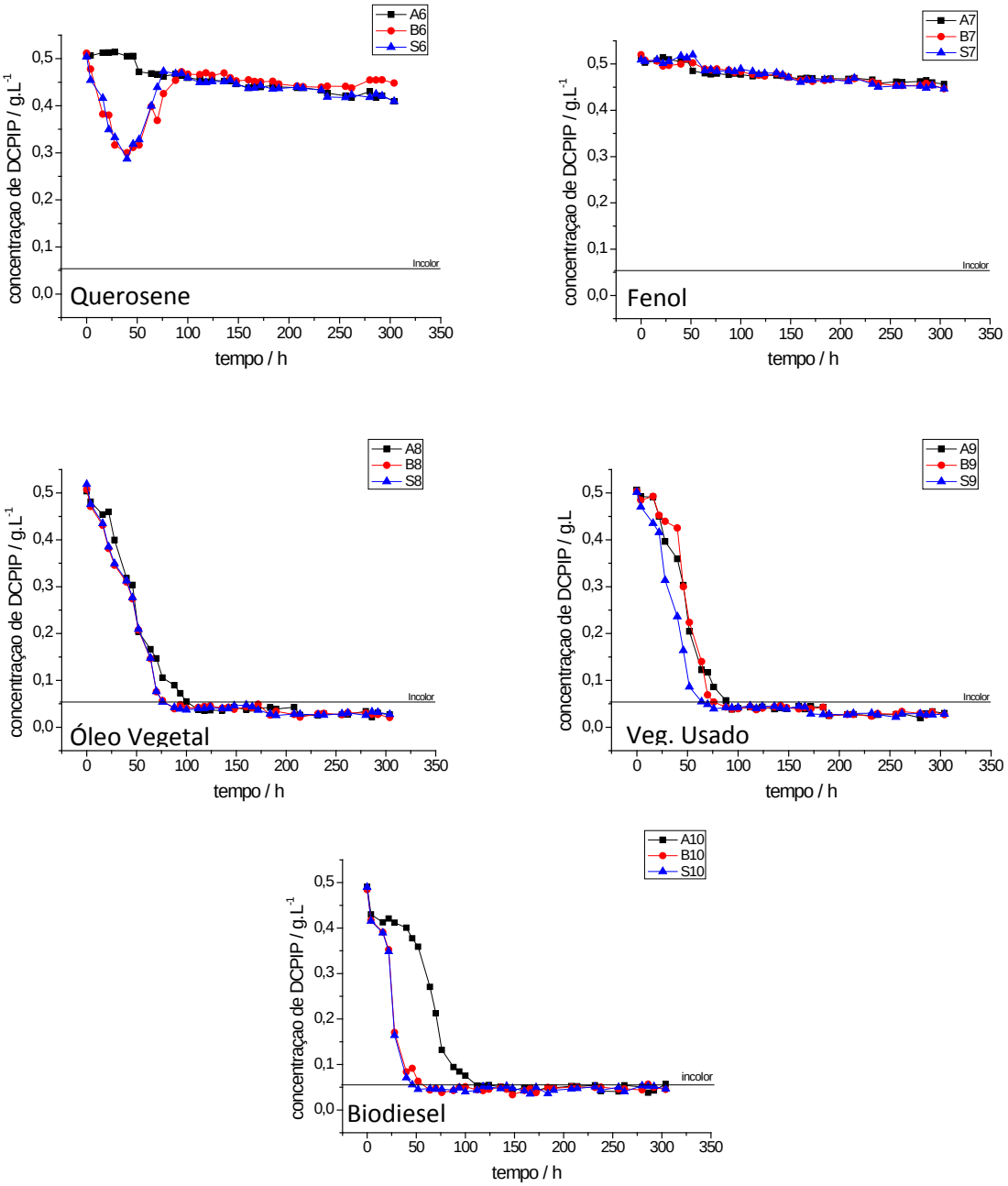


Figura 39 (Continuação) – Descoloração do indicador DCPIP analisada por espectrofotometria no comprimento de 600 nm nos ensaios controle (C0, C1, C2 e C3), apenas substrato (A1 a A10), substrato + *B. subtilis* (B1 a B10) e substrato + *B. subtilis* + biossurfactante (S1 a S10).

Na Figura 39 percebe-se a estabilidade da coloração do indicador ao longo do tempo pela pequena alteração nos valores de absorbância nos ensaios controle C0, C1, C2 e C3. Os ensaios controle foram feitos para investigar a estabilidade do corante, uma possível interação entre *B. subtilis* e DCPIP, uma possível interação entre o surfactante e DCPIP e a atividade metabólica do *B. subtilis* sobre o biossurfactante. Nos outros ensaios, com exceção de A1, A5, A6, B6, S6, A7, B7 e S7 observou-se a diminuição da concentração de DCPIP ao longo do tempo.

A seqüência de biodegradação observada entre os substratos testados foi semelhante à encontrada na respirometria e pode ser usada como uma confirmação dos resultados obtidos pela outra técnica. Foi possível quantificar a mudança de coloração do conteúdo dos frascos pela absorbância, considerando a diminuição da concentração do DCPIP em sua estrutura original como uma medida indireta da ocorrência de biodegradação dos substratos testados.

Assim como a respirometria, na colorimetria observou-se uma rápida biodegradação dos óleos vegetais usados (9) e dos óleos vegetais (8), além de que os ensaios contendo biossurfactantes foram todos mais rapidamente biodegradados. Outra semelhança entre os resultados obtidos com a colorimetria e respirometria foi a influência do biossurfactante na biodegradação do petróleo, que foi muito mais rápida com biossurfactante (172 h) do que sem biossurfactante (292 h).

Dentre todos os ensaios, o biodiesel (10) foi o ensaio que descoloriu mais rapidamente. O mesmo não ocorreu em longo prazo conforme monitorado pela respirometria. Na respirometria observou-se uma elevada produção inicial de CO_2 que não se manteve ao longo de todo o processo de biodegradação, resultando em uma baixa produção acumulada de CO_2 ao término do monitoramento. Na colorimetria foi observada apenas uma rápida mudança de cor do indicador DCPIP após 64 h. A alta biodegradabilidade do biodiesel nos ensaios colorimétricos comparada à respirometria pode estar associada à baixa toxicidade da substância para *B. subtilis* conforme apontado em 5.5.1. Outra possibilidade também é a não formação de metabólitos secundários e subprodutos potencialmente tóxicos em longo prazo nos ensaios colorimétricos, diferentemente do ocorrido nos ensaios respirométricos discutido em 5.5.2.

5.4. Discussões sobre Biodegradação

5.4.1. Biodegradação de derivados do petróleo

Os dados respirométricos (seção 5.2.) e colorimétricos (seção 5.4.) obtidos permitem a discussão sobre as causas e fatores que influenciaram na biodegradação das diferentes derivados do petróleo. Fatores como a grande diversidade de componentes de biodegradabilidade variável (EPA, 2003; WIDDEL e RABUS, 2001) das diferentes subtâncias analisadas permitem a discussão sobre a biodegradação observada nos diferentes perfis de biodegradação nas Figuras 31, 32 e 39. É possível, por exemplo, inferir sobre a biodegradabilidade dos diferentes derivados com base no tamanho da cadeia de *n*-alcanos, concentração de cadeias ramificadas e/ou de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (FEITKENHAUER et al., 2003; ABDUL-MEGEED, 2004; JOVANČIĆEVIĆ et al., 2008).

Frações de petróleo podem ser obtidas pela destilação e refino. Em geral, existe uma composição média para todos os derivados, sendo estes formados por uma variedade de alcanos, cadeias insaturadas, anéis aromáticos e estruturas policíclicas (MERCK, 1976). De acordo com as Tabelas 7 e 8 foi estudada a biodegradação do petróleo e muitos de seus derivados, cuja composição varia muito. Assim, encontrou-se nos ensaios respirométricos uma produção de CO_2 que variou em um máximo de 551,8 mg de CO_2 para óleos lubrificantes usados e um mínimo de 180,7 mg de CO_2 para petróleo sem biossurfactante (Tabela 11). Foi atribuído que a variação na susceptibilidade à biodegradação dos compostos relaciona-se com diferentes tamanhos das cadeias carbônicas, e também aos componentes presentes nas substâncias a serem biodegradadas (PETERS et al., 2005).

As cadeias de C_7 até C_{11} estão presentes na gasolina, na qual há uma alta concentração de alcenos comparada a outros derivados do petróleo. A biodegradação da gasolina produziu um máximo de 371,7 mg de CO_2 na respirometria, sendo esta mais alta que os demais derivados do petróleo, com excessão dos óleos lubrificantes, que produziram 393,3 e 551,8 mg de CO_2 na presença de biossurfactante. Isso ocorreu porque os alcenos são facilmente

biodegradados (SOLANO-SERENA et al., 1999), já que estes compostos, como propileno e eteno, ativam enzimas especificas (monooxigenases) que são carboxiladas e passam para o metabolismo do microrganismo (ENSIGN, 2001). Descobriu-se também que pequenas moléculas de hidrocarbonetos são mais facilmente biodegradadas e compostos aromáticos são degradados em taxa mais lenta que alcanos em ambientes marinhos (SASAKI et al., 1998). Sabe-se também que n-alcanos com cadeias de comprimento inferiores a C_{14} são quebrados pelo intemperismo em água do mar (EHRHARDT e WEBER, 1991).

O óleo diesel é um composto mais denso que a gasolina, contendo cadeias na faixa de C_{12} a C_{15}, seguido pelo querosene e outros óleos combustíveis. Conforme a Tabela 11 e os perfis de biodegradação observados na Figura 31, o tamanho da cadeia foi determinante na biodegradabilidade desses compostos, que produziram na presença de biossurfactante 324,7 e 230,7 mg de CO_2 respectivamente. Contudo, o tamanho das cadeias carbônicas não explica a maior biodegradabilidade dos óleos lubrificantes. Os óleos lubrificantes possuem cadeias carbônicas ainda mais longas que a gasolina, diesel e querosene. Entretanto, a produção de CO_2 ao término do monitoramento respirométrico (393,3 mg de CO_2) indicam uma maior degradabilidade desse óleo em comparação aos outros derivados.

Dentre os derivados estudados, sabe-se que os óleos lubrificantes automotivos podem constituir um sério risco ao ambiente, uma vez que somente uma pequena parcela é reciclada e a maior parte é incinerada ou queimada. Foi observado no presente estudo que *B. subtilis* é capaz de degradar os óleos lubrificantes (seção 5.4.), principalmente, na presença de biossurfactante. Nos ensaios colorimétricos a biodegradação dos óleos lubrificantes foi considerada completa após 230 h. Koma et al. (2001) estudaram a capacidade degradação de óleos automotivos usados por microrganismos isolados do solo e assim como observado em *B. subtilis* (Figura 39), os autores concluíram que bactérias como *Acinetobacter* sp. foram capazes de crescer em um meio mínimo contendo n-parafinas e óleos lubrificantes (0,1% p/v), cotudo em um tempo ainda menor: após 96 h de cultivo. O crescimento microbiano utilizando óleos lubrificantes automotivos como fonte de carbono também foi observado nos consórcios de microrganismos da seção 5.2.

Os altos valores de produção de CO_2 encontrados nos ensaios com óleo lubrificante usado (509,1 mg de CO2 sem biossurfatante) quando comparados ao lubrificante não usados (350,9 mg de CO_2 sem biossurfactante) apresentaram-se semelhantes aos descritos por Einsentraeger et al. (2002). Em seu estudo foi proposto que mudanças na estrutura química dos hidrocarbonetos nos lubrificantes ocorrem quando utilizados. As altas temperaturas e pressão do motor quebram as longas cadeias carbônicas presentes nesse óleo, facilitando assim a ação microbiana. A biodegradabilidade dos derivados de petróleo não depende exclusivamente do tamanho das cadeias, e é discutida em muitos estudos como o de Leahy e Colwell (1990), que estabelece níveis de biodegradabilidade da grande variedade de componentes presentes no petróleo. Em geral a biodegradabilidade dos hidrocarbonetos apresenta a seguinte ordenação: n-alcanos > alcanos ramificados > compostos aromáticos de baixo peso molecular > ciclo-alcanos > compostos poliaromáticos > compostos polares, de acordo com os níveis estabelecidos por Prince e Walters (2007) na Figura 8, baseando-se nos índices de Wenger et al. (2003) e Peters et al. (2005).

Além disso, as condições do processo de biodegradação influenciaram no seu desempenho, assim como a presença de microrganismos específicos (PRINCE, 1993; KARHU et al., 2009; ROSOLEN et al., 2005; ANTIC et al., 2006). Por esse motivo, foram testados a bioestimulação pela adição do biossurfactante produzido (em 5.2.) e a bioaumentação pelo uso de *B. subtilis* (em 5.4.).

Por outro lado, a biodegradação do fenol não foi observada por ambas as metodologias empregadas. A produção acumulada de CO_2 em ensaios contendo fenol (99,4 mg) foi ainda mais baixos que o controle (197,4 mg), ou até mesmo não foi observada (Figura 39). Os compostos fenólicos são constituintes bastante comuns de efluentes de refinarias de petróleo, contudo sua biodegradação depende de condições adequadas de temperaturas e microrganismos fenolíticos específicos. Onysko et al. (2000) conseguiram promover o crescimento de somente um tipo de microrganismo psicrófilo, *Pseudomonas putida*, para remover uma variedade de compostos fenólicos. Entretanto, nos resultados do presente estudo foi demonstrado que tanto o consórcio de microrganismos quanto o inóculo de *B. subtilis* não foram capazes de promover a biodegradação do fenol. Entretanto, um aumento da capacidade fenolítica do consórcio de microrganismos nos respirômetros foi

observada no término da respirometria por um aumento na produção de CO_2 após 120 dias (Figura 31).

Contaminantes contendo fenol geralmente não são facilmente tratados por ação biológica, assim, os microrganismos não são capazes de tratar efluentes industriais com alta concentração de compostos fenólicos, conforme apresentado por um grande número de estudos presentes na literatura (COMNINELLIS e PULGARIN, 1993; RAJKUMAR e PALANIVELU, 2004). Esperava-se um aumento na biodegradação mínima dos ensaios S7-S observado na seção 5.2. (Figuras 31 e Tabela 11) conforme descrito por Banat et al. (2000) que afirmaram a ocorrência e aprimoramento da biodegradação dos HPAs com quatro ou mais anéis aromáticos com o uso de biossurfactantes. Ainda assim, a biodegradação do fenol no presente estudo foi 19,8 mg de CO_2 menor com a adição de biossurfactante. Contudo, nesse caso os compostos fenólicos utilizados tinham apenas um anel aromático, o que pode ter dificultado a atividade dos microrganismos. Ademais, os componentes solúveis em água contaminada com petróleo e seus resíduos podem exercer um efeito tóxico sobre microrganismos marinhos (conforme 5.5.). Em geral, os compostos aromáticos são mais tóxicos que os compostos alifáticos, e as moléculas menores são mais tóxicas do que as maiores (NICODEM et al., 1997).

A bioquímica associada aos microrganismos degradadores de petróleo não é uniforme e é difícil estabelecer padrões de relação entre as substâncias e organismos (AUSTIN et al., 1977). Foi observado com a aplicação do teste F uma grande variedade de perfis de produção de CO_2, muitos deles com nenhuma probabilidade de serem iguais ($P = 0,000$). Ainda assim, foi possível estabelecer semelhanas entre perfis de biodegradação nas Tabelas 14 e 15. Há uma grande diversidade de reações envolvidas no processo de biodegradação de derivados do petróleo que explicam tais diferenças, e essas reações podem variar dependendo das condições ambientais (DAS et al., 2008). Assim, a proposta do conhecimento e dos perfis de biodegradação das diferentes substâncias permite a ampliação do conhecimento sobre o comportamento ambiental das substâncias.

Quanto à biodegradação do biodiesel foi observada na respirometria apenas uma grande produção inicial de CO_2, que cessou após poucos dias. Conforme os modelos matemáticos (seção 5.2.1.), a biodegradação do biodiesel atinge um dos

valores de BRmax mais altos (32,01 mg de CO_2) em menos tempo (45,22 dias). Alguns estudos demonstraram que o biodiesel foi mais facilmente biodegradado que hidrocarbonetos derivados do petróleo (ZHANG et al., 1998; LAPINSKIENE et al., 2006). Entretanto, alguns estudos apontam para um baixo desempenho na biodegradação do biodiesel em alguns casos, como em misturas com outras substâncias (SOARES et al., 2009). Nesse estudo foi observado que o consórcio de microrganismos não foi capaz de biodegradar o biodiesel em longo prazo, dado o final da produção de CO_2 semanal ter se encerrado em apenas 120,12 dias. Isso pode ser devido à provável formação de metabólitos secundários não biodegradáveis (ZHENGKAI e WRENN, 2008), conforme discutido em 5.5. Todavia, é possível que a rápida produção de CO_2 inicial observada na respirometria foi de fato a biodegradação completa do biodiesel presente nos respirômetros, o que causou o esgotamento da fonte de carbono dos microrganismos logo nos após os primeiros dias, justificando a baixa produção de CO_2 subsequente. O inoculo de *B. subtilis*, por sua vez, degradou mais rapidamente o biodiesel do que todas as outras substâncias (47 h) testadas na colorimetria (Figura 39).

5.4.2. Biossurfactantes e biodegradação

A biodisponibilidade de substâncias é determinada pela taxa de transferência para as células dos microrganismos relativa ao seu metabolismo (JOHNSEN et al., 2005). Foi observado nesse estudo que a adição de biossurfactantes alterou a biodegradação das substâncias pelos microrganismos, permitindo assim um aumento da atividade metabólica, causando um aumento médio de 14,1% na produção acumulada de CO_2. O aumento da biodisponibilidade causado pelos surfactantes também foi encontrada nos estudos de (WEST e HARWELL, 1992; VOLKERING et al., 1998). Alguns autores afirmam a ocorrência de efeitos inibitórios dos biossurfactantes ao metabolismo (DAS et al., 2008), o que não foi observado nos ensaios controle S0-S (Tabela 11) e C2 e C3 (Figura 39). Verificou-se também que o biossurfactate produzido por *B. subtilis* não apresentou para os organismos, em ensaios de toxicidade tais efeitos (conforme 5.5.), o que torna viável sua aplicação em procedimentos de biorremediação. Na seção 5.5. foi discutida como

mais tóxica a produção de compostos secundários e metabólitos na ausência do biossurfactante.

As características físico-químicas em que se encontram os hidrocarbonetos são um fator decisivo na cinética de biodegradação. Os microrganismos agem principalmente na interface óleo-água (AMUND e ADEBIYI, 1991). Com exceção do fenol (S7 e S7-S), todos os ensaios respirométricos apresentaram um melhor rendimento de CO_2 após adicionado o biossurfactante. Já dentre os ensaios colorimétricos que apresentaram descoloração, apenas a gasolina (S5) não apresentou maior biodegradação com a adição de biossurfactante. Assim, de acordo com Mulligan et al. (2001), a ação de biossurfactantes, como a surfactina produzida por *B. subtilis,* facilitou a atividade metabólica dos microrganismos presentes no meio para completar o processo de biodegradação. Dentre os motivos apontados o biossurfactante não apenas facilitou o contato dos microrganismos com o substrato, como também foi capaz de remover cobre e zinco de ambientes contaminados com hidrocarbonetos, devido ao caráter aniônico desses surfactantes, sendo mais eficiente que surfactantes químicos.

Além disso, o aumento da área de superfície causado pelos biossurfactantes acelerou a biodegradação, aumentando o potencial de dispersão dos compostos em meios aquosos. A adição de biossurfactantes fez com que a emulsificação (E_{24}) dos compostos hidrofóbicos fosse em média 81,25% maior que em sua ausência, principalmente, para o querosene em que a emulsificação passou de 10,87% para 46,51%. A aplicação de biossurfactante nas substâncias testadas foi responsável por uma biodegradação mais rápida na maioria dos casos, principalmente, na biodegradação do petróleo. Milioli e Sobral (2007) sustentam esse argumento ao indicar que o surfactante aumenta a emulsificação, a solubilidade, a dessorção dos hidrocarbonetos sorvidos no meio e a difusão facilitada dos hidrocarbonetos entre fases, aumentando assim, a disponibilidade do óleo para ação dos microrganismos.

Uma biodegradação efetiva depende da ação simultânea de microrganismos metabolicamente versáteis e condições ambientais favoráveis ao processo (VENKATESWARAN e HARAYAMA, 1995). Foi proposto no presente estudo a pré-seleção de um inóculo capaz de metabolizar o petróleo e derivados (seção 4.2.2.) e a aplicação de *B. subtilis* pela capacidade produtora de biossurfactante e

metabolizar óleo (4.3.2.). Um derramamento de petróleo leva a um processo metabólico adaptativo. De acordo com a Tabela 12, esse período de adaptação pode ser maior (no caso de S2, S3 e S8, que levaram em média 98,31 ± 15,18 dias para atingir BRmax) ou menor (S4, S6 e S10, que levaram em média 36,99 ± 7,05 dias para atingir BRmax). A adição de microorganismos rapidamente a ambientes contaminados foi sugerida por Chhatre et al. (1996), pois o longo período de adaptação ao qual a biota local responderia seria diminuída consideravelmente.

A Figura 39 mostra que o *B. subtilis* se adaptou rapidamente à biodegradação de óleos vegetais, gasolina, diesel e biodiesel, mas no caso do querosene e fenol a biodegradação não ocorreu. O uso de biossurfactantes nos ensaios colorimétricos fez com que a descoloração das amostras ocorresse em média 37,4 ± 12,2 h antes. Assim, a adição de microrganimos e biossurfactantes foi uma maneira de otimizar a biodegradação de uma vasta variedade de substâncias de uma mistura complexa como o petróleo.

5.5. Toxicidade

5.5.1. Toxicidade para B. subtilis

Na Figura 40 estão os resultados de toxicidade para B*. subtilis* através do kit “ToxTrack Toxicity Test” da Hach Company conforme metodologia apontada em 4.4.2. Avaliou-se a porcentagem de inibição do petróleo, derivados e óleos vegetais para a bactéria produtora de biossurfactante utilizada nesse estudo. Diferentemente dos testes de toxicidade em plantas foi analisada aqui somente a toxicidade da substância ao microrganismo, sem que esta tenha passado por um processo prévio de biodegradação.

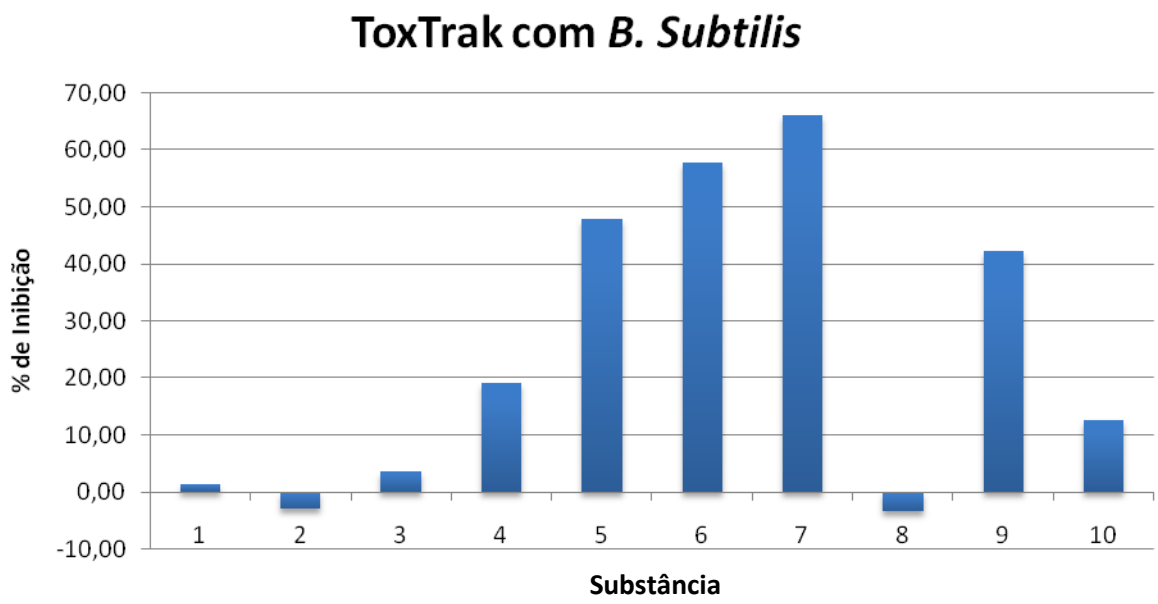


Figura 40 – Porcentagem de inibição do metabolismo de *B. subtilis* em diferentes substâncias, sendo petróleo (1), lubrificante sintético (2), lubrificante usado (3), diesel (4), gasolina (5), querosene (6), fenol (7), óleo vegetal (8), óleo vegetal usado (9) e biodiesel (10).

Os resultados expressos em porcentagem de inibição (%I) são uma medida relativa. Eles não representam uma medida quantitativa da concentração da toxina. A %I calculada não é diretamente proporcional à concentração das toxinas. De acordo com o Method 10017 (Hach Company), resultados abaixo de 10% não são totalmente confiáveis, mas passam a ser estimativas bastante coerentes quando são feitas repetições de resultados semelhantes. Nesses casos, a ocorrência de muitos resultados entre 10% e -10%, cuja variância entre suas repetições seja baixa, devem ser consideradas apenas como levemente tóxicas ao microrganismo testado. Resultados muito negativos (abaixo de -10%) por sua vez devem ser considerados tóxicos.

O método ToxTrak foi realizado em triplicatas, sendo este um número razoável para concluir sobre a toxicidade das substâncias. Sendo assim, de acordo com a Figura 40, as substâncias: diesel (4), gasolina (5), querosene (6), fenol (7) e óleo vegetal usado (9); são tóxicas para *B. subtilis*. Já o lubrificante sintético (2), lubrificante usado (3) e óleo vegetal usado (8) são levemente tóxicas. O biodiesel (10) também apresentou baixa toxicidade para *B. subtilis*, o que pode explicar à alta

biodegradação observada nos ensaios colorimétricos em 5.3.2. O petróleo (1), no entanto, apresentou resultados variados no intervalo de -10% a 10%. De acordo com a metodologia não deve ser considerada tóxica.

É possível associar a toxicidade do óleo vegetal usado para *B. subtilis* com a presença de compostos químicos resultantes do seu uso. Mesmo que não contenha as mesmas substâncias presentes no petróleo e derivados, os óleos vegetais podem apresentar efeitos tóxicos em organismos sensíveis (ZONGQIANG et al., 2008). Os óleos vegetais são compostos, principalmente, por triacilgliceróis que são os ácidos oleicos, linoleicos e linolênicos, palmítico e esteárico (SCRIMGEOUR, 2005). A toxicidade desses óleos varia com o tempo (MATTSON et al. 1976; FENNEMA, 1985) e pode causar inibição do crescimento e mortalidade em organismos (MUDGE, 1995). Campo et al. (2007) observaram que no caso dos óleos vegetais de cadeias maiores apresentaram maior toxicidade em microrganismos. Assim, a transformação dos óleos vegetais durante seu uso como, por exemplo, no preparo de alimentos, pode fazer com que a toxicidade dessas substâncias aumente (ALUYOR et al., 2009) conforme observado na Figura 40. Compostos intermediários tóxicos de óleos vegetais também podem ter sido formados ao longo da duração do teste e aumentado assim a toxicidade do óleo vegetal para *B. subtilis* (AL DARBI et al., 2005; ZHENGKAI e WRENN, 2008). Os resultados encontrados por essa metodologia corroboram estudos de avaliação da toxicidade aguda que têm evidenciado os hidrocarbonetos aromáticos e os fenóis como compostos que mais influenciam na toxicidade (NEFF, 2002). Tais resultados coincidem também no efeito tóxico dos hidrocarbonetos voláteis por Gamo et al. (2003). Somado a isso, hidrocarbonetos de baixa massa molar como os presentes em gasolina e diesel apresentam intenso efeito tóxico agudo, principalmente, devido a sua elevada solubilidade e presença de moléculas mais voláteis com capacidade de penetrar as células e alterar estruturas celulares (PARIDA e DAS, 2005).

5.5.2. Toxicidade para sementes

Os problemas de toxicidade em uma planta surgem quando certos constituintes diluídos no meio aquoso em que o embrião se desenvolve são absorvidos e acumulados em seus tecidos em concentrações suficientemente altas para provocar danos e reduzir seus rendimentos (AYERS e WESTCOT, 1999). O teste de toxicidade realizado em plantas nesse estudo apresentou resultados acerca da toxicidade das substâncias analisadas antes e depois de sofrerem o processo de biodegradação com a vantagem de possuir baixo custo e simplicidade.

A toxicidade dos biossurfactante é um fator de inibição da biodegradação, contudo, grande parte dos biossurfactantes não apresenta efeitos inibitórios quando utilizados próximos dos valores de concentração micelar crítica (VAN HAMME e WARD, 1999). Sendo assim a toxicidade do biossurfactante para as sementes de alface e pepino foi testada em ensaios controle. Não foi observada diferença significativa entre a germinação e crescimento de sementes nos ensaios com ou sem o biossurfactante produzido. Isso indica que o biossurfactante na concentração utilizada (1 $g.L^{-1}$) não foi tóxico.

5.5.2.1. Toxicidade para alface

Na Figura 41 foram apresentados os dados relativos à porcentagem de germinação e porcentagem de inibição das sementes de alface expostas às diferentes substâncias durante 120 h. Nos ensaios controle negativo (conforme 4.4.1.1.) sem biossurfactante a germinação foi de 79,5%, enquanto que nos ensaios controle com biossurfactante a germinação foi de 81,5%. Não houve germinação de nenhuma semente nos controles positivos contendo $ZnSO_4$ (conforme 4.4.1.1.).

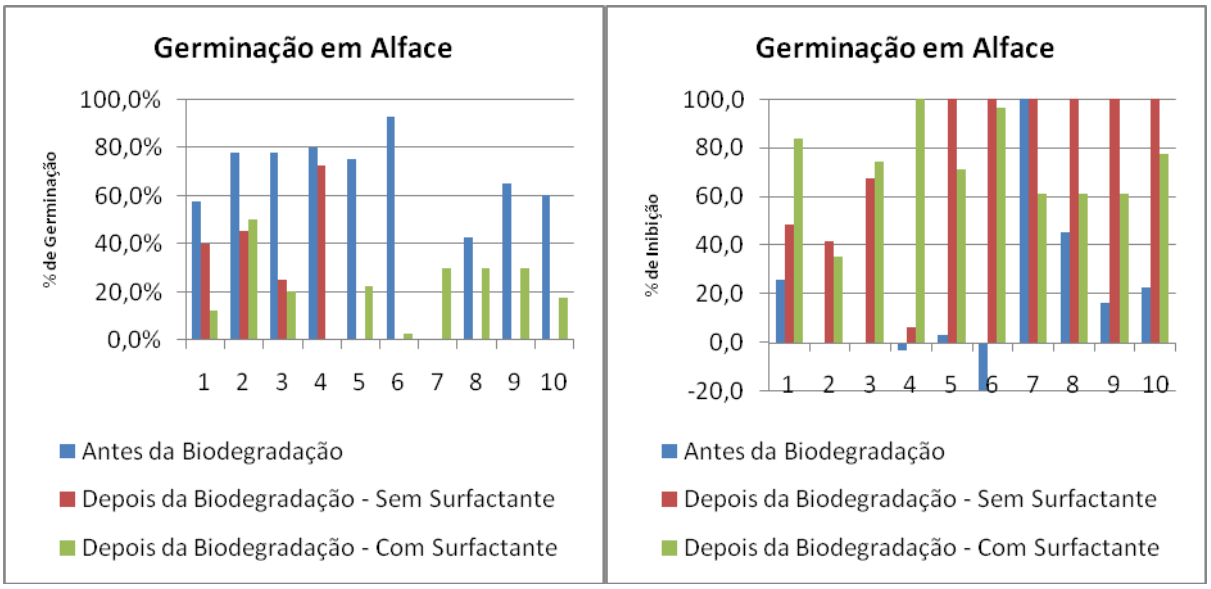


Figura 41 – Porcentagem média de germinação e porcentagem de inibição para alface, submetidas a diferentes substâncias, sendo petróleo (1), lubrificante sintético (2), lubrificante usado (3), diesel (4), gasolina (5), querosene (6), fenol (7), óleo vegetal (8), óleo vegetal usado (9) e biodiesel (10).

Foi observado na Figura 41 que uma maior porcentagem de germinação ocorreu em todas as sementes que foram expostas às substâncias antes da ocorrência do processo de biodegradação. A única exceção a isso foi o fenol (7), cuja exposição às sementes somente permitiu a germinação após sofrer biodegradação com a adição do biossurfactante, apresentando uma porcentagem de inibição de 100% nos demais ensaios.

Com relação à influência do biossurfactante ao longo da biodegradação foram obtidos resultados variados dentre as substâncias. Pode-se considerar que sua adição aos ensaios de biodegradação resultou em substratos menos tóxicos para alface em gasolina (5), querosene (6), fenol (7), óleo vegetal (8), óleo vegetal usado (9) e biodiesel (10); pois assim como uma germinação mais alta, observa-se inibição completa da germinação das sementes que cresceram em meio saturado da substância biodegradada sem a presença de biossurfactante durante o processo de biodegradação. Em contrapartida, para petróleo (1) e diesel (4) a presença de biossurfactante durante a biodegradação resultou em um substrato tóxico para germinação das sementes. Não foi observada diferença significativa entre a

germinação em substrato depois da biodegradação com ou sem biossurfactante em lubirifcante sintético (2) e lubrificante usado (3).

A germinação de alface durante 120 h de exposição às substâncias antes e depois da biodegradação foi analisada estatisticamente pelo teste de Tukey a um nível de siginificância de 5%, em que foi verificado que as médias e as variâncias, das amostras dos grupos “antes da biodegradação”, “depois da biodegradação – com biossurfactante” e “depois da biodegradação – sem biossurfactante” diferem estatisticamente do controle e entre si, indicando que as variáveis as quais as sementes foram expostas tiveram influência no índice de germinação da alface.

A toxicidade das substâncias depois de biodegradadas também foi observada no crescimento de tecidos vegetais na Figura 42 abaixo.

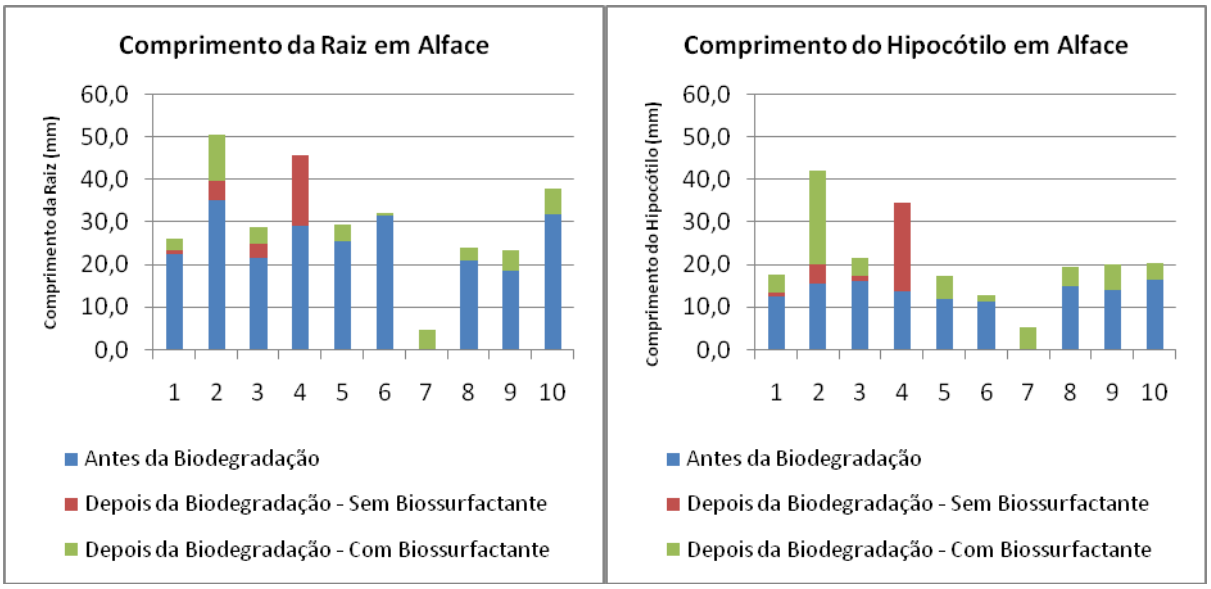


Figura 42 – Comprimento médio da raiz e hipocótilo em alface, submetidas a diferentes substâncias, sendo petróleo (1), lubrificante sintético (2), lubrificante usado (3), diesel (4), gasolina (5), querosene (6), fenol (7), óleo vegetal (8), óleo vegetal usado (9) e biodiesel (10).

Assim como observado na porcentagem de germinação e inibição das sementes (Figura 42), após sofrerem o processo de biodegradação, as substâncias passam a ter um efeito negativo no crescimento da raiz e hipocótilo da plântula.

Após 120 h foi observado um maior comprimento desses tecidos nos ensaios contendo as substâncias antes da biodegradação. Com exceção de diesel (4), o crescimento de raiz e hipocótilo ocorreu, embora em menor tamanho médio, nas substâncias biodegradadas com acréscimo de biossurfactante. O diesel (4) por sua vez indicou que a combinação com biossurfactante durante a biodegradação afetou o desenvolvimento de raiz e hipocótilo. Somente o ensaio contendo fenol (7) se beneficiou do processo de biodegradação com biossurfactante na promoção de seu crescimento.

Os ensaios de lubrificante sintético (2) e diesel (4) geraram estruturas vegetais de maior comprimento médio quando expostos às substâncias que sofreram biodegradação, contudo, esses valores foram apenas medidos dentre as sementes germinadas. Neste caso, é possível concluir que a concentração de óleo diesel utilizada pode não ter sido suficiente para inibir a germinação, visto que a semente possui reserva de energia para este processo (GONG et al., 2001). No entanto, a presença do contaminante foi suficiente para reduzir o crescimento da raiz e do hipocótilo, principalmente, no início da contaminação. Assim, ao combinar a informação sobre germinação observada na Figura 41 e a porcentagem de inibição das estruturas vegetais em comparação com o controle (Figura 43) foi possível concluir melhor sobre a toxicidade de cada substância à alface.

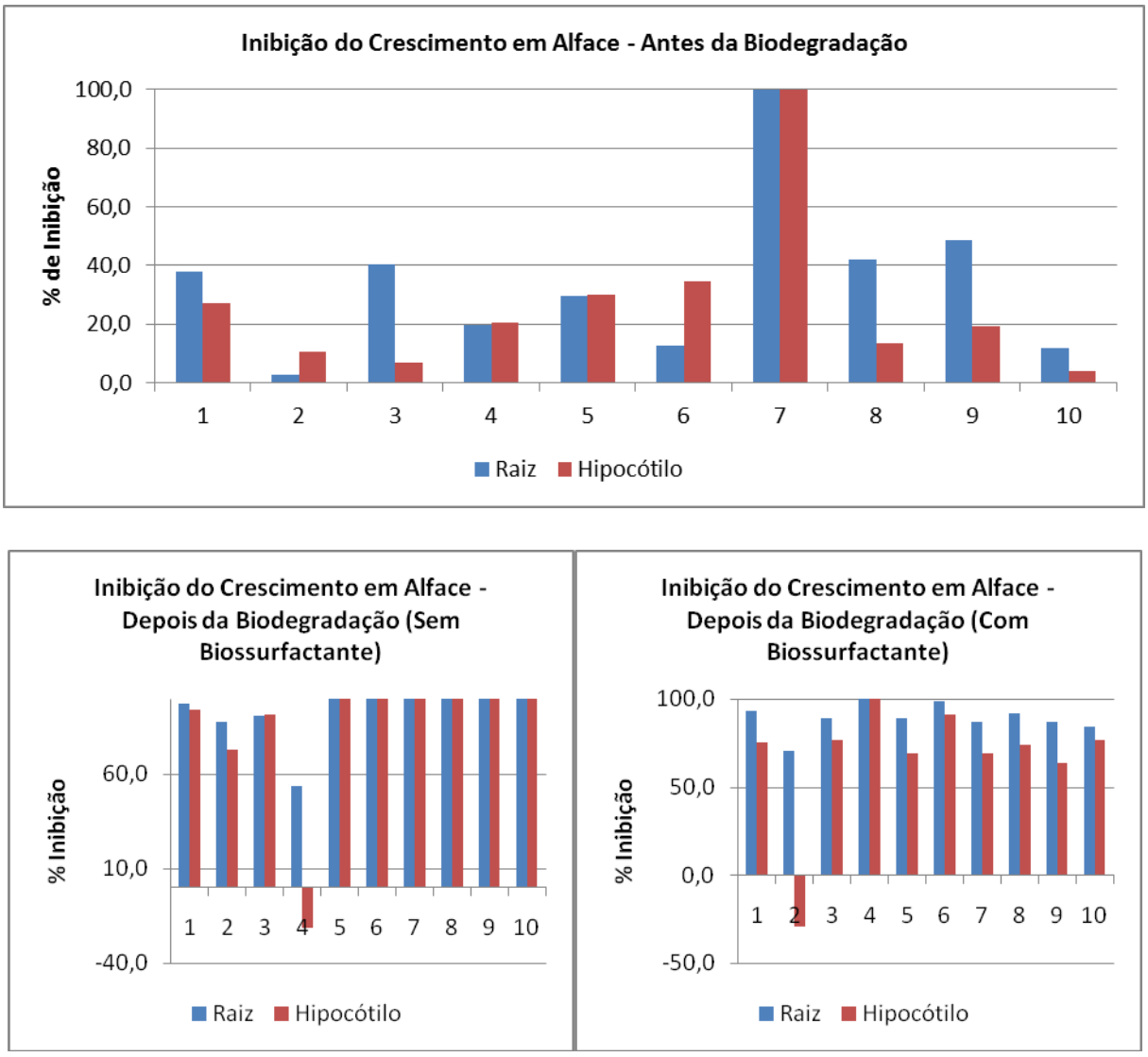


Figura 43 - Porcentagem de inibição do crescimento de raiz e hipocótilo para alface, submetidas a diferentes substâncias, sendo petróleo (1), lubrificante sintético (2), lubrificante usado (3), diesel (4), gasolina (5), querosene (6), fenol (7), óleo vegetal (8), óleo vegetal usado (9) e biodiesel (10).

Conforme a Figura 43 o processo de biodegradação produziu substâncias mais tóxicas do que as substâncias originais. Com exceção do fenol (7), a inibição do crescimento de raiz e hipocótilo foi bastante grande após o processo de biodegradação ocorrer em todas as substâncias. As únicas situações em que não houve inibição do crescimento foram à formação de um hipocótilo maior em diesel (4) na ausência de biossurfactante; e em lubrificante sintético (2) na presença de biossurfactante. Ainda assim, nota-se que das substâncias 5 a 10 ocorrem valores

de inibição menores quando as substâncias passam pelo processo de biodegradação com o biossurfactante, resultando assim em uma menor toxicidade para alface.

5.5.2.2. Toxicidade para pepino

Os mesmos testes feitos com alface foram conduzidos também com sementes de pepino. Os resultados foram descritos nas Figuras 44, 45 e 46, seguidos de uma comparação com os resultados obtidos nos testes de toxicidade para alface.

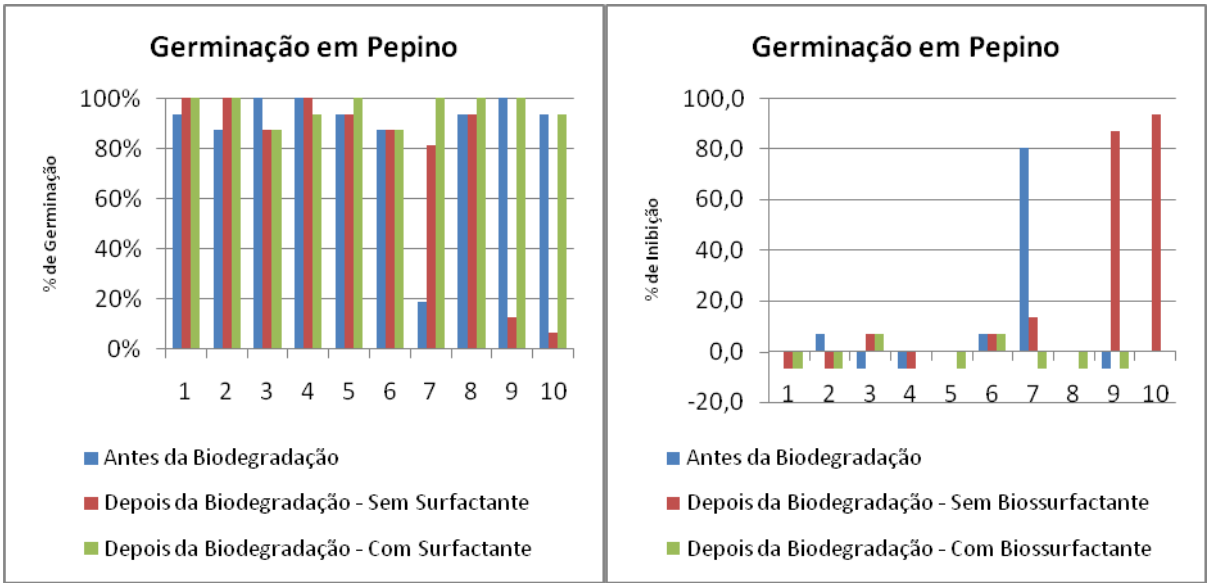


Figura 44 - Porcentagem média de germinação e porcentagem de inibição para pepino, submetidas a diferentes substâncias, sendo petróleo (1), lubrificante sintético (2), lubrificante usado (3), diesel (4), gasolina (5), querosene (6), fenol (7), óleo vegetal (8), óleo vegetal usado (9) e biodiesel (10).

De acordo com a Figura 44, foram obtidas porcentagens de germinação bastante altas para grande parte das substâncias testadas. A análise dos dados de germinação pelo teste de Tukey indicou que não existe diferença significativa ao nível de significância 5% entre os dados de germinação, com exceção de fenol (7), óleo vegetal usado (9) e biodiesel (10).

Em comparação com alface, foi observado um maior crescimento de raiz e hipocótilo de pepino em substratos biodegradados com adição de biossurfactantes. A biodegradação sem biossurfactante gerou substâncias que inibem o crescimento das plantas quando testada à toxicidade para pepino. Contudo, a adição de biossurfactante durante o processo de biodegradação fez com que ocorresse a germinação e o crescimento mais acentuado em todas as substâncias biodegradadas. No caso de fenol (7), óleo vegetal usado (9) e biodiesel (10); a germinação e crescimento somente ocorreram quando as sementes foram expostas às substâncias biodegradadas tratadas com biossurfactante.

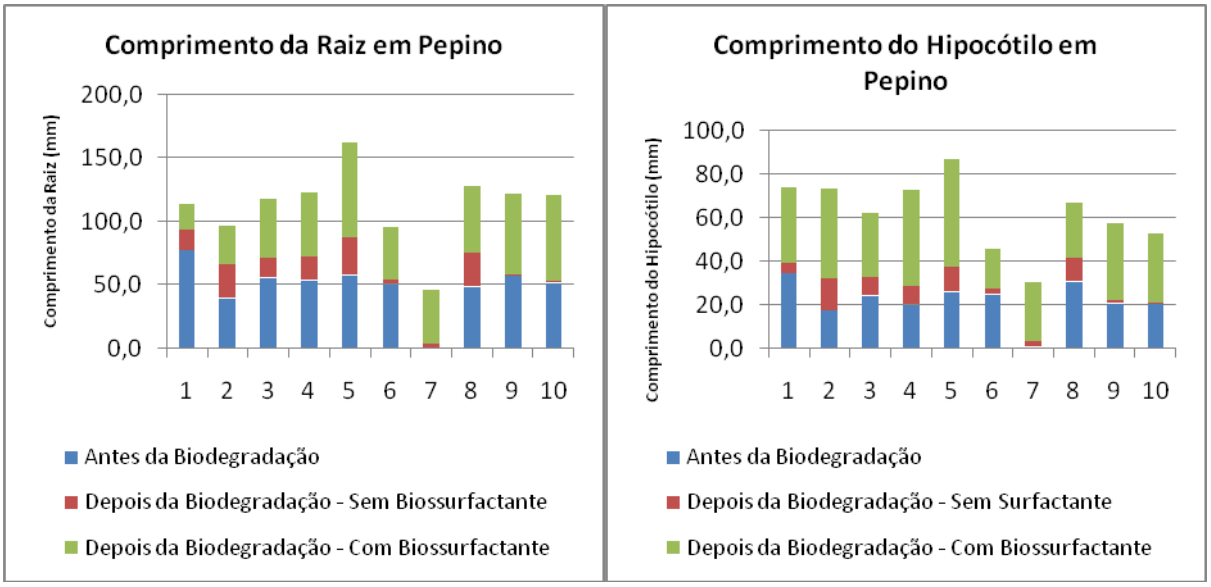


Figura 45 – Comprimento médio da raiz e hipocótilo em alface, submetidas a diferentes substâncias, sendo petróleo (1), lubrificante sintético (2), lubrificante usado (3), diesel (4), gasolina (5), querosene (6), fenol (7), óleo vegetal (8), óleo vegetal usado (9) e biodiesel.

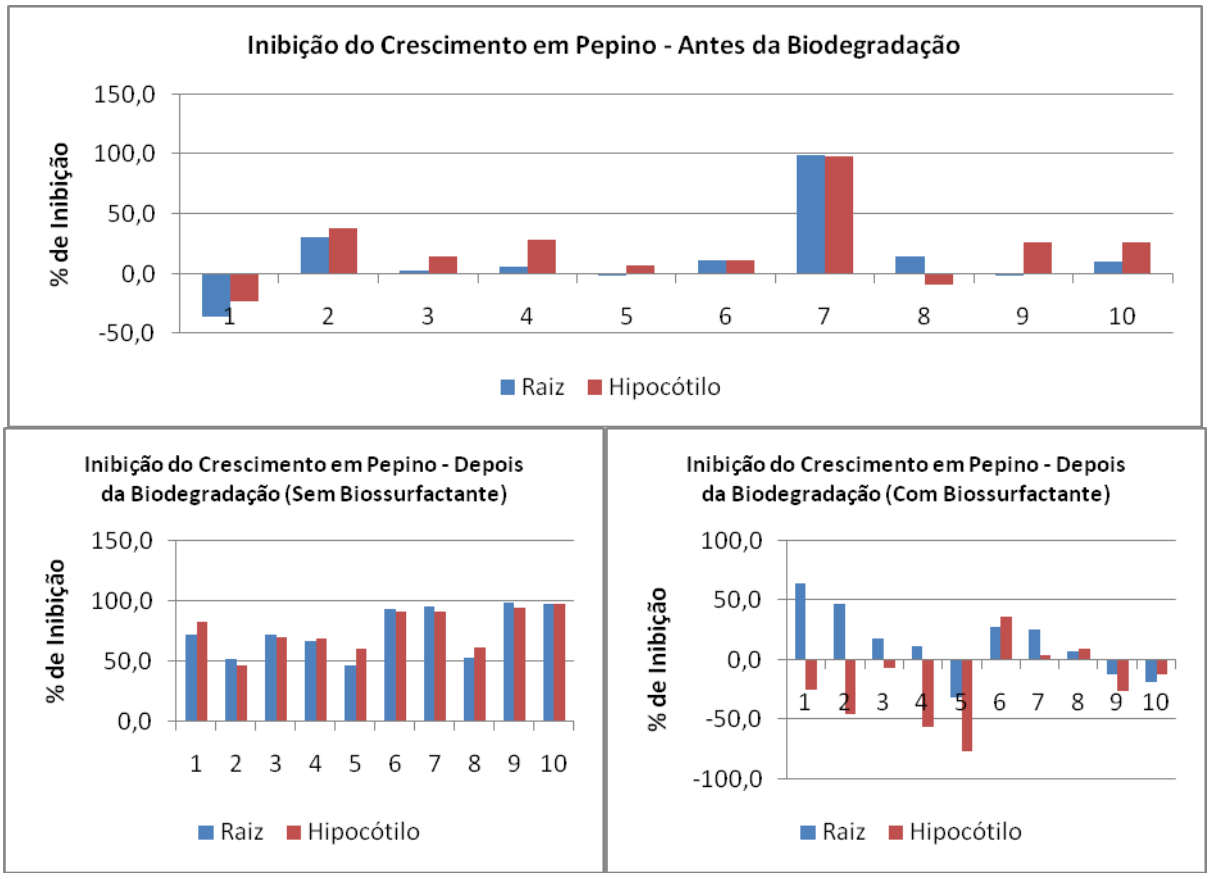


Figura 46 – Porcentagem de inibição do crescimento de raiz e hipocótilo para alface, submetidas a diferentes substâncias, sendo petróleo (1), lubrificante sintético (2), lubrificante usado (3), diesel (4), gasolina (5), querosene (6), fenol (7), óleo vegetal (8), óleo vegetal usado (9) e biodiesel (10).

Embora a germinação e o crescimento variem entre espécies, a expressão disso é também modificada pelas condições e substâncias as quais as sementes foram expostas (SANTOS et al., 1992). Ao comparar os dados de germinação e crescimento observa-se que as sementes de pepino foram menos sensíveis à toxicidade das substâncias biodegradadas quando comparadas a alface, dada a menor porcentagem de inibição média para as substâncias testadas. Pode-se afirmar que as sementes de alface foram mais apropriadas para o teste de toxicidade aguda ao petróleo, derivados e aos óleos vegetais.

5.5.3. Discussões sobre toxicidade

A água é o fator de maior importância no processo inicial de desenvolvimento de uma planta. Ao absorver água a planta reidrata os tecidos, aumenta o metabolismo e produz a energia necessária para o crescimento do eixo embrionário (CARVALHO e NAKAGAWA, 1988). Ao inserir os derivados de petróleo e óleos vegetais nos ensaios de germinação e crescimento de alface e pepino, foram causadas também perturbações nesse estágio inicial de desenvolvimento da planta, que resultaram nas diferenças observadas nas Figuras 41, 42, 44 e 45. Os bioensaios se mostraram úteis para predizer o efeito de misturas complexas, como os derivados de petróleo, na contaminação de outros organismos (BANKS e SCHULTZ, 2005).

Contudo, antes de discutir sobre o efeito tóxico dos derivados do petróleo para as sementes ao longo da biodegradação, é necessário comentar sobre os efeitos adversos das condições ambientais. O valor do pH é definido como a atividade do íon hidrogênio, expressa com logaritmo negativo da sua concentração, e determina a acidez relativa de um meio. Sabe-se que o pH do solo é de grande importância para o crescimento da planta, devido ao seu efeito na disponibilidade de nutrientes, em especial, de micronutrientes (HANDRECK e BLACK, 1999). Sabe-se também que a influência do pH sobre a germinação tem recebido pouca atenção. Valores de pH menores que 3,0 e superiores a 8,0 tem sido descritos como inibidores do processo germinativo (JANSEN e CRONIN, 1953; MALHOTRA, 1930).

Foram observadas diferenças no pH das substâncias no interior dos respirômetros na presença ou ausência de biossurfactante após o processo de biodegradação conforme a Tabela 16. Em geral, foi observado um pH mais ácido nos respirômetros sem biossurfactante, chegando à 2,98 no respirômetro contendo querosene. Contudo, a alcalinidade observada nos respirômetros contendo biossurfactante não pode ser justificada apenas pela alteração do pH durante o processo de biodegradação. Conforme 4.1.5., o biossurfactante foi ressuspendido em água alcalinizada em pH 11,0. Ao adicionar esse biossurfactante nos respirômetros foi observado um aumento do pH de 7,21 para 8,39 (Tabela 16). Em geral, durante a biodegradação ocorreu também uma diminuição do pH nos respirômetros contendo biossurfactante, como por exemplo nos ensaios contendo

gasolina (pH = 4,18) ou biodiesel (pH = 6,85). Porém, a acidificação desses ensaios apresentou menor intensidade comparada aos ensaios em que não foi adicionado biossurfactante. Assim, a alcalinização do meio promovida pela adição do biossurfactante pode ter causado um efeito positivo na germinação das sementes após a biodegradação.

O pH e a concentração de substâncias pode influenciar na germinação de sementes (FERREIRA, 1976). Frequentemente, a vegetação de ambientes perturbados é limitada pela acidez ou alcalinidade do solo (MAGDOFF et al., 1987). Correlações negativas entre o pH e a germinação foram observadas também em sementes de beterraba, melancia, pimentão e tomate por Nascimento et al. (2002). Foi observado na Tabela 16 que o processo de biodegradação sem biossurfactante resultou na maioria dos casos em uma redução geral do pH, causando uma acidificação do meio e afetando assim a germinação das sementes de alface e pepino. Esse efeito do substrato com pH muito ácido ou alcalino não é bem tolerado pelas plantas (REDMANN e ABOUGUENDIA, 1979).

Tabela 16 – Condutividade e pH do conteúdo dos respirômetros após o tempo de biodegradação

Substância	**Ensaio**			
	pH		**Condutividade (µS.cm^{-1})**	
	s/ Surf.	**c/ Surf.**	**s/ Surf.**	**c/ Surf.**
Controle	4,98	6,89	693	199
Petróleo	3,03	7,22	863	355
Óleo Lub.	3,64	7,10	802	143
Lub. Usado	3,72	6,95	784	283
Diesel	4,12	7,40	803	146
Gasolina	3,02	4,18	909	197
Querosene	2,98	7,68	758	465
Fenol	5,50	6,81	883	316
Óleo Veg.	3,20	7,82	728	150
Veg. Usado	5,34	7,05	887	595
Biodiesel	3,05	6,85	853	451
Antes da Biodegradação				
Liq. Base	**7,21**	**8,39**	**82,5**	**89,2**

A salinidade é uma medida da quantidade de sais dissolvidos na água. O mais usual é medir a salinidade a partir da condutividade da solução (IANETTA e COLONNA, 2008). Foi observado na Tabela 16 um aumento da condutividade depois da biodegradação. Durante o processo de biodegradação as moléculas são quebradas e com isso são gerados sais e íons, que podem aumentar a condutividade da solução. O aumento da salinidade medido pela maior condutividade foi mais expressivo no caso dos ensaios sem biossurfactante, alcançando valores de 909 $\mu S.cm^{-1}$ nos respirômetros contendo gasolina (Tabela 16). O valor da condutividade antes da biodegradação era bem inferior tanto na presença quanto na ausência de biossurfactante (82,5 e 89,2 $\mu S.cm^{-1}$, respectivamente).

A condutividade muito alta após a biodegradação, principalmente, nos ensaios sem biossurfactante (Tabela 16) promove drástica diminuição na absorção de água pelas sementes, podendo inviabilizar a seqüência de eventos do processo germinativo (BANSAL et al., 1980). Além disso, a salinidade afeta a germinação não só por dificultar a absorção de água, mas também por facilitar a entrada de íons em quantidades tóxicas nas sementes durante a embebição (SANTOS et al., 1992). Segundo Larcher (1995), a elevada concentração iônica do meio pode causar desequilíbrio nutricional, toxidade de alguns íons. Assim, a presença de sais pode deprimir ou inibir a germinação de sementes (RYAN et al., 1975; CUCCI et al., 1994).

Um estudo por Raymond et al. (1976) sugeriu que tanto o petróleo quanto os metabólitos gerados pela sua degradação afetaram o crescimento de plantas em solo. Observaram que os metabólitos de petróleo afetaram as propriedades do solo (como o pH e salinidade) e que isso diminuiu de alguma forma o crescimento das plantas. A poluição por óleo em solo pode também agravar problemas de alta salinidade e reduzir a tolerância de estresse hídrico das sementes e plântulas (YOUSSEF, 2002).

A capacidade de predizer os efeitos negativos de misturas complexas, como os hidrocarbonetos, necessita de amplos estudos capazes de associar sua composição química à toxicidade para muitos organismos. Todavia, são poucos os estudos que propõem a análise da toxicidade de substâncias ao longo do processo

de biodegradação (MOORE e DWYNER, 1974). A maioria dos estudos tem como foco diferentes concentrações de substâncias individuais. Avaliar todos os compostos e efeitos sinergísticos que contribuem para a toxicidade é um estudo amplo que requer muitas pesquisas capazes de agregar dados sobre várias substâncias e organismos-teste ao longo do tempo (PLAZA et al., 2005). Além disso, segundo Vaajasaari et al. (2002), em diferentes amostras de composição química bem similar, tais como os hidrocarbonetos desse estudo, podem-se observar níveis de toxicidade variáveis entre si e entre diferentes organismos-teste.

As sementes de pepino não demonstraram grande sensibilidade nos testes de germinação quando comparados com as sementes de alface. Este resultado está de acordo com Plaza et al. (2005) em sua avaliação de solo contaminado por petróleo biorremediado. Em seu estudo, observaram que apenas obtiveram maior sensibilidade por esta espécie nos testes de desenvolvimento da raiz e não na inibição da germinação. Alguns autores como Wang et al. (2001) determinam que o alongamento da raiz de pepino é um indicador sensível de fitoxicidade e não a germinação.

Em seu estudo sobre toxicidade de hidrocarbonetos previamente biodegradados, Marwood et al. (1997) mostraram haver biodegradação dos hidrocarbonetos, porém nem todos responderam com redução de toxicidade, e eles complementaram os bioensaios com análises químicas. Sendo assim, pode-se concluir que os resultados de toxicidade após biodegradação das substâncias testadas no presente estudo levam a formação de compostos secundários de efeito tóxico para alface e pepino.

Dentre os resultados encontrados, os ensaios de toxicidade utilizando petróleo cru chamam a atenção por sua peculiaridade, ao apresentar a germinação e desenvolvimento das plântulas num ambiente contendo petróleo na concentração 1% v/v (Tabela 7) conforme Figura 47 abaixo. Resultados similares a esse foram encontrados em outro organismo-teste por Vwioko e Fashemi (2005). Esses autores observaram que baixas concentrações do óleo lubrificante usado prova ter um efeito benéfico para *Ricinus communis* (mamona), pois pequenas quantidades do óleo seriam facilmente degradadas, aumentando a disponibilidade de matéria orgânica aos organismos.

Figura 47 – Germinação de sementes de pepino (esquerda) e alface (direita) em meio contendo petróleo 1% v/v.

Assim como a maior concentração de nutrientes pode afetar o desenvolvimento das plântulas, a facilitação dos nutrientes do ambiente pode ter uma influência positiva no crescimento dos órgãos vegetais. Foi observado em 5.1.4. que a presença de biossurfactantes aumenta a emulsificação dos óleos (Figura 30) em meio aquoso, ou até mesmo sua dispersão (BANAT et al., 2000). De maneira análoga à facilitação do consumo de substratos aos microrganismos, o biossurfactante pode ter ajudado na solubilização dos nutrientes não tóxicos para serem aproveitados pelas plantas nos primeiros estágios de desenvolvimento após esgotamento do endosperma.

Já a menor toxicidade do fenol após biodegradação nos ensaios contendo biossurfactante não pode ser explicada dessa maneira, pois o biossurfactante no fenol não atuou na solubilização. Provavelmente, com base no aumento da produção de CO_2 notado na Figura 31, o biossurfactante tenha promovido o crescimento de microrganismos fenolíticos, que por sua vez metabolizaram o fenol em cadeias não aromáticas menos tóxicas aos organismos-teste (FROST et al., 1999 *apud* GABARDO, 2007), resultando numa menor toxicidade relativa aos outros ensaios contendo fenol. A biodegradação rápida e eficiente do fenol é por isso importante na biorremediação de ambientes contaminados por petróleo e seus derivados (LISTE e FELGENTREU, 2006). Microrganismos degradadores de compostos fenólicos e hidrocarbonetos aromáticos são decisivos no crescimento e germinação de plantas em ambientes contaminados por petróleo. Bactérias oxidantes de anéis aromáticos são capazes de diminuir a toxicidade e mutagenicidade em organismos (HUESEMANN, 1995).

Em todos os casos (exceto fenol), o processo de biodegradação produziu um aumento da toxicidade dos compostos. A biodegradação produz compostos intermediários, os quais podem se apresentar mais tóxicos que a substância de origem. Logo, os produtos gerados poderiam interferir no processo de germinação e, consequentemente, no desenvolvimento da raiz e do hipocótilo da planta. Foi isso que Lapinskiene et al. (2006) concluíram em seu estudo sobre a biodegradação do biodiesel.

A biodegradação da gasolina observada nas Figuras 31 e discutida em 5.4, por exemplo, apresenta cerca de 20 metabólitos e subprodutos estudados. Durante a biodegradação, intermediários como o álcool terc-butílico (TBA), formato terc-butílico (TBF) e lactato são formados (MARTIENSSEN et al., 2006), além da presença de componentes voláteis como benzeno, tolueno, etil-benzeno e xileno (BTEX). Um dos aditivos da gasolina, o éter metil terc-butílico (MTBE) foi encontrado em altas concentrações (87 $mg.L^{-1}$) em derramamentos de gasolina, sendo considerado um grave contaminante ambiental (SCHMIDT et al., 2002). A toxicidade potencial desses compostos e subprodutos é baixa para humanos, mas foi capaz de inibir a germinação em até 100% em alface (Figura 41) e pode tambpem ser bastante carcinogênica para animais, especialmente o MTBE, conforme estudos de Belpoggi et al., 1995).

De acordo com Moore e Dwyner (1974) alguns parâmetros que influenciam a toxicidade são conhecidos como, por exemplo, o fato de maiores cadeias carbônicas apresentarem uma toxicidade mais baixa do que derivados de petróleo de baixo peso molecular, cuja presença de aromáticos pode causar uma grande toxicidade. Logo, os resultados encontrados no presente estudo indicam que a quebra das longas cadeias carbônicas de hidrocarbonetos potencializa a produção de compostos secundários tóxicos. Todavia, antes da biodegradação existe um efeito inerte nas moléculas que são incapazes de afetar os organismos-teste dessa maneira.

Os resultados obtidos nesse estudo foram encontrados por Haigh (1995) em seus ensaios de toxicidade de óleos lubrificantes biodegradados. Em seus estudos percebeu que os ensaios biodegradáveis, sendo estes não necessariamente os mais persistentes, apresentaram toxicidade e afetaram o crescimento e germinação de

plantas como o trigo. Tais resultados também foram observados em milho e aveia (SALANITRO et al., 1997). Isso é justificado pelo fato de que os óleos após biodegradação por microrganismos têm o tamanho de sua cadeia carbônica reduzido e a viscosidade do óleo passa a ser menor. Isso pode fazer com que o contato das moléculas com os organismos seja maior e aumentar o efeito tóxico da substância.

Bioensaios de toxicidade fornecem importantes informações sobre as consequências da poluição ambiental em organismos. Em contraste às analises químicas, eles podem detectar os efeitos de contaminantes múltiplos, subprodutos e metabólitos durante processos de biorremediação (MAILA e CLOETE, 2005). A toxicidade de solos, água e sedimentos contaminados com petróleo durante a biodegradação deve ser avaliada pela presença de subprodutos genotóxicos e citotóxicos produzidos (PLAZA et al. 2008).

A composição do petróleo e derivados é muito complexa e suas propriedades biológicas variam bastante. Assim como diferentes perfis de biodegradação (conforme 5.2) ocorrem para diferentes substâncias, a toxicidade (conforme 5.5) varia de acordo com muitos fatores. Somado a isso, os vários constituintes e derivados são afetados de maneira diferente ao longo do tempo por processos degradantes, no qual se inclui a biodegradação. Sendo assim o efeito biológico de toxicidade dessas substâncias pode variar bastante em decorrência de cada situação (BATELLE, 2007). Na Tabela 17 foram resumidos e comparados os dados de biodegradação e toxicidade encontrados no presente estudo para todas as substâncias analisadas.

Tabela 17 – Resumo da biodegradabilidade e toxicidade das substâncias estudadas

Biodegradabilidade*		s/ Biossurf.	Veg. Usado > Óleo Veg. > Lub. Usado > Óleo Lub. ~ Gasolina > Biodiesel > Diesel > Querosene > Petróleo ~ Fenol
		c/ Biossurf.	Veg. Usado > Lub. Usado > Óleo Veg. > Petróleo ~ Óleo Lub. > Gasolina > Biodiesel > Querosene > Diesel > Fenol
Toxicidade**	*Lactuca sativa*	s/ Biossurf.	Fenol > Óleo Veg. ~ Petróleo > Biodiesel > Óleo Vegetal Usado > Gasolina > Óleo Lub. ~ Lub. Usado > Diesel > Querosene
		c/ Biossurf.	Diesel > Querosene > Petróleo > Biodiesel > Lub. Usado > Gasolina > Óleo Veg ~ Veg. Usado ~ Fenol > Óleo Lub.
	B. subtilis	Fenol > Querosene > Gasolina > Veg. Usado > Diesel ~ Biodiesel > Óleo Veg. ~ Óleo Lub ~ Lub. Usado ~ Petróleo > Biossurfactante	

* Com base nos valores de biodegradação máxima prevista (Bmax)
** Baseada na porcentagem de germinação (%G) do organismo teste mais sensível.

Foi observado nesse estudo que existe uma grande variedade de comportamentos no ambiente para diferentes substâncias liberadas no ambiente quanto à biodegradabilidade. A biodegradação e o uso de biossurfactantes, por sua vez, foram também fatores de influência na toxicidade. Portanto, durante processos de biodegradação, deve-se assegurar que uma boa biodegradação não seja acompanhada de uma maior toxicidade. Tanto a alta biodegradabilidade quanto a baixa toxicidade são características importantes de substâncias e ambas devem ser consideradas quanto ao impacto ambiental causado. A habilidade de simultaneamente degradar derivados do petróleo e reduzir a toxicidade foi alvo de muitos estudos na busca de potenciais candidatos para biorremediação (BODOUR e MILLER-MAIE, 2002; RON e ROSENBERG 1997; SINGH e CAMEOTRA, 2004).

Neste trabalho, assim como em muitos dos casos estudados, a capacidade de linhagens bacterianas em produzir biossurfactantes surge como uma possibilidade bastante promissora em atingir ambos os objetivos, a biodegradabilidade e baixa toxicidade, durante a aplicação em ambientes contaminados com petróleo e derivados.

6. CONCLUSÃO

- Biodegradação dos derivados do petróleo ocorreu pela ação de consórcio de microrganismos e pela presença de *B. subtilis*.

- Todas as substâncias foram biodegradadas, exceto fenol.

- Foi possível realizar a modelagem matemática dos perfis de biodegradação associados às características específicas de cada substância.

- Produção de biossurfactante por B*. subtilis* ocorreu. A produção foi observada pela diminuição da tensão superficial e emulsificação das substâncias.

- A adição do biossurfactante, mais a pré-seleção de um consórcio microbiano e a adição de *B. subtilis* aos ensaios de biodegradação promoveu maior biodegradação das substâncias estudadas. Os óleos vegetais, principalmente os usados, apresentaram uma maior biodegradabilidade em comparação à outros derivados do petróleo.

- O processo de biodegradação produziu em todos os ensaios (com exceção do fenol) produtos de biodegradação mais tóxicos do que a substância original.

- A aplicação do biossurfactante à biodegradação provocou um menor aumento da toxicidade.

- Dentre os organismos teste, o pepino foi menos sensível à toxicidade das substâncias, pois a reserva de nutrientes na semente permitiu uma maior germinação e crescimento independente das condições externas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-MEGEED A. **Psychrophilic degradation of long chain alkanes**. Tese de Doutorado. Universität Hamburg-Harburg, Alemanha, 2004.

ABRAJANO, T. A.; YAN, B.; O'MALLEY, V. High Molecular Weight Petrogenic and Pyrogenic Hydrocarbons in Aquatic Environments. **Treatise on Geochemistry**, v. 9, p. 475-509, 2003.

ADEBUSOYE, S. A.; AMUND, O. O.; TENIOLA, O. D.; OLATOPE, S. O. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons in a polluted tropical stream. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 23, p. 1149-1159, 2007.

AL-DARBI, M. M.; SAEED, N. O.; ISLAM, M. R.; LEE, K. Biodegradation of Natural Oils in Seawater. **Energy Sources**, v. 27, p. 19–34, 2005.

ALEXANDER, M. **Biodegradation and bioremediation**. Academic Press, 1994.

ALLARD, A. S.; NEILSON, A. H. Bioremediation of organic waste sites: A critical review of microbiological aspects. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 39, p. 253–285, 1997.

ALTAS, L, BÜYÜKGÜNGÖR, H. Sulfide removal in petroleum refinery wastewater by chemical precipitation. **Journal of Hazardous Materials**, v. 153, p. 462–469, 2008.

ALUYOR, E. O.; OBAHIAGBON, K. O.; ORI-JESU, M. Biodegradation of vegetable oils: A review. **Scientific Research and Essay**, v. 4, p. 543-548, 2009.

AMUND, O. O. Utilization and degradation of na Ester-based synthetic lubricant by *Acinetobacter lwoffil*. **Biodegradation**, v. 7, p. 91-95, 1996.

AMUND, O. O.; ADEBIYI, A. G. Effect of viscosity on the biodegradability of automotive lubricating oils. **Tribology International**. v. 24, p. 235–237, 1991.

ANON. Product Rewiew: Biodegradable fluids and lubricants. **Industrial Lubrication and Tribology**, v. 48, p. 17-26, 1994.

ANP – AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO. Brasil, 2010. Disponível em: <http://www.anp.gov.br>

ANTIC, M. P.; JOVANCICEVIC, B. S.; ILIC, M.; VRVIC, M. M.; SCHWARZBAUER, J. Petroleum pollutant degradation by surface water microorganisms. **Environmental Science & Pollution Research**, v. 13, p. 320-327, 2006.

ARIMA, K.; KAKINUMA, A.; TAMURA, G. Surfactin, a crystalline peptidelipid surfactant produced by *B. subtilis*: isolation, characterization and its inhibition of fibrin clot formation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 31, p. 488–494, 1968.

ATLAS, R. M. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. **Microbiology Reviews***,* v.45, p. 180-209, 1981.

ATLAS, R. M.; BARTHA, R. Hydrocarbon biodegradation and oil-spill bioremediation. **Advances in Microbial Ecology**, v.12, p. 287-338, 1992.

ATLAS, R. M.; CERNIGLIA, C. E. Bioremediation of petroleum pollutants: diversity and environmental aspects of hydrocarbon biodegradation. **Bioscience**, v. 45, p. 332–338, 1995.

ATTIOGBE, F. K.; GLOVER-AMENGOR, M.; NYADZIEHE, K. T. Correlating biochemical and chemical oxygen demand of effluents—a case study of selected industries in Kumasi, Ghana. **West Africa Journal of Applied Ecology**, v. 11, p. 110–118, 2007.

AUSTIN, B.; CALOMIRIS, J. J.; WALKER, J. D.; COLWELL, R. R. Numerical taxonomy and ecology of petroleum-degrading bacteria. **Applied Environmental Microbiology**, v. 34, p. 60–68, 1977.

AYERS, R. S.; WESTCOT, D. W. **A qualidade da água na agricultura**. UFPB, Campina Grande, 1999.

BAKER, K. H.; HERSON, D. S. **Bioremediation**. McGraw-Hill, New York, 1994.

BALBA, M. T.; AL. AWADHI, N.; AL. DAHER, R. Biorremediation of Oil – Contaminated Soil: Microbiologics Methods for Feasibillite, Assessement and Field, Evaluation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 3, p. 155-164, 1998.

BANAT I. M. Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. **Bioresource Technology**, v. 51, p.1-12, 1994.

BANAT, I. M., MAKKAR, R. S., CAMEOTRA, S. S. Potential applications of microbial surfactants. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 53, p. 495–508, 2000.

BANKS, M. K.; SCHULTZ, K. E. Comparison of plants for germination toxicity tests in petroleum-contaminated soils. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 167, p. 211–219, 2005.

BANSAL, R. P.; BHATI, P. R.; SEND, D. N. Differential specificity in water imbibition of Indian arid zone. **Biologia Plantarum**, v.22, p.327-331, 1980.

BARATHI, S.; VASUDEVAN, N. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas fluorescens* isolated from a petroleum-contaminated soil. **Environment International**, v. 26, p. 413-416, 2001.

BARROS F. F. C.; QUADROS C. P.; JÚNIOR M. R. M.; PASTORE G. M. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. **Química Nova**, v. 30, p. 409-414, 2007.

BARTHA, R.; BOSSERT, I. The treatment and disposal of petroleum wastes. In: **Petroleum Microbiology**, Macmillion Pub Co., New York, 1984.

BARTHA, R.; PRAMER, D. Features of flask and method for measurement of the persistence and biological effects of pesticides in soil. **Soil Science**, v. 68-70, p. 100, 1965.

BARTZ, W. J. Lubricants and the environmental. **Tribology International,** v. 31, p. 35-47, 1998.

BASU, B.; SINGH, M. P.; KAPUR, G. S.; NAZAKATI, A.; SASTRY, M. I. S.; JAIN, S. K.; SRIVASTAVA, S. P.; BHATNAGAR, A. K. Prediction of biodegradability of mineral based oils from chemical composition using artificial neural networks. **Tribology International**, v. 31, p. 159-168, 1998.

BATELLE. **Sediment Toxicity of Petroleum Hydrocarbon Fractions. Massachusetts Department of Environmental Protection Office of Research and Standards**. EPA, Boston, 2007. Disponível em <http://www.mass.gov/dep/cleanup/laws/tphbat.pdf>.

BBC – British Broadcasting. **Gulf of Mexico oil leak 'worst US environment disaster**, 2010. Disponível em < http://www.bbc.co.uk/news/10194335>.

BELPOGGI, F.; SOFFRITTI, M.; MALTONI, C.. Methyl-tertiary-butyl ether (Mtbe)—a gasoline additive—causes testicular and lymphohaematopoietic cancers in rats. **Toxicology and Ind. Health**, v. 11, p. 119–149, 1995

BENEDIK, M. J.; GIBBS, P. R.; RIDDLE, R. R.; WILSON, R. C. Microbial denitrogenation of fossil fuels. **Trends in Biotechnology**, v. 16, p. 390–395, 1998.

BENTO, F. M.; CARMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER, W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 1049-1055, 2005.

BERTRAND, J.C.; BONIN, P.; GOUTX, M.; GAUTHIER, M.; MILLE, G.The potential application of biosurfactants in combating hydrocarbon pollution in marine environment. **Research in Microbiology**, v. 145, p. 53–56, 1994.

BODOUR, A.; MILLER-MAIE, R. M. **Encyclopedia of environmental microbiology**. Wiley, p. 750–770, 2002.

BRAGG, J. R.; PRINCE, R. C.; HARNER, E. J.; ATLAS, R. M. Effectiveness of bioremediation for the Exxon Valdez oil spill. **Nature***,* v.368, p. 413-418, 1994.

BROCK, T. D.; MADINGAN, M. T. **Biology of Microrganisms**, 6ª edição, Prentice-Hall, 1991.

CALVO, C.; MANZANERA, M.; SILVA-CASTRO, G. A.; UAD, I.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. Application of bioemulsifiers in soil oil bioremediation processes. Future prospects. **Science of The Total Environment**, v. 407, p. 3634 – 3640, 2008.

CAMPO, P.; ZHAO, Y.; SUIDAN, M. T.; VENOSA, A. D.; SORIAL, G. A. Biodegradation kinetics and toxicity of vegetable oil triacylglycerols under aerobic conditions. **Chemosphere**, v. 68, p. 2054–2062, 2007.

CARVALHO, N. M.; NAKAGAWA, J. **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. Fundação Cargill, Campinas, 1988.

CERNIGLIA, C. E.; GIBSON, D. T.; BALAN, C. V. Oxidation of naphthalene by cynobacteria and microalgae. **Journal of General Microbiology**, v. 116, p. 495-500, 1980.

CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Solos – Determinação da Biodegradação de Resíduos – Método Respirométrico de Bartha**. Norma técnica L6.350, 1990.

CETESB - Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental. **Vazamentos de óleo**, 2001. Disponível em < http://www.cetesb.sp.gov.br/emergencia /acidentes/vazamento/vazamento.asp>.

CHAILLAN, F.; FLECHA, A. L.; BURY, E.; PHANTAVONG, E. B.; GRIMONT, P.; SALIOT, A.; OUDOT, J. Identification and biodegradation potential of tropical aerobic hydrocarbon degrading microorganisms. **Research in Microbiology**, v. 55, p. 587-595, 2004.

CHAÎNEAU, C. H.; ROUGEUX, G.; YÉPRÉMIAN, C.; OUDOT, J. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. **Soil Biology & Biochemistry**, v. 37, p. 1490–1497, 2005.

CHAMPION, J. T.; GILKEY, J. C.; LAMPARSKI, H.; RETTERER, J.; MILLER, R. M. Electron microscopy of rhamnolipid (biosurfactant) morphology: effects of pH, cadmium and octadecane. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 170, p. 569-574, 1995.

CHEN H., JUANG R. Recovery and separation of surfactin from pretreated fermentation broths by physical and chemical extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v.28, p.39-46, 2008.

CHHATRE, S.; PUROHIT, H.; SHANKER, R.; KHANNA, P. Bacterial consortia for crude oil spill remediation. **Water Science Technology**, v. 34, p. 187–94, 1996.

CHRISTOFI, N.; IVSHINA, I. B. Microbial surfactants and their use in field studies of soil remediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 915–936, 2002.

COATES, J. D.; ANDERSON, R. T.; LOVELY, D. R. Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons under sulfate-reducing conditions. **Applied Environmental Microbiology**, v. 62, p.1099–1101, 1997.

COMNINELLIS, C.; PULGARIN, C. Electrochemical oxidation of phenol for wastewater treatment using SnO_2 anodes. **Journal of Applied Electrochemistry**, v.23, p.108-112, 1993.

COONEY, J. J. The fate of petroleum pollutants in fresh water ecosystems. In : **Petroleum Microbiology**, Macmillian Pub Co, New York, 1984.

COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface-active agents from two *Bacillus* species. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, p. 224–229, 1987.

COOPER, D. G.; MACDONALD, C. R.; DUFF, S. J. B, KOSARIC, N. Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 42, p.408-412, 1981.

COSTA, G. A. N.; Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2005.

CPDP - Comité Professionnel Du Pétrole. **Bulletin mensuel de monde**, 2010. Disponível em <www.cpdp.org>.

CUBITTO, M. A.; MORÁN, A. C.; COMMENDATORE, M.; SCHIARELLO, M. N.; BALDINI, M. D.;SIÑERIZ, F. Effects of *Bacillus subtilis* O9 biosurfactant on the bioremediation of crude oil-polluted soils. **Biodegradation**, v. 15, p. 281-287, 2004.

CUCCI, G.; DE CARO, A.; CICIRETTI, L.; LEONI, B. Salinity and seed germination of some vegetable crops. **Acta Horticulturae**, v. 362, p. 305-310, 1994.

CUNHA, C. D. **Avaliação da Biodegradação de Gasolina em Solo**. Dissertação de Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1996.

DAS, K.; MUKHERJEE, A. K. Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1339–1345, 2007.

DAS, P.; MUKHERJEE, A K.; SEN, R. Improved bioavailability and biodegradation of a model polyaromatic hydrocarbon by a biosurfactant producing bacterium of marine origin. **Chemosphere**, v. 72, p. 1229-1234, 2008.

DAUGULIS, A. J.; McCRACKEN, R. M. Microbial degradation of high and low molecular weight polyaromatic hydrocarbons in a two phase partitioning bioreactors by two strains of *Sphingomonas* sp. **Biotechnology Letters**, v. 25, p. 1441-1444, 2003.

DAVIS, D. A.; LYNCH, H. C.; VARLEY, J. The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 25, p. 322-329, 1999.

DEHGHAN-NOUDEH, G.; HOUSAINDOKHT, M.; BAZZAZ, B. S. F. Isolation, characterization, and investigation of surface and hemolytic activities of a lipopeptide biosurfactant produced by *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **The Journal of Microbiology**, v. 43, p. 272-276, 2005

DEMNEROVA, K.; MACKOVA, M.; SPEVAKOVA, V.; BERANOVA, K.; KOCHANKOVA, L.; LOVECKA, P.; RYSLAVA, E.; MACEK, T. Two approaches to biological decontamination of groundwater and soil polluted by aromatics characterization of microbial populations. **International Microbiology**, v.8, n. 3, p.205–211, 2005.

DEPPE, U.; RICHNOW, H. H.; MICHAELIS, W.; ANTRANIKIAN, G. Degradation of crude oil by an arctic microbial consortium. **Extremophiles**, v. 9, p. 461–470, 2005.

DESAI, J. D.; BANAT, I. M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, p. 47–64, 1997.

DIAZ, E. **Microbial Biodegradation: Genomics and Molecular Biology**, 1ª edição, Caister Academic Press, New York, 2008.

DIFCO. **Difco Manual**. Difco Laboratories, Detroit, 1984.

DUTKA, B. **Short-term root elongation toxicity bioassay - Methods for toxicological alalysis of waters, wastewaters and sediments**. National Water Research Institute (NWRI), Canada, 1989.

EDWARDS, E. A.; WILLS, L. E.; REINHARD, M.; GRBIC-GALIC, D. Anaerobic degradation of toluene and xylene by aquifer microorganisms under sulfate-reducing conditions. **Applied Environmental Microbiology**. v. 58, p. 794–800, 1992.

EHRHARDT, M.; WEBER, R.R. Formation of low molecular weight carbonyl compounds by sensitized photochemical decomposition of aliphatic hydrocarbons in seawater. **Fresenjus Journal of Analytical Chemistry**, v. 339, p. 772-776, 1991.

EHRLICH, H. L. **Geomicrobiology**. Marcel Dekker Inc, New York, 1995.

EIA - Energy Information Administration. **Annual Energy Review 2000**. DOE/EIA-0384(00), Washington, 2001. Disponível em <www.eia.doe.gov>.

EISENTRAEGER, A.; SCHMIDT, M.; MURRENHOFF, H.; DOTT, W.; HAHN, S. Biodegradability testing of synthetic ester lubricants – effects of additives and usage. **Chemosphere**, v. 48, p. 89–96, 2002.

ENGLERT, C. J.; KENZIE, E. J.; DRAGUN, J. **Bioremediation of petroleum products in soil - Principles and Practices for Petroleum Contaminated Soils**. Lewis Publishers, Boca Raton, 1993.

ENSIGN, S. A. Microbial metabolism of aliphatic alkenes. **Biochemistry**, v. 40, p. 5845–5853, 2001.

EPA - Environmental Protection Agency. **Aerobic biodegradation of oily wastes - A field guidance book for federal on-scene coordinators**. EPA, Estados Unidos, 2003. Disponivel em: < www.epa.gov/oem/docs/oil/edu /Landfarming.pdf>

FEITKENHAUER, H.; MULLER, R.; MARKL, H. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and long chain alkanes at 6070°C by *Thermus* and *Bacillus* spp. **Biodegradation**, v. 14,p. 367–372, 2003.

FENNEMA, O. R. **Food Chemistry**. 2ª edição, Marcel Dekker Inc., New York, 1985.

FERREIRA, A. G. Germinação de sementes deMimosa bimucronata (DC) OK. maricá 1- Efeito da escarificação e do pH. **Ciência & Cultura**, v. 28, p. 1200-1204, 1976.

FETTER, C. W. **Contaminant Hydrology**. Macmillan, New York, 1993.

FIÚZA, A. M. A.; VILA, M. C. C. An insight into soil bioremediation through respirometry. **Environment International**, v. 31, p. 179-183, 2004.
FLOODGATE, G. The fate of petroleum in marine ecosystems, In: **Petroleum Microbiology**, Mac million Pub Co, New York, 1984.

FORSTNER, U. **Umweltschutzstechnik**. Springer Verlag, Berlin, 1990.

FRAZER, A. C.; COSCHIGANO, P. W.; YOUNG, L. Y. Toluene metabolism under anaerobic conditions: a review. **Anaerobe**, v.1, p. 293–303, 1995.

FREUDENRICH, C. C. **How Oil Refining Works**. HowStuffWorks Inc, Atlanta, 2001. Disponível em <http://www.howstuffworks.com/environmental/energy/oil-refining.htm>

FRONTERA-SUAU, R.; BOST, F. D.; McDONALD, T.; MORRIS, P. J. Aerobic biodegradation of hopanes and other biomarkers by crude oil-degrading enrichment cultures. **Environmental Science and Technology**, v. 36, p. 4585-4592, 2002.

FROOMKIN, D. **Scientists Find Evidence That Oil And Dispersant Mix Is Making Its Way Into The Foodchain**. Huffington Post Inc., Estados Unidos, 2010. DIsponível em < http://www.huffingtonpost.com/2010/07/29/scientists-find-evidence_n_664298.html>.

FROST, T. K.; JOHENSEN, S.; UTVIK, T. R. **Produced water discharges to the North Sea: Fate and effects in the water column**. The Norwegian Oil Industry Association, Noruega, 1998.

FWS – Fish and Wildlife Service. **Collection Report**. Estados Unidos, 2010. Disponível em <http://www.fws.gov/home/dhoilspill/pdfs/collection _11022010.pdf>.

GABARDO, I. T. **Caracterização química e toxicológica da água produzida descartada em plataformas de óleo e gás na costa brasileira e seu comportamento dispersivo no mar**. Tese de Doutorado, UFRN, Natal, 2007.

GALLEGO, J. L.; LOREDO, J.; LLAMAS, J. F.; VAZQUEZ, F., SANCHEZ, J. Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. **Biodegradation**, v. 12, p. 325–335, 2001.

GALLEGO, J. R.; GONZÁLEZ-ROJAS, E.; PELÁEZ, A. I.; SÁNCHEZ, J.; GARCÍA-MARTÍNEZ, M. J.; ORTIZ, J. E. Natural attenuation and bioremediation of Prestige fuel oil along the Atlantic coast of Galicia (Spain). **Organic Chemistry**, v. 37, p. 1869–1884, 2006.

GAMO, M.; OKA, T.; NAKANISHI, J. Ranking the risk of 12 major environmental pollutants that occur in Japan, **Chemosphere**, v. 53, p. 277-284, 2003.

GARRETT, R. M.; ROTHENBURGER, S. J.; PRINCE, R. C. Biodegradation of fuel oil under laboratory and arctic marine conditions. **Spill Science & Technology B**, v. 8, p. 297–302, 2003.

GAUTHIER, M. J.; LAFAY, B.; CHRISTEN, R.; FERNANDEZ, L.; ACQUAVIVA, M.; BONIN, P.; BERTRAND, J. C. Marinobacter hydrocarbonoclasticus gen. nov., sp. nov., a new, extremely halotolerant, hydrocarbondegrading marine bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 42, p. 568–579, 1992.

GEERDINK, M. J.; LOOSDRECHT, M. C. M.; LUYBEN, K. C. A. M. Biodegradability of diesel oil. **Biodegradation**, v. 7, p. 73–81, 1996.

GEORGIOU, G.; LIN, S.; SHARMA, M. M. Surface active compounds from microorganisms. **Biotechnology***,* v.10, p. 60-65, 1992.

GONG, G.; ZHENG, Z.; CHEN, H.; YUAN, C.; WANG, P.; YAO, L.; YU, Z. Enhanced production of surfactin by *Bacillus subtilis* e8 mutant obtained by ion beam implantation. **Food Technology and Biotechnology**, p. 47, v. 23-31, 2009.

GONG, P.; WILKE, B. M.; STROZZI, E.; FLEISCHMANN, S. Evaluation and refinement of a continuous seed germination and early seedling growth test for the use in the ecotoxicological assessment of soils. **Chemosphere**, v. 44, p. 491-500, 2001.

GONZÁLEZ G.; HERRERA, G.; GARCIA, M. T.; PEÑA, M. Biodegration of phenolic industrial wastewater in a fluidized bed bioreactor with immobilized cells of *Pseudomonas putida*. **Bioresource Technology**, v. 80, p. 137-142, 2001.

GOYAN, R. L.; MELLEY, R. E.; WISSNER, P. A.; ONG, W. C. Biodegradable Lubricants. **Lubrication Engineering**, v. 54, p. 10-17, 1998.

GRAVES A.; LANG C.; LEAVITT M. Respirometric analysis of the biodegradation of organic contaminants in soil and water. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 28-29, p. 813–26, 1991.

HAACK, S. K.; BEKINS, B. A. Microbial populations in contaminant plumes. **Hydrogeology Journal**, v. 8, p. 63–76, 2000.

HAFERBURG, D.; HOMMEL, R.; CLAUS, R.; KLEBER, H. Extracellular microbial lipids as biosurfactants. **Advances in Biochemistry and Engineering/Biotechnology***,* v.33, p. 53-93, 1986.

HAIGH, D. S. Fate and effects of synthetic lubricants in soil: biodegradation and effect on crops in field studies. **The Science of the Total Environment**, v. 168, p. 71-83, 1995.

HAMDI, H.; BENZARTI, S.; MANUSADZIANAS, L.; AOYAMA, I.; JEDIDI, N. Solid-phase bioassays and soil microbial activities to evaluate PAH-spiked soil ecotoxicity after a long-term bioremediation process simulating landfarming. **Chemosphere**, v. 70, p. 135-143, 2007.

HANDRECK, K.; BLACK, N. **Growing media for ornamental plants and turf**. University of New South Wales, Sydney, 1999.

HANSON, K. G.; DESAI, J. D.; DESAI, A. J. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. **Biotechnology Techniques**, v. 7, p. 745-748, 1993.

HAO, R.; LU, A.; WANG, G. Crude-oil-degrading thermophilic bacterium isolated from an oil field. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 50, p. 175–182, 2004.

HARAYAMA, S.; KISHIRA, H.; KASAI, Y.; SHUTSUBO, K. Petroleum biodegradation in marine environments. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v.1, p. 63-70, 1999.

HARVEY, S.; ELASHVILI, I.; VALDES, J. J.; KAMELY, D.; CHAKRABARTY, A. M. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. **Biotechnology***,* v.8, p. 228-230, 1990.

HAWLE-AMBROSCH, E.; RIEPE, W.; DORNMAYR-PFAFFENHUEMER, M.; RADAX, C.; HOLZINGER, A.; STAN-LOTTER, H. Biodegradation of fuel oil hydrocarbons by a mixed bacterial consortium in sandy and loamy soils. **Biotechnology Journal**, v. 2, p. 1564–1568, 2007.

HEIDER, J.; SPORMANN, A. M.; BELLER, H. R.; WIDDEL, F. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, p. 459-473, 1998.

HILLS, R. G.; TRUCANO, T. G. Statistical Validation of Engineering and Scientific Models: Background. Sandia National Laboratories, Califórnia, 1999.

HOLDEN, P. A.; HERSMAN, L.E.; FIRESTONE, M. K. Water content mediated microaerophilic toluene biodegradation in arid vadose zone materials. **Microbial Ecology**, v. 42, p. 256–266, 2001.

HOLLAWAY, S. L.; FAW, G. M., SIZEMORE, R. K. The bacterial community composition of an active oil field in the North Western Gulf of Mexico. **Marine Pollution Bulletin**, v. 11, p. 153-156, 1980.

HOLMBERG, K. Natural surfactants. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 6, p. 148-159, 2001.

HOLST, M. T.; WENTZEL, A; ELLINGSEN, T. E.; KOTLAS, H. K.; ZOTCHEU, S. B. Identification of novel genes involved in long chain n-alkane degradation by *Acinetobacter* Sp. Strain DSM 17874. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, p. 3327-3332, 2007.

HOUK, V. S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents: A review. **Mutation Research**, v.227, p.91-138, 1992.

HUANG, H.; LARTER, S. R.; BOWLER, B. F. J; OLDENBURG, T. B. P. A. dynamic biodegradation model suggested by petroleum compositional gradients within reservoir columns from the Liaohe basin, NE China. **Organic Geochemistry,** v. 35, p. 299–316, 2004.

HUBBERT, M. K. **Nuclear energy and the fossil fuels - Drilling and Production Practice**. American Petroleum Institute, Washington, 1956. Disponivel em < www.hubbertpeak.com/hubbert/1956/1956.pdf>.

HUESEMANN, M. H. Predictive model for estimating the extent of petroleum hydrocarbon biodegradation in contaminated soils. **Environmental Science Technology**, v. 29, p. 7–18, 1995.

HUNT, J. M. **Petroleum Geochemistry and Geology**. W.H. Freeman, New York, 1996.

IANETTA, M.; COLONNA N. Landcare in Deserfication Affected Areas – Salinização. Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2008. Disponível em <http://geografia.fcsh.unl.pt/lucinda/Leaflets/B3_Leaflet_PT.pdf>.

IEA - International Energy Agency. **Oil Market Report,** 2009. Disponível em <www.iea.org/stats/index.asp>

ILORI, M. O.; AMOBI, C. J.; ODOCHA, A. C. Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* sp., isolated from a tropical environment. **Chemosphere**, v. 61, p. 985–992, 2005.

JACQUES, R. J. S.; OKEKE, B. C.; BENTO, F. M.; TEIXEIRA, A. S.; PERALBA, M. C. R; CAMARGO, F. A. O. Microbial consortium bioaugmentation of a polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soil. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 2637-2643, 2008.

JANSEN, L. L.; CRONIN, E. H. Halogeton on trial. **Farm & Home Science**, v. 14, p. 38-39, 1953.

JAVAHERI, M.; JENNEMAN, G. E.; MCINERNEY, M. J.; KNAPP, R. M. Anaerobic production of a biosurfactant by *Bacillus licheniformis* JF-2. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, p. 698-700, 1985.

JIANG, Z.; HUANG, Y.; XU, X.; LIAO, Y.; SHOU, L.; LIU, J.; CHEN, Q.; ZENG, J. Advance in the toxic effects of petroleum water accommodated fraction on marine plankton. **Acta Ecologica Sinica**, v. 30, p. 8-15, 2010.

JOHNSEN, A. R.; WICK, L. Y.; HARMS, L. Principles of microbial PAH-degradation in soil. **Environmental Pollution**, v. 133, p. 71–84, 2005.

JONES, J.; KNIGHT, M.; BYRON, J. A. Effect of gross population by kerosene hydrocarbons on the micro flora of a moorland soil. **Nature**, v. 227, p. 1166, 1970.

JOVANČIĆEVIĆ, B.; ANTIĆ, M.; PAVLOVIĆ, I.; VRVIĆ, M.; BEŠKOSKI, V.; KRONIMUS, A.; SCHWARZBAUER, J. Transformation of petroleum saturated hydrocarbons during soil bioremediation experiments. **Water Air and Soil Pollution**, v. 190, p. 299–307, 2008.

JUHASZ, A. L.; NAIDU, R. Bioremediation of high-molecularweight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[*a*]pyrene. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 45, p. 57–88, 2000.

KARHU, M.; KAAKINEN, J.; KUOKKANEN T.; RÄMÖ J. Biodegradation of light fuel oils in water and soil as determined by the manometric respirometric method. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 197, p. 3-14, 2009.

KARLSEN, D. A.; LARTER, S. R. Analysis of petroleum fractions by TLC-FID: applications to petroleum reservoir description. **Organic Geochemistry**, v. 17, p. 603-617, 1991.

KATAOKA, A. P. A. G., **Biodegradação de resíduo oleoso de refinaria de petróleo por microorganismos isolados de "landfarming"**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, 2003.

KAVITHA, V.; PALANIVELU, K. The role of ferrous ion in Fenton and photo-Fenton processes for the degradation of phenol. **Chemosphere**, v. 55,p. 1235–1243, 2004.

KELL, H.; HOLZWARTH, J. F.; BOETTCHER, C.; HEENAN, R. K.; VATER, J. Physicochemical studies of the interaction of the lipoheptapeptide surfactin with lipid bilayers of l-α-dimyristoyl phosphatidylcholine. **Biophysical Chemistry**, v. 128, p. 114,124, 2007.

KELLER, K.; FRIEDMANN, T.; BOXMAN, X. The bioseparations need for tomorrow. **Trends in Biotechnology**, v. 19, p. 438–441, 2001.

KERNANSHANI, A.; KARARNANEV, D.; MARGARITIS, A. Kinetic modeling of the biodegradation of the aqueous p-xylene in the immobilized soil bioreactor. **Engineering Journal**, v. 27, p. 204–211, 2006.

KHAN, R. A.; RYAN, P. Long Term Effects of Crude Oil on Common Murres (*Uria aalge*) Following Rehabilitation. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 46, p. 216-222, 1991.

KILLOPS, S. D.; AL-JUBOORI, M. A. H. A. Characterisation of the unresolved complex mixture (UCM) in the gas chromatograms of biodegraded petroleums. **Organic Geochemistry**, v. 15, p. 147-160, 1990.

KIM, S. H.; LIM, E. J.; LEE, S.; O.; LEE, J. D.; LEE, T. H. Purification and characterization of biosurfactants from *Nocardia* sp. L-417. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 31, p. 249-253, 2000.

KITAMOTO, D.; YANAGLSHITA, H.; SHINBO, T.; NAKANE, T.; KAMISAVA, C.; NAKAHARA, T. Surface-active properties and antimicrobial activities of mannosylerythritol lipids as biosurfactants produced by Candida antarctica. **Journal of Biotechnology**, v. 29, 91-96, 1993.

KOJIMA, T.; NISHIJIMA, K.; MATSUKATA, M. Removal and recovery of phenol from FCC effluent. **Journal of Membrane Science**, v.102, p.43-47, 1995.

KOMA, D.; HASUMI, F.; YAMAMOTO, S.; OHTA, T.; CHUNG, S. Y.; KUBO, M. Biodegradation of long-chain n-paraffins from waste oil of car engine by *Acinetobacter* sp. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, p. 94-96, 2001.

KORNMÜLLER, A.; WIESMANN, U. Continuous ozonation ofpolycyclic aromatic hydrocarbons in oil/water-emulsions and biodegradation of oxidation products. **Water Science Technology**, v. 40, p. 107–114, 1999.

KORTE, F.; BOEDEFELD, E. Ecotoxicological review of global impact of petroleum industry and its products. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 2, p. 55-103, 1978.

KOSARIC, N. Biosurfactants and their application for soil bioremediation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 39, p. 295–304, 2001.

KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L. **Biosurfactants and biotechnology**. Marcel Dekker, New York: 1987.

KOWALL, M.; VATER, J.; KLUGE, B.; STEIN, T. FRANKE, P.; ZIESSOW, D. Separation and characterization of surfactin isoforms produced by *Bacillus subtilis* OKB 105. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 204, p. 1-8, 1998.

KUYUKINA, M. S.; IVSHINA, I. B.; PHILP, J. C.; CHRISTOFI, N.; DUNBAR, S. A.; RITCHKOVA, M. I. Recovery of Rhodococcus biosurfactants using methyl tertiarybutyl ether extraction, **Journal of Microbiology Methods**, v. 46, p. 149–156, 2001.

KVENVOLDEN, K. A.; COOPER, C. K. Natural seepage of crude oil into the marineenvironment. **Earth and Environ Sciences**, v. 23, p. 140-146, 2003.

LABOURIAU, L. G. **A germinação das sementes**. OEA, Washington, 1983.

LABOURIAU, L. G.; AGUDO, M. On the physiology of seed germination in *Salvia hispanica* L. I. Temperature effects. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 59, p. 37-56, 1987.

LABRENZ, M.; DRUSCHEL, G. K.; THOMSEN-EBERT, T.; GILBERT, B.; WELCH, S. A.; KEMNER, K. M.; LOGAN, G. A.; SUMMONS, R. E.; STASIO, G.; DE BOND, P. L.; LAI, B.; KELLY, S. D.; BANFIELD, J. F. Formation of sphalerite (ZnS) deposits in natural biofilms of sulfate-reducing bacteria. **Science**, v. 290, p. 1744–1747, 2000.

LAMBERTS, R. F.; JOHNSEN, A. R.; ANDERSEN, O.; CHRISTENSEN J. H. Univariate and multivariate characterization of heavy fuel oil weathering and biodegradation in soil. **Environment & Pollution**, v. 156, p. 297-305, 2008.

LANDIS, W. G.; YU, M. **Introduction to environmental toxicology: Impacts of chemicals upon ecological systems**. CRC Press, Boca Raton, 1995.

LANG, S. Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). Current Opinion in Colloid Interface Science, v. 7, p. 12–20, 2002.

LAPINSKIENE, A.; MARTINKUS, P.; REBZDAITE, V. Eco-toxicological studies of diesel and biodiesel fuels in aerated soil. **Environmental Pollution**, v. 142, p. 432-437, 2006.

LARCHER, W. **Physiological plant ecology**. 3ª edição, Springer – Verlag, Berlin, 1995.

LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiology Reviews**, v. 54, p. 305-315, 1990.

LEE, R. F. Agents which promote and stabilize water-in-oil emulsions. **Spill Science and Technology Bulletin**, v.5, p. 117–26, 1999.

LI, X.; LI, P.; LIN, X.; ZHANG, C.; LI, Q.; GONG, Z. Biodegradation of aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by microbial consortia in soil and slurry phases. **Journal of Hazardous Materials**, v. 150, p. 21-26, 2008.

LIN, S. Biosurfactants: recent advances. **Journal of Chemistry Technology and Biotechnology**, v. 66, p. 109-120, 1996.

LISTE, H.; FELGENTREU, D. Crop growth, culturable bacteria, and degradation of petrol hydrocarbons (PHCs) in a long-term contaminated field soil. **Applied Soil Ecology**, v. 31, p. 43–52, 2006.

LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Evaluation of the Biodegradation of Different Types of Lubricant Oil in Liquid Medium. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 1285-1290, 2009.

MACKAY, D. M.; ROBERTS, P. V.; CHERRY, J. A. Transport of organic contaminants in groundwater. **Environmental Science and Technology**, v. 19 p. 384–392, 1985.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARK, D.P. **Brock Biology of Microorganisms**. Prentice Hall, New Jersey, 2008.

MAGDOFF, F. R.; BARRET, R. J.; ROSS, D. S. Acidification and pH buffering of forest soil. **Soil Science Society of America Journal**, v. 51, p. 1384-1385, 1987.

MAIER, R. M. Biosurfactants: evolution and diversity. **Advances in Applied Microbiology**, v. 52, p. 101-121, 2003.

MAILA, M. P.; CLOETE, T. E. The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants-perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 55, p.1–15, 2005.

MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S. Utilization of Molasses for Biosurfactant Production by Two *Bacillus* Strains at Thermophilic Conditions. **JAOCS**, v. 74, p. 886-889, 1997.

MALHOTRA, R. C. A new method of germination and the influence of hydrogen-ion concentration on the germination and growth of Helianthus annuus and *Lycopersicum* (sic) *esculentum*. **Journal Indian Botanical Society**, v. 9, p. 218-239, 1930.

MANDRI, T.; LIN, J. Isolation and characterization of engine oil degrading indigenous microorganisms in Kwazulu-Natal, South Africa. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p.23–26, 2007.

MANNING, F. C.; THOMPSON, R. E. **Oilfield processing - Crude oil**. PennWell, Oklahoma, 1995.

MARGESIN, R.; SCHINNER, F. Bioremediation of diesel oil contaminated alpine soils at low temperatures. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 47, p. 462-468, 1997.

MARIN, J. A.; HERNANDEZ, T.; GARCIA, C. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: influence on soil microbial activity. **Environmental Research**, v. 98, p. 185–195, 2005.

MARTIENSSEN, M.; FABRITIUS, H.; KUKLA, S.; BALCKE, G. U.; HASSELWANDER, E.; SCHIRMER, M. Determination of naturally occurring MTBE biodegradation by analysing metabolites and biodegradation by-products. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 87, p. 37–53, 2006.

MARWOOD, T. M.; KNOKE, K.; YAU, K.; LEE, H.; TREVORS, J. T.; SUCHORSKI-TREMBLAY, A.; FLEMMING, C. A.; HODGE, V.; LIU, D L.; SEECH, A. G. Comparison of Toxicity Detected by Five Bioassays During Bioremediation of Diesel Fuel-Spiked Soils. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 13, p.117-126, 1998.

MASON, R. **Oil reserves 'exaggerated by one third'**. Telegraph Media Group, Reino Unido, 2010. Disponível em <http://www.telegraph.co.uk/finance/newsbysector/energy/oilandgas/7500669/Oil-reserves-exaggerated-by-one-third.html>

MATAR, S.; HATCH, L. F. **Chemistry of Petrochemical Processes**. Gulf Publishing Co., Texas, 1994.

MATATOV-MEYTAL, Y. I.; SEINTUCH, M. Abatement of pollutants by adsorption and oxidative catalytic regeneration. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v.36, p.4374–4380, 1997.

MATTSON, R.V.; ARTHUR, J.W.; WALBRIDGE, C.T. **Acute Toxicity of Selected Organic Compounds to Fathead Minnows**. US Environmental Protection Agency (EPA), Minnesota, 1976.

McCLAY, K.; FOX, B. G.; STEFFAN, R. J. Toluene monooxygenase catalyze depoxidation of alkenes. **Applied Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1877–1882, 2000.

McMILLEN, S.; O'REILLY, K.; BERNIER, R.; HOFFMAN, R.; SMART, R. **Bioremediation as Practiced by ChevronTexaco**. DOE/PERF Bioremediation Workshop, Estados Unidos, 2002.

MEMBRÉ, J. M.; THURETTE J.; CATTEAU, M. Modeling the growth, survival and death of Listeria monocytogenes. **Journal of Applied Microbiology**, v.82, p.345-350, 1996.

MERCADE, M. E.; MANRESA, M. A. The use of agroindustrial by-products for biosurfactant production. **JAOCS**, v. 71, p. 61-64, 1994.

MERCER, J. W.; COHEN, R.M. A review of immiscible fluids in the subsurface: properties, models, characterization and remediation. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 6, p. 107–163, 1990.

MERCK. **The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals and Drugs**. 9ª edição, Merck & Co. Inc, New Jersey, 1976.

MILLIOLI, V. S.; SOBRAL, E. F. **Biorremediação de solo contaminado com óleo cru: avaliação da adição de ramnolipídio quanto à toxicidade e a eficiência de biodegradação**. 4° PDPETRO, Campinas, 2007.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. **Gestão de óleo lubrificante automotivo usado em oficinas automotivas**. Brasil, 2006.

MME - Ministerio de Minas e Energia. **Balanço Energético Nacional**. 2009. Disponível em <http://www.mme.gov.br/>.

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Applied models to biodegradation kinetics of lubricant and vegetable oils in wastewater. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 63, p. 297-305, 2009.

MOORE S. F.; DWYER, R. F. Effects of oil on marine organisms a critical assessment of published data. **Water Research**, v. 8, p. 819-827, 1974.

MORALES, C. G. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Agua: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. IMTA, México, 2004.

MORELLI, I. S.; DEL PANNO, M. T.; DE ANTONI, G. L.; PAINCEIRA, M. T. Laboratory study on the bioremediation of petrochemical sludge contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.55, p.271–278, 2005.

MORIKAWA, M.; DAIDO, H.; TAKAO, T.; MURATA, S.; SHIMONISHI, T.; IMANAKA, T. A new lipopeptide biosurfactant produced by *Arthrobacter* sp. **Journal of Bacteriology**, v. 175, p. 6459-6466, 1993.

MORKES, J. Oil-spills - whose technology will clean up. **R&D Magazine**, v. 35, p. 54-56, 1993.

MOURA, F. E.; PRASAD, S.; LEITE, V. D.; MORAIS, R. S.; BARROS, A. J. M, SOUZA, A. G. Thermogravimetric study of aerobic biodegradation of sanitary sewage sludge and lubricating oil. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 87, p. 679-683, 2007.

MUDGE, S. M. Deleterious effects from accidental spillages of vegetable oils. **Spill Science and Technology B**, v. 2, p. 187–191, 1995.

MULKINS-PHILLIPS, G.J.; STEWART, J. E. Distribution of hydrocarbon utilizing bacteria in North Western Atlantic waters and coastal sediments. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 20, p. 955-962, 1974.

MULLER-HURTIG, R.; WAGNER, F.; BLASZCZYK, R.; KOSARIC, N. **Biosurfactants Production - Properties – Applications**. Kosaric Marcel Dekker, New York, 1993.

MULLIGAN, C. N.; YONG, R. N.; GIBBS, B. F. Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. **Engineering Geology**, v. 60, p. 371–380, 2001.

NADARAJAH, N.; SINGH, A.; WARD, O. P. De-emulsification of petroleum oil emulsion by a mixed bacterial culture. **Process Biochemstry**, n. 37, p. 1135-1141, 2002a.

NANO, G.; BORRONI, A.; ROTA, R. Combined slurry and solid-phase bioremediation of diesel contamined soils. **Journal of Hazardous Materials**, v.100, p.79–94, 2003.

NASCIMENTO, W. M; SILVA, J. B. C.; NUNES, E. X. Produção de mudas de tomate em diferentes tipos de bandejas, substratos e fertilização. **Horticultura Brasileira**, v. 20, p. 388, 2002.

NASSIF, S. M. L.; VIEIRA, I. G.; FERNANDES, G. D. **Informativo Sementes do Instituto de Pesquisas e Estudos Florestais**. Escola Superior de Agricultura Luís de Queiroz (ESALQ), Universidade de São Paulo (USP), Piracicaba, 1998.

NEFF, J. M. **Bioaccumulation in marine organisms. Effect of contaminants from oil well produced water**. 1ª edição, Elsevier, London, 2002.

NICODEM, D. E.; FERNANDES, M. C. Z.; GUEDES, C. L. B.; CORREA, R. J. Photochemical processes and the environmental impact of petroleum spills. **Biogeochemistry**, v. 39, p. 121-138, 1997.

NISSEN, E., J.; VATER, G.; VOLLENBROICH, D. Application of surfactin for mycoplasma inactivation in virus stocks. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal**, v. 33, p. 414-41, 1997.

NITSCHKE, M.; FERRAZ, C.; PASTORE, G. M. Selection of microorganisms for biosurfactant production using agroindustrial wastes. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 81-85, 2004.

NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.

NORMAN, R. S.; FRONTERA-SUAU, R.; MORRIS, P. J. Variability in *Pseudomonas aeruginosa* lipopolysaccharide expression during crude oil degradation. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 5096–103, 2002.

NRC - National Research Council. **Oil in the Sea: Inputs, Fates, and Effects**. National Academy Press, Washingon, 1985.

OBAYORI, O. S.; HORI, M. O.; ADEBUSOYE, S. A.; OYETIBO, G. O.; OMOTAYO, A. E.; AMUND, O. O. Degradation of hydrocarbons and biosurfactant production by *Pseudomonas* sp. strain LP1. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p.1615–1623, 2009.

OKOH, A. I.; TREJO-HERNANDEZ, M. R. Remediation of petroleum hydrocarbon polluted systems: exploiting the bioremediation strategies. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, p.2520–2525, 2006.

OLIVEIRA, F. J. S.; DE FRANÇA, F. P.; The use of biostimulation and intrinsic bioremediation for crude-oil contaminated sandy soil treatment", **Solos e Rochas - Revista Brasileira de Geotecnia**, v. 27, p. 287-292, 2004.

OLIVEIRA, N. L.; COMMENDATORE, M. G.; MORÁN, A. C.; ESTEVES, J. L.. Biosurfactant-enhanced degradation of residual hydrocarbons from ship bilge wastes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 25, p. 70-73, 2000.

OLLIVIER, B.; MAGOT, M. **Petroleum Microbiology**. ASM Press, Washington, 2005.

OLSON, J. J.; MILLS, G.; HERBERT, B. E.; MORRIS, P. J. Biodegradation rates of separated diesel components. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, p. 2448–2453, 1999.

OLUWOLE, O.S.; MAKINDE, S. C. O.; PHILIPS, D. A. **The impact of spent engine oil pollution on the growth of Celosia argentea**. Lagos State University (LASU), Ojo, 2005.

ONYSKO, K. A.; BUDMAN, H. M.; ROBINSON, C. W. Effect of temperature on the inhibition kinetics of phenol biodegradation by *Pseudomonas putida* Q5. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 70, p. 291–299, 2000.

OUDOT, J.; MERLIN, F.X.; PINVIDIC, P. Weathering rates of oil components in a bioremediation experiment in estuarine sediment. **Marine Environmental Research**,v. 45, p. 113–125, 1998.

PALA, D. M.; CARVALHO, D. D.; PINTO, J. C.; SANT'ANNA, G. L. A suitable model to describe bioremediation of a petroleum-contaminated soil. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.58, p.254–260, 2006.

PALEJWALA, S.; DESAI, J. D. Production of an extracellular emulsifier by a Gram negative bacterium. **Biotechnology Letters***,* v*.* 11, p. 115-118, 1989.

PANDAY, S.; FORSYTH, P. A.; FALTA, R. W.; WU, Y. S.; HUYAKORN, P. S. Consideration for robust compositional simulations of subsurface nonaqueous phase liquid contamination and remediation. **Water Resources Research**, v. 31, p. 1273–1289, 1995.

PARDESHI, S. K.; PATIL, A. B. A simple route for photocatalytic degradation of phenol in aqueous zinc oxide suspension using solar energy. **Solar Energy**, v. 82, p. 700–705, 2008.

PARIDA, A. K.; DAS, A. B. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 60, p. 324-349, 2005.

PASSERI, A. Marine biosurfactants: IV. Production, characterization and biosynthesis of an anionic glucose lipid from the marine bacterial strain MM1. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 37, p. 281-286, 1992.

PELTOLA, R.; SALONEN, M. S.; PULKKINEN, J.; KOIVUNEN, M.; TURPEINEN, A. R.; AARNIO, T.; ROMANTSCHUK, M.; Nitrification in polluted soil fertilized with fast- and slow-releasing nitrogen: A case study at a refinery landfarming site. **Environmental Pollution**, v. 143, p. 247-253, 2006.

PENET, S.; MARCHAL, R.; SGHIR, A.; MONOT, F. Biodegradation of hydrocarbon cuts used for diesel oil formulation. **Applied Microbiology Biotechnology**, v.66, p. 40–47, 2004.

PEREIRA, L. T. C.; LEMOS, J. L. S. **Degradação de hidrocarbonetos de petróleo por Aspergillus niger e Penicillium corylophilum**. Anais do XII Jornada de Iniciação Científica - CETEM, 2004. Disponível em: <http://www.cetem.gov.br/>.pdf.

PEREIRA, R. C. C.; PASA, V. M. D. Effect of alcohol and copper content on the stability of automotive gasoline. **Energy Fuel**, v. 19 p. 426–432, 2005.

PETERS, K. E.; WALTERS, C.C.; MOLDOWAN, J. M. **The biomarker guide, biomarkers and isotopes in petroleum exploration and earth history**. Cambridge Univ. Press, New York, 2005.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; LABBE, H.; GRANGEMARD, I.; DAS, B. C.; TAK, M.; WALLACH, J.; MICHEL, G. [Ala 4] surfactin, a novel isoform from *Bacillus subtilis* studied by mass and NMR spectroscopies. **European Journal of Biochemistry**, v. 224, p. 89-96, 1994.

PEYPOUX, F.; BONMATIN, J. M.; WALLACH, J. Recent trends in the biochemistry of surfactin. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 51, p. 553-563, 1999.

PIMENTEL-GOMES, F. **Curso de estatística experimental**. Nobel, São Paulo, 1987.

PINDER, G. F.; ABRIOLA, L. M. On the simulation of non-aqueous phase organic compounds in the subsurface. **Water Resources Research**, v. 22, p. 109–119, 1986.

PINHOLT, Y.; STRUWE, S.; KJOLLER, A. Microbial changes during oil decomposition in soil. **Holarct Ecology**, v. 2, p. 195-200, 1979.

PITTER, P.; CHUDOBA, J. **Biodegradability of Organic Substances in the Aquatic Environment**. CRC Press, Boca Raton, 1990.

PLAZA, G. A.; JANGID, K.; LUKASIK, K.; NALECZ-JAWECKI, G.; BERRY, C. J.; BRIGMON, R. L. Reduction of Petroleum Hydrocarbons and Toxicity in Refinery Wastewater by Bioremediation. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 81, p. 329-333, 2008.

PLAZA, G.; NALEEZ-JAWEEKI, G.; ULFIG, K.; BRIGMON, R. L. The Application of Bioassays as Indicators of Petroleum-contaminated soil remediation. **Chemosphere**, v. 59, p. 289-296, 2005.

POULTON, S. W.; KROM, M. D.; RIJN, J. V.; RAISWELL, R. The use of hydrous iron (III) oxides for the removal of hydrogen sulphide in aqueous systems. **Water Research**, v. 36, p. 825–834, 2002.

PRINCE, R. C. Petroleum spill bioremediation in marine environments. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 19, p. 2514–2522, 1993.

PRINCE, R. C.; CLARK J. R. **Bioremediation of marine oil spills**. In: Petroleum Biotechnology — Studies in Surface Science and Catalysis, Elsevier, 2004.

PRINCE, R. C.; WALTERS, C. C. **Biodegradation of oil hydrocarbons and its implications for source identification**. In: WANG, Z; STOUT, S. Oil Spill Environmental Forensics. Canada: Academic Press, 2007.

PRITCHARD, P. H.; COSTA, C. F. EPAs Alaska oil spill bioremediation project. **Environmental Science and Technology**, v. 25, p. 372–379, 1991.

QUEIROGA, C. L.; NASCIMENTO, L. R.; SERRA, G. E. Evaulation of paraffins biodegradation and biosurfactant production by *Bacillus subtilis* in the presence of crude oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p.321-324, 2003.

RADWAN, S. S.; AL-AWADHI, H.; SORKHOH, N. A.; EL-NEMR, I. M. Rhizospheric hydrocarbon-utilizing microorganisms as potential contributors to phytoremediation for the oily Kuwaiti desert. **Microbiology Research**, v. 153, p. 247–251, 1998.

RAHMAN, K. S. M.; RAHMAN, T.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P.; BANAT, I. M. Occurrence of crude oil degrading bacteria in gasoline and diesel station soils. **Journal of Basic Microbiology**, v. 4, p. 284-291, 2002.

RAJKUMAR, D.; PALANIVELU, K. Electrochemical treatment of industrial wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, v.113, p.123-129, 2004.

RATLEDGE, C. **Biochemistry of microbial degradation**. Kluwer academic Publisher, Netherlands, 1994.

RAYMOND R. L.; HUDSON, J. O.; JAMISON, V. W. Oil degradation in soil. **Applied Environmental Microbiology**, v. 31, p. 522-535, 1976.

RAZAFINDRALAMBO, H.; POPINEAU, Y.; DELEU, M.; HBID, C.; JACQUES, P.; THONART, P.; PAQUOT, M. Foaming properties of lipopeptides produced by *Bacillus subtilis*: effect of lipid and peptide structural attributes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 911-916, 1998.

READMAN, J. W.; BARTOCCI, J.; TOLOSA, I.; FOWLER, S. W.; OREGIONI, B.; ABDULRAHEEM, M. Y. Recovery of the coastal marine environment in the Gulf following the 1991 war-related oil spills. **Marine Pollution Bulletin**, v. 32, p. 493–498, 1996.

READMAN, J. W.; FOWLER, S. W.; VILLENEUVE, J. P.; CATTINI, C.; OREGIONI, B.; MEE, L. D. Oil and combustion-product contamination of the Gulf marine environment following the war. **Nature**, v. 358, p. 662-665, 1992.

REDMANN, R. E.; ABOUGUENDIA, Z. M. Germination and seedling growth on substrates with extreme pH. Laboratory evaluation of buffers. **Journal Applied Ecology**, v. 16, p. 901-907, 1979.

REN, T.; DANIELS, B.; PATEL, M. K.; BLOK, K. Petrochemicals from oil, natural gas, coal and biomass: Production costs in 2030–2050. **Resources, Conservation and Recycling**, v. 53, p. 653-663, 2009.

RIKE, A. G.; HAUGEN, K. B.; BØRRESEN, M.; ENGENE, B.; KOLSTAD, P. In situ biodegradation of petroleum hydrocarbons in frozen arctic soils. **Cold Regions Science and Technology**, v. 37, p. 97–120, 2003.

RISER-ROBERT, E. **Remediation of petroleum contaminated soils: biological, physical, and chemical process**. CRC Press LL, Florida, 1998.

ROB, J. W. B.; MARGREET, I. P.; ROLAND, J. S. Hydrocarbon degrading bacteria: the oil–spill clean up crew. **Miocrobial Biotechnology**, v. 2., p. 587-594, 2009.

ROBERTSON, C.; KRAUSS, C. **Gulf Spill Is the Largest of Its Kind, Scientists Say**. The New York Times Company, New York, 2010. Disponível em <www.nytimes.com/2010/08/03/us/03spill.html>.

ROCHA, M. V. P.; MENDES, J. S.; GIRO M. E. A.; GONÇALVES, L. R. B. **Estudo da estabilidade do biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* em suco de caju**. 4° PDPETRO, Campinas, 2007.

ROSA, A. P.; TRIGUIS, J. A. Bioremediation process on Brazil shoreline. **Enviromental Science Pollution Resource International**, v. 17, p. 470-476, 2007.

ROSENBERG, E.; RON, E. Z. Bioemulsans: microbial polymeric emulsifier. **Current Opinion in Biotechnology**, v.8, p. 313–316, 1997.

ROSOLEN, V.; HERPIN, U.; FRÄNCLE, S.; BREULMANN, G.; CAMARGO, P. B.; PAGANINI, W. S.; CERRI, C. C.; MELFI, A. J.; MARKERT, B. Land application of wastewater in Brazil – A scientific challenge: Chemical characterization of soil at Populina, São Paulo State. **Journal of Soils and Sediments**, v. 5, p. 112–120, 2005.

RUDOLF, J. C. **Is 'Peak Oil' Behind Us?**. The New York Times Company, New York, 2010. Disponível em < http://green.blogs.nytimes.com/2010/11/14/is-peak-oil-behind-us>.

RYAN, J.; MIYAMOTO, S.; STROEHLEIN, J. L. Effect of acidity on germination of some grasses and alfafa. **Journal of Range Management**, v. 28, p. 154-155, 1975.

SALANITRO, J. P.; DORN, P. B.; HUESEMANN, M. H.; MOORE, K. O.; RHODES, L. M.; JACKSON, R.; VIPOAD, T. E.; WESTERN, M. M.; WISNIEWSKI, H. L. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. **Environmental Science Technology**, v. 31, p. 1769-1776, 1997.

SANDRIN, C.; PEYPOUX, F.; MICHEL, G. Coproduction of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties, by *Bacillus subtilis*. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 12, p. 370–375, 1990.

SANTOS, S.; REZENDE, M. O. O. Avaliação do potencial herbicida de compostos secundários na germinação de sementes de plantas daninhas encontradas em pastagens. **Revista Analytica**, n. 32, p. 72-79, 2008.

SANTOS, V. L. M.; CALIL, A. C.; RUIZ, H. A.; ALVARENGA, E. M.; SANTOS, C. M. Efeito do estresse salino e hídrico na germinação e vigor de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, v.14, p.189-194, 1992.

SARKAR, D.; FERGUSON, M.; DATTA R.; BIRNBAUM, S. Bioremediation of petroleum hydrocarbons in contaminated soils: comparison of biosolids addition, carbon supplementation, and monitored natural attenuation. **Environmental Pollution**, p. 136, v. 187–195, 2005.

SASAKI, T.; MAKI, H.; ISHIHARA, M.; HARAYAMA, S. Vanadium as an internal marker to evaluate microbial degradation of crude oil. **Environmental Science and Technology**, v. 22, p. 3618-3621, 1998.

SCHMIDT, S. K.; SIMKINS, S.; ALEXANDER, M. Models for the Kinetics of Biodegradation of Organic Compounds Not Supporting Growth. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 50, n. 2, p.323-331, 1985.

SCHMIDT, T. C.; MORGENROTH, E.; SCHIRMER, M.; EFFENBERGER, M.; HADERLEIN, S.B. **Oxygenates in Gasoline: Environmental Aspects**. ACS, Washington, 2002.

SCHWILLE, F. **Dense Chlorinated Solvents in Porous and Fractured Media**. Lewis, Chelsea, 1988.

SCRIMGEOUR, C. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. John Wiley and Sons Inc., New Jersey, 2005.

SHAW, D. G. The Exxon-valdez oil-spill-ecology and social consequences. **Environmental Conservation**, v. 19, p. 253–258, 1992.

SHIMP, R. J.; PFAENDER, F. K. Effect of Adaptation to Phenol on Biodegradation of Monosubstituted Phenols by Aquatic Microbial Communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 53, p. 1496-1499, 1987.

SIKKEMA, J.; DEBONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. Microbiology Reviews, v. 59, p. 201 – 222, 1995.

SINGH, A.; VAN HAMME, J. D.; WARD, O. P. Surfactants in microbiology and biotechnology: Part 2. Application aspects. **Biotechnology Advances**, v. 25, p. 99–121, 2007.

SINGH, H. **Mycoremediation: Fungal bioremediation**. Wiley Interscience Pub, New York, 2006.

SINGH, P.; CAMEOTRA, S. S. Enhancement of metal bioremediation by use of microbial surfactants. **Biochemistry and Biophysics Research Communications**, v. 319, p. 291–297, 2004.

SNEDECOR, G.W. **Statistical methods**. Iowa State Univ., Iowa, 1962.

SOARES Jr, J.; MARIANO, A. P.; ANGELIS, D. F. Biodegradation of biodiesel/diesel blends by *Candida viswanathii*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, p. 2774-2778, 2009.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry: the principles and practice of statistics in biological research**. 3ª edição, W. H. Freeman and Co, New York, 1995.

SOLANO-SERENA, F.; MARCHAL, M. R.; LEBEAULT, R. J. M.; VANDECASTEELE, J. P. Biodegradation of gasoline: Kinetics, mass balance and fate of individual hydrocarbons. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, p. 1008–1016, 1999.

SONG, H. C.; WANG, X.; BARTHA, R. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 652–656, 1990.

SQUILLACE, P. J.; ZOGORSKI, J. S.; WILBER, W. G.; PRICE, C. V. Preliminary assessment of the occurrence and possible sources of MTBE in groundwater in the US, 1993–1994. **Environmental Science Technology**, v. 30, p. 1721–1730, 1996.

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

STARK, J. S.; SNAPE, I.; RIDDLE, M. J. The effects of petroleum hydrocarbon and heavy metal contamination of marine sediments on recruitment of Antarctic soft-sediment assemblages: a field experimental investigation. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 283, p. 21-50, 2003.

STREVA, E. R.; PASA, V. M. D.; SODRÉ, J. R. Aging effects on gasoline–ethanol blend properties and composition. **Fuel**, v. 90, p. 215-219, 2011.

SZABÓ, B. **The p-Version of the Finite Element Method**. ESRD, New York, 2006.

TAM, E. K. L.; BYER, P. H. Remediation of contaminated lands: a decision methodology for site owners. **Journal of Environmental Management**, v. 64, p. 387–400, 2002.

TANG, Y. J., CARPENTER, S.; DEMING, J.; KRIEGER-BROCKETT, B. Controlled release of nitrate and sulfate to enhance anaerobic bioremediation of phenanthrene in marine sediments. **Environmental Science Technology,** v. 39, p. 3368–3373, 2005.

TANGLEY, L. **Bird Habitats Threatened by Oil Spill**. National Wildlife Federation, 2010. Disponível em < http://www.nwf.org/News-and-Magazines/National-Wildlife/Birds/Archives/2010/Oil-Spill-Birds.aspx>.

TAVARES, P. **Relatório do Grupo de Monitoramento Permanente da Resolução CONAMA 362/2005**. 2006. Disponível em < www.mma.gov.br /conama>.

TESTA, S. M.; WINEGARDNER, D. L. **Restoration of Contaminated Aquifer: Petroleum Hydrocarbons and Organic Compounds**. Lewis Publishers, Chelsea, 2000.

THOMAS, J. E.; TRIGGIA, A. A.; CORREIA, C. A.; VEROTTI FILHO, C.; XAVIER, J. A. D.; MACHADO, J. C. V.; SOUZA FILHO, J. E.; PAULA, J. L.; DE ROSSI, N. C. M.; PITOMBO, N. E. S.; GOUVEIA, P. C. V. M.; CARVALHO, R. S.; BARRAGAN, R. V.; **Fundamentos de Engenharia de Petróleo**. Editora Interciência/PETROBRAS, Rio de Janeiro, 2001.

TIEHM, A. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. **Applied Environmental Microbiology**, v. 60, p. 258–263, 1994.

TIEHM, A.; STIEBER, M.; WERNER, P.; FRIMMEL, F. H. Surfactantenhanced mobilization and biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in manufactured gas plant soil. **Environmental Science Technology**, v. 31, p. 2570–2576, 1997.

TISSOT, B. P.; WELTE, D. H. **Petroleum formation and ocurrence**. Springer-Verlag, Berlin, 1978.

TJESSEN, K.; PEDERSEN, D.; AABERG, A. On the environmental fate of a dispersed Ekofisk crude oil in sea-immersed plastic columns. **Water Research**, v. 9, p. 1129-1136, 1984.

UYSAL, A.; TURKMAN,A. Biodegradation of 4-chlorophenol in biosurfactant supplemented activated sludge. In: **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology, Microbiology Book Series 2**. Formatex Research Center, Badajoz, 2011.

VAAJASAARI, K.; JOUTTI, A.; SCHULTZ, E.; SELONEN, S.; WESTERHOLM, H. Comparisons of terrestrial and Aquatic Bioassays for Oil-Contaminated Soil Toxicity. **Journal of Soils & Sediments**. v. 2, p. 194-202, 2002.

VAN DYKE, M. I.; H. LEE; TREVORS, J. T. Applications of microbial surfactants. **Biotechnology Advances**, v. 9, p. 241-252, 1991.

VAN HAMME, J. D.; SINGH, A.; WARD, O. P. Recent Advances in Petroleum Microbiology. **Recent Advances in Petroleum Microbiology**, v. 67, p. 503–549, 2003.

VAN HAMME, J.; WARD, O. P. Influence of chemical surfactants on the biodegradation of crude oil by a mixed bacterial culture. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 45, p. 130–137, 1999.

VASUDEVAN, N.; RAJARAM, P. Bioremediation of oil sludge contaminated soil. **Environmental International**, v. 26, p. 409–411, 2001.

VATER, J. Lipopeptides, an attractive class of microbial surfactants. **Progress in Colloid and Polymer Science**, v. 72, p. 12-18, 1986.

VAZOLLER, R. F. **Biodiversidade: perspectivas e oportunidades tecnológicas. Microbiologia e Saneamento Ambiental**. Fundação André Tosello, 2004. Disponível em: <www.bdt.fat.org.br/ >.

VENKATESWARAN, K.; HARAYAMA, S. Sequential enrichment of microbial populations exhibiting enhanced biodegradation of crude oil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 767–775, 1995.

VERNON, L.P.; ZAUGG, W.S. Photoreductions by fresh and aged chloroplasts; requirement for ascorbate and 2,6-dichlorophenolindophenol with aged chloroplasts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 235, p. 2728-2733, 1960.

VOLKERING, F.; BREURE, A. M.; RULKENS, W. H. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. **Biodegradation**, v. 8, p. 401–417, 1998.

VWIOKO, D. E.; FASHEMI, D. S. Growth Response of *Ricinus communis* L (Castor Oil) in Spent Lubricating Oil Polluted Soil. **Journal of Applied Sciences & Environmental Management** , v. 9,p. 73-79, 2005.

WAKE, H. Oil refineries: a review of their ecological impacts on the aquatic environment. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**, v. 62, p. 131–140, 2005.

WANG, W. Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants. **Environmental Toxicology & Chemistry**, v. 6, p. 409-414, 1987.

WANG, X.; SUN, C.; GAO, S.; WANG, L.; SHUOKUI, H. Validation of germination rate and root elongation as indicator to asses phytotoxicity with *Cucumis sativus* . **Chemosphere**. V. 44, p 1711-1721, 2001.

WARD, O.; SINGH, A.; VAN HAMME, J. Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. **Journal of Industrial and Microbiology Biotechnology**, v. 30, p. 260–270, 2003.

WARD, O.; SINGH, A.; VAN-HAMME, J. Accelerated biodegradation of petroleum hydrocarbon waste. **Journal of Industrial Microbiology Biotechnology**, v. 30, p. 260–270, 2003.

WENGER, L. M.; DAVIS, C. L.; ISAKSEN, G. H. Multiple controls on petroleum biodegradation and impact on oil quality. **SPE Reservoir Evaluation & Engineering**, v. 5, p. 375–383, 2002.

WEST, C. C.; HARWELL, J. H. Surfactant and subsurface remediation. **Environmental Science Technology**, v. 26, p. 2324–2330, 1992.

WIDDEL, F.; RABUS, R. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 259–276, 2001.

WILHELMS, A.; LARTER, S. R.; HEAD, I.; FARRIMOND, P.; DI-PRIMIO, R.; ZWACH, C. Biodegradation of oil in uplifted basins prevented by deep-burial sterilization. **Nature**, v. 411, p. 1034–1037, 2001.

WILSON, T. V. **How Play-Doh Modeling Compound Works**, HowStuffWorks Inc, Atlanta, 2000. Disponível em <http://entertainment.howstuffworks.com/play-doh.htm>.

WOLFE, D. A.; GALT, J. A.; SHORT, J.; WATABAYASHI, G.; O'CLAIRE, C.; RICE, S.; MICHEL, J.; PAYNE, J. R.; BRADDOCK, J.; HANNA, S.; SALE, D. The fate of the oil spilled from the Exxon Valdez. **Environmental Science Technology**, v. 28, p. 561–567, 1994.

WU, Y.; CHIANG, C.; LU, C. Respirometric Evaluation by Graphical Analysis for Microbial Systems. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 92, p. 137–152, 2004.

XU, X.; ZHU, X. Treatment of refectory oily wastewater by electro-coagulation process. **Chemosphere**, v. 56, p. 889–894, 2004.

YAKIMOV, M. M.; TIMMIS, K. N.; GOLYSHIN, P. N. Obligate oil degrading marine bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 257-266, 2007.

YANG, S.; ZHU, W.; WANG, J.; CHEN, Z. Catalytic wet air oxidation of phenol over CeO2–TiO2 catalyst in the batch reactor and the packed-bed reactor, **Journal Hazardous Materials**, v. 153, p. 1248–1253, 2008.

YOUSSEF, T. Evidence for reduced post-sill recovery by the halophyte Sporobolus ioclaus Nees in oil-contaminated sediments. **Maritime Pollution Bulletin**, v. 44, p. 334-339, 2002.

ZANIER, A. Thermal-oxidative stability of motor gasolines by pressure d.s.c. **Fuel**, v. 77, p. 865–870, 1998.

ZHANG, X.; PETERSON, C. L.; REECE, D.; HAWS, R.; MOLLER, G. Biodegradability of biodiesel in the aquatic environment. **Transactions of the ASAE**, v. 41, p. 1423-1430, 1998.

ZHENGKAI, L.; WRENN, B. A. Effects of ferric hydroxide on the anaerobic biodegradation kinetics and toxicity of vegetable oil in freshwater sediments. **Water Research**, v. 38, p. 3859–3868, 2008.

ZOBELL, C. E. Action of microorganisms on hydrocarbons. **Bacteriological Reviews**, v. 10, p. 1-49, 1969.

ZONGQIANG, G.; PEIJUN, L.; WILKE, B. M.; ALEF, K. Effects of vegetable oil after soil extraction on physical-chemical properties of sandy soil and plant growth. **Journal of Environmental Sciences**, v. 20, p. 1458-1462, 2008.

8. APÊNDICES

Nos apêndices estão descritos em Tabelas e Figuras todos os dados coletados ao longo dos experimentos realizados nesse trabalho. Informações adicionais como desvio padrão e parâmetros de ajustes matemáticos dos resultados que não foram incluídos nos gráficos e tabelas a fim de melhorar a visualização dos mesmos podem ser encontrados nessa seção.

8.1. Dados de produção de biossurfactante

8.1.1. Biomassa

Tabela 18 – Peso dos frascos durante medição de biomassa em BHI + Mg de 0 h a 48 h

Tempo (h)	Peso do Tubo (g)		Peso Úmido (g)		Peso Seco (g)	
	A	B	A	B	A	B
2	15,4460	15,2845	15,5433	15,2925	15,4519	15,2896
4	15,3902	15,3821	15,5666	15,5780	15,3935	15,3960
8	15,3230	15,0890	15,4870	15,2953	15,3551	15,1067
12	15,2623	15,1827	15,4471	15,3751	15,3803	15,2229
16	15,4461	15,2834	15,6488	15,4887	15,5704	15,3965
20	15,2536	15,0814	15,5173	15,3230	15,3924	15,2307
24	15,3108	15,3455	15,5788	15,6198	15,4617	15,4897
28	15,1442	15,3155	15,5951	15,5436	15,4366	15,4240
32	15,1442	15,2567	15,4136	15,5250	15,3529	15,4465
36	15,3840	15,3901	15,7556	15,7414	15,5950	15,5982
40	15,3109	15,3255	15,5788	15,6198	15,5017	15,5397
44	15,1752	15,3325	15,5951	15,5436	15,5565	15,4332
48	15,3840	15,3901	15,7526	15,7414	15,6150	15,6372

Tabela 19 – Produção de biomassa em BHI + Mg de 0 h a 48 h

Tempo (h)	Crescimento	Desvio Pad.	Seco/Úmido	Biomassa (g/L)
2	0,0055	0,0003889	0,104463	**0,2750**
4	0,0086	0,0006081	0,046199	**0,4300**
8	0,0249	0,0017607	0,134486	**1,2450**
12	0,0791	0,0055932	0,419406	**3,9550**
16	0,1187	0,0083934	0,581863	**5,9350**
20	0,1441	0,0101859	0,570156	**7,2025**
24	0,1475	0,0104334	0,544164	**7,3775**
28	0,2005	0,014174	0,590427	**10,0225**
32	0,1992	0,0140891	0,74112	**9,9625**
36	0,2096	0,0148174	0,579748	**10,4775**
40	0,2025	0,0143189	0,720384	**10,1250**
44	0,2410	0,0170413	0,763867	**12,0500**
48	0,2391	0,0169034	0,66412	**11,9525**

Tabela 20 – Peso dos frascos durante medição de biomassa em BHI + Mg de 48 h a 168 h

Tempo (h)	Peso do Tubo (g)			Peso Úmido (g)			Peso Seco (g)		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
24	14,9380	15,3570	15,2755	15,2822	15,6860	15,5837	15,1253	15,5493	15,4487
48	15,2019	15,1764	15,1864	15,6380	15,6027	15,6308	15,6053	15,4859	15,5006
72	15,2528	15,2065	14,8698	15,6922	15,6067	15,2954	15,5969	15,5203	15,2027
96	15,1955	15,2221	15,3243	15,6493	15,6280	15,7714	15,5700	15,5453	15,6804
120	14,8983	15,2373	15,2868	15,2734	15,6567	15,6986	15,2056	15,5882	15,6245
144	15,2568	15,2392	15,3684	15,6403	15,6089	15,7726	15,5599	15,5297	15,6886
168	15,2589	15,3137	14,9233	15,6672	15,6578	15,2950	15,5589	15,5806	15,2116

Tabela 21 – Produção de biomassa em BHI + Mg de 0 h a 48 h

Tempo (h)	Crescimento	Desvio Pad.	Seco/Úmido	Biomassa (g/L)
24	0,2172	0,0153595	0,614706	**8,6887**
48	0,3100	0,0219168	0,71027	**12,3980**
72	0,3375	0,023866	0,804537	**13,5007**
96	0,3566	0,0252142	0,807084	**14,2633**
120	0,3134	0,0221595	0,781147	**12,5353**
144	0,3028	0,02141	0,792799	**12,1113**
168	0,3085	0,0218154	0,827862	**12,3407**

8.1.2. Rendimento de biossurfactante

Tabela 22 – Peso dos frascos durante medição de produção de biossurfactante em BHI + Mg de 0h a 48 h

Tempo (h)	Peso do Tubo (g)	Peso Úmido (g)	Peso Seco (g)
2	4,3615	4,3884	4,3815
4	10,9037	10,9709	10,9538
8	10,1452	10,2342	10,1915
12	9,0245	9,1508	9,0851
16	8,9354	9,1053	9,0091
20	12,8773	13,0154	12,9470
24	12,9590	13,1452	13,0309
28	8,9786	9,1356	9,0652
32	8,8444	9,0139	8,9088
36	10,2906	10,4354	10,3695
40	10,0626	10,2047	10,1298
44	11,2701	11,4293	11,3454
48	11,7209	11,8864	11,8105

Tabela 23 – Produção de biossurfactante em BHI + Mg de 0h a 48 h

Tempo (h)	Rendimento	Desvio Pad.	Seco/Úmido	Surfactante (g/L)
2	0,0206	0,0014552	0,77719	**1,0290**
4	0,0514	0,0036381	0,77719	**2,5725**
8	0,0477	0,0033764	0,534415	**2,3875**
12	0,0606	0,0042851	0,47981	**3,0300**
16	0,0737	0,0052114	0,433785	**3,6850**
20	0,0697	0,0049285	0,504707	**3,4850**
24	0,0719	0,0050841	0,386144	**3,5950**
28	0,0866	0,0061235	0,551592	**4,3300**
32	0,0644	0,0045538	0,379941	**3,2200**
36	0,0789	0,0055791	0,54489	**3,9450**
40	0,0672	0,0047518	0,472906	**3,3600**
44	0,0753	0,005322	0,472906	**3,7632**
48	0,0896	0,0063371	0,541451	**4,4810**

Tabela 24 – Peso dos frascos durante medição de produção de biossurfactante em BHI + Mg de 48h a 168 h

Tempo (h)	Peso do Tubo (g)		Peso Úmido (g)		Peso Seco (g)	
	A	B	A	B	A	B
48	9,1448	10,7849	9,2525	10,9074	9,2582	10,8543
72	11,5767	11,6040	11,6609	11,7002	11,6888	11,6572
96	9,1208	9,1832	9,1886	9,2564	9,1789	9,3117
120	9,1604	9,3134	9,2452	9,3890	9,2110	9,4235
144	9,0670	8,8685	9,1417	8,9662	9,0912	8,9879
168	9,1137	9,0910	9,1935	9,1776	9,1511	9,2057

Tabela 25 – Produção de biossurfactante em BHI + Mg de 0h a 48 h

Tempo (h)	Rendimento	Desvio Pad.	Seco/Úmido	Surfactante (g/L)
48	0,0914	0,006463	0,794092	**4,5700**
72	0,0826	0,0058442	0,916297	**4,1325**
96	0,0933	0,0065973	1,323404	**4,6650**
120	0,0804	0,0056816	1,00187	**4,0175**
144	0,0718	0,005077	0,832947	**3,5900**
168	0,0761	0,0053793	0,914363	**3,8037**

8.1.3. Tensão superficial

Tabela 26 – Tensão superficial do meio BHI + Mg na produção de biossurfactante em $mN.m^{-1}$

Tempo	s/ Centrifugação	c/ Centrifugação
2	55,1	50,9
4	52,3	46,7
8	37,2	35,7
12	33,8	32,8
16	31,2	30,8
20	31,4	30,9
24	31,3	31,2
28	31,6	31,5
32	31,6	31,3
36	31,7	31,4
40	31,6	31,4
44	31,6	31,5
48	31,6	31,4
48	32	32,5
72	33	32,6
96	33,4	32,9
120	33,6	32,8
144	33,7	32,9
168	33,7	32,9

8.1.4. Emulsificação

Tabela 27 – Medidas de índice de emulsificação (E_{24}) nas substâncias em %

	Controle		Surfactante		Desvio Padrão		E24	
Ensaio	Emulsão	Coluna	Emulsão	Coluna	Emulsão	Coluna	Controle	Surfactante
1	0,05	3,5	0,35	3,9	0,0212132	0,0282843	1,43	8,97
2	1,5	3,7	1,9	4,2	0,0282843	0,0353553	40,54	45,24
3	0,2	3,7	0,4	4,2	0,0141421	0,0353553	5,41	9,52
4	0,3	4,3	0,7	4,2	0,0282843	0,0070711	6,98	16,67
5	0,5	4,6	2	4,3	0,006066	0,0212132	10,87	46,51
6	0,2	4,3	0,1	4,3	0,0070711	0	2,33	4,65
7	0,05	3,6	1	3,5	0,0671751	0,0070711	1,39	28,57
8	0,2	3,2	1,5	4	0,0919239	0,0565685	6,25	37,50
9	0,1	3,5	0,2	3,7	0,0070711	0,0141421	2,86	5,41

8.2. Dados de respirometria

8.2.1. Titulação

Tabela 28 – Volume de HCl titulado para Branco, S0, S0-S, S1 e S1-S em mL

Tempo (dias)	HCl (mL)								
	Branco	S0		S0-S		S1		S1-S	
		A	B	A	B	A	B	A	B
7	19,2	17,6	18,2	15,8	16,4	18,0	18,3	17,8	17,9
14	18,5	16,2	17,3	14,6	16,4	16,3	17,4	15,4	16,1
21	19,2	15,2	16,4	16,7	14,8	15,4	16,3	12,3	13,9
28	18,4	14,0	15,9	13,3	14,3	12,0	14,3	11,4	10,5
35	18,0	15,1	15,0	14,3	16,5	13,2	12,5	12,5	11,2
42	19,1	14,9	14,5	16,4	13,1	12,3	13,2	11,6	9,9
49	19,0	14,6	15,0	13,1	13,5	12,6	14,2	12,1	11,2
56	19,5	15,1	15,2	13,6	13,7	12,8	13,8	10,0	10,8
63	18,8	15,6	16,2	14,0	15,4	14,7	14,0	9,0	11,0
70	18,9	16,2	14,4	14,6	18,7	15,0	14,1	8,0	9,5
77	19,0	16,7	15,2	15,0	18,2	16,3	16,2	8,2	9,4
84	18,7	17,1	15,3	16,2	13,8	15,0	15,2	8,5	8,5
91	19,2	17,0	15,2	15,3	13,7	13,2	14,4	9,2	8,6
98	20,1	17,2	15,7	15,5	14,1	15,7	16,3	9,4	8,4
105	18,5	16,0	15,3	14,4	12,2	17,5	15,1	9,1	8,5
112	19,6	16,3	15,8	13,0	14,2	16,0	15,0	8,9	9,2
119	19,5	16,3	15,9	14,7	14,3	14,6	16,2	8,5	9,2
126	19,6	16,4	16,1	14,8	14,5	15,3	16,3	8,8	9,1
133	18,5	17,2	16,0	15,5	12,8	15,7	16,9	9,4	9,0
140	19,4	16,2	16,7	11,3	15,0	15,8	17,6	10,0	8,4
147	19,9	16,0	18,0	14,4	19,4	17,0	17,2	9,0	8,5

Tabela 29 – Volume de HCl titulado para S2, S2-S, S3, S3-S, S4 e S4-S em mL

Tempo (dias)	HCl (mL)											
	S2		S2-S		S3		S3-S		S4		S4-S	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
7	14,4	15,2	13,0	12,2	11,4	12,8	12,5	10,2	16,7	16,2	16,3	15,8
14	15,9	14,8	16,7	13,3	11,1	10,1	8,9	9,1	13,2	13,5	12,9	13,2
21	15,3	13,4	13,8	12,1	10,1	9,0	9,0	7,2	10,9	11,4	10,7	11,1
28	14,8	15,9	13,3	16,7	11,9	9,9	14,3	8,9	11,3	11,8	11,0	11,5
35	13,1	14,2	13,8	15,5	10,7	4,6	9,6	3,2	10,6	11,0	10,3	10,8
42	13,2	12,5	11,9	11,3	9,4	8,2	8,4	6,6	11,2	11,6	10,9	9,4
49	14,5	13,9	13,1	12,5	10,4	7,8	9,4	7,0	11,4	11,8	9,9	10,1
56	11,2	10,3	9,0	9,3	7,7	6,4	7,0	5,8	13,0	13,5	12,7	13,2
63	11,7	11,8	10,5	12,4	8,9	7,2	6,2	6,5	14,8	15,4	11,1	13,0
70	12,0	12,5	10,8	13,1	8,4	6,0	11,8	5,4	13,2	13,7	9,5	11,4
77	10,6	9,1	7,4	7,3	6,8	7,2	6,1	6,5	14,2	14,8	11,9	9,4
84	9,5	10,5	8,6	9,5	7,9	7,1	4,7	5,3	13,0	13,5	12,7	13,2
91	8,7	8,4	9,1	7,6	6,3	6,0	5,7	5,4	11,7	12,1	9,4	10,8
98	8,4	8,1	7,6	6,5	6,1	6,2	3,6	5,6	12,5	13,0	12,2	12,7
105	9,2	8,3	8,3	7,5	6,2	6,4	5,6	5,1	12,6	13,1	12,3	12,8
112	8,5	9,2	6,8	8,3	6,9	6,6	6,2	5,9	13,1	13,6	10,2	12,9
119	9,2	8,3	8,3	7,5	6,2	6,2	5,6	5,6	13,0	13,5	12,7	12,1
126	9,7	10,4	8,7	10,9	7,8	5,7	4,7	5,1	13,3	13,8	12,2	13,5
133	9,0	11,1	9,9	8,9	8,3	6,5	7,5	5,8	13,4	13,9	13,1	13,6
140	10,0	12,0	9,0	9,6	9,0	9,4	5,4	7,5	13,5	14,0	11,3	13,7
147	10,4	13,0	10,9	11,7	9,8	8,0	8,8	7,2	14,4	15,0	14,1	14,6

Tabela 30 – Volume de HCl titulado para S5, S5-S, S6, S6-S, S7 e S7-S em mL

Tempo (dias)	HCl (mL)											
	S5		S5-S		S6		S6-S		S7		S7-S	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
7	17,0	16,3	15,3	17,1	18,2	17,2	18,1	18,5	18,1	18,3	18,2	17,3
14	13,4	15,4	12,8	15,1	14,7	15,0	12,2	13,3	17,9	17,0	18,0	17,2
21	12,0	13,2	11,4	12,5	13,7	10,8	11,4	9,0	17,8	17,3	18,9	18,0
28	8,4	10,1	8,8	9,6	12,5	10,9	10,4	9,1	17,5	16,2	17,0	18,3
35	13,8	9,9	14,5	10,4	10,2	8,0	8,5	7,9	16,3	17,9	18,0	17,2
42	9,8	10,0	10,3	9,0	10,0	9,8	9,2	3,8	17,0	17,2	17,3	17,0
49	9,9	8,7	10,4	8,3	13,0	9,6	8,2	8,0	16,7	16,0	18,3	18,4
56	15,7	9,8	12,0	10,0	8,6	9,9	7,2	7,0	16,5	17,0	18,4	17,9
63	10,5	10,3	11,1	10,8	12,8	10,4	10,7	8,6	16,0	16,2	17,2	18,1
70	9,3	10,4	9,7	12,5	17,3	14,5	14,4	12,1	17,5	17,0	17,3	17,3
77	10,3	11,0	10,8	15,4	17,7	19,2	14,8	16,0	17,3	16,0	17,5	16,0
84	9,7	10,4	10,2	10,9	17,7	19,4	14,8	16,2	17,4	15,3	16,4	17,2
91	10,6	11,3	11,1	10,2	16,0	17,0	16,8	18,0	16,7	18,2	16,2	18,3
98	12,9	10,9	13,6	11,4	17,0	12,6	17,0	18,0	16,2	18,4	16,0	18,2
105	9,6	10,7	10,1	10,2	15,9	15,6	15,8	15,6	16,4	17,2	16,9	18,1
112	9,4	9,2	9,9	9,7	15,7	17,8	17,8	18,3	15,2	16,0	16,4	17,0
119	9,2	12,3	9,9	12,9	16,6	19,2	18,8	16,8	15,0	15,2	15,9	16,3
126	10,3	9,4	9,8	10,0	14,0	17,0	19,0	19,2	15,4	15,3	15,0	16,2
133	12,1	10,5	12,7	8,4	15,7	18,0	17,3	18,7	16,3	15,0	15,3	14,2
140	11,0	10,5	11,6	11,0	15,0	17,4	19,0	18,8	15,2	14,2	15,2	14,8
147	9,0	8,9	11,3	10,7	17,4	16,0	19,2	18,0	14,0	15,5	14,9	13,5

Tabela 31 – Volume de HCl titulado para S8, S8-S, S9, S9-S, S10 e S10-S em mL

Tempo (dias)	HCl (mL)											
	S8		S8-S		S9		S9-S		S10		S10-S	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
7	17,4	16,4	15,3	15,6	15,4	14,2	14,2	11,2	15,1	14,2	15,1	15,4
14	15,9	14,8	16,7	15,8	13,2	11,9	11,2	15,5	13,4	12,2	10,2	11,1
21	13,2	14,3	13,8	12,1	9,1	10,8	10,0	12,3	9,0	10,8	9,5	10,8
28	15,4	15,9	14,2	12,3	8,5	8,2	7,0	7,3	8,5	8,1	6,2	5,1
35	13,1	10,0	11,2	9,2	7,3	5,2	5,1	8,0	7,3	5,2	2,1	1,7
42	10,5	7,2	10,0	8,1	3,7	4,3	5,6	7,1	3,7	4,3	2,3	1,5
49	6,4	5,7	7,3	7,3	4,4	4,7	4,5	2,1	4,4	4,7	5,2	4,4
56	5,1	5,2	4,1	3,9	3,0	3,1	1,9	5,2	3,0	3,1	3,2	3,3
63	4,2	3,2	2,1	2,9	2,2	3,1	2,5	1,9	6,1	5,2	8,9	7,2
70	3,6	4,7	1,4	3,2	4,2	4,3	3,1	2,4	9,4	10,2	12,0	10,1
77	2,2	3,4	1,9	2,2	2,3	3,2	1,0	1,7	12,8	11,2	12,3	13,3
84	3,2	4,1	2,8	2,6	5,2	3,5	2,1	1,0	16,0	15,1	12,3	13,5
91	5,4	4,1	4,3	4,8	4,5	3,7	2,2	1,5	15,5	12,3	14,0	15,0
98	5,6	4,8	5,2	5,5	3,6	4,9	1,9	3,4	17,3	18,9	14,2	15,0
105	4,1	5,9	6,3	5,2	2,5	1,4	3,9	2,8	18,4	15,0	13,2	16,7
112	5,3	3,9	4,3	4,0	4,3	2,9	6,2	8,2	16,2	15,3	14,8	16,9
119	5,2	2,2	3,1	5,0	5,2	4,7	5,8	5,9	14,2	15,3	17,3	14,0
126	4,2	8,3	4,3	6,2	3,2	7,3	6,3	7,4	15,0	15,6	17,5	16,0
133	6,5	9,0	6,2	5,8	5,5	8,0	7,2	9,1	16,5	16,0	14,4	15,6
140	7,1	7,0	6,1	6,4	6,0	7,9	10,4	8,9	13,4	17,4	14,2	15,9
147	10,4	10,3	7,4	5,2	8,2	10,5	11,1	8,6	16,2	17,0	16,0	16,7

8.2.2. Respirometria semanal

Tabela 32 – CO_2 semanal calculado para S0, S0-S, S1, S1-S, S2, S2-S, S3 e S3-S em mL

Tempo (dias)	CO2							
	S0	S0-S	S1	S1-S	S2	S2-S	S3	S3-S
7	2,9	6,8	2,3	3,0	9,7	14,6	15,6	17,2
14	3,9	6,6	3,6	6,1	6,9	7,7	17,4	21,0
21	7,5	7,6	7,4	13,4	10,7	13,8	21,3	24,4
28	7,6	10,1	11,6	16,4	6,7	7,5	16,5	14,9
35	6,5	5,7	11,3	13,5	9,6	7,4	22,8	25,5
42	9,7	9,6	15,0	18,4	13,8	16,6	22,7	25,5
49	9,2	12,5	14,1	16,2	10,6	13,7	21,8	23,8
56	9,6	12,9	14,7	20,0	19,3	22,8	27,4	28,9
63	6,4	9,0	9,0	19,4	15,5	16,1	23,7	27,4
70	7,9	4,9	8,6	22,3	14,6	15,3	25,7	22,7
77	6,7	5,2	5,9	22,4	20,1	25,6	26,4	27,9
84	5,5	8,1	8,1	22,4	19,1	21,3	24,7	30,1
91	6,8	10,4	11,9	22,7	23,4	23,9	28,7	30,1
98	8,0	11,6	9,0	24,6	26,1	28,8	30,7	34,1
105	6,3	11,4	4,8	21,3	21,5	23,4	26,8	28,9
112	7,8	13,1	9,0	23,2	23,7	26,5	28,3	29,8
119	7,5	11,0	9,0	23,4	23,7	25,6	29,2	30,6
126	7,4	10,9	8,4	23,4	21,0	21,5	28,3	32,4
133	4,2	9,6	4,8	20,5	18,6	20,0	24,4	26,0
140	6,5	13,7	5,9	22,4	18,5	22,2	22,5	28,5
147	6,4	6,6	6,2	24,5	18,0	18,9	24,3	26,2

Tabela 33 – CO_2 semanal calculado para S4, S4-S, S5, S5-S, S6, S6-S, S7 e S7-S em mL

Tempo (dias)	CO2							
	S4	S4-S	S5	S5-S	S6	S6-S	S7	S7-S
7	6,1	6,9	5,6	6,5	3,3	2,0	2,2	3,2
14	11,3	12,0	9,0	10,1	8,0	12,6	2,3	2,0
21	17,7	18,3	14,5	15,9	15,3	19,8	3,6	1,7
28	15,1	15,7	20,1	20,2	14,7	19,0	3,4	1,7
35	15,8	16,4	13,5	12,2	19,6	21,6	2,0	0,9
42	16,9	19,7	20,3	20,9	20,2	27,7	4,4	4,3
49	16,3	19,8	21,3	21,2	16,9	24,0	5,8	1,4
56	13,7	14,4	14,8	18,7	22,5	27,3	6,1	3,0
63	8,2	14,9	18,4	17,3	15,9	20,1	5,9	2,5
70	12,0	18,6	19,9	17,1	6,6	12,4	3,6	3,5
77	9,9	18,4	18,3	12,9	1,2	8,0	5,2	5,0
84	12,0	12,7	19,0	17,9	0,3	7,1	5,2	4,2
91	16,1	20,0	18,2	18,8	5,9	4,0	3,9	4,3
98	16,2	16,8	18,0	16,7	11,7	5,7	6,2	6,6
105	12,4	13,1	18,4	18,4	6,1	6,1	3,7	2,2
112	13,7	17,7	22,7	21,6	6,3	3,5	8,8	6,4
119	13,7	15,6	19,3	17,8	3,5	3,7	9,7	7,5
126	13,3	14,8	21,5	21,4	9,0	1,1	9,4	8,8
133	10,6	11,4	15,8	17,5	3,6	1,1	6,3	8,3
140	12,4	15,2	19,0	17,8	7,0	1,1	10,3	9,7
147	11,5	12,2	24,1	19,7	7,0	2,9	11,3	12,5

Tabela 34 – CO_2 semanal calculado para S8, S8-S, S9, S9-S, S10, S10-S em mL

Tempo (dias)	CO2				
	S8	S8-S	S9	S9-S	S10
7	5,1	8,3	9,7	14,3	10,0
14	6,9	5,0	13,1	11,3	12,5
21	12,0	13,8	20,4	17,7	20,5
28	6,1	11,3	22,1	24,8	22,2
35	14,2	17,2	25,9	25,2	25,9
42	22,6	22,1	33,2	28,1	33,2
49	28,5	25,7	31,8	34,5	31,8
56	31,6	34,1	36,2	35,1	36,2
63	33,2	35,9	35,5	36,5	28,9
70	32,5	36,5	32,2	35,5	20,0
77	35,6	37,3	35,8	38,8	15,4
84	33,1	35,2	31,6	37,7	6,9
91	31,8	32,2	33,2	38,2	11,7
98	32,8	32,5	34,9	38,4	4,4
105	29,7	28,1	36,4	33,3	4,0
112	33,0	34,0	35,2	27,3	8,5
119	34,8	34,0	32,0	30,0	10,5
126	29,4	31,6	31,6	28,1	9,5
133	23,7	27,5	25,9	22,8	5,0
140	27,2	28,9	27,4	21,5	8,8
147	21,0	29,9	23,2	22,1	7,3

Tabela 35 – Desvio padrão do CO_2 semanal calculado para S0, S0-S, S1, S1-S, S2, S2-S, S3 e S3-S em mL

Tempo (dias)	CO2							
	S0	S0-S	S1	S1-S	S2	S2-S	S3	S3-S
7	1,0	0,9	1,1	1,0	1,3	0,4	0,4	2,0
14	1,4	0,5	0,8	0,3	1,8	1,4	1,3	0,9
21	1,6	0,7	0,2	1,6	0,3	1,9	1,2	0,7
28	1,4	0,0	1,0	0,3	1,7	0,7	1,9	2,1
35	0,4	0,3	1,5	1,2	1,0	1,0	1,3	0,8
42	1,0	1,5	0,4	1,0	1,9	0,8	2,1	0,1
49	1,3	0,8	0,3	2,0	0,6	0,5	1,2	0,2
56	0,8	0,7	0,8	0,4	1,6	0,1	0,9	1,9
63	1,4	1,2	0,5	0,6	2,0	0,0	1,6	1,9
70	2,1	0,5	0,9	1,2	0,2	1,8	0,9	0,3
77	0,3	0,6	0,5	1,6	0,3	0,2	1,4	0,9
84	1,6	1,4	1,0	0,5	1,9	0,8	1,5	0,6
91	1,7	1,7	1,4	1,5	1,4	1,2	0,8	1,6
98	2,0	0,1	1,2	0,2	1,1	1,9	1,3	0,8
105	0,2	0,5	1,9	0,6	0,6	0,2	0,7	0,3
112	0,9	0,6	1,5	0,2	0,1	0,8	1,3	1,0
119	1,7	0,9	0,9	2,1	0,5	0,7	0,3	1,9
126	1,8	0,2	1,2	1,0	0,4	1,7	0,5	0,2
133	0,6	0,1	1,7	0,8	0,8	0,1	1,6	1,9
140	0,4	0,9	1,7	1,9	0,8	0,6	0,3	0,5
147	0,1	1,5	1,7	1,3	1,0	0,2	1,2	1,2

Tabela 36 – Desvio padrão do CO_2 semanal calculado para S4, S4-S, S5, S5-S, S6, S6-S, S7 e S7-S em mL

Tempo (dias)	CO2							
	S4	S4-S	S5	S5-S	S6	S6-S	S7	S7-S
7	0,4	0,9	1,7	1,5	1,8	2,1	0,3	0,3
14	0,7	1,1	1,7	1,3	1,7	0,2	1,8	0,7
21	0,0	1,3	0,4	0,7	1,1	0,7	0,1	2,1
28	1,8	0,9	1,0	0,9	1,1	0,2	1,5	0,4
35	2,1	1,7	2,0	0,8	0,5	0,6	0,2	1,8
42	0,1	0,9	1,4	1,8	0,6	2,0	0,4	1,2
49	1,0	1,6	1,0	1,1	1,5	0,9	2,1	1,5
56	0,6	0,5	1,5	2,0	1,0	1,8	0,8	0,7
63	1,6	2,0	1,8	1,1	0,5	1,0	1,4	1,0
70	1,8	1,8	1,1	0,4	1,1	1,1	1,7	1,0
77	1,8	1,8	0,3	0,0	1,5	0,3	2,1	0,8
84	1,2	1,8	1,1	0,6	1,2	1,0	0,0	0,3
91	0,5	0,3	1,4	2,1	1,5	2,1	0,5	1,1
98	0,4	1,8	0,6	1,2	1,8	0,0	2,0	0,4
105	0,3	0,3	0,2	1,1	0,9	1,0	0,6	1,1
112	0,7	0,3	2,1	0,2	0,9	1,2	1,5	1,8
119	0,1	1,8	0,7	1,0	1,7	0,6	1,7	1,0
126	1,8	0,1	0,4	1,1	1,8	0,8	1,2	0,2
133	0,3	0,4	0,1	1,2	1,8	1,9	1,8	1,3
140	1,2	1,6	2,0	1,6	1,1	0,3	1,6	0,9
147	0,1	1,3	0,2	0,2	2,0	1,3	0,7	0,6

Tabela 37 – Desvio padrão do CO_2 semanal calculado para S8, S8-S, S9, S9-S, S10, S10-S em mL

Tempo (dias)	CO2				
	S8	S8-S	S9	S9-S	S10
7	1,2	0,1	0,5	1,7	0,9
14	1,7	0,2	1,6	2,0	1,3
21	1,3	0,7	0,2	1,6	0,4
28	1,7	1,3	0,1	1,0	2,0
35	0,3	0,5	1,1	1,9	0,8
42	0,9	1,5	1,0	0,5	1,1
49	1,1	1,0	1,0	0,8	1,0
56	1,2	1,5	0,2	0,4	1,0
63	0,2	0,3	1,7	1,6	0,5
70	0,2	1,1	0,4	0,2	1,3
77	0,3	1,1	0,0	0,5	1,7
84	0,3	0,4	1,1	1,0	0,5
91	1,2	1,5	1,4	1,4	1,6
98	0,9	0,7	0,3	1,6	2,1
105	1,9	2,0	1,5	1,1	1,9
112	0,9	1,6	1,4	0,9	1,0
119	1,7	0,4	0,1	1,7	0,8
126	2,0	0,6	1,4	0,9	0,9
133	1,5	0,5	1,9	1,4	0,5
140	1,6	1,9	0,9	0,8	0,5
147	2,0	0,1	1,7	1,6	2,0

8.2.3. Respirometria acumulada

Tabela 38 – CO_2 acumulado calculado para S0 a S5-S em mL

Tempo (dias)	CO2 Acumulado											
	S0	S0-S	S1	S1-S	S2	S2-S	S3	S3-S	S4	S4-S	S5	S5-S
7	2,86	6,80	2,31	2,97	9,68	14,61	15,64	17,20	6,05	6,92	5,57	6,54
14	6,71	13,38	5,94	9,02	16,61	22,29	33,04	38,15	17,38	18,95	14,54	16,60
21	14,19	20,99	13,31	22,44	27,28	36,12	54,33	62,52	35,06	37,22	29,06	32,50
28	21,78	31,10	24,86	38,83	33,99	43,58	70,80	77,46	50,18	52,95	49,19	52,73
35	28,27	36,77	36,19	52,36	43,56	51,03	93,64	102,98	66,00	69,34	62,73	64,96
42	37,95	46,41	51,15	70,73	57,31	67,60	116,33	128,51	82,88	89,00	83,03	85,82
49	47,19	58,91	65,23	86,90	67,87	81,29	138,08	152,26	99,21	108,80	104,31	107,04
56	56,76	71,81	79,97	106,92	87,12	104,13	165,44	181,18	112,94	123,22	119,12	125,74
63	63,14	80,80	88,99	126,28	102,63	120,28	189,15	208,60	121,12	138,07	137,55	143,02
70	71,06	85,75	97,57	148,61	117,26	135,54	214,89	231,30	133,08	156,66	157,48	160,15
77	77,77	90,95	103,51	171,05	137,39	161,17	241,26	259,22	143,02	175,03	175,83	173,09
84	83,27	99,07	111,65	193,49	156,53	182,51	265,93	289,30	154,98	187,70	194,86	191,02
91	90,09	109,43	123,53	216,15	179,96	206,39	294,64	319,36	171,06	207,72	213,01	209,83
98	98,12	121,08	132,55	240,79	206,03	235,17	325,35	353,44	187,23	224,56	231,01	226,52
105	104,39	132,48	137,39	262,13	227,48	258,54	352,17	382,34	199,65	237,67	249,38	244,95
112	112,20	145,61	146,41	285,34	251,13	285,07	380,44	412,10	213,38	255,38	272,04	266,59
119	119,68	156,63	155,43	308,77	274,78	310,65	409,67	442,70	227,11	271,01	291,29	284,39
126	127,05	167,58	163,79	332,20	295,79	332,15	437,97	475,05	240,38	285,86	312,74	305,75
133	131,23	177,17	168,63	352,66	314,38	352,19	462,39	501,10	251,01	297,21	328,58	323,23
140	137,72	190,84	174,57	375,10	332,86	374,41	484,87	529,60	263,40	312,39	347,61	341,08
147	144,10	197,44	180,73	399,63	350,90	393,31	509,12	555,81	274,86	324,63	371,70	360,73

Tabela 39 – CO_2 acumulado calculado para S6 a S10-S em mL

Tempo (dias)										
	S6	S6-S	S7	S7-S	S8	S8-S	S9	S9-S	S10	S10-S
7	3,30	1,98	2,20	3,19	5,06	8,25	9,68	14,30	10,01	8,69
14	11,34	14,56	4,51	5,17	11,99	13,20	22,77	25,63	22,55	25,96
21	26,66	34,36	8,14	6,82	23,98	26,95	43,12	43,34	43,01	45,87
28	41,40	53,39	11,55	8,47	30,03	38,28	65,23	68,09	65,23	73,92
35	60,98	74,95	13,53	9,35	44,22	55,44	91,08	93,28	91,08	109,34
42	81,22	102,67	17,93	13,64	66,77	77,55	124,30	121,33	124,30	147,18
49	98,16	126,65	23,76	15,07	95,26	103,29	156,09	155,87	156,09	178,42
56	120,66	153,93	29,81	18,04	126,83	137,39	192,28	190,96	192,28	214,17
63	136,52	174,04	35,75	20,57	160,05	173,25	227,81	227,48	221,21	237,82
70	143,09	186,45	39,38	24,09	192,50	209,77	260,04	263,01	241,23	255,09
77	144,34	194,46	44,55	29,04	228,14	247,06	295,79	301,84	256,63	268,73
84	144,61	201,54	49,72	33,22	261,25	282,26	327,36	339,57	263,56	281,49
91	150,55	205,50	53,57	37,51	293,04	314,49	360,58	377,74	275,22	291,83
98	162,21	211,18	59,73	44,11	325,82	346,94	395,45	416,13	279,62	303,93
105	168,26	217,29	63,47	46,31	355,52	374,99	431,86	449,46	283,58	311,74
112	174,53	220,75	72,27	52,69	388,52	408,98	467,06	476,74	292,05	319,99
119	178,05	224,49	81,95	60,17	423,28	442,97	499,07	506,77	302,50	328,46
126	187,07	225,59	91,30	68,97	452,65	474,54	530,64	534,82	311,96	334,73
133	190,70	226,69	97,57	77,22	476,30	502,04	556,49	557,59	316,91	342,43
140	197,74	227,79	107,91	86,90	503,47	530,97	583,88	579,04	325,71	352,00
147	204,78	230,65	119,24	99,44	524,48	560,89	607,09	601,15	332,97	359,81

8.2.4. Parâmetros dos modelos matemáticos

Tabela 40 – Equações correspondentes à regressão linear da Figura 31

Ensaio	*Equação*	*R^2*
S0	$y = -0{,}0000039x^3 + 0{,}000667x^2 + 0{,}00395x + 7{,}3624$	0,4082
S1	$y = 0{,}0000288x^3 - 0{,}00784x^2 + 0{,}58755x - 1{,}19787$	0,9143
S2	$y = 0{,}0000084x^3 + 0{,}0056x^2 - 0{,}11787x + 9{,}02505$	0,8467
S3	$y = -0{,}000010x^3 + 0{,}0009x^2 + 0{,}14068x + 15{,}37088$	0,7726
S4	$y = 0{,}000017x^3 - 0{,}00515x^2 + 0{,}43254x + 7{,}0583$	0,3597
S5	$y = 0{,}000028x^3 - 0{,}00761x^2 + 0{,}6291x + 2{,}9353$	0,6219
S6	$y = 0{,}000062x^3 - 0{,}015x^2 + 0{,}9267x – 0{,}23261$	0,8517
S7	$y = 0{,}000008x^3 - 0{,}00161x^2 + 0{,}12747x + 1{,}12454$	0,8353
S8	$y = 0{,}000003x^3 - 0{,}00354x^2 + 0{,}77025x – 3{,}64553$	0,8753
S9	$y = 0{,}000016x^3 - 0{,}00766x^2 + 0{,}91399x + 3{,}38418$	0,9121
S10	$y = 0{,}000103x^3 - 0{,}02571x^2 + 1{,}6564x – 2{,}85237$	0,8729

Tabela 41 – Parâmetros ajustados ao modelo de Membré et al. (1996) na Figura 33

Ensaio	*K1*	*K2*	*m1*	*m2*
S0	1,3583	9,7463	0,1354	0,0033
S0-S	-	-	-	-
S1	0,5934	19,2146	0,1519	0,0084
S1-S	3,3134	19,2536	0,0921	-0,0014
S2	6,2576	1311,6406	0,0164	0,0279
S2-S	7,9923	1851,9784	0,0072	0,0292
S3	16,0662	1101,4227	0,0087	0,0229
S3-S	18,1382	2217,6108	0,0143	0,0255
S4	1,2744	16,3456	0,2739	0,0023
S4-S	3,0238	19,8896	0,1782	0,0025
S5	1,7482	17,2562	0,1859	-0,0011
S5-S	2,2977	17,4598	0,1885	-0,0005
S6	1,9095	44,0897	0,1210	0,0191
S6-S	5,0183	317,0190	0,0576	0,0434
S7	2,5144	0,0096	2,8353	-0,1835
S7-S	1,1514	8563,6114	0,0155	-20,7008
S8	2,4075	62,5151	0,0662	0,0064
S8-S	3,0398	54,1588	0,0663	0,0045
S9	8,8460	54,0897	0,0571	0,0048
S9-S	10,8989	147,9579	0,0333	0,0133
S10	4,8578	115,6699	0,0904	0,0241
S10-S	5,9828	213,0669	0,0607	0,0317

Tabela 42 – Parâmetros ajustados ao modelo de Schmidt et al. (1985) na Figura 34

Ensaio	*Bmax*	*Bo*	*r*
S0	150,5662	10,1196	0,0343
S0-S	240,6858	16,1824	0,0276
S1	179,6283	11,0788	0,0398
S1-S	447,6143	18,0600	0,0340
S2	419,5208	15,2909	0,0330
S2-S	470,6435	19,3180	0,0321
S3	582,9594	34,6153	0,0309
S3-S	643,9138	39,2392	0,0301
S4	300,1417	24,5737	0,0304
S4-S	344,5028	24,0996	0,0334
S5	411,0096	23,4686	0,0318
S5-S	403,0023	25,5981	0,0308
S6	186,5687	12,6581	0,0527
S6-S	223,0541	9,3549	0,0689
S7	181,4674	6,9883	0,0257
S7-S	274,4205	5,0481	0,0230
S8	560,0471	15,4881	0,0401
S8-S	596,8261	18,6093	0,0387
S9	630,2758	27,6642	0,0385
S9-S	653,3771	30,6874	0,0358
S10	311,3218	15,7462	0,0588
S10-S	337,4159	20,2432	0,0559

8.3. Dados de colorimetria

8.3.1. Concentração de DCPIP

Tabela 43 – Concentração de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios colorimétricos controle

Tempo (h)	C0		C1		C2		C3	
	A	B	A	B	A	B	A	B
0	0,502	0,505	0,516	0,509	0,519	0,524	0,510	0,522
4	0,498	0,512	0,505	0,500	0,506	0,508	0,499	0,497
16	0,492	0,503	0,492	0,492	0,497	0,495	0,482	0,491
22	0,492	0,502	0,490	0,492	0,497	0,499	0,474	0,477
28	0,488	0,501	0,489	0,487	0,491	0,493	0,466	0,475
40	0,489	0,493	0,465	0,483	0,490	0,491	0,486	0,469
46	0,482	0,487	0,466	0,455	0,478	0,489	0,472	0,453
52	0,479	0,485	0,460	0,454	0,475	0,488	0,467	0,462
64	0,475	0,484	0,453	0,451	0,474	0,480	0,464	0,459
70	0,475	0,478	0,458	0,453	0,468	0,487	0,466	0,448
76	0,478	0,481	0,456	0,452	0,467	0,488	0,467	0,454
88	0,476	0,484	0,453	0,454	0,474	0,482	0,457	0,446
94	0,475	0,480	0,460	0,452	0,467	0,480	0,455	0,462
100	0,475	0,477	0,450	0,451	0,465	0,479	0,454	0,444
112	0,473	0,471	0,440	0,449	0,463	0,475	0,444	0,429
118	0,474	0,471	0,444	0,447	0,464	0,475	0,449	0,433
124	0,472	0,471	0,444	0,448	0,463	0,474	0,447	0,437
136	0,474	0,472	0,443	0,450	0,462	0,476	0,450	0,443
142	0,474	0,472	0,444	0,450	0,465	0,474	0,442	0,440
148	0,471	0,470	0,440	0,447	0,455	0,471	0,442	0,426
160	0,470	0,463	0,439	0,444	0,447	0,464	0,432	0,416
166	0,471	0,468	0,440	0,445	0,451	0,467	0,438	0,409
172	0,469	0,469	0,432	0,447	0,451	0,470	0,430	0,425
184	0,470	0,465	0,430	0,445	0,451	0,467	0,442	0,418
190	0,470	0,469	0,433	0,446	0,450	0,465	0,439	0,410
208	0,471	0,466	0,439	0,444	0,452	0,471	0,433	0,420
214	0,471	0,463	0,440	0,446	0,450	0,464	0,437	0,424
232	0,468	0,462	0,430	0,444	0,446	0,463	0,429	0,408
238	0,467	0,460	0,429	0,440	0,440	0,462	0,429	0,405
256	0,466	0,455	0,425	0,444	0,438	0,458	0,418	0,395
262	0,464	0,460	0,422	0,441	0,444	0,455	0,425	0,392
280	0,467	0,461	0,421	0,442	0,443	0,462	0,426	0,402
286	0,465	0,461	0,424	0,441	0,444	0,462	0,427	0,393
292	0,467	0,455	0,429	0,442	0,442	0,457	0,422	0,393
304	0,464	0,454	0,421	0,440	0,436	0,455	0,417	0,390

Tabela 44 – Concentração de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios colorimétricos contendo petróleo

Tempo (h)	A1			B1			S1		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0	0,508	0,518	0,499	0,518	0,493	0,506	0,502	0,506	0,496
4	0,501	0,516	0,504	0,513	0,464	0,489	0,512	0,463	0,487
16	0,517	0,520	0,500	0,508	0,460	0,484	0,492	0,445	0,468
22	0,519	0,515	0,493	0,502	0,454	0,478	0,452	0,409	0,431
28	0,495	0,503	0,493	0,496	0,449	0,473	0,416	0,377	0,396
40	0,499	0,504	0,511	0,487	0,441	0,464	0,347	0,315	0,331
46	0,493	0,496	0,503	0,479	0,434	0,457	0,323	0,292	0,308
52	0,488	0,467	0,462	0,459	0,415	0,437	0,273	0,248	0,260
64	0,483	0,457	0,452	0,457	0,413	0,435	0,246	0,223	0,235
70	0,480	0,465	0,451	0,452	0,409	0,431	0,229	0,208	0,219
76	0,484	0,461	0,452	0,449	0,407	0,428	0,224	0,203	0,213
88	0,484	0,456	0,460	0,429	0,389	0,409	0,208	0,188	0,198
94	0,481	0,459	0,451	0,409	0,370	0,389	0,192	0,174	0,183
100	0,479	0,454	0,444	0,393	0,356	0,375	0,178	0,161	0,169
112	0,471	0,448	0,436	0,373	0,337	0,355	0,175	0,159	0,167
118	0,477	0,453	0,439	0,367	0,333	0,350	0,153	0,138	0,146
124	0,479	0,449	0,442	0,350	0,317	0,333	0,172	0,156	0,164
136	0,471	0,443	0,434	0,321	0,290	0,306	0,138	0,125	0,131
142	0,476	0,450	0,431	0,308	0,279	0,293	0,127	0,115	0,121
148	0,471	0,442	0,426	0,284	0,257	0,271	0,090	0,082	0,086
160	0,471	0,439	0,409	0,272	0,246	0,259	0,089	0,081	0,085
166	0,470	0,432	0,415	0,242	0,219	0,231	0,077	0,070	0,073
172	0,463	0,434	0,421	0,221	0,200	0,211	0,056	0,059	0,055
184	0,467	0,431	0,409	0,197	0,179	0,188	0,044	0,045	0,047
190	0,465	0,432	0,414	0,184	0,167	0,175	0,048	0,044	0,051
208	0,465	0,437	0,422	0,173	0,156	0,165	0,039	0,046	0,036
214	0,466	0,437	0,426	0,170	0,154	0,162	0,041	0,047	0,050
232	0,463	0,429	0,408	0,156	0,141	0,149	0,043	0,036	0,051
238	0,459	0,429	0,399	0,113	0,103	0,108	0,046	0,039	0,046
256	0,457	0,427	0,393	0,128	0,116	0,122	0,033	0,023	0,030
262	0,456	0,420	0,404	0,090	0,082	0,086	0,020	0,021	0,032
280	0,455	0,429	0,399	0,074	0,067	0,070	0,030	0,027	0,025
286	0,459	0,417	0,394	0,059	0,053	0,056	0,027	0,024	0,035
292	0,461	0,423	0,392	0,056	0,053	0,052	0,032	0,025	0,020
304	0,455	0,417	0,390	0,026	0,020	0,030	0,026	0,030	0,032

Tabela 45 – Concentração de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios colorimétricos contendo óleo lubrificante sintético

Tempo (h)	A2			B2			S2		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0	0,497	0,502	0,506	0,499	0,499	0,497	0,509	0,497	0,497
4	0,506	0,458	0,482	0,488	0,473	0,498	0,517	0,468	0,493
16	0,502	0,454	0,478	0,483	0,468	0,493	0,512	0,464	0,488
22	0,495	0,448	0,472	0,477	0,462	0,487	0,503	0,456	0,479
28	0,490	0,443	0,466	0,472	0,457	0,481	0,481	0,435	0,458
40	0,480	0,435	0,458	0,463	0,449	0,472	0,465	0,421	0,443
46	0,473	0,428	0,451	0,456	0,442	0,465	0,437	0,395	0,416
52	0,453	0,410	0,431	0,436	0,423	0,445	0,401	0,363	0,382
64	0,451	0,408	0,429	0,434	0,421	0,443	0,393	0,356	0,374
70	0,446	0,404	0,425	0,430	0,417	0,439	0,380	0,344	0,362
76	0,444	0,402	0,423	0,427	0,414	0,436	0,375	0,340	0,357
88	0,424	0,384	0,404	0,408	0,396	0,416	0,367	0,333	0,350
94	0,403	0,365	0,384	0,388	0,377	0,396	0,356	0,322	0,339
100	0,388	0,351	0,370	0,374	0,363	0,381	0,341	0,309	0,325
112	0,368	0,333	0,350	0,354	0,344	0,362	0,317	0,287	0,302
118	0,363	0,328	0,345	0,349	0,339	0,356	0,295	0,268	0,281
124	0,345	0,313	0,329	0,333	0,323	0,340	0,291	0,263	0,277
136	0,317	0,287	0,302	0,305	0,296	0,311	0,275	0,249	0,262
142	0,304	0,275	0,289	0,293	0,284	0,298	0,255	0,231	0,243
148	0,280	0,254	0,267	0,270	0,262	0,276	0,248	0,225	0,236
160	0,268	0,243	0,256	0,258	0,251	0,264	0,225	0,204	0,214
166	0,239	0,216	0,228	0,230	0,223	0,235	0,193	0,175	0,184
172	0,218	0,198	0,208	0,210	0,204	0,215	0,172	0,156	0,164
184	0,194	0,176	0,185	0,187	0,182	0,191	0,164	0,149	0,157
190	0,182	0,165	0,173	0,175	0,170	0,179	0,124	0,112	0,118
208	0,170	0,154	0,162	0,164	0,159	0,168	0,121	0,109	0,115
214	0,168	0,152	0,160	0,162	0,157	0,165	0,109	0,099	0,104
232	0,154	0,139	0,147	0,148	0,144	0,151	0,086	0,078	0,082
238	0,112	0,102	0,107	0,108	0,105	0,110	0,058	0,057	0,053
256	0,126	0,114	0,120	0,122	0,118	0,124	0,042	0,044	0,045
262	0,089	0,081	0,085	0,086	0,083	0,088	0,049	0,044	0,047
280	0,088	0,080	0,084	0,070	0,068	0,071	0,041	0,040	0,051
286	0,067	0,061	0,064	0,056	0,056	0,053	0,032	0,041	0,039
292	0,069	0,063	0,066	0,028	0,020	0,036	0,037	0,033	0,031
304	0,054	0,057	0,052	0,026	0,022	0,021	0,026	0,033	0,035

Tabela 46 – Concentração de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios colorimétricos contendo óleo lubrificante usado

Tempo (h)	A3			B3			S3		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0	0,511	0,508	0,502	0,522	0,505	0,514	0,508	0,518	0,509
4	0,496	0,449	0,472	0,520	0,471	0,496	0,519	0,474	0,499
16	0,479	0,434	0,456	0,505	0,457	0,481	0,499	0,456	0,480
22	0,460	0,417	0,438	0,501	0,453	0,477	0,468	0,428	0,450
28	0,431	0,390	0,411	0,473	0,428	0,451	0,463	0,423	0,445
40	0,430	0,390	0,410	0,454	0,411	0,433	0,414	0,378	0,398
46	0,429	0,388	0,409	0,437	0,395	0,416	0,432	0,395	0,416
52	0,408	0,369	0,389	0,433	0,392	0,413	0,378	0,346	0,364
64	0,372	0,337	0,355	0,423	0,383	0,403	0,358	0,328	0,345
70	0,360	0,326	0,343	0,400	0,363	0,381	0,322	0,294	0,310
76	0,326	0,296	0,311	0,370	0,335	0,352	0,294	0,269	0,283
88	0,311	0,282	0,297	0,358	0,324	0,341	0,292	0,267	0,280
94	0,292	0,265	0,279	0,353	0,319	0,336	0,290	0,265	0,279
100	0,273	0,248	0,260	0,339	0,307	0,323	0,275	0,251	0,264
112	0,267	0,242	0,255	0,335	0,304	0,320	0,265	0,242	0,255
118	0,255	0,231	0,243	0,303	0,274	0,289	0,227	0,208	0,219
124	0,248	0,224	0,236	0,284	0,258	0,271	0,162	0,148	0,156
136	0,242	0,220	0,231	0,282	0,256	0,269	0,127	0,116	0,122
142	0,222	0,201	0,211	0,247	0,223	0,235	0,112	0,102	0,108
148	0,187	0,170	0,179	0,213	0,193	0,203	0,079	0,072	0,076
160	0,155	0,141	0,148	0,208	0,188	0,198	0,074	0,068	0,071
166	0,143	0,130	0,137	0,183	0,166	0,175	0,059	0,054	0,057
172	0,121	0,110	0,115	0,129	0,117	0,123	0,054	0,049	0,052
184	0,097	0,088	0,092	0,102	0,092	0,097	0,059	0,055	0,050
190	0,090	0,082	0,086	0,082	0,074	0,078	0,036	0,041	0,049
208	0,086	0,078	0,082	0,051	0,056	0,051	0,050	0,034	0,044
214	0,071	0,065	0,068	0,040	0,032	0,048	0,039	0,051	0,039
232	0,053	0,055	0,058	0,051	0,033	0,042	0,039	0,051	0,050
238	0,045	0,043	0,033	0,045	0,048	0,033	0,037	0,042	0,036
256	0,042	0,046	0,051	0,045	0,039	0,051	0,046	0,041	0,045
262	0,047	0,048	0,046	0,037	0,032	0,039	0,048	0,042	0,047
280	0,045	0,035	0,033	0,025	0,036	0,024	0,036	0,025	0,035
286	0,033	0,020	0,034	0,026	0,029	0,029	0,037	0,028	0,023
292	0,021	0,037	0,019	0,024	0,021	0,025	0,029	0,033	0,028
304	0,026	0,022	0,030	0,031	0,035	0,034	0,036	0,019	0,026

Tabela 47 – Concentração de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios colorimétricos contendo diesel

Tempo (h)	A4			B4			S4		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0	0,524	0,496	0,522	0,496	0,520	0,512	0,508	0,510	0,503
4	0,507	0,459	0,483	0,507	0,459	0,483	0,538	0,487	0,512
16	0,489	0,443	0,466	0,488	0,442	0,465	0,493	0,446	0,469
22	0,485	0,439	0,462	0,473	0,428	0,451	0,439	0,397	0,418
28	0,474	0,429	0,452	0,454	0,411	0,433	0,368	0,333	0,351
40	0,450	0,408	0,429	0,386	0,349	0,367	0,285	0,258	0,271
46	0,418	0,378	0,398	0,333	0,301	0,317	0,229	0,208	0,218
52	0,374	0,338	0,356	0,315	0,285	0,300	0,182	0,165	0,173
64	0,334	0,303	0,318	0,283	0,256	0,269	0,149	0,135	0,142
70	0,332	0,301	0,316	0,214	0,194	0,204	0,110	0,099	0,105
76	0,315	0,285	0,300	0,166	0,150	0,158	0,089	0,080	0,084
88	0,301	0,273	0,287	0,149	0,135	0,142	0,052	0,052	0,053
94	0,280	0,254	0,267	0,109	0,099	0,104	0,036	0,034	0,044
100	0,246	0,223	0,235	0,105	0,095	0,100	0,036	0,033	0,049
112	0,208	0,189	0,199	0,072	0,065	0,069	0,048	0,045	0,046
118	0,209	0,189	0,199	0,055	0,057	0,051	0,044	0,044	0,043
124	0,182	0,165	0,173	0,046	0,046	0,050	0,050	0,038	0,036
136	0,166	0,150	0,158	0,032	0,037	0,048	0,044	0,051	0,039
142	0,128	0,116	0,122	0,049	0,039	0,040	0,034	0,037	0,051
148	0,096	0,087	0,091	0,039	0,032	0,033	0,032	0,044	0,049
160	0,092	0,083	0,088	0,049	0,041	0,049	0,042	0,036	0,033
166	0,072	0,065	0,069	0,036	0,035	0,039	0,051	0,050	0,050
172	0,051	0,054	0,051	0,052	0,040	0,033	0,038	0,041	0,050
184	0,042	0,044	0,047	0,033	0,050	0,042	0,033	0,031	0,021
190	0,038	0,038	0,049	0,039	0,039	0,046	0,027	0,035	0,029
208	0,040	0,047	0,042	0,044	0,035	0,049	0,024	0,031	0,031
214	0,039	0,040	0,034	0,029	0,028	0,021	0,033	0,021	0,026
232	0,037	0,043	0,045	0,030	0,034	0,023	0,025	0,019	0,035
238	0,046	0,034	0,043	0,031	0,025	0,021	0,035	0,024	0,025
256	0,041	0,047	0,049	0,034	0,025	0,035	0,025	0,034	0,027
262	0,024	0,037	0,034	0,022	0,024	0,034	0,036	0,029	0,022
280	0,022	0,030	0,024	0,023	0,021	0,037	0,029	0,022	0,031
286	0,027	0,035	0,034	0,033	0,021	0,022	0,026	0,023	0,020
292	0,034	0,037	0,036	0,019	0,022	0,021	0,025	0,022	0,025
304	0,029	0,026	0,035	0,037	0,027	0,033	0,022	0,021	0,035

Tabela 48 – Concentração de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios colorimétricos contendo gasolina

Tempo (h)	A5			B5			S5		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0	0,503	0,507	0,514	0,499	0,514	0,512	0,505	0,509	0,518
4	0,521	0,495	0,503	0,511	0,462	0,487	0,550	0,450	0,500
16	0,506	0,493	0,498	0,490	0,443	0,467	0,523	0,429	0,476
22	0,512	0,522	0,511	0,473	0,428	0,450	0,517	0,423	0,470
28	0,519	0,504	0,508	0,450	0,408	0,429	0,495	0,405	0,450
40	0,513	0,509	0,521	0,429	0,388	0,409	0,467	0,383	0,425
46	0,525	0,507	0,496	0,386	0,349	0,367	0,428	0,351	0,389
52	0,488	0,467	0,462	0,338	0,306	0,322	0,359	0,294	0,327
64	0,480	0,456	0,454	0,286	0,259	0,272	0,360	0,295	0,328
70	0,483	0,456	0,450	0,212	0,192	0,202	0,298	0,244	0,271
76	0,487	0,456	0,450	0,180	0,163	0,171	0,278	0,228	0,253
88	0,481	0,466	0,456	0,131	0,119	0,125	0,241	0,197	0,219
94	0,485	0,463	0,461	0,063	0,057	0,060	0,181	0,148	0,165
100	0,479	0,454	0,444	0,059	0,054	0,058	0,134	0,110	0,122
112	0,478	0,447	0,432	0,037	0,051	0,044	0,111	0,091	0,101
118	0,472	0,452	0,428	0,034	0,051	0,032	0,057	0,056	0,060
124	0,473	0,449	0,428	0,036	0,048	0,033	0,043	0,049	0,034
136	0,474	0,451	0,428	0,034	0,034	0,049	0,047	0,041	0,038
142	0,474	0,452	0,439	0,045	0,048	0,033	0,040	0,042	0,046
148	0,471	0,442	0,426	0,038	0,036	0,046	0,037	0,038	0,043
160	0,466	0,430	0,417	0,048	0,038	0,048	0,034	0,047	0,050
166	0,469	0,430	0,423	0,035	0,036	0,043	0,045	0,043	0,047
172	0,466	0,437	0,420	0,036	0,048	0,042	0,033	0,039	0,036
184	0,466	0,440	0,421	0,044	0,051	0,048	0,045	0,043	0,046
190	0,467	0,434	0,415	0,032	0,034	0,025	0,033	0,046	0,047
208	0,466	0,431	0,422	0,024	0,032	0,030	0,044	0,041	0,046
214	0,466	0,434	0,413	0,035	0,034	0,028	0,024	0,027	0,026
232	0,463	0,429	0,408	0,026	0,029	0,021	0,023	0,031	0,019
238	0,461	0,427	0,406	0,022	0,020	0,021	0,022	0,021	0,033
256	0,461	0,429	0,407	0,020	0,021	0,025	0,021	0,029	0,028
262	0,463	0,428	0,407	0,028	0,021	0,023	0,023	0,023	0,035
280	0,459	0,428	0,406	0,022	0,022	0,033	0,026	0,037	0,025
286	0,459	0,428	0,406	0,031	0,029	0,029	0,029	0,025	0,031
292	0,459	0,428	0,407	0,024	0,023	0,031	0,030	0,023	0,030
304	0,458	0,427	0,406	0,019	0,022	0,020	0,024	0,036	0,036

Tabela 49 – Concentração de DCPIP (mg.L^{-1}) nos ensaios colorimétricos contendo querosene

Tempo (h)	A6			B6			S6		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0	0,502	0,504	0,510	0,498	0,519	0,519	0,492	0,501	0,519
4	0,509	0,513	0,498	0,502	0,454	0,478	0,477	0,432	0,454
16	0,493	0,522	0,523	0,401	0,363	0,382	0,437	0,396	0,416
22	0,512	0,505	0,521	0,399	0,361	0,380	0,367	0,332	0,349
28	0,502	0,523	0,517	0,332	0,301	0,317	0,349	0,316	0,333
40	0,505	0,502	0,508	0,315	0,285	0,300	0,301	0,273	0,287
46	0,507	0,505	0,505	0,327	0,296	0,311	0,334	0,303	0,318
52	0,488	0,467	0,462	0,332	0,301	0,317	0,344	0,312	0,328
64	0,481	0,464	0,460	0,418	0,379	0,398	0,419	0,380	0,400
70	0,480	0,466	0,454	0,387	0,350	0,369	0,461	0,417	0,439
76	0,481	0,455	0,451	0,447	0,405	0,426	0,487	0,465	0,467
88	0,484	0,463	0,455	0,476	0,431	0,454	0,486	0,466	0,453
94	0,483	0,457	0,454	0,488	0,467	0,462	0,488	0,463	0,454
100	0,479	0,454	0,444	0,482	0,463	0,456	0,479	0,454	0,444
112	0,476	0,449	0,443	0,487	0,456	0,455	0,479	0,443	0,427
118	0,473	0,449	0,431	0,487	0,464	0,458	0,475	0,446	0,428
124	0,475	0,446	0,444	0,484	0,464	0,445	0,473	0,452	0,430
136	0,479	0,447	0,431	0,488	0,467	0,454	0,478	0,443	0,433
142	0,477	0,445	0,434	0,479	0,454	0,444	0,479	0,445	0,438
148	0,471	0,442	0,426	0,472	0,452	0,435	0,471	0,442	0,426
160	0,468	0,432	0,414	0,479	0,452	0,434	0,463	0,430	0,418
166	0,470	0,433	0,423	0,474	0,454	0,427	0,465	0,435	0,411
172	0,470	0,432	0,418	0,474	0,446	0,433	0,464	0,439	0,425
184	0,470	0,438	0,421	0,474	0,445	0,437	0,464	0,430	0,412
190	0,471	0,438	0,411	0,471	0,442	0,426	0,467	0,430	0,413
208	0,467	0,432	0,415	0,469	0,436	0,421	0,471	0,438	0,408
214	0,467	0,432	0,416	0,465	0,434	0,422	0,468	0,432	0,411
232	0,463	0,429	0,408	0,465	0,441	0,412	0,463	0,429	0,408
238	0,453	0,426	0,401	0,471	0,432	0,421	0,452	0,406	0,397
256	0,448	0,410	0,406	0,466	0,441	0,417	0,448	0,403	0,401
262	0,457	0,401	0,393	0,470	0,432	0,411	0,444	0,418	0,407
280	0,460	0,427	0,403	0,453	0,460	0,451	0,445	0,418	0,391
286	0,439	0,420	0,395	0,448	0,458	0,458	0,444	0,425	0,406
292	0,443	0,423	0,398	0,451	0,458	0,456	0,460	0,409	0,392
304	0,438	0,400	0,390	0,444	0,456	0,445	0,438	0,400	0,390

Tabela 50 – Concentração de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios colorimétricos contendo fenol

Tempo (h)	A7			B7			S7		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0	0,518	0,522	0,497	0,524	0,512	0,524	0,506	0,514	0,507
4	0,506	0,501	0,501	0,507	0,505	0,512	0,497	0,521	0,500
16	0,505	0,500	0,516	0,498	0,521	0,499	0,502	0,513	0,512
22	0,519	0,505	0,519	0,497	0,497	0,492	0,500	0,506	0,498
28	0,514	0,513	0,502	0,493	0,503	0,494	0,493	0,509	0,514
40	0,512	0,498	0,505	0,504	0,495	0,500	0,524	0,525	0,503
46	0,511	0,514	0,502	0,494	0,525	0,514	0,511	0,506	0,523
52	0,479	0,485	0,491	0,497	0,502	0,508	0,514	0,520	0,526
64	0,476	0,485	0,479	0,496	0,477	0,495	0,476	0,503	0,478
70	0,477	0,480	0,475	0,484	0,479	0,500	0,478	0,507	0,479
76	0,478	0,484	0,477	0,483	0,478	0,508	0,477	0,501	0,475
88	0,476	0,477	0,476	0,482	0,476	0,502	0,478	0,503	0,476
94	0,476	0,483	0,478	0,482	0,478	0,485	0,478	0,495	0,478
100	0,475	0,477	0,479	0,481	0,483	0,485	0,487	0,489	0,491
112	0,472	0,476	0,472	0,472	0,479	0,482	0,483	0,478	0,491
118	0,474	0,477	0,477	0,475	0,475	0,477	0,472	0,488	0,473
124	0,472	0,477	0,478	0,476	0,471	0,474	0,477	0,473	0,491
136	0,473	0,475	0,477	0,472	0,483	0,482	0,483	0,487	0,473
142	0,474	0,477	0,472	0,475	0,481	0,472	0,476	0,472	0,482
148	0,471	0,471	0,471	0,471	0,471	0,471	0,471	0,471	0,471
160	0,469	0,469	0,467	0,470	0,461	0,463	0,463	0,460	0,459
166	0,469	0,471	0,469	0,468	0,468	0,463	0,466	0,464	0,466
172	0,468	0,470	0,469	0,464	0,463	0,460	0,467	0,462	0,466
184	0,468	0,467	0,465	0,468	0,463	0,462	0,461	0,468	0,470
190	0,470	0,469	0,467	0,471	0,466	0,461	0,461	0,470	0,468
208	0,469	0,468	0,465	0,466	0,463	0,463	0,462	0,468	0,458
214	0,469	0,469	0,471	0,468	0,470	0,467	0,471	0,470	0,469
232	0,468	0,466	0,465	0,463	0,461	0,460	0,458	0,457	0,455
238	0,458	0,460	0,458	0,458	0,461	0,453	0,447	0,451	0,453
256	0,460	0,462	0,463	0,450	0,458	0,453	0,454	0,452	0,451
262	0,465	0,461	0,456	0,460	0,452	0,447	0,452	0,456	0,450
280	0,467	0,464	0,456	0,457	0,456	0,450	0,455	0,455	0,448
286	0,468	0,463	0,464	0,462	0,460	0,453	0,448	0,451	0,445
292	0,457	0,463	0,459	0,462	0,455	0,446	0,455	0,453	0,451
304	0,456	0,457	0,456	0,450	0,445	0,444	0,445	0,449	0,445

Tabela 51 – Concentração de DCPIP (mg.L^{-1}) nos ensaios colorimétricos contendo óleo vegetal

Tempo (h)	A8			B8			S8		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0	0,496	0,510	0,506	0,518	0,512	0,492	0,519	0,517	0,520
4	0,529	0,433	0,481	0,466	0,485	0,462	0,499	0,452	0,476
16	0,499	0,409	0,454	0,427	0,444	0,422	0,457	0,414	0,435
22	0,506	0,414	0,460	0,378	0,393	0,374	0,404	0,366	0,385
28	0,439	0,360	0,400	0,342	0,356	0,339	0,367	0,332	0,349
40	0,350	0,286	0,318	0,307	0,319	0,303	0,328	0,297	0,313
46	0,334	0,273	0,303	0,271	0,282	0,268	0,290	0,263	0,277
52	0,224	0,184	0,204	0,205	0,214	0,203	0,220	0,199	0,210
64	0,183	0,150	0,166	0,145	0,151	0,144	0,155	0,141	0,148
70	0,161	0,132	0,147	0,075	0,078	0,074	0,080	0,073	0,076
76	0,116	0,096	0,106	0,059	0,060	0,051	0,059	0,050	0,052
88	0,098	0,081	0,090	0,041	0,036	0,041	0,038	0,038	0,051
94	0,079	0,065	0,072	0,042	0,051	0,051	0,045	0,034	0,037
100	0,056	0,052	0,057	0,043	0,035	0,044	0,039	0,039	0,032
112	0,035	0,042	0,035	0,035	0,044	0,047	0,037	0,046	0,036
118	0,040	0,033	0,033	0,042	0,041	0,050	0,036	0,051	0,033
124	0,035	0,035	0,039	0,049	0,037	0,052	0,044	0,047	0,036
136	0,037	0,033	0,037	0,035	0,040	0,048	0,036	0,044	0,039
142	0,042	0,041	0,040	0,043	0,036	0,048	0,036	0,044	0,040
148	0,043	0,042	0,043	0,037	0,038	0,040	0,041	0,051	0,047
160	0,036	0,043	0,034	0,039	0,050	0,041	0,045	0,048	0,048
166	0,037	0,045	0,039	0,046	0,035	0,044	0,042	0,049	0,042
172	0,048	0,035	0,039	0,049	0,051	0,048	0,034	0,036	0,039
184	0,038	0,050	0,038	0,024	0,021	0,032	0,025	0,035	0,026
190	0,037	0,046	0,034	0,036	0,032	0,034	0,022	0,028	0,026
208	0,047	0,044	0,037	0,021	0,027	0,034	0,020	0,032	0,032
214	0,022	0,029	0,028	0,022	0,023	0,019	0,021	0,034	0,028
232	0,022	0,028	0,026	0,022	0,028	0,036	0,028	0,022	0,030
238	0,034	0,033	0,019	0,031	0,021	0,037	0,029	0,024	0,024
256	0,032	0,020	0,028	0,021	0,028	0,032	0,029	0,021	0,037
262	0,022	0,036	0,025	0,036	0,029	0,028	0,027	0,031	0,033
280	0,035	0,032	0,035	0,024	0,035	0,032	0,022	0,035	0,020
286	0,022	0,024	0,021	0,036	0,023	0,025	0,032	0,032	0,034
292	0,034	0,032	0,024	0,025	0,020	0,037	0,033	0,026	0,037
304	0,035	0,026	0,019	0,019	0,023	0,020	0,032	0,031	0,020

Tabela 52 – Concentração de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios colorimétricos contendo óleo vegetal usado

Tempo (h)	A9			B9			S9		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0	0,507	0,505	0,508	0,497	0,519	0,496	0,498	0,492	0,515
4	0,541	0,443	0,492	0,533	0,436	0,484	0,517	0,424	0,471
16	0,540	0,442	0,491	0,542	0,444	0,493	0,479	0,392	0,435
22	0,495	0,406	0,450	0,497	0,407	0,452	0,457	0,375	0,416
28	0,436	0,357	0,396	0,483	0,396	0,440	0,345	0,283	0,314
40	0,395	0,324	0,359	0,467	0,383	0,425	0,259	0,213	0,236
46	0,333	0,273	0,303	0,330	0,270	0,300	0,180	0,148	0,164
52	0,225	0,184	0,205	0,246	0,202	0,224	0,095	0,078	0,086
64	0,134	0,110	0,122	0,154	0,126	0,140	0,059	0,054	0,050
70	0,129	0,106	0,117	0,076	0,062	0,069	0,046	0,049	0,052
76	0,094	0,078	0,086	0,051	0,053	0,058	0,051	0,032	0,034
88	0,057	0,057	0,057	0,051	0,040	0,038	0,039	0,047	0,040
94	0,047	0,032	0,036	0,034	0,044	0,038	0,032	0,049	0,043
100	0,043	0,041	0,038	0,032	0,039	0,047	0,035	0,041	0,051
112	0,042	0,051	0,035	0,051	0,045	0,036	0,049	0,048	0,041
118	0,049	0,034	0,037	0,033	0,040	0,039	0,034	0,046	0,041
124	0,043	0,043	0,045	0,041	0,041	0,040	0,043	0,047	0,044
136	0,033	0,047	0,036	0,038	0,043	0,048	0,049	0,039	0,046
142	0,038	0,043	0,044	0,047	0,048	0,044	0,048	0,041	0,036
148	0,032	0,040	0,047	0,039	0,048	0,038	0,045	0,037	0,036
160	0,049	0,034	0,051	0,042	0,041	0,034	0,051	0,041	0,044
166	0,034	0,048	0,033	0,038	0,041	0,047	0,033	0,047	0,050
172	0,049	0,049	0,035	0,032	0,040	0,046	0,024	0,031	0,031
184	0,043	0,049	0,037	0,046	0,042	0,040	0,030	0,021	0,031
190	0,022	0,026	0,026	0,025	0,020	0,030	0,032	0,027	0,023
208	0,023	0,034	0,025	0,021	0,028	0,034	0,028	0,030	0,022
214	0,024	0,027	0,031	0,020	0,033	0,028	0,036	0,025	0,028
232	0,025	0,027	0,022	0,027	0,021	0,022	0,034	0,032	0,024
238	0,026	0,027	0,027	0,033	0,025	0,030	0,036	0,020	0,025
256	0,026	0,020	0,036	0,023	0,027	0,033	0,020	0,020	0,024
262	0,025	0,036	0,027	0,036	0,034	0,030	0,030	0,023	0,034
280	0,020	0,019	0,021	0,034	0,028	0,028	0,028	0,027	0,032
286	0,036	0,021	0,027	0,025	0,020	0,034	0,024	0,027	0,028
292	0,031	0,032	0,037	0,036	0,025	0,037	0,034	0,026	0,019
304	0,032	0,036	0,021	0,034	0,023	0,023	0,026	0,031	0,029

Tabela 53 – Concentração de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios colorimétricos contendo biodiesel

Tempo (h)	A10			B10			S10		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0	0,490	0,486	0,497	0,464	0,502	0,487	0,489	0,483	0,498
4	0,444	0,417	0,429	0,421	0,420	0,410	0,418	0,407	0,421
16	0,429	0,398	0,410	0,393	0,392	0,388	0,379	0,398	0,392
22	0,435	0,410	0,418	0,358	0,356	0,343	0,355	0,345	0,345
28	0,428	0,397	0,410	0,183	0,169	0,160	0,194	0,153	0,146
40	0,415	0,385	0,402	0,057	0,089	0,106	0,080	0,065	0,068
46	0,416	0,382	0,335	0,079	0,103	0,093	0,073	0,041	0,053
52	0,412	0,356	0,309	0,074	0,059	0,058	0,062	0,040	0,034
64	0,324	0,217	0,271	0,035	0,055	0,042	0,052	0,055	0,035
70	0,255	0,171	0,213	0,046	0,037	0,059	0,049	0,044	0,045
76	0,158	0,106	0,132	0,039	0,042	0,035	0,044	0,048	0,046
88	0,113	0,076	0,094	0,035	0,052	0,041	0,034	0,040	0,057
94	0,101	0,068	0,084	0,056	0,044	0,051	0,056	0,045	0,045
100	0,090	0,061	0,075	0,053	0,042	0,058	0,038	0,040	0,042
112	0,051	0,052	0,057	0,039	0,059	0,036	0,051	0,047	0,033
118	0,046	0,059	0,053	0,041	0,037	0,049	0,048	0,052	0,053
124	0,049	0,059	0,056	0,053	0,041	0,042	0,052	0,050	0,051
136	0,057	0,039	0,059	0,052	0,051	0,048	0,058	0,038	0,046
142	0,049	0,036	0,060	0,038	0,053	0,045	0,059	0,039	0,060
148	0,040	0,036	0,053	0,035	0,032	0,033	0,043	0,042	0,058
160	0,035	0,053	0,059	0,046	0,033	0,049	0,033	0,054	0,040
166	0,036	0,051	0,058	0,054	0,047	0,041	0,032	0,035	0,038
172	0,042	0,043	0,043	0,036	0,039	0,039	0,054	0,055	0,041
184	0,047	0,042	0,059	0,053	0,048	0,048	0,037	0,037	0,034
190	0,054	0,058	0,035	0,052	0,056	0,036	0,040	0,036	0,054
208	0,050	0,060	0,047	0,046	0,052	0,053	0,041	0,056	0,042
214	0,057	0,043	0,056	0,043	0,057	0,052	0,050	0,054	0,038
232	0,053	0,051	0,058	0,038	0,054	0,056	0,059	0,051	0,044
238	0,053	0,035	0,036	0,054	0,058	0,039	0,044	0,043	0,044
256	0,036	0,039	0,046	0,034	0,049	0,055	0,056	0,049	0,045
262	0,059	0,059	0,044	0,044	0,054	0,042	0,039	0,046	0,035
280	0,041	0,052	0,060	0,054	0,037	0,041	0,050	0,054	0,057
286	0,041	0,039	0,034	0,052	0,059	0,060	0,058	0,043	0,056
292	0,052	0,038	0,038	0,059	0,032	0,057	0,060	0,052	0,044
304	0,055	0,059	0,058	0,048	0,048	0,039	0,032	0,052	0,055

Tabela 54 – Concentração média de DCPIP (mg.L^{-1}) nos ensaios controle

Tempo (h)	Concentração				Desvio Padrão			
	C0	C1	C2	C3	C0	C1	C2	C3
0	0,503398	0,512374	0,521431	0,515719	0,012	0,159	0,04	0,19
4	0,505356	0,502255	0,506662	0,498338	0,033	0,042	0,001	0,05
16	0,497604	0,491974	0,495809	0,486751	0,101	0,16	0,151	0,117
22	0,497196	0,491321	0,497686	0,475572	0,14	0,117	0,167	0,173
28	0,49434	0,487812	0,491729	0,470921	0,011	0,052	0,135	0,183
40	0,490913	0,473695	0,490505	0,477367	0,017	0,169	0,036	0,182
46	0,484385	0,460639	0,483242	0,462108	0,151	0,151	0,024	0,156
52	0,481855	0,457049	0,481202	0,464556	0,13	0,083	0,061	0,092
64	0,479652	0,452071	0,476714	0,461537	0,095	0,184	0,077	0,149
70	0,476388	0,455743	0,477286	0,457049	0,18	0,176	0,103	0,013
76	0,479407	0,454356	0,477367	0,460231	0,173	0,093	0,099	0,13
88	0,48006	0,453622	0,47802	0,451745	0,183	0,101	0,155	0,054
94	0,477612	0,455662	0,473287	0,458436	0,157	0,13	0,152	0,115
100	0,476204	0,450398	0,472206	0,449215	0,024	0,066	0,128	0,167
112	0,471818	0,444809	0,468799	0,436894	0,01	0,001	0,082	0,025
118	0,47239	0,445543	0,469044	0,441137	0,087	0,026	0,148	0,048
124	0,471492	0,446114	0,468718	0,442034	0,094	0,099	0,049	0,133
136	0,473042	0,446359	0,468718	0,446686	0,17	0,127	0,052	0,138
142	0,472553	0,446767	0,469534	0,441137	0,189	0,036	0,062	0,081
148	0,470554	0,443748	0,46321	0,433874	0,037	0,078	0,099	0,138
160	0,466596	0,441545	0,455498	0,424327	0,111	0,142	0,034	0,049
166	0,469452	0,442524	0,459252	0,423593	0,068	0,17	0,046	0,148
172	0,469044	0,439586	0,460721	0,427591	0,181	0,058	0,165	0,153
184	0,467575	0,437954	0,458762	0,429794	0,133	0,067	0,105	0,141
190	0,469534	0,43975	0,45713	0,424409	0,125	0,171	0,044	0,083
208	0,468718	0,441626	0,461047	0,42653	0,144	0,025	0,124	0,027
214	0,467086	0,442606	0,456804	0,430774	0,074	0,076	0,058	0,04
232	0,464903	0,437098	0,454213	0,418534	0,068	0,135	0,145	0,037
238	0,463495	0,43469	0,451418	0,416983	0,19	0,119	0,092	0,181
256	0,460558	0,434446	0,448318	0,40613	0,05	0,075	0,179	0,032
262	0,462271	0,43159	0,449297	0,408415	0,132	0,157	0,162	0,152
280	0,464066	0,43159	0,452479	0,413719	0,181	0,005	0,059	0,123
286	0,462761	0,432569	0,452806	0,409639	0,001	0,01	0,023	0,132
292	0,461047	0,435425	0,449786	0,407518	0,004	0,157	0,173	0,161
304	0,459252	0,430447	0,445217	0,403193	0,007	0,153	0,189	0,098

Tabela 55 – Concentração média de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios contendo petróleo

Tempo (h)	Concentração			Desvio Padrão		
	A1	B1	S1	A1	B1	S1
0	0,508	0,506	0,501	0,08	0,046	0,137
4	0,507	0,489	0,487	0,122	0,125	0,167
16	0,512	0,484	0,468	0,161	0,106	0,172
22	0,509	0,478	0,431	0,066	0,18	0,054
28	0,497	0,473	0,396	0,021	0,042	0,086
40	0,505	0,464	0,331	0,039	0,133	0,004
46	0,497	0,457	0,308	0,19	0,155	0,101
52	0,472	0,437	0,260	0,136	0,133	0,044
64	0,464	0,435	0,235	0,127	0,151	0,104
70	0,465	0,431	0,219	0,152	0,068	0,112
76	0,466	0,428	0,213	0,007	0,057	0,184
88	0,467	0,409	0,198	0,077	0,11	0,039
94	0,464	0,389	0,183	0,034	0,121	0,013
100	0,459	0,375	0,169	0,009	0,106	0,068
112	0,452	0,355	0,167	0,007	0,085	0,173
118	0,457	0,350	0,146	0,169	0,056	0,037
124	0,457	0,333	0,164	0,111	0,128	0,033
136	0,449	0,306	0,131	0,19	0,091	0,095
142	0,452	0,293	0,121	0,062	0,037	0,174
148	0,446	0,271	0,086	0,013	0,048	0,107
160	0,440	0,259	0,085	0,045	0,099	0,063
166	0,439	0,231	0,073	0,148	0,075	0,176
172	0,439	0,211	0,057	0,153	0,038	0,17
184	0,436	0,188	0,045	0,171	0,012	0,17
190	0,437	0,175	0,048	0,146	0,039	0,154
208	0,441	0,165	0,040	0,165	0,079	0,04
214	0,443	0,162	0,046	0,07	0,035	0,103
232	0,433	0,149	0,043	0,078	0,005	0,093
238	0,429	0,108	0,044	0,056	0,061	0,085
256	0,425	0,122	0,029	0,043	0,022	0,061
262	0,427	0,086	0,025	0,096	0,082	0,1
280	0,428	0,070	0,027	0,162	0,17	0,081
286	0,423	0,056	0,028	0,078	0,028	0,042
292	0,425	0,054	0,025	0,027	0,103	0,17
304	0,420	0,026	0,030	0,13	0,125	0,012

Células em azul representam os frascos incolores

Tabela 56 – Concentração média de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios contendo óleo lubrificante

Tempo (h)	Concentração			Desvio Padrão		
	A2	B2	S2	A2	B2	S2
0	0,502	0,498	0,501	0,182	0,065	0,176
4	0,482	0,486	0,493	0,08	0,087	0,044
16	0,478	0,482	0,488	0,085	0,175	0,016
22	0,472	0,475	0,479	0,18	0,013	0,052
28	0,466	0,470	0,458	0,119	0,138	0,116
40	0,458	0,461	0,443	0,077	0,024	0,119
46	0,451	0,454	0,416	0,024	0,185	0,142
52	0,431	0,435	0,382	0,14	0,19	0,026
64	0,429	0,433	0,374	0,043	0,002	0,064
70	0,425	0,429	0,362	0,107	0,106	0,056
76	0,423	0,426	0,357	0,113	0,143	0,166
88	0,404	0,407	0,350	0,132	0,063	0,007
94	0,384	0,387	0,339	0,119	0,146	0,151
100	0,370	0,373	0,325	0,005	0,189	0,14
112	0,350	0,353	0,302	0,104	0,185	0,152
118	0,345	0,348	0,281	0,02	0,097	0,033
124	0,329	0,332	0,277	0,172	0,155	0,107
136	0,302	0,304	0,262	0,041	0,137	0,177
142	0,289	0,292	0,243	0,16	0,076	0,122
148	0,267	0,269	0,236	0,119	0,137	0,093
160	0,256	0,258	0,214	0,184	0,18	0,164
166	0,228	0,230	0,184	0,121	0,003	0,018
172	0,208	0,210	0,164	0,004	0,063	0,002
184	0,185	0,187	0,157	0,18	0,147	0,155
190	0,173	0,175	0,118	0,162	0,112	0,001
208	0,162	0,164	0,115	0,131	0,017	0,062
214	0,160	0,161	0,104	0,079	0,106	0,146
232	0,147	0,148	0,082	0,089	0,14	0,091
238	0,107	0,108	0,056	0,126	0,065	0,085
256	0,120	0,121	0,043	0,051	0,167	0,167
262	0,085	0,086	0,047	0,052	0,153	0,068
280	0,084	0,070	0,044	0,116	0,061	0,118
286	0,064	0,055	0,037	0,077	0,09	0,088
292	0,066	0,028	0,034	0,118	0,088	0,172
304	0,054	0,023	0,032	0,162	0,109	0,149

Células em azul representam os frascos incolores

Tabela 57 – Concentração média de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios contendo óleo lubrificante usado

Tempo (h)	Concentração			Desvio Padrão		
	A3	B3	S3	A3	B3	S3
0	0,507	0,513	0,512	0,072	0,075	0,159
4	0,472	0,496	0,497	0,155	0,061	0,012
16	0,456	0,481	0,478	0,052	0,119	0,078
22	0,438	0,477	0,449	0,133	0,098	0,1
28	0,411	0,451	0,444	0,025	0,068	0,058
40	0,410	0,433	0,397	0,109	0,072	0,133
46	0,409	0,416	0,414	0,13	0,006	0,004
52	0,389	0,413	0,362	0,026	0,129	0,109
64	0,355	0,403	0,344	0,072	0,085	0,067
70	0,343	0,381	0,308	0,078	0,024	0,024
76	0,311	0,352	0,282	0,049	0,045	0,18
88	0,297	0,341	0,280	0,167	0,137	0,086
94	0,279	0,336	0,278	0,032	0,084	0,036
100	0,260	0,323	0,263	0,121	0,157	0,03
112	0,255	0,320	0,254	0,083	0,122	0,155
118	0,243	0,289	0,218	0,05	0,153	0,042
124	0,236	0,271	0,156	0,177	0,153	0,173
136	0,231	0,269	0,122	0,138	0,024	0,041
142	0,211	0,235	0,107	0,066	0,022	0,001
148	0,179	0,203	0,076	0,049	0,083	0,126
160	0,148	0,198	0,071	0,024	0,011	0,142
166	0,137	0,175	0,057	0,123	0,072	0,067
172	0,115	0,123	0,051	0,011	0,059	0,155
184	0,092	0,097	0,055	0,022	0,146	0,147
190	0,086	0,078	0,042	0,095	0,015	0,058
208	0,082	0,053	0,043	0,076	0,098	0,157
214	0,068	0,040	0,043	0,073	0,027	0,073
232	0,055	0,042	0,047	0,167	0,122	0,045
238	0,041	0,042	0,038	0,12	0,05	0,094
256	0,046	0,045	0,044	0,023	0,026	0,087
262	0,047	0,036	0,046	0,079	0,165	0,121
280	0,038	0,028	0,032	0,182	0,187	0,002
286	0,029	0,028	0,029	0,023	0,019	0,13
292	0,026	0,023	0,030	0,109	0,17	0,024
304	0,026	0,033	0,027	0,027	0,028	0,111

Células em azul representam os frascos incolores

Tabela 58 – Concentração média de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios contendo diesel

Tempo (h)	Concentração			Desvio Padrão		
	A4	B4	S4	A4	B4	S4
0	0,514	0,509	0,507	0,041	0,023	0,127
4	0,483	0,483	0,512	0,127	0,142	0,018
16	0,466	0,465	0,469	0,124	0,085	0,187
22	0,462	0,451	0,418	0,048	0,136	0,155
28	0,452	0,433	0,351	0,008	0,143	0,069
40	0,429	0,367	0,271	0,05	0,05	0,109
46	0,398	0,317	0,218	0,08	0,059	0,145
52	0,356	0,300	0,173	0,125	0,095	0,033
64	0,318	0,269	0,142	0,102	0,147	0,062
70	0,316	0,204	0,105	0,118	0,114	0,049
76	0,300	0,158	0,084	0,168	0,1	0,131
88	0,287	0,142	0,052	0,121	0,07	0,039
94	0,267	0,104	0,038	0,053	0,032	0,175
100	0,235	0,100	0,039	0,007	0,152	0,171
112	0,199	0,069	0,046	0,107	0,187	0,171
118	0,199	0,054	0,044	0,039	0,01	0,059
124	0,173	0,047	0,041	0,153	0,019	0,152
136	0,158	0,039	0,045	0,15	0,064	0,182
142	0,122	0,043	0,041	0,072	0,081	0,1
148	0,091	0,035	0,042	0,111	0,157	0,088
160	0,088	0,046	0,037	0,077	0,146	0,09
166	0,069	0,036	0,050	0,08	0,132	0,147
172	0,052	0,042	0,043	0,165	0,178	0,177
184	0,045	0,042	0,028	0,179	0,058	0,109
190	0,041	0,041	0,030	0,09	0,158	0,128
208	0,043	0,043	0,029	0,169	0,146	0,106
214	0,038	0,026	0,026	0,138	0,016	0,113
232	0,042	0,029	0,026	0,024	0,174	0,085
238	0,041	0,025	0,028	0,185	0,173	0,021
256	0,045	0,031	0,028	0,073	0,045	0,181
262	0,032	0,027	0,029	0,166	0,117	0,025
280	0,025	0,027	0,027	0,088	0,023	0,126
286	0,032	0,025	0,023	0,178	0,076	0,112
292	0,036	0,021	0,024	0,145	0,039	0,089
304	0,030	0,032	0,026	0,057	0,128	0,174

Células em azul representam os frascos incolores

Tabela 59 – Concentração média de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios contendo gasolina

Tempo (h)	Concentração			Desvio Padrão		
	A5	B5	S5	A5	B5	S5
0	0,508	0,508	0,510	0,054	0,078	0,106
4	0,506	0,487	0,500	0,13	0,186	0,124
16	0,499	0,467	0,476	0,007	0,127	0,154
22	0,515	0,450	0,470	0,103	0,166	0,122
28	0,510	0,429	0,450	0,017	0,092	0,184
40	0,514	0,409	0,425	0,023	0,139	0,088
46	0,509	0,367	0,389	0,086	0,053	0,098
52	0,472	0,322	0,327	0,087	0,08	0,024
64	0,464	0,272	0,328	0,146	0,156	0,121
70	0,463	0,202	0,271	0,082	0,03	0,122
76	0,464	0,171	0,253	0,14	0,119	0,189
88	0,468	0,125	0,219	0,02	0,096	0,001
94	0,470	0,060	0,165	0,076	0,105	0,19
100	0,459	0,057	0,122	0,153	0,12	0,025
112	0,452	0,044	0,101	0,031	0,132	0,055
118	0,451	0,039	0,058	0,02	0,093	0,181
124	0,450	0,039	0,042	0,13	0,025	0,153
136	0,451	0,039	0,042	0,071	0,061	0,135
142	0,455	0,042	0,043	0,139	0,041	0,036
148	0,446	0,040	0,040	0,178	0,025	0,05
160	0,438	0,045	0,044	0,115	0,113	0,181
166	0,441	0,038	0,045	0,007	0,138	0,054
172	0,441	0,042	0,036	0,125	0,168	0,126
184	0,442	0,048	0,045	0,19	0,122	0,09
190	0,439	0,030	0,042	0,001	0,155	0,005
208	0,440	0,029	0,043	0,158	0,072	0,183
214	0,438	0,032	0,026	0,082	0,13	0,104
232	0,433	0,025	0,024	0,029	0,03	0,019
238	0,432	0,021	0,026	0,125	0,014	0,091
256	0,432	0,022	0,026	0,094	0,154	0,13
262	0,432	0,024	0,027	0,16	0,001	0,143
280	0,431	0,026	0,029	0,05	0,021	0,017
286	0,431	0,030	0,028	0,133	0,101	0,179
292	0,431	0,026	0,028	0,176	0,009	0,005
304	0,430	0,020	0,032	0,162	0,129	0,019

Células em azul representam os frascos incolores

Células em vermelho não apresentaram mudança de cor até o final do experimento

Tabela 60 – Concentração média de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios contendo querosene

Tempo (h)	Concentração			Desvio Padrão		
	A6	B6	S6	A6	B6	S6
0	0,506	0,512	0,504	0,131	0,096	0,174
4	0,507	0,478	0,454	0,081	0,167	0,036
16	0,513	0,382	0,416	0,116	0,054	0,07
22	0,513	0,380	0,349	0,099	0,024	0,132
28	0,514	0,317	0,333	0,082	0,04	0,085
40	0,505	0,300	0,287	0,033	0,164	0,046
46	0,506	0,311	0,318	0,105	0,165	0,037
52	0,472	0,317	0,328	0,001	0,005	0,024
64	0,468	0,398	0,400	0,035	0,175	0,107
70	0,467	0,369	0,439	0,008	0,053	0,098
76	0,462	0,426	0,473	0,168	0,146	0,178
88	0,467	0,454	0,468	0,189	0,15	0,157
94	0,465	0,472	0,468	0,124	0,126	0,162
100	0,459	0,467	0,459	0,072	0,119	0,099
112	0,456	0,466	0,450	0,06	0,004	0,154
118	0,451	0,470	0,450	0,142	0,181	0,051
124	0,455	0,465	0,452	0,189	0,179	0,072
136	0,452	0,469	0,451	0,065	0,1	0,125
142	0,452	0,459	0,454	0,07	0,146	0,106
148	0,446	0,453	0,446	0,154	0,066	0,084
160	0,438	0,455	0,437	0,188	0,152	0,147
166	0,442	0,452	0,437	0,1	0,173	0,001
172	0,440	0,451	0,443	0,02	0,084	0,177
184	0,443	0,452	0,435	0,044	0,14	0,036
190	0,440	0,446	0,437	0,091	0,088	0,131
208	0,438	0,442	0,439	0,181	0,057	0,176
214	0,438	0,440	0,437	0,13	0,092	0,153
232	0,433	0,439	0,433	0,099	0,138	0,016
238	0,427	0,441	0,419	0,026	0,072	0,125
256	0,421	0,441	0,417	0,067	0,176	0,112
262	0,417	0,438	0,423	0,075	0,138	0,093
280	0,430	0,455	0,418	0,037	0,117	0,01
286	0,418	0,455	0,425	0,045	0,022	0,067
292	0,421	0,455	0,421	0,045	0,084	0,011
304	0,409	0,448	0,409	0,189	0,008	0,182

Células em azul representam os frascos incolores

Células em vermelho não apresentaram mudança de cor até o final do experimento

Tabela 61 – Concentração média de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios contendo fenol

Tempo (h)	Concentração			Desvio Padrão		
	A7	B7	S7	A7	B7	S7
0	0,512	0,520	0,509	0,06	0,181	0,156
4	0,503	0,508	0,506	0,12	0,056	0,184
16	0,507	0,506	0,509	0,037	0,129	0,159
22	0,514	0,495	0,501	0,042	0,119	0,122
28	0,510	0,497	0,505	0,03	0,099	0,147
40	0,505	0,500	0,517	0,059	0,145	0,065
46	0,509	0,511	0,513	0,025	0,02	0,15
52	0,485	0,502	0,520	0,06	0,06	0,101
64	0,480	0,489	0,486	0,028	0,037	0,002
70	0,477	0,488	0,488	0,124	0,175	0,016
76	0,479	0,489	0,484	0,129	0,028	0,051
88	0,476	0,487	0,486	0,156	0,147	0,035
94	0,479	0,482	0,483	0,012	0,19	0,071
100	0,477	0,483	0,489	0,008	0,072	0,05
112	0,473	0,477	0,484	0,057	0,055	0,115
118	0,476	0,476	0,478	0,014	0,187	0,08
124	0,476	0,474	0,480	0,081	0,099	0,063
136	0,475	0,479	0,481	0,083	0,187	0,065
142	0,474	0,476	0,477	0,016	0,153	0,053
148	0,471	0,471	0,471	0,124	0,082	0,152
160	0,468	0,465	0,461	0,109	0,019	0,109
166	0,470	0,466	0,465	0,004	0,148	0,057
172	0,469	0,462	0,465	0,048	0,056	0,184
184	0,467	0,464	0,466	0,057	0,095	0,066
190	0,469	0,466	0,466	0,043	0,106	0,125
208	0,468	0,464	0,463	0,045	0,014	0,101
214	0,469	0,468	0,470	0,021	0,145	0,022
232	0,466	0,461	0,457	0,153	0,09	0,095
238	0,458	0,457	0,450	0,175	0,129	0,047
256	0,462	0,454	0,452	0,099	0,015	0,018
262	0,461	0,453	0,453	0,151	0,022	0,173
280	0,462	0,454	0,452	0,142	0,081	0,004
286	0,465	0,458	0,448	0,096	0,154	0,022
292	0,460	0,455	0,453	0,142	0,071	0,129
304	0,457	0,446	0,446	0,088	0,053	0,162

Células em vermelho não apresentaram mudança de cor até o final do experimento

Tabela 62 – Concentração média de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios contendo óleo vegetal

Tempo (h)	Concentração			Desvio Padrão		
	A8	B8	S8	A8	B8	S8
0	0,504	0,507	0,519	0,133	0,032	0,051
4	0,481	0,471	0,476	0,056	0,005	0,063
16	0,454	0,431	0,435	0,091	0,022	0,178
22	0,460	0,381	0,385	0,166	0,093	0,012
28	0,400	0,346	0,349	0,061	0,047	0,124
40	0,318	0,310	0,313	0,053	0,074	0,177
46	0,303	0,274	0,277	0,144	0,05	0,185
52	0,204	0,208	0,210	0,081	0,066	0,19
64	0,166	0,146	0,148	0,062	0,09	0,01
70	0,147	0,076	0,076	0,169	0,066	0,161
76	0,106	0,057	0,054	0,049	0,033	0,117
88	0,090	0,039	0,042	0,099	0,158	0,013
94	0,072	0,048	0,039	0,122	0,093	0,134
100	0,055	0,041	0,037	0,096	0,004	0,081
112	0,037	0,042	0,040	0,085	0,049	0,183
118	0,035	0,044	0,040	0,095	0,067	0,093
124	0,036	0,046	0,042	0,059	0,03	0,089
136	0,036	0,041	0,040	0,085	0,007	0,058
142	0,041	0,042	0,040	0,018	0,153	0,088
148	0,043	0,038	0,046	0,021	0,086	0,029
160	0,038	0,043	0,047	0,123	0,112	0,079
166	0,040	0,042	0,044	0,004	0,128	0,14
172	0,041	0,049	0,036	0,054	0,17	0,124
184	0,042	0,026	0,029	0,007	0,19	0,15
190	0,039	0,034	0,025	0,032	0,148	0,061
208	0,043	0,027	0,028	0,026	0,132	0,123
214	0,026	0,021	0,028	0,033	0,059	0,113
232	0,025	0,029	0,027	0,034	0,182	0,141
238	0,028	0,030	0,026	0,052	0,115	0,13
256	0,027	0,027	0,029	0,094	0,033	0,041
262	0,028	0,031	0,031	0,048	0,025	0,038
280	0,034	0,030	0,026	0,005	0,107	0,104
286	0,022	0,028	0,033	0,174	0,095	0,006
292	0,030	0,027	0,032	0,081	0,165	0,029
304	0,027	0,021	0,028	0,075	0,08	0,008

Células em azul representam os frascos incolores

Tabela 63 – Concentração média de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios contendo óleo vegetal usado

Tempo (h)	Concentração			Desvio Padrão		
	A9	B9	S9	A9	B9	S9
0	0,507	0,504	0,502	0,138	0,008	0,115
4	0,492	0,484	0,471	0,127	0,025	0,101
16	0,491	0,493	0,435	0,056	0,088	0,044
22	0,450	0,452	0,416	0,096	0,006	0,089
28	0,396	0,440	0,314	0,016	0,117	0,152
40	0,359	0,425	0,236	0,043	0,118	0,187
46	0,303	0,300	0,164	0,079	0,107	0,061
52	0,205	0,224	0,086	0,078	0,096	0,09
64	0,122	0,140	0,055	0,177	0,147	0,174
70	0,117	0,069	0,049	0,067	0,184	0,159
76	0,086	0,054	0,039	0,124	0,044	0,048
88	0,057	0,043	0,042	0,121	0,124	0,022
94	0,038	0,039	0,041	0,055	0,167	0,125
100	0,041	0,039	0,042	0,031	0,085	0,039
112	0,043	0,044	0,046	0,085	0,011	0,058
118	0,040	0,037	0,040	0,099	0,128	0,092
124	0,043	0,041	0,045	0,133	0,105	0,006
136	0,039	0,043	0,045	0,14	0,158	0,005
142	0,042	0,046	0,041	0,179	0,166	0,054
148	0,040	0,042	0,039	0,04	0,16	0,138
160	0,045	0,039	0,045	0,043	0,107	0,116
166	0,039	0,042	0,043	0,054	0,016	0,087
172	0,044	0,039	0,028	0,082	0,111	0,085
184	0,043	0,043	0,027	0,165	0,019	0,093
190	0,024	0,025	0,027	0,052	0,184	0,176
208	0,027	0,027	0,026	0,039	0,071	0,125
214	0,028	0,027	0,030	0,18	0,15	0,084
232	0,025	0,023	0,030	0,153	0,087	0,031
238	0,027	0,029	0,027	0,165	0,144	0,095
256	0,027	0,028	0,021	0,135	0,163	0,117
262	0,029	0,033	0,029	0,108	0,132	0,102
280	0,020	0,030	0,029	0,003	0,118	0,071
286	0,028	0,027	0,027	0,156	0,046	0,069
292	0,034	0,033	0,027	0,062	0,099	0,127
304	0,030	0,027	0,028	0,003	0,173	0,156

Células em azul representam os frascos incolores

Tabela 64 – Concentração média de DCPIP ($mg.L^{-1}$) nos ensaios contendo biodiesel

Tempo (h)	Concentração			Desvio Padrão		
	A10	B10	S10	A10	B10	S10
0	0,491	0,484	0,490	0,171	0,002	0,053
4	0,430	0,417	0,416	0,124	0,159	0,067
16	0,412	0,391	0,390	0,081	0,101	0,13
22	0,421	0,352	0,348	0,068	0,068	0,046
28	0,412	0,170	0,164	0,165	0,031	0,013
40	0,401	0,084	0,071	0,04	0,091	0,18
46	0,378	0,092	0,056	0,03	0,106	0,065
52	0,359	0,063	0,045	0,051	0,06	0,079
64	0,271	0,044	0,047	0,099	0,052	0,112
70	0,213	0,047	0,046	0,085	0,159	0,035
76	0,132	0,038	0,046	0,119	0,026	0,087
88	0,094	0,043	0,044	0,179	0,166	0,156
94	0,084	0,050	0,049	0,099	0,089	0,186
100	0,075	0,051	0,040	0,12	0,157	0,106
112	0,054	0,044	0,044	0,086	0,116	0,066
118	0,053	0,042	0,051	0,032	0,083	0,077
124	0,055	0,045	0,051	0,126	0,045	0,145
136	0,051	0,050	0,047	0,098	0,155	0,031
142	0,049	0,046	0,053	0,1	0,062	0,09
148	0,043	0,033	0,048	0,034	0,093	0,067
160	0,049	0,043	0,042	0,11	0,007	0,092
166	0,049	0,047	0,035	0,135	0,019	0,073
172	0,043	0,038	0,050	0,001	0,11	0,034
184	0,049	0,050	0,036	0,094	0,026	0,167
190	0,049	0,048	0,043	0,089	0,019	0,032
208	0,052	0,050	0,046	0,01	0,126	0,133
214	0,052	0,050	0,048	0,177	0,11	0,026
232	0,054	0,049	0,051	0,146	0,04	0,109
238	0,041	0,050	0,044	0,153	0,176	0,001
256	0,041	0,046	0,050	0,064	0,166	0,132
262	0,054	0,047	0,040	0,051	0,139	0,018
280	0,051	0,044	0,054	0,129	0,164	0,032
286	0,038	0,057	0,052	0,075	0,029	0,073
292	0,043	0,050	0,052	0,163	0,118	0,143
304	0,057	0,045	0,046	0,094	0,002	0,121

Células em azul representam os frascos incolores

8.3.2. Acompanhamento fotográfico

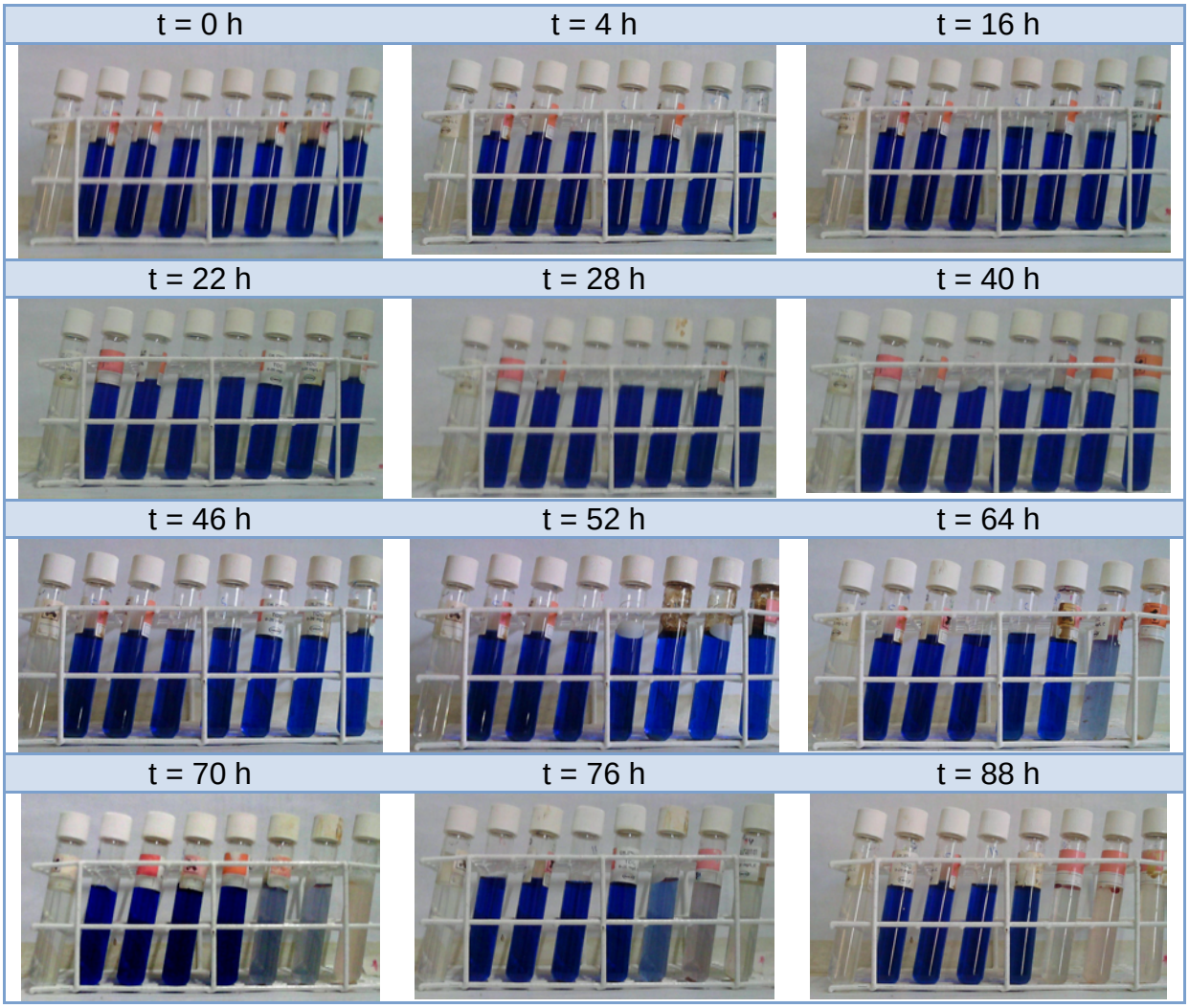


Figura 48 – Biodegradação de óleo vegetal usado acompanhado pela descoloração do DCPIP. Da esquerda para a direita nos tubos de ensaio estão contidos caldo BH, C0, C1, C2, C3, A9, B9 e S9. O tempo de captura das imagens foi indicado acima das imagens.

8.4. Dados de toxicidade

8.4.1. ToxTrak com B. subtilis

Tabela 65 – Porcentagem de inibição do crescimento de *B. subtilis* pelo uso do ToxTrak

Ensaio	Inicial		Desv. Pad	Final		Desv. Pad	% Inibição
	A	B		A	B		
Controle	0,32		-	0,105		-	-
1	0,586	0,966	0,268701	0,374	0,998	0,441235	1,40
2	0,326	0,442	0,082024	0,144	0,182	0,02687	-2,79
3	0,54	0,46	0,056569	0,328	0,258	0,049497	3,72
4	0,395	0,414	0,013435	0,219	0,242	0,016263	19,07
5	0,322	0,383	0,043134	0,207	0,274	0,047376	47,91
6	0,211	0,308	0,068589	0,126	0,212	0,060811	57,91
7	0,214	0,456	0,17112	0,141	1,028	0,627204	66,05
8	0,32	0,67	0,244659	0,20	0,34	0,098995	-3,26
9	0,25	0,40	0,103945	0,18	0,23	0,03182	42,33
10	0,254	0,554	0,212132	0,143	0,289	0,103238	12,56

8.4.2. Toxicidade para sementes de alface

Tabela 66 - Toxicidade para alface antes da biodegradação

Ensaio	Germ.		Raiz (mm)		Hipocot. (mm)		Germinação		Comprimento (mm)			
	A	B	A	B	A	B	%	% Inib.	Médio R.	% Inib.	Médio H.	% Inib.
1	12	11	16	29	13	12	57,5%	25,8	22,5	37,8	12,5	27,3
2	15	16	35	35,5	14	16,8	77,5%	0,0	35,3	2,6	15,4	10,5
3	16	15	20,1	23	15	17	77,5%	0,0	21,6	40,5	16,0	7,0
4	17	15	31,2	27	14,2	13,1	80,0%	-3,2	29,1	19,6	13,7	20,6
5	13	17	17	34	8	16	75,0%	3,2	25,5	29,6	12,0	30,2
6	20	17	29	34,1	12	10,5	92,5%	-19,4	31,6	12,8	11,3	34,6
7	0	0	0	0	0	0	0,0%	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
8	11	6	22	20	15	14,7	42,5%	45,2	21,0	42,0	14,9	13,7
9	12	14	10,1	27	12,8	15	65,0%	16,1	18,6	48,8	13,9	19,2
10	13	11	34	29,9	16	17	60,0%	22,6	32,0	11,7	16,5	4,1

Tabela 67 - Toxicidade para alface depois da biodegradação sem biossurfactante

Ensaio	Germ.		Raiz (mm)		Hipocot. (mm)		Germinação		Comprimento (mm)			
	A	B	A	B	A	B	%	% Inib.	Médio R.	% Inib.	Médio H.	% Inib.
1	9	7	1	0,8	1	1	40%	48,4	0,9	97,5	1,0	94,2
2	6	12	2	7	3,2	6	45%	41,9	4,5	87,6	4,6	73,3
3	2	8	4,5	1,8	1,5	1,3	25%	67,7	3,2	91,3	1,4	91,9
4	15	14	19	14,5	23,7	18,1	73%	6,5	16,8	53,7	20,9	-21,5
5	0	0	0	0	0	0	0%	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
6	0	0	0	0	0	0	0%	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
7	0	0	0	0	0	0	0%	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
8	0	0	0	0	0	0	0%	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
9	0	0	0	0	0	0	0%	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
10	0	0	0	0	0	0	0%	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0

Tabela 68 - Toxicidade para alface depois da biodegradação com biossurfactante

Ensaio	Germ.		Raiz (mm)		Hipocot. (mm)		Germinação		Comprimento (mm)			
	A	B	A	B	A	B	%	% Inib.	Médio R.	% Inib	Médio H.	% Inib.
1	3	2	1,1	4	2,4	6	13%	83,9	2,6	93,0	4,2	75,6
2	8	12	11,5	10	24	20,4	50%	35,5	10,8	70,3	22,2	-29,1
3	5	3	3,6	4,6	1,8	6,3	20%	74,2	4,1	88,7	4,1	76,5
4	0	0	0	0	0	0	0%	100,0	0,0	100,0	0,0	100,0
5	5	4	3,4	4,5	8,2	2,5	23%	71,0	4,0	89,1	5,4	68,9
6	0	1	0	1	0	3	3%	96,8	0,5	98,6	1,5	91,3
7	2	10	6	3,3	3	7,7	30%	61,3	4,7	87,2	5,4	68,9
8	4	8	2,8	3	5	4,1	30%	61,3	2,9	92,0	4,6	73,5
9	7	5	3,3	6,4	4,4	8,2	30%	61,3	4,9	86,6	6,3	63,4
10	2	5	4,5	7,1	4	4	18%	77,4	5,8	84,0	4,0	76,7

8.4.3. Toxicidade para sementes de pepino

Tabela 69 - Toxicidade para pepino antes da biodegradação

Ensaio	Germ.		Raiz (mm)		Hipocot. (mm)		Germinação		Comprimento (mm)			
	A	B	A	B	A	B	%	% Inib.	Médio R.	% Inib.	Médio H.	% Inib.
1	7	8	88	67	37	32	94%	0,0	77,5	-36,0	34,5	-23,2
2	7	7	36,7	42	16,8	18	88%	6,7	39,4	31,0	17,4	37,9
3	8	8	57	54	25	23	100%	-6,7	55,5	2,6	24,0	14,3
4	8	8	54	53	18	22	100%	-6,7	53,5	6,1	20,0	28,6
5	8	7	64	51	22	30,2	94%	0,0	57,5	-0,9	26,1	6,8
6	7	7	52,9	48	35,6	14	88%	6,7	50,5	11,5	24,8	11,4
7	3	0	1	0	1	0	19%	80,0	0,5	99,1	0,5	98,2
8	7	8	48	49	32	29	94%	0,0	48,5	14,9	30,5	-8,9
9	8	8	61,1	53	18,8	22,4	100%	-6,7	57,1	-0,1	20,6	26,4
10	8	7	57	45,6	21	20	94%	0,0	51,3	10,0	20,5	26,8

Tabela 70 - Toxicidade para pepino depois da biodegradação sem biossurfactante

Ensaio	Germ.		Raiz (mm)		Hipocot. (mm)		Germinação		Comprimento (mm)			
	A	B	A	B	A	B	%	% Inib.	Médio R.	% Inib.	Médio H.	% Inib.
1	8	8	19	12	4,8	4,5	100,0%	-6,7	15,5	72,8	4,7	83,4
2	8	8	28,2	26	14,5	15,1	100,0%	-6,7	27,1	52,5	14,8	47,1
3	7	7	17	14	6,8	10	87,5%	6,7	15,5	72,8	8,4	70,0
4	8	8	24	14	6	11	100,0%	-6,7	19	66,7	8,5	69,6
5	7	8	32,1	28	11,4	10,8	93,8%	0,0	30,05	47,3	11,1	60,4
6	7	7	4	3	3	2	87,5%	6,7	3,5	93,9	2,5	91,1
7	6	7	3	2	2	3	81,3%	13,3	2,5	95,6	2,5	91,1
8	8	7	29,2	23,8	11,2	10,2	93,8%	0,0	26,5	53,5	10,7	61,8
9	0	2	0	1	0	3	12,5%	86,7	0,5	99,1	1,5	94,6
10	1	0	2	0	1	0	6,3%	93,3	1	98,2	0,5	98,2

Tabela 71 - Toxicidade para pepino depois da biodegradação com biossurfactante

Ensaio	Germ.		Raiz (mm)		Hipocot. (mm)		Germinação		Comprimento (mm)			
	A	B	A	B	A	B	%	% Inib.	Médio R.	% Inib.	Médio H.	% Inib.
1	8	8	14	27,1	40,1	29,9	100,0%	-6,7	20,6	63,9	35,0	-25,0
2	8	8	30,5	30	40,1	41,9	100,0%	-6,7	30,25	46,9	41,0	-46,4
3	7	7	44,2	49	36	24	87,5%	6,7	46,6	18,2	30,0	-7,1
4	7	8	42	59	45	43	93,8%	0,0	50,5	11,4	44,0	-57,1
5	8	8	78	72	50	49	100,0%	-6,7	75	-31,6	49,5	-76,8
6	6	8	34	48	17	19	87,5%	6,7	41	28,1	18,0	35,7
7	8	8	41,5	43,5	24,4	29,6	100,0%	-6,7	42,5	25,4	27,0	3,6
8	8	8	54,5	51,8	22,8	28	100,0%	-6,7	53,15	6,8	25,4	9,3
9	8	8	58,7	69,8	31,8	38,8	100,0%	-6,7	64,25	-12,7	35,3	-26,1
10	7	8	71,8	64,3	29,4	33,6	93,8%	0,0	68,05	-19,4	31,5	-12,5