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

**BIODEGRADAÇÃO DE GASOLINA E ÓLEO DIESEL UTILIZANDO
BIOSURFACTANTES E *Pseudomonas putida* com plasmídeo TOL**

ELIS MARINA TURINI CLARO

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

Setembro - 2017

**BIODEGRADAÇÃO DE GASOLINA E ÓLEO DIESEL UTILIZANDO
BIOSSURFACTANTES E *Pseudomonas putida* com plasmídeo TOL**

ELIS MARINA TURINI CLARO

Orientador: Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia

Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Henrique Otenio

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

Rio Claro – SP
Setembro - 2017

620.1122 Claro, Elis Marina Turini
C613b Biodegradação de gasolina e óleo diesel utilizando
biossurfactantes e *Pseudomonas putida* com plasmídeo TOL /
Elis Marina Turini Claro. - Rio Claro, 2017
166 f. : il., figs., gráfs., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Biociências de Rio Claro
Orientador: Ederio Dino Bidoia
Coorientador: Marcelo Henrique Otenio

1. Biodegradação. 2. Biodegradação de hidrocarbonetos.
3. Hidrocarbonetos. 4. BTE(o-)X. 5. Biossurfactante. 6.
Ecotoxicidade. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: BIODEGRADAÇÃO DE GASOLINA E ÓLEO DIESEL UTILIZANDO
BIOSSURFACTANTES E *Pseudomonas putida* com plasmídeo TOL

AUTORA: ELIS MARINA TURINI CLARO

ORIENTADOR: EDERIO DINO BIDOIA

COORIENTADOR: MARCELO HENRIQUE OTENIO

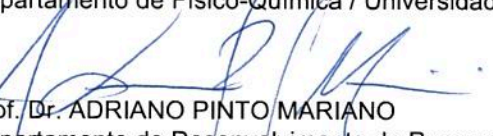
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA APLICADA), pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. EDERIO DINO BIDOIA
Departamento de Bioquímica e Microbiologia / IB Rio Claro



Profa. Dra. MARCIA NITSCHKE
Departamento de Físico-Química / Universidade de São Paulo



Prof. Dr. ADRIANO PINTO MARIANO
Departamento de Desenvolvimento de Processos e Produtos / UNICAMP



Profa. Dra. ROBERTA BARROS LOVAGLIO
Universidade Federal de São Carlos / Universidade Federal de São Carlos



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

Rio Claro, 06 de setembro de 2017

Dedico aos meus pais, Wilson e Silvia
e aos meus irmãos Caio e João Guilherme.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus, pela força, luz e sabedoria proporcionadas na realização do trabalho e na estruturação pessoal que me capacitou para percorrer esta jornada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ederio Dino Bidoia, cuja orientação foi essencial na minha formação profissional. Todo seu incentivo, sabedoria e apoio desde minha graduação, foram fundamentais para o meu caminho acadêmico e pessoal.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marcelo Henrique Otenio, que me acompanha desde a graduação, contribuindo para o crescimento daquela estagiária do SAAE. Obrigada pela oportunidade de vislumbrar novas experiências e por todo apoio, confiança e incentivo para minha formação profissional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada e ao Instituto de Biociências da UNESP, campus Rio Claro, por me conceder esta oportunidade.

Ao Programa de Formação de Recursos Humanos em Geologia do Petróleo e Ciências Ambientais Aplicadas ao Setor de Petróleo e Gás e de Biocombustíveis (PRH-05) pela bolsa concedida.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Bioquímica e Microbiologia. Em especial aos técnicos de laboratório: Adriano, que tanto me ensinou com os equipamentos e dúvidas, Beto, Carmen e Fátima, por toda ajuda com os empréstimos de materiais. Também, ao Zito e ao Marcio pelo empréstimo de materiais.

À Profa. Dra. Pricila Veiga dos Santos e ao técnico João, do Laboratório de Tecnologia de produtos de origem animal, na Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Campus de Botucatu pelas análises para caracterização do soro de ricota.

Ao Prof. Dr Jonas Contiero pela permissão em utilizar o Laboratório de Microbiologia Industrial e especialmente ao Vinicius Luiz da Silva pelo auxílio na produção e caracterização dos biossurfactantes.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales pela parceria e permissão em utilizar o Laboratório de Mutagênese e em especial a doutoranda Nádia Corroqué por todo ensinamento e pela paciência.

A todos os amigos do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas em Meio Ambiente (Ana Paula Juntiniano, Carolina Rosai, Érica Almeida, Gabriela M. Quiterio, Guilherme Dilarri, Jaqueline M. Cruz, José Rubens Moraes Júnior, Paulo Renato M. Lopes, Renato N. Montagnolli e a agregada Lorena T. Lacerda), pela rotina de trabalho compartilhada,

companheirismo, festas e eventos Lab Multi. Faço um agradecimento especial a Jaqueline e ao Renato por toda ajuda, paciência, incentivo e ensinamentos compartilhados. Vocês foram fundamentais!

Ao meu amigo Jefferson Eduardo Silveira, que mesmo longe, sempre se encontra presente. Obrigada por todos os ensinamentos compartilhados desde o mestrado e por sempre se dispor a me ajudar.

À minha querida amiga Juliana Montesino, pela cumplicidade, inúmeras risadas e pela atenção que sempre me dedicou. Você me faz muita falta!

Aos meus pais, Wilson Turini e Silvia Turini, por serem meus pilares e sempre me darem incentivo, apoio e conselhos em minhas decisões. Se hoje caminho ativa e realizo grandes feitos, esses são seus legados. Aos meus irmãos Caio e João Guilherme.

Ao meu namorado Fábio Girardi Filho, pelo incentivo, companheirismo e carinho. Tenho ciência que meu débito com você pelo ouvido amigo é enorme!

Agradeço a todos que tornaram possível a realização dessa tese, que não se trata apenas de um esforço individual. Todo o trabalho foi construído com significativas contribuições em diferentes esferas por pessoas que surgiram pelo caminho e deixaram seu nome registrado na minha história. A gratidão, os ensinamentos e os momentos estarão sempre presentes.

“Nunca é tarde demais para ser aquilo que sempre se desejou ser”
(Adelaide Anne Procter)

Resumo

Grande atenção vem sendo dada a contaminação por hidrocarbonetos resultante das atividades da indústria petroquímica. Dentre as tecnologias utilizadas na remediação e tratamento de áreas impactadas, a biodegradação vem despontando como um dos principais campos de pesquisa em microbiologia, se apresentando como uma técnica bastante eficaz. Dessa forma, o presente trabalho visou estudar a biodegradação de gasolina, óleo diesel e dos compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e o-xileno (BTE(o-)X) por *Pseudomonas putida* CCM1 852 com plasmídeo TOL pWW0, com aplicação de biossurfactante, para aumentar a biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos, produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBI a partir do soro de ricota, como fonte de carbono e com avaliação da toxicidade com sementes de alface (*Lactuca sativa*) e genotoxicidade com sementes de cebola (*Allium cepa*), antes e após a biodegradação. Foi observado um potencial de produção de biossurfactantes do tipo ramnolipídios em soro de ricota como substrato alternativo para produção, com rendimento de 0,45 g L⁻¹. O monitoramento da biodegradação dos hidrocarbonetos, foi realizado por ensaios colorimétricos utilizando os indicadores redox DCPIP e TTC e a quantificação foi realizada por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (CG/MS). Os testes colorimétricos foram eficientes e bastante eficaz para verificar a atividade bacteriana, indicando o potencial do micro-organismo em degradar esses compostos, fato este que comprovou-se pela análise em GC/MS. O plasmídeo TOL pWW0 encontrado naturalmente na linhagem bacteriana *P. putida* CCM1 852, confere às células a capacidade de degradarem hidrocarbonetos presentes na gasolina mais facilmente em relação ao óleo diesel e que a *P. putida* CCM1 852 não foi capaz de metabolizar o benzeno, nem individualmente, nem em misturas, indicando a via de degradação da linhagem sendo a via TOL. Em mistura BTE(o-)X, a presença do benzeno ocasionou efeito negativo na degradação do tolueno que apresentou taxa de degradação 33,5% menor do que quando individualmente, enquanto que em mistura, o etilbenzeno aumentou 50,3%. Em misturas ternárias TE(o-)X, os compostos apresentaram maior taxa de degradação em relação à presença do benzeno, com aumento de 14,2% para tolueno, seguido de 4,8% e 2,5% para o (o-)xileno e etilbenzeno, respectivamente. A sequência de degradação encontrada foi tolueno, o-xileno e etilbenzeno. O uso do biossurfactante no processo, não aumentou a taxa de biodegradação. Contudo, ao realizar testes de toxicidade (com sementes de alface) foi observado que na maioria dos ensaios foram produzidos compostos intermediários da biodegradação, mais tóxicos aos organismos-teste do que a substância original. Os testes com *A. cepa* permitiram verificar

potencial genotóxico da gasolina e do óleo diesel biodegradados após 10 dias, por alterações no índice mitótico e mutagênico dos compostos.

Palavras-chave: Biodegradação, Hidrocarbonetos, BTE(o-)X, Biossurfactante, Ecotoxicidade

Abstract

Great attention has been given to the contamination by hydrocarbons from the petrochemical industry. Among the technologies used in the remediation and treatment of impacted areas, biodegradation has emerged as a very effective technique, which is now among the main research fields in microbiology. Thus, this thesis aimed to study the biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene and o-xylene (BTE(o-)X) by *Pseudomonas putida* CCMI 852 with the TOL pWW0 plasmid, as well as biosurfactant application to increase the bioavailability of hydrophobic compounds produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI using ricotta serum as the source of carbon. The evaluation of toxicity with lettuce seeds (*Lactuca sativa*) and genotoxicity with onion seeds (*Allium cepa*), before and after biodegradation, was also considered. The potential production of rhamnolipidic biosurfactants in ricotta whey as an alternative substrate yielded 0.45 g L⁻¹. Monitoring the biodegradation of hydrocarbons was performed by colorimetric assays using the both DCPIP and TTC redox indicators. Quantification was performed by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC / MS). The colorimetric tests were efficient and quite effective to verify the bacterial activity, indicating the potential of the microorganism to degrade these compounds. This fact was evidenced by GC / MS analysis. The plasmid TOL pWW0 found naturally in the bacterial line *P. putida* CCMI 852, gives the cells the ability to degrade hydrocarbons present in gasoline more easily relative to diesel oil. *P. putida* CCMI 852 was not able to metabolize benzene, nor individually, or in mixtures, indicating that the route of degradation of this specific strain is the TOL route. In the BTE(o-)X mixture, benzene caused a negative effect on the degradation of toluene, which had a degradation rate of 33.5% lower than its individual presence. While in the mixture, ethylbenzene increased its degradation rate by 50.3%. In ternary mixtures TE(o-)X, the compounds had a higher rate of degradation in relation to the presence of benzene, with a 14.2% increase in toluene, followed by 4.8% and 2.5% for xylene and ethylbenzene, respectively. The degradation sequence found was toluene, o-xylene and ethylbenzene. The use of the biosurfactant in the process did not increase the rate of biodegradation. However, when performing toxicity tests (with lettuce seeds) it was observed that in the majority of the assays, intermediate compounds of the biodegradation were produced, which were more toxic to the test organisms in the original substance. The tests with onion seeds verified the genotoxic potential of biodegraded gasoline and diesel oil after 10 days, due to changes in the mitotic and mutagenic index of such compounds.

Keywords: Biodegradation, Hydrocarbons, BTEX, Biosurfactant, Ecotoxicity

Lista de abreviaturas

AC – Aberrações cromossômicas

ANP – Agência Nacional do Petróleo

BH – Bushnell-Haas

BH1: soro de ricota com adição direta de sais do meio Bushnell-Haas

BH2: 75% de soro de ricota suplementado de 25% de meio mineral Bushnell-Haas BH3: 50% de soro de ricota suplementado de 50% de meio mineral Bushnell-Haas

Bs - Biossurfactante

BTE(o-)X – Benzeno, tolueno, etilbenzeno e orto-xileno

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CMC – Concentração Micelar Crítica

CN – Controle negativo

CP – Controle positivo

DBO – Demanda Bioquímica de Oxigênio

DCPIP - 2,6-diclorofenol indofenol

DQO – Demanda Química de Oxigênio

E₂₄ - Índice de emulsificação

%G - Taxa de germinação das sementes

Gas – Gasolina

GC/MS – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

IG - Índice de germinação

In – Inóculo

IM – Índice mitótico

MMM – Meio Mineral Mínimo

MMS – Metilmetano sulfonato

MN – Micronúcleos

%R – Alongamento da raiz

RL – Ramnolipídio

SR - Sais de Robert

SR1: soro de ricota com adição de sais do meio mineral sais de Robert

SR2: 75% de soro de ricota suplementado de 25% do meio mineral sais de Robert

SR3: 50% de soro de ricota suplementado de 50% do meio mineral sais de Robert

TPF - 1,3,5-trifenilformazan

Lista de Figuras

Figura 1 – Distribuição das fontes de contaminação, por atividade, no Estado de São Paulo, em dezembro de 2016.....	12
Figura 2 – Vias de degradação aeróbia do tolueno (pela ação das enzimas tolueno 2- e 3-monooxigenases e tolueno dioxigenase)	21
Figura 3 – Estrutura dos biossurfactantes e formação de micelas	23
Figura 4 – Estrutura dos quatro principais homólogos dos ramnolipídios.....	26
Figura 5 – Fluxograma de obtenção do soro de ricota	28
Figura 6 – Esquema experimental do processo de produção de biossurfactantes por <i>P. aeruginosa</i> LBI em soro de ricota como fonte de carbono	34
Figura 7 – Erlenmeyers contendo 150 mL do meio de produção (100% soro de ricota)	34
Figura 8 – Curva padrão de biomassa x absorbância (600 nm)	35
Figura 9 – Curva padrão da concentração de ramnose x absorbância (400 – 430 nm).....	36
Figura 10 – a) Extração de ramnolipídios com solvente acetato de etila e separação das fases orgânica (superior) e aquosa (inferior); b) Concentração da fase orgânica do caldo livre de células no rotavapor a 40 °C	42
Figura 11 – Efeito do soro de ricota como meio de cultivo sobre o crescimento celular, pH e produção de ramnose	45
Figura 12 – Meio de cultivo evidenciando a produção de pioverdina, um pigmento verde fluorescente, característico da <i>P. aeruginosa</i> em diferentes tempos de fermentação	47
Figura 13 – Produção de biossurfactantes em diferentes meios de cultivo, em termos de ramnose por <i>P. aeruginosa</i> LBI, em diferentes tempos e concentrações de soro de ricota	48
Figura 14 – Valores da tensão superficial (mN m^{-1}) do caldo livre de células, nos diferentes tempos de fermentação. Onde: BH2: 75% de soro de ricota suplementado de 25% de meio mineral Bushnell-Haas; SR2: 75% de soro de ricota suplementado de 25% do meio mineral sais de Robert	50
Figura 15 – Quantificação de espécies homólogas e do total de ramnolipídios (R total) produzidos por <i>P. aeruginosa</i> LBI, utilizando meio SR2 (75% de soro de ricota suplementado de 25% do meio mineral sais de Robert).....	52
Figura 16 – Cromatografia de camada delgada do biossurfactante produzido por <i>P. aeruginosa</i> LBI em meio SR2 (75% de soro de ricota suplementado de 25% do meio mineral sais de Robert), extraído com acetato de etila em rotavapor após 72 h de fermentação	53

Figura 17 - Obtenção do biossurfactante produzido por <i>P. aeruginosa</i> LBI, após extração em rotavapor com solvente acetato de etila. Onde: a) Biossurfactante concentrado logo após extração; b) Biossurfactante bruto extraído após ser seco em estufa	54
Figura 18 – Determinação da concentração micelar crítica em função da tensão superficial (mN m^{-1}), utilizando-se diferentes diluições de uma solução concentrada do biossurfactante extraído	56
Figura 19 – Teste para medida do índice de emulsificação, antes da emulsificação e após emulsificação. Na sequência: Gasolina (1) e óleo diesel (2), Biossurfactante (a) e Tween80 (b)	57
Figura 20 – Mecanismo da oxirredução do 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio a 1,3,5-trifenilformazan pela enzima desidrogenase	60
Figura 21 – Reação de oxirredução do 2,6-diclorofenol indofenol como acceptor de elétrons	62
Figura 22 – Ensaio do potencial de biodegradação de hidrocarbonetos por <i>P. putida</i> CCMI 852 utilizando TTC, antes da leitura em espectrofotômetro	67
Figura 23 – Reta padrão do 1,3,5-trifenilformazan e seu espectro de absorção em diferentes concentrações.....	68
Figura 24 – Leitura dos ensaios colorimétricos em espectrofotômetro Nanocolor® UV/Vis-Macherey-Nagel a 600 nm	71
Figura 25 – Reta padrão do indicador redox DCPIP e seu espectro de absorção UV-Vis em diferentes concentrações.....	72
Figura 26 – Ensaio para aclimação da <i>P. putida</i> CCMI 852, onde: a) gasolina e b) óleo diesel como fontes de carbono, após 48 h de incubação	74
Figura 27 - Gráfico dos valores preditos (teóricos) pelos observados, da atividade da enzima desidrogenase utilizando o indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC).....	75
Figura 28 - Superfície de resposta sobre o efeito do inóculo (A), temperatura (B) e agitação (C) na atividade da enzima desidrogenase, utilizando o indicador redox TTC.....	78
Figura 29 - Medida qualitativa da atividade da enzima desidrogenase pelo indicador redox TTC em diferentes tempos de tratamento	79
Figura 30 - Atividade da enzima desidrogenase pelo indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) em diferentes tempos de biodegradação e diferentes compostos	80
Figura 31 – Efeito de diferentes concentrações de tolueno no crescimento da linhagem <i>P. putida</i> CCMI 852.....	81

Figura 32 – Porcentagem de descoloração do indicador DCPIP _{ox} em função do tempo. Onde: a) amostras controle e inóculos com gasolina; b) Inóculos com óleo diesel; c) Inóculos com BTE(o-)X em mistura; d) Inóculos com TE(o-)X individuais	83
Figura 33 - Curva de decaimento de pseudo-primeira ordem nas condições estabelecidas, ao longo do tempo de degradação	86
Figura 34 - Constantes de velocidade obtidas pela cinética de pseudo-primeira ordem para biodegradação de diferentes hidrocarbonetos.....	87
Figura 35 - Frascos de 100 mL utilizados nos experimentos de biodegradação de hidrocarbonetos por <i>P. putida</i> CCMI 852	94
Figura 36 – Curva de calibração em GC/MS para os compostos BTE(o-)X	96
Figura 37 – Cromatograma de BTE(o-)X, obtido por GC/MS. Os sinais de resposta indicam diferentes substâncias com base nos diferentes tempos de retenção, sendo respectivamente, benzeno, tolueno, etilbenzeno e o-xileno	97
Figura 38 – Curvas de degradação do benzeno, tolueno, etilbenzeno e o-xileno, em misturas e individuais. Onde: In.: Inóculo de <i>P. putida</i> CCMI 852; Bs.: Biossurfactante produzido com soro de ricota	98
Figura 39 - Cromatograma de mistura de compostos BTE(o-)X, extraídas por <i>headspace</i> para análise em GC/MS, em 48 h de biodegradação utilizando <i>P. putida</i> CCMI 852.....	101
Figura 40 - Cromatograma da gasolina, extraída por <i>headspace</i> para análise em GC/MS após 48 h de biodegradação. Onde: In.: Inóculo; Bs.: Biossurfactante produzido com soro de ricota	103
Figura 41 - Cromatograma do óleo diesel, extraído por <i>headspace</i> para análise em GC/MS após 29 dias de biodegradação. Onde: In.: Inóculo; Bs.: Biossurfactante produzido com soro de ricota	103
Figura 42 - Disposição das sementes de alface (<i>L. sativa</i>) utilizadas como organismos-teste nos bioensaios de toxicidade.....	102
Figura 43 – (a) Taxa de germinação das sementes de alface, em relação ao controle negativo, e (b) índice de germinação, antes e após a biodegradação da gasolina e óleo diesel, por <i>P. putida</i> CCMI 852	115

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas e características dos compostos BTEX	8
Tabela 2 – Potencial de degradação de compostos BTEX por diferentes micro-organismos	15
Tabela 3 – Produção de biossurfactantes por diferentes micro-organismos.....	25
Tabela 4 – Composição de sais do meio mineral Bushnell-Haas.....	37
Tabela 5 – Composição do meio mineral sais de Robert	38
Tabela 6 – Condições de cultivo do biossurfactante em diferentes meios de fermentação.....	39
Tabela 7 – Características físico-químicas do soro de ricota utilizado como fonte de carbono para produção de biossurfactantes	44
Tabela 8 – Rendimento do processo de produção de biossurfactante a partir de soro de ricota	54
Tabela 9 – Índice de emulsificação do biossurfactante produzido por <i>P. aeruginosa</i> LBI a partir de soro de ricota e do Tween80, com diferentes hidrocarbonetos após 24 h	57
Tabela 10 – Propriedades do indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio	60
Tabela 11 – Propriedades do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol	61
Tabela 12 – Variáveis independentes e seus respectivos níveis empregados no planejamento experimental	65
Tabela 13 – Composição de sais no preparo de meio mineral salino acrescido de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)	66
Tabela 14 – Composição dos ensaios acrescidos de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)	67
Tabela 15 – Composição dos ensaios colorimétricos utilizando indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP)	70
Tabela 16 - Análise de variância do modelo ajustado para atividade enzimática utilizando metodologia de superfície de resposta.....	76
Tabela 17 - Porcentagem de descoloração (D%) em relação aos controles, constantes de velocidade (k) e tempo de meia vida ($T_{1/2}$)	85
Tabela 18 - Composição dos ensaios de biodegradação utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS).	93
Tabela 19 – Condições utilizadas na cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, para biodegradação de hidrocarbonetos.	95

Tabela 20 – Eficiência de biodegradação por <i>P. putida</i> CCMI 852 dos compostos BTE(o-)X em diferentes condições, em 48 h de tratamento.....	99
Tabela 21 - Frequência de alterações celulares e cromossômicas observadas em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> , antes e após a biodegradação utilizando <i>Pseudomonas putida</i> CCMI 852.....	116

Sumário

1 Introdução	1
2 Objetivos.....	4
2.1 Objetivos Gerais	4
2.2 Objetivos Específicos	4
3 Revisão de Literatura.....	6
3.1 Óleo Diesel	6
3.2 Gasolina.....	7
3.3 Compostos BTEX.....	7
3.4 Impactos ambientais	10
3.5 Processo biotecnológico e a biodegradação de hidrocarbonetos.....	12
3.6 Biossurfactantes.....	22
3.7 Soro de ricota.....	27
4 Capítulo 1 Viabilidade de aproveitamento do soro de ricota como meio de cultivo para produção de biossurfactantes por <i>P. aeruginosa</i> LBI	30
4.1 Introdução	30
4.2 Material e Métodos.....	32
4.2.1 Caracterização físico-química do soro de ricota como meio de produção	32
4.2.2 Micro-organismo	33
4.2.3 Preparo do inóculo.....	33
4.2.5 Ensaios com meios de cultivo salino adicionado de soro de ricota.....	36
4.2.6 Condições de cultivo	38
4.2.7 Processamento das amostras.....	39
4.2.8 Avaliação da produção de ramnolipídios	39
4.2.9 Recuperação dos ramnolipídios.....	41
4.2.10 Caracterização das propriedades tensoativas.....	42
4.3 Resultados e discussão.....	44
4.3.1 Caracterização do soro de ricota.....	44
4.3.2 Ensaio preliminar da produção de biossurfactante	45
4.3.4 Meio mineral salino adicionado ao soro de ricota.....	47
4.3.7 Rendimento na produção bruta de ramnolipídios.....	53
4.3.8 Caracterização do biossurfactante	55

5 Capítulo 2 - Avaliação do potencial de biodegradação de hidrocarbonetos por <i>Pseudomonas putida</i> CCMI 852	59
5.1 Introdução	59
5.1.1 Indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio	59
5.1.2 Indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol	61
5.2 Material e Métodos	63
5.2.1 Preparo do inóculo	63
5.2.2 Adaptação bacteriana	63
5.2.3 Potencial de biodegradação utilizando o indicador redox TTC	64
5.2.4 Determinação da concentração de hidrocarbonetos	68
5.2.5 Potencial de biodegradação utilizando o indicador redox DCPIP	69
5.3 Resultados e Discussão	74
5.3.1 Verificação da adaptação bacteriana	74
5.3.2 Otimização dos parâmetros para a biodegradação	75
5.3.3 Biodegradação utilizando indicador redox TTC	79
5.3.4 Crescimento bacteriano em diferentes concentrações de hidrocarbonetos	81
5.3.5 Biodegradação utilizando indicador redox DCPIP	82
6 Capítulo 3 Acompanhamento da biodegradação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas	89
6.1 Introdução	89
6.2 Material e métodos	92
6.2.1 Montagem dos ensaios	92
6.2.2 Determinação por <i>headspace</i> estático	94
6.2.3 Análises cromatográficas	94
6.2.4 Construção de curvas analíticas para a quantificação dos BTE(o-)X	95
6.3 Resultados e Discussão	97
7 Capítulo 4 - Toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade da gasolina e óleo diesel, antes e após biodegradação por <i>Pseudomonas putida</i> CCMI 852	106
7.1 Introdução	106
7.1.1 Ensaio de toxicidade utilizando sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i>)	106
7.1.2 Bioensaios com sementes de cebola (<i>Allium cepa</i>)	107
7.2 Material e métodos	110
7.2.1 Ensaios de toxicidade	110
7.2.2 Bioensaios com células meristemáticas de <i>Allium cepa</i>	111

7.3 Resultados e discussão	114
7.3.1 Bioensaios de toxicidade com sementes de alface (<i>L. sativa</i>).....	114
8 Considerações Finais	119
Referências	121

1 Introdução

A contaminação do ambiente por compostos orgânicos é uma das principais preocupações enfrentadas pela sociedade no século XXI (COLEDAM et al., 2017). Grande atenção vem sendo dada a contaminação por hidrocarbonetos resultante das atividades da indústria petroquímica, sendo considerado um dos principais problemas ambientais (NOEL et al., 2016; DONG et al., 2017; MNIF et al., 2017). Em março de 2017, a produção de petróleo no Brasil totalizou 2,550 milhões de barris por dia, o que representou um crescimento de 12,6% em relação ao mesmo mês em 2016, de acordo com a Agência Nacional do Petróleo (ANP, 2017a).

Episódios de acidentes envolvendo hidrocarbonetos de petróleo são relatados com bastante frequência, principalmente em função da exploração, refino, transporte e armazenamento, resultando em uma degradação ambiental considerável, principalmente devido à capacidade limitada dos ecossistemas absorverem esses impactos (FARHADIAN et al., 2008; CESARINO et al., 2013; GUARINO et al., 2017; TURNER e RENEGAR, 2017).

Alguns derivados de petróleo, como o óleo diesel e a gasolina, são pouco solúveis em água e alguns compostos orgânicos presentes na composição desses combustíveis exigem maior atenção, quanto aos seus possíveis danos ambientais. Os hidrocarbonetos monoaromáticos voláteis, conhecidos como BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e três isômeros de xileno, orto-, meta- e para-xileno), são listados como poluentes prioritários pela *United States Environmental Protection Agency* - USEPA (QU et al., 2015; LUEDERS, 2017, MÊÇABIH, 2017), além de estarem incluídos na Lista de Poluentes Atmosféricos Perigosos (*Hazardous Air Pollutants List*) como uma das 275 substâncias identificadas como potencial ameaça à saúde humana (RAHUL e BALOMAJUMDER, 2013; AKMIRZA et al., 2017).

Tais compostos são os constituintes mais solúveis e abundantes na gasolina, o que lhes confere alta toxicidade, mobilidade e consequente biodisponibilidade (MITRA e ROY, 2011), podendo migrar do solo para a água subterrânea e alcançar locais de abastecimento de água mesmo longe de sua origem de contaminação. Os BTEX possuem como característica principal a presença do anel benzênico nas suas estruturas moleculares e apresentam potencial de poluição elevado, devido a suas propriedades, neurotóxicas, carcinogênicas e teratogênicas, cientificamente comprovadas, representando um sério risco ao meio ambiente e ao ser humano (ATSDR, 1999; FUCHS et al., 2011; ALMEDA et al., 2013).

Dentre as tecnologias utilizadas na remediação e tratamento de áreas impactadas por combustíveis derivados de petróleo, a biodegradação, por meio da atividade de micro-organismos, vem despontando como uma técnica bastante eficaz, podendo ser utilizada como complemento às tecnologias convencionais, por serem relativamente de baixo custo e não invasiva (BENTO et al., 2005; OTENIO et al., 2005; DAS e CHANDRAN, 2011; EL-NAAS et al., 2014).

Porém, a eficiência da biodegradação pode ser reduzida em virtude de os compostos hidrofóbicos serem imiscíveis em solução aquosa e por estarem adsorvidos às partículas de sedimento, limitando sua biodisponibilidade à microbiota. Dessa forma, a fim de promover maior acessibilidade destas moléculas ao metabolismo microbiano e o desenvolvimento da microbiota endêmica, os biossurfactantes tem se mostrado uma ferramenta em potencial para este fim (MUKHERJEE et al., 2006; ARAUJO et al., 2013; PEREIRA et al., 2013; GONG et al., 2015).

Os biossurfactantes agem como tensoativos e são produzidos por uma grande variedade de micro-organismos, dentre eles bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, que sintetizam biossurfactantes do tipo ramnolipídios. Esses biotensoativos vêm recebendo considerável interesse nos últimos anos, devido a sua natureza biodegradável, baixa toxicidade e diversidade de aplicações (LOVAGLIO et al., 2015; DOBLER et al., 2016).

A produção dos biossurfactantes em escala industrial não tem recebido tanta atenção devido aos elevados custos de processamento, sendo a escolha de substratos de baixo custo importante para a economia global do processo (NITSCHKE e PASTORE, 2002; RUFINO et al., 2014). Esses compostos podem ser produzidos a partir de substratos renováveis, como soro de leite, soro de ricota, manipueira, entre outros, que podem viabilizar economicamente o processo (BENINCASA et al., 2002; PORNSUNTHORNTAWEE et al., 2008; MARIANO et al., 2008; LOVAGLIO et al., 2014; GUDIÑA et al., 2015a).

A ricota é uma alternativa de aproveitamento do soro resultante da fabricação de queijo, sendo utilizado para coagulação e precipitação das proteínas não coaguláveis pelo coalho, gerando como subproduto da fabricação, o denominado soro de ricota, um fluido opaco, verde-amarelado. Esse soro de ricota possui alto teor de ácido láctico, cálcio e fósforo e, pelo seu forte sabor ácido, é pouco utilizado, tendo apenas usos como coagulante na fabricação do queijo branco, ração animal e para suplementar sucos de frutas ácidas, mas pode deixar um gosto residual salgado, o que o torna menos aceito pelos consumidores (MIZUBUTI, 1994; CARVALHO et al., 2013; MAGALHÃES-GUEDES et al., 2013).

Muitas indústrias ainda consideram o soro de ricota como um efluente, o qual, quando indevidamente tratado, gera um sério problema ambiental devido à sua elevada carga orgânica. O governo tem incentivado o desenvolvimento de tecnologias que permitam o aproveitamento do soro de uma forma que seja viável, tanto do ponto de vista econômico como tecnológico (ALVES et al., 2014).

2 Objetivos

2.1 Objetivos Gerais

O presente trabalho teve como objetivo estudar a biodegradação da gasolina, óleo diesel e seus hidrocarbonetos monoaromáticos (BTE(o-)X) por *Pseudomonas putida* CCMI 852, acrescentado de biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBI a partir do soro de ricota, como fonte de carbono. Também foi realizada a avaliação da toxicidade com sementes de alface (*Lactuca sativa*) e genotoxicidade com sementes de cebola (*Allium cepa*) da gasolina e do óleo diesel antes e após a biodegradação.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar a viabilidade da produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* LBI, utilizando o soro de ricota como fonte de carbono;
- Avaliar a biodegradação por *P. putida* CCMI 852 de gasolina, óleo diesel e compostos BTE(o-)X, com e sem o biossurfactante produzido.
- Monitorar o processo de biodegradação por *P. putida* CCMI 852 frente a esses compostos por técnicas de colorimetria e por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (GC/MS);
- Verificar a sequência de biodegradação dos compostos BTE(o-)X em mistura, por *P. putida* CCMI 852.
- Avaliar a toxicidade com sementes de alface (*L. sativa*) e genotoxicidade com sementes de cebola (*A. cepa*) dos produtos da biodegradação em organismos-teste e a sensibilidade destes organismos para uso como bioindicadores.

3 Revisão de Literatura

3.1 Óleo Diesel

O óleo diesel comercial, produto da destilação fracionada do petróleo, apresenta em sua composição uma mistura complexa de hidrocarbonetos de cadeias de 6 a 30 átomos de carbono e, em menor proporção, nitrogênio, enxofre e oxigênio (COLLINS, 2007; SOUZA et al., 2016). Sua composição depende da origem do óleo cru utilizado no processo de destilação e das misturas adicionadas na sua formulação final, contendo principalmente hidrocarbonetos saturados, não ramificados, aromáticos e compostos polares (ATSDR, 1995; BENTO et al., 2005). De acordo com Penet et al. (2004), o diesel apresenta a maior parte formada por componentes saturados, cerca de 64%, incluindo alcanos ramificados e cíclicos.

A susceptibilidade dos constituintes do petróleo à biodegradação se modifica conforme o tamanho da molécula do hidrocarboneto e sua concentração (SOUZA et al., 2016). Segundo Kanaly et al. (2000) e Yu et al. (2005), de modo geral, o aumento no número de anéis aromáticos eleva a estabilidade química e a hidrofobicidade da molécula, tornando-os menos disponíveis à biodegradação.

Bento et al. (2005) demonstraram que populações microbianas podem degradar frações alifáticas e aromáticas de hidrocarbonetos simultaneamente, embora as adições de determinados compostos, assim como a composição de algumas misturas, podem interferir na degradação dos componentes. Além disso, a baixa biodegradabilidade do diesel é comumente associada a limitações na transferência de hidrocarbonetos ou na quantidade insuficiente de oxigênio do meio. Muitos estudos de biodegradação dessa substância foram feitos em sistemas abertos que promoviam o desaparecimento da substância por volatilização (SONG et al., 1990).

3.2 Gasolina

A gasolina, derivada do petróleo, é o segundo combustível mais consumido no Brasil, depois do óleo diesel (ANP, 2017b). É formada por uma mistura complexa de mais de 230 hidrocarbonetos saturados, naftalênicos, aromáticos, com 4 a 12 átomos de carbono (MARCHAL et al., 2003; STREVA et al., 2011). Sua composição pode ser extremamente variável, dependendo da origem e do tipo de petróleo que a gerou, dos processos utilizados no refino e da existência ou não de aditivos (NWANKWEGU e ONWOSI, 2017).

Os hidrocarbonetos monoaromáticos BTEX, representam concentração significativa na gasolina, onde, dependendo da origem do petróleo, sua fração em volume pode ser superior a 20% (WEELINK et al., 2010; MONTAGNOLLI et al., 2017a).

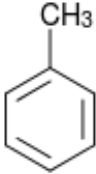
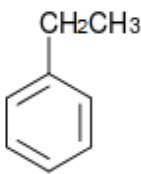
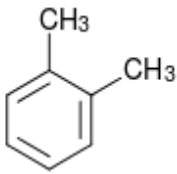
No Brasil, as gasolinas comercializadas são: gasolina A, sem etanol, vendida pelos produtores e importadores de gasolina; e gasolina C, com adição de etanol anidro combustível, vendida aos postos revendedores e em seguida ao consumidor final (ANP, 2017b).

De acordo com a ANP (2016), a gasolina C é aditivada com 20 a 27% (v/v) aproximadamente de etanol, a fim de melhorar o desempenho do combustível e diminuir as emissões de gás carbônico, fato que aumenta, consideravelmente, a probabilidade de contaminação de águas por BTEX devido ao seu efeito co-solvente (CUNHA et al., 2007; MAZZEO et al., 2011). Acrescenta-se, ainda, que a estabilidade estrutural do benzeno, torna a oxidação e, conseqüentemente a degradação mais difícil (JOHNSON et al., 2003).

3.3 Compostos BTEX

Os hidrocarbonetos monoaromáticos BTEX estão entre os principais contaminantes de grande preocupação ambiental (QU et al., 2015; XIE et al., 2016), sendo frequentemente encontrados na água superficial e subterrânea, como resultado de derramamentos acidentais, vazamento de tanque de estocagem e de encanamentos subterrâneos ou, algumas vezes, ao descarte intencional de óleo ou resíduos oleosos na água, como efluentes químicos industriais, por exemplo (MITRA e ROY, 2011; EL-NAAS et al., 2014; FATHEPURE, 2014). Esses compostos são relativamente estáveis e possuem baixo peso molecular, sendo os principais componentes aromáticos encontrados em muitos produtos do petróleo. Na Tabela 1 são apresentadas as estruturas químicas do BTEX.

Tabela 1 – Propriedades físico-químicas e características dos compostos BTEX.

	Benzeno	Tolueno	Etilbenzeno	o-Xileno
CAS number	71-43-2	108-88-3	100-41-4	95-47-6
Estrutura química				
Fórmula	C ₆ H ₆	C ₇ H ₈	C ₈ H ₁₀	C ₈ H ₁₀
Massa molecular g mol⁻¹	78,11	92,14	106,17	106,17
Ponto de ebulição (°C)	80,1	110,6	136,2	144,5
Solubilidade em água (20 °C) (mg L⁻¹)	1770	520	150	170
Densidade específica (20 °C) (mg L⁻¹)	0,877	0,867	0,867	0,880
Pressão de vapor (25 °C) (mmHg)	74,6	22,0	7,0	7,0
Viscosidade (20 °C) (cP)	0,647	0,580	0,678	0,802
Temperatura de ignição (°C)	498	480	432	463
Características	Carcinogênico	Inflamável	Inflamável	Inflamável
	Inflamável	Nocivo	Nocivo	Nocivo
	Tóxico			Irritante

Fonte: Adaptado de Weelink et al. (2010) e El-Naas et al. (2014).

Esses compostos são amplamente utilizados por indústrias químicas e farmacêuticas, como intermediários da síntese de milhares de compostos orgânicos incluindo adesivos, revestimentos, desengraxantes, detergentes, corantes, explosivos, combustíveis, vernizes, tintas, pesticidas, esmaltes, resinas, solventes, entre outros (WEELINK et al., 2010; BOLDEN et al., 2015).

Na gasolina, os compostos BTEX são os hidrocarbonetos mais abundantes, podendo representar uma parcela de 18% a 25% em massa (ANP, 2016). As porcentagens dos compostos BTEX na gasolina são apresentadas, de acordo com Mitra e Roy (2011), como 11% de benzeno, 26% de tolueno, 11% de etilbenzeno, 12% de o-xileno, 31% de m-xileno e 9% de p-xileno. Estes compostos correspondem aos indicadores específicos utilizados para se caracterizar a contaminação de áreas por gasolina, pois são insolúveis em água e, portanto, são os poluentes que primeiro atingirão as águas subterrâneas.

A presença de etanol na gasolina, acrescentado no Brasil a fim de melhorar o desempenho do combustível e diminuir as emissões de gás carbônico, faz com que a quantidade dissolvida seja ainda maior, devido ao seu efeito de co-solvência, que é definido como a

capacidade de um determinado solvente aumentar a solubilidade de um soluto em outro solvente. Uma vez dissolvidos, os BTEX serão transportados pelo movimento da água subterrânea. A mobilização também pode ser retardada pela sorção nos grãos de solo, porém o principal mecanismo que limita o transporte dos BTEX é a biodegradação, e em menor extensão a volatilização (NASCIMENTO FILHO et al., 2013).

Além da importante contaminação ambiental, os compostos BTEX merecem grande destaque, devido ao seu potencial toxicológico elevado. São nocivos à saúde humana, estando relacionados à carcinogênese, síndromes hematopoiéticas e depressão do sistema nervoso central, constituindo um importante problema de saúde pública (OTENIO et al., 2005; XIE et al., 2016). Assim, esses compostos são listados como poluentes prioritários pela USEPA (QU et al., 2015).

O benzeno atua no sistema imunológico, hematopoiético e reprodutivo podendo causar deformações no feto, infertilidade e aborto, além de ser comprovadamente cancerígeno, apresentando-se como o composto mais tóxico dos BTEX (KINDER et al., 2017). O tolueno está associado com as disfunções hepáticas e gastrointestinais sendo, também, teratogênico e depressor do sistema nervoso central (TIBURTIUS et al., 2004; BOWEN e HANNIGAN, 2006). De acordo com a *International Agency for Research on Cancer* (IARC, 2000), o etilbenzeno também tem potencial carcinogênico, além de causar prejuízo ao sistema respiratório, irritação aos olhos e desmaios.

Os distúrbios mais comuns observados com a exposição crônica aos vapores de xilenos são fadiga, dor de cabeça, irritabilidade, fraqueza, perda de memória, sonolência, distúrbio de humor e do equilíbrio, zumbido, náusea e perda de apetite (TIBURTIUS et al., 2004; EL-NAAS et al., 2014). Em concentrações elevadas, o xileno pode levar a inconsciência e morte, por depressão do sistema nervoso central (ATSDR, 2004).

O controle e a fiscalização da qualidade dos solos e da água subterrânea tem sido importante nos últimos anos em função do aumento da demanda dos recursos hídricos subterrâneos para o abastecimento público. No Brasil, as legislações existentes tratam das normas e padrões de potabilidade destinadas ao consumo humano e sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. De acordo com a portaria vigente, N° 2.914/11 do Ministério da Saúde, os valores máximos permitidos para o benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos em água potável são de 5, 170, 200 e 300 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente (BRASIL, 2011a), enquanto que para o lançamento de efluentes, segundo a Resolução N° 430/2011 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA), o valor máximo permitido para benzeno, tolueno, etilbenzeno e xilenos é de 1,2, 1,2, 0,84 e 1,6 mg L^{-1} , respectivamente (BRASIL, 2011b).

3.4 Impactos ambientais

Os acidentes envolvendo hidrocarbonetos de petróleo têm chamado a atenção pública pelos impactos a longo prazo que provocam ao ambiente e à sociedade (LI et al., 2016). No Brasil, em novembro de 2011, de acordo com o relatório da ANP (2012), durante a perfuração de um poço de petróleo em Campo do Frade, na Bacia de Campos, Macaé, RJ, ocorreu o vazamento de 3.700 barris de petróleo, o equivalente a 588 mil litros de óleo no mar, produzindo uma mancha de óleo que alcançou 18 km de extensão. Este vazamento ocorreu devido a sete fissuras no poço, que foi detectado dois dias depois.

Em 2001, o rompimento de um duto da Petrobrás em Barueri, SP, ocasionou o vazamento de 200 mil litros de óleo, que atingiram as águas do rio Tietê e do córrego Cachoeirinha. Em março de 2017, um vazamento de cerca de 3 mil litros de óleo diesel, proveniente de um posto de combustível na cidade de Governador Valadares, MG, atingiu a rede pluvial e consequentemente o rio Doce (SEMAD, 2017).

Considerado como um dos mais graves desastres ambientais da América do Sul, em 2000, de acordo com o Relatório do Ministério do Meio Ambiente (BRASIL, 2001), um duto da Petrobrás que ligava a Refinaria Duque de Caxias (Reduc) ao terminal Ilha d'Água, na Ilha do Governador, no Rio de Janeiro, rompeu-se provocando o derramamento de 1,3 milhão de litros de óleo combustível e graxa nas águas da baía de Guanabara. A mancha se espalhou por mais de 40 km². O fato de ter acontecido dentro de uma baía fez com que os efeitos fossem mais nocivos para o ecossistema local, pois o derramamento não ocasionou apenas a poluição do espelho d'água, mas também das areias, costões rochosos, muros de contenção e pedras das ilhas do Governador e de Paquetá, além de ter provocado danos à fauna e à flora.

Assim, os derrames de petróleo em áreas marítimas e fluviais tem recebido grande atenção por parte de várias áreas de pesquisa. Quando em contato com a água, o óleo como material hidrofóbico forma uma fina camada na superfície, que impede a troca de gases entre o ar e a água, dificultando assim a passagem da luz solar e os processos de respiração e fotossíntese. O impacto dos resíduos ocasiona um colapso crucial à cadeia alimentar (FREITAS et al., 2016).

Durante vazamentos acidentais de grandes proporções, devem ser tomadas ações para remover os contaminantes, como a remediação ou recuperação imediata do poluente. Já os vazamentos em postos de gasolina, têm a característica de provocar contaminações de menor porte, porém contínuos e prolongados (MAPELLI et al., 2017).

Em um derramamento e/ou vazamento de gasolina no solo, ocorre migração vertical pela zona não saturada, por meio dos poros interligados, sob a influência da força gravitacional, com velocidade maior que a da água, expulsando a água intersticial e o ar. Assim, pode ocorrer a formação de várias fases, onde os contaminantes podem transitar de uma fase para outra, e sua permanência em cada uma delas é determinada por propriedades físico-químicas do contaminante e das condições ambientais. A percolação do BTEX pode ser retardada por volatilização e pela sorção nos grãos de solo, principalmente se este for rico em matéria orgânica. Porém, quando o vazamento atinge a zona de aeração, os compostos entram em contato com a água subterrânea e se dissolvem nela, o que facilita a permeabilidade (XU et al., 2015). Portanto, uma vez estabelecida a contaminação, esta poderá atuar em três níveis diferentes: solo, água subterrânea e atmosfera. Assim, a tarefa de avaliação da extensão, dinâmica, concentração das contaminações, análise de riscos e possíveis estratégias de remediação torna-se complexa (EL-NAAS et al., 2014).

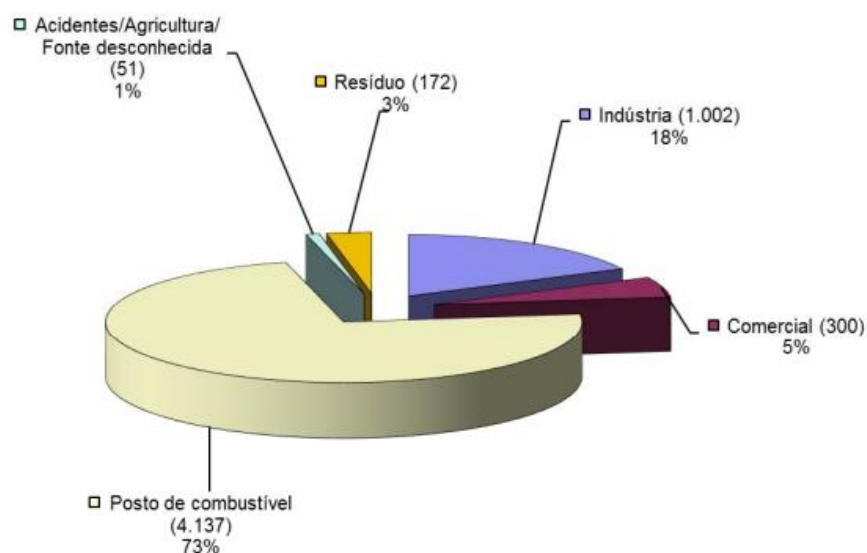
No Estado de São Paulo, a Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental (CETESB) divulgou em 2002, pela primeira vez, uma lista de áreas contaminadas, registrando a existência de 255 áreas contaminadas no Estado de São Paulo. Com o acompanhamento e atualização desses registros, em dezembro de 2016, foram totalizadas 5.662 áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo (CETESB, 2016).

Os postos de combustíveis destacam-se com 4.137 registros (73% do total), seguidos das atividades industriais, comerciais e das instalações para destinação de resíduos. Os casos de acidentes, agricultura e fonte de contaminação de origem desconhecida perfazem 1%, conforme apresenta a Figura 1.

Ainda segundo a CETESB (2016), o grupo de solventes aromáticos, basicamente representados pelos BTEX, apresenta-se como principal grupo de contaminantes encontrado nas áreas impactadas, seguido de combustíveis automotivos, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, metais e solventes halogenados.

Os passos para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas descritos na Resolução CONAMA nº 420/2009 (BRASIL, 2009) de águas determinam critérios e valores orientadores de referência de qualidade, de prevenção e de investigação do solo e valores para águas subterrâneas. A Resolução cita que, na ocorrência comprovada de substâncias químicas que possam causar risco à saúde humana e ao meio ambiente, devem ser desenvolvidas ações específicas para a proteção ambiental feitas por órgãos competentes (LIMA et al., 2017), surgindo assim, caminhos onde a biotecnologia assume um papel fundamental.

Figura 1 – Distribuição das fontes de contaminação, por atividade, no Estado de São Paulo, em dezembro de 2016.



Fonte: CETESB (2016).

3.5 Processo biotecnológico e a biodegradação de hidrocarbonetos

A baixa biodegradabilidade e a persistência dos hidrocarbonetos ocasionam impactos ambientais significativos. Para minimizar esses impactos, são necessárias ações que incluam o desenvolvimento de tecnologias inovadoras, econômicas e ecológicas (SANDU et al., 2017).

Muitos métodos convencionais de tratamentos físico-químicos *ex-situ*, como por exemplo a lavagem do solo, inativação química (com o uso de permanganato de potássio e/ou peróxido de hidrogênio como oxidante químico) e a incineração, separam os contaminantes, porém apresentam muitas limitações, destacando-se o alto custo (TRELLU et al., 2016; VARJANI, 2017). Quando os hidrocarbonetos percolam o solo, grande quantidade permanece sorvida na matriz (aproximadamente 50%), diminuindo a eficiência de remoção. Os custos crescentes e a eficiência limitada desses tratamentos físico-químicos convencionais estimularam o desenvolvimento de tecnologias alternativas para aplicações *in situ* (VARJANI, 2017).

Nesse contexto, micro-organismos com potencial biodegradante tem sido utilizado como uma tecnologia promissora para modificar ou decompor determinados poluentes em áreas contaminadas e, assim reduzir a toxicidade. Esse processo de biorremediação surgiu como uma

tecnologia alternativa de remediação de locais impactados com poluentes orgânicos (DAS e CHANDRAN, 2011; MONTAGNOLLI e BIDOIA, 2012; DAS e DASH, 2014).

Dentre os processos biotecnológicos utilizados na remediação e tratamento de áreas impactadas por hidrocarbonetos, a biodegradação vem despontando como uma técnica bastante promissora e eficaz, podendo ser utilizada como complemento às tecnologias convencionais (BIDOIA et al., 2010; MAZZEO et al., 2010; EL-NAAS et al., 2014; VARJANI, 2017).

A biodegradação é baseada em três princípios básicos para biotransformar ou mineralizar os compostos contaminantes: a presença do micro-organismo com capacidade metabólica, sendo eles autóctones ou adicionados (bioaugmentação); a disponibilidade do contaminante como fonte de carbono e energia e; as condições ambientais adequadas para o crescimento e atividade microbiana (ORTIZ-HERNÁNDEZ et al., 2014).

A biotransformação consiste em alterar a estrutura molecular de compostos orgânicos, para uma molécula com características diferentes da original, que pode ou não ser menos tóxica que sua precursora (OBEROI e PHILIP, 2017). A mineralização, por sua vez, representa a degradação completa das moléculas orgânicas em substâncias inorgânicas inertes, como dióxido de carbono, água e compostos residuais (DAS e CHANDRAN, 2011; EL-NAAS et al., 2014).

Observa-se geralmente que uma maior biodegradação de hidrocarbonetos depende da presença de micro-organismos específicos. Além disso, a composição da população microbiana é diretamente afetada pelas condições ambientais e pela composição dos hidrocarbonetos (EL-NAAS et al., 2014). De acordo com Colla et al. (2008), locais contaminados com poluentes constituem uma boa fonte de obtenção de micro-organismos para estudos de biorremediação desses mesmos poluentes, uma vez que o local contaminado atua como um meio de cultivo seletivo para esses micro-organismos, sendo que os que permanecem nestes locais tornam-se adaptados ao poluente que, por sua vez, pode ser utilizado como fonte de nutrientes para o crescimento.

Em estudo realizado por Atlas (1991) verificou-se que os micro-organismos com capacidade de degradar os hidrocarbonetos em ecossistemas não poluídos consistiam em menos de 0,1% da comunidade microbiana, porém esse número aumentou de 1-10% da população total, quando o meio apresentou contaminação por hidrocarbonetos de petróleo. No entanto, é bem estabelecido que em ambientes poluídos, a diversidade microbiana geral diminui, resultando no surgimento de populações dominantes dentro dessas comunidades perturbadas, que podem sobreviver com os contaminantes tóxicos (AISLABIE et al., 2006; WOLICKA et al., 2009; KUMAR e KHANNA, 2010; CHIKERE et al., 2011; VARJANI, 2017).

A degradação microbiológica possui uma sequência preferencial de compostos para serem degradados, sendo que os hidrocarbonetos alifáticos (alcanos e alcenos) parecem ser mais rápidos e facilmente degradados, seguidos pelos hidrocarbonetos aromáticos e finalmente os cicloalcanos (VARJANI, 2017). Geralmente, compostos ramificados e polinucleados são mais difíceis de degradar que moléculas monoaromáticas ou com cadeias simples. Quando aumenta o grau de halogenação da molécula, diminui-se a biodegradabilidade.

Para o óleo diesel, a presença da fração de n-alcanos de C₁₀-C₂₀ torna-o mais suscetível à degradação microbiana. Uma grande diversidade de estudos relacionados à degradação deste tipo de combustível informa que isto só é possível graças à presença de micro-organismos providos de um aparato enzimático específico, capaz de utilizar o óleo diesel presente no ambiente, em fonte de carbono e energia (NWAOGU et al., 2008).

Além disso, a biodegradação dos hidrocarbonetos, com relação à presença de etanol, tem sido bastante investigada, devido a preferência dos micro-organismos pelo etanol, o que leva ao decréscimo da biodegradação dos hidrocarbonetos (ALVAREZ e HUNT, 2002; LOVANH et al., 2002; SILVA e ALVAREZ, 2004; CHEN et al., 2008; CORSEUIL et al., 2015). De acordo com Rice (2000) e Deeb et al. (2002), a preferência da degradação do etanol ocorre na presença de enzimas constitutivas, produzidas naturalmente pelos micro-organismos por várias vias metabólicas, enquanto que, para a degradação do BTEX, são necessárias enzimas específicas que demandam tempo e a presença do contaminante para serem induzidas.

3.5.1 Micro-organismos utilizados em biodegradação

A capacidade de certos micro-organismos degradar substâncias orgânicas tóxicas é um fato bem documentado (VOGT et al., 2011; PRINCE et al., 2016; PADHI e GOKHALE, 2017; OBEROI e PHILIP, 2017; VARJANI, 2017). A habilidade em utilizar os compostos BTEX como única fonte de carbono, foi estabelecida em 1908, quando a bactéria *Bacillus hexavarbovorum* foi isolada e estudada quanto à sua capacidade de crescer aerobicamente em tolueno e xileno (GIBSON e SUBRAMANIAN, 1984; ALVAREZ e HUNT, 2002).

Inúmeros micro-organismos têm sido relatados por crescerem aerobicamente em compostos BTEX como única fonte de carbono, conforme apresenta a Tabela 2. A grande maioria é constituída por bactérias, havendo também actinomicetos, fungos e leveduras (VARJANI, 2017). Os membros do gênero *Pseudomonas* são caracterizados por degradar centenas de compostos orgânicos diferentes e por possuir habilidades na biodegradação dos compostos BTEX (SHIM et al., 2005; OTENIO et al., 2005; QU et al., 2015; VARJANI e UPASANI, 2016).

Tabela 2 - Potencial de degradação de compostos BTEX por diferentes micro-organismos.

Micro-organismos	Substrato	Referências
<i>Bacillus firmus</i>	m-X	Irshaid e Jacob (2015)
<i>Bacillus subtilis</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BTX	Mukherjee e Bordoloi (2012)
<i>Candida tropicalis</i>	T	Ahmed e Song (2011)
<i>Cladosporium</i> sp	o- e m-X	Nikolova e Nenov (2005)
<i>Cladophialophora</i> sp.	BTEX	Prenafeta-Boldú et al. (2002)
<i>Desulfotomaculum</i>	o- e m-X	Morasch et al. (2004)
<i>Enterobacter cloacae</i> SG208	B	Padhi e Gokhale (2017)
<i>Marinobacter</i> spp	B	Nicholson e Fathepure (2004)
<i>Pseudomonas putida</i> e <i>Pseudomonas fluorescens</i>	BTEX	Shim et al. (2005) e Mazzeo et al. (2010)
<i>Pseudomonas putida</i> CCM 852	TX	Otenio et al. (2005)
<i>Pseudomonas putida</i> F1	B	Reardon et al. (2002)
<i>Pseudomonas thivervalensis</i> MAH1	BTEX	Qu et al. (2015)

Fonte: Elaborado pelo autor.

Um consórcio de bactérias foi utilizado por Gusmão et al. (2006) para formar biofilme em um reator anaeróbio horizontal de leito fixo, contendo BTEX. Entre os micro-organismos degradadores estavam membros do gênero *Bacteroides* e *Pseudomonas*.

Khodaei et al. (2017) isolaram uma cepa de *P. zhaodongensis* de água subterrânea contaminada com petróleo e identificaram sua capacidade em degradar compostos BTEX, simples e misturados. Em solução pura, a linhagem bacteriana degradou benzeno, tolueno e etilbenzeno, enquanto que o m-xileno não foi biodegradado. Ao testar os compostos em mistura, a bactéria se mostrou capaz de degradar todos os compostos, revelando um co-metabolismo em presença de benzeno e tolueno. Geralmente, são as bactérias que possuem papel central na biorremediação, entretanto, outros micro-organismos como fungos filamentosos e protozoários também podem contribuir (ORTIZ-HERNÁNDEZ et al., 2014; NWANKWEGU e OWOSI, 2017).

Segundo Das e Chandran (2011), alguns gêneros de leveduras, isolados de água contaminada, como *Candida*, *Rhodotorula*, *Geotrichum* sp, e *Trichosporon* também foram capazes de degradar hidrocarbonetos.

Teixeira (2007) isolaram e caracterizaram 37 linhagens bacterianas de solos contaminados com gasolina. Foi determinada a degradação do etanol e do BTEX na gasolina comercial, por meio de cromatografia gasosa, bem como a produção de biossurfactantes para cinco destes isolados. Dentre as espécies encontradas, foram identificadas *P. putida* e *P. aeruginosa*, que apresentaram diferentes capacidades de degradação aos derivados da gasolina.

3.5.2 Aspectos biológicos da degradação de BTEX

As mudanças nas concentrações dos compostos ligadas à biodegradação possuem um papel de grande importância em quadros de remediação, constituindo um dos processos mais relevantes para remoção dos BTEX em águas. Para que essa biodegradação ocorra, além da presença do substrato, outras condições são previamente necessárias, como: presença de um aceptor de elétrons, expressão enzimática e acesso microbiano ao substrato (VARJANI e UPASANI, 2017).

O processo de biodegradação baseia-se em reações de oxi-redução biológica, por meio de micro-organismos, em que os hidrocarbonetos são oxidados (doam elétrons) na presença de aceptores de elétrons, que são reduzidos (ganham elétrons). Existem diferentes compostos que podem agir como aceptores de elétrons, entre eles o oxigênio (O_2), o nitrato (NO_3^-), óxidos de ferro ($Fe(OH)_3$), sulfato (SO_4^{2-}) e a água (H_2O). Além dos aceptores de elétrons, outras variáveis podem estar relacionadas com os processos biológicos, como o pH e o potencial redox da substância (DAS e CHANDRAN, 2011; EL-NAAS et al., 2014; CORSEUIL et al., 2015).

A transferência de elétrons é essencial para a respiração celular e libera a energia (ATP) necessária para funções vitais aos micro-organismos. As bactérias aeróbicas utilizam oxigênio como aceptor de elétrons, produzindo gás carbônico e água, enquanto que as bactérias anaeróbicas utilizam outros compostos, como nitrato (NO_3^-), íon Fe^{3+} e sulfato (SO_4^{2-}), produzindo metano e água (EL-NAAS et al., 2014).

A maioria dos hidrocarbonetos de petróleo são biodegradados sob condições aeróbias, sendo que o oxigênio atua como um co-substrato para a enzima que pode inicializar o metabolismo do hidrocarboneto, além de ser utilizado como aceptor final de elétrons para a geração de energia (WOLICKA et al., 2009; IRSHAD e JACOB, 2015). Em muitos casos, a maior limitação na biodegradação aeróbia em subsuperfície é a baixa solubilidade do oxigênio em água. As reações estequiométricas globais da biodegradação do BTEX em condições aeróbicas são apresentadas, de acordo com as Equações 1 a 3, onde o BTEX é o elétron doador e o oxigênio é o aceptor de elétrons.



Uma das limitações naturais comuns à biodegradação são os altos níveis de concentração de poluentes, que podem prejudicar o crescimento dos micro-organismos de

modo a afetar a taxa de biodegradação dos substratos (MNIF et al., 2017). Contudo, as lentas taxas de biodegradação *in situ* são frequentemente um resultado do acesso restrito aos poluentes pelos micro-organismos. Deste modo, a degradação depende principalmente da transferência do substrato. Por outro lado, a presença de fontes de carbono mais facilmente assimiláveis, como o etanol presente na gasolina, pode diminuir a taxa de biodegradação de um composto alvo (DEEB et al., 2002; GUSMÃO et al., 2006; CORSEUIL et al., 2015).

A baixa concentração de nutrientes, como nitrogênio e fósforo, é outro fator que pode limitar a extensão e viabilidade da biodegradação (HOLLENDER et al., 2003; BENINCASA, 2007). Os micro-organismos necessitam dos macronutrientes para sintetizar componentes celulares, como o nitrogênio para aminoácidos e enzimas, o fósforo para o ATP e o DNA, enxofre para algumas proteínas e coenzimas, cálcio para estabilizar a parede celular e magnésio para estabilizar os ribossomos. Micro-organismos requerem principalmente nitrogênio e fósforo para incremento de biomassa, assim, a disponibilidade desses nutrientes na área contaminada é um fator crítico para a efetividade da biodegradação (ABOUSEOUD et al., 2008).

O pH ótimo para a ação da maioria dos micro-organismos é próximo da neutralidade, porém, muitos micro-organismos se adaptam bem, sem prejuízo de suas funções, em valores de pH entre 5 e 9 (MADIGAN et al., 2016). No entanto, normalmente o pH diminui durante a biodegradação devido à produção de metabólitos ácidos e CO₂, podendo provocar a diminuição da atividade microbiana (DÖRR, 2008).

A temperatura do meio é, também, outro importante fator para o crescimento e atividade dos micro-organismos, influenciando tanto na natureza físico-química dos poluentes (a solubilidade dos compostos mais hidrofóbicos depende deste parâmetro, uma vez que o aumento da temperatura provoca diminuição da viscosidade, afetando o grau de dispersão, a volatilização e as taxas de difusão dos compostos orgânicos), quanto na biodisponibilidade e velocidades das reações químicas e enzimáticas das células (MARTÍNEZ-ALONSO e GAJU, 2005). Temperaturas muito acima do valor ótimo podem levar à desnaturação e inativação de proteínas, enzimas e ácidos nucleicos. Muitas das bactérias presentes no meio subterrâneo operam mais eficientemente na faixa de 20 a 40 °C e esta é a faixa de temperatura de muitos ambientes naturais (VARJANI e UPASANI, 2017).

Outro fator a ser considerado como limitante da biorremediação é a presença de biomassa insuficiente para a degradação dos contaminantes. Para Corseuil (1994), baixas populações de micro-organismos podem resultar em aumento da fase lag, antes do início mensurável da biodegradação, mesmo em condições favoráveis de oxigênio e nutrientes.

3.5.3 Expressão enzimática – plasmídeo TOL

O destino dos hidrocarbonetos degradados, depende de micro-organismos que conseguiram desenvolver estratégias para aumentar suas via de biodisponibilidade e degradação, lhes permitindo utilizar os hidrocarbonetos como fontes de carbono e energia (MAPELLI et al., 2017). Todavia, a complexidade dos processos metabólicos necessários à degradação, leva à formação de consórcios, com bactérias de diferentes gêneros e espécies, cada uma especializada em degradar uma ou várias frações de hidrocarbonetos (LITTLEJOHNS e DAUGULIS, 2008).

Nos últimos anos, muitos trabalhos foram publicados descrevendo os mecanismos e, de forma geral, o caminho metabólico para a degradação dos hidrocarbonetos (RON e ROSENBERG, 2014; MECKENSTOCK et al., 2016; WILKES et al., 2016; VARJANI e UPASANI, 2017).

A rota metabólica da degradação dependerá do micro-organismo envolvido e das condições favoráveis ao seu crescimento (JOUTEY et al., 2013). Qualquer composto sofrerá biodegradação somente se houver uma enzima ou um sistema enzimático capaz de catalisá-lo (DIEZ, 2010).

Dentre os micro-organismos degradadores, a *P. putida* apresenta grande versatilidade metabólica, o que permite seu crescimento em diferentes fontes de carbono e a caracteriza como um micro-organismo de grande importância para a degradação natural de ambientes contaminados (OTENIO et al., 2005; D'ALVISE et al., 2010). Essas bactérias possuem plasmídeos como elemento genético, além do cromossomo. Embora os plasmídeos possuam a sua própria origem de replicação, eles dependem de enzimas cromossomicamente codificadas para a sua replicação. Por definição, os plasmídeos não codificam funções essenciais para a bactéria, porém, carregam genes que influenciam na fisiologia celular da mesma (MADIGAN et al., 2016).

Entre os grupos de plasmídeos naturais encontrados em *P. putida* está o plasmídeo de degradação, denominado plasmídeo TOL, que confere às células a capacidade de degradarem compostos tóxicos como hidrocarbonetos monoaromáticos. O plasmídeo TOL (pWW0), originalmente isolado da linhagem *P. putida* mt-2 por Williams e Murray (1974) é um dos mais bem estudados plasmídeos catabólicos, possuindo a capacidade de codificar a via de degradação para tolueno, xileno e etilbenzeno (BURLAGE et al., 1989; GREATER et al., 2002; OTENIO et al., 2005; D'ALVISE et al., 2010; DOMÍNGUEZ-CUEVAS e MARQUÉS, 2017).

O plasmídeo TOL (pWW0) possui 117 kb e pertence a classe de incompatibilidade IncP-9. Ele é estável em diversos micro-organismos, como *P. putida*, *P. aeruginosa*, *P.*

corrugata e *Escherichia coli* (GREATER et al., 2002). Otenio et al. (2005) realizaram eletroforese do DNA plasmidial da linhagem *P. putida* CCMI 852, isolada de uma estação de tratamento de esgoto doméstico e encontraram um perfil genético que correspondeu ao perfil padrão do plasmídeo TOL (pWW0).

Para que o processo de degradação aconteça, é necessário que haja uma indução de enzimas degradadoras apropriadas. Para isso, a presença de um indutor (o qual pode ser o substrato/contaminante a ser degradado) deve estar em concentrações mais altas que o limite mínimo de indução, envolvendo então a ativação de regiões específicas do genoma bacteriano (RÜEGG et al., 2007; COZZARELI et al., 2010). Em geral esse limite é bastante baixo e a indução de enzimas dificilmente é um fator limitante na biorremediação de BTEX. Quando alguns substratos alvos como, por exemplo, o tolueno, estão presentes, as bactérias iniciam reações bioquímicas em cascata que resultam na transcrição de genes (plasmídeos) que codificam a síntese das enzimas necessárias para degradar o composto alvo (MARIANO, 2006). A confirmação da presença do plasmídeo em uma bactéria potencialmente capaz de degradar hidrocarbonetos torna-se uma ferramenta biológica de grande importância.

As contaminações subterrâneas por BTEX são geralmente descobertas vários anos após a ocorrência de um vazamento e a aclimação microbiológica e a indução de enzimas pode ocorrer durante este período (CARMONA et al., 2009). Os plasmídeos carregam informações genéticas essenciais para iniciar a degradação dos hidrocarbonetos.

As duas principais vias metabólicas aeróbias de degradação que levam a mineralização dos compostos BTEX são fornecidas por dois sistemas enzimáticos: dioxigenases e monooxigenases. A dioxigenase, também denominada como via TOD, ataca o anel aromático e as monooxigenases, denominada via TOL, ataca aos substituintes metil (EL-NAAS et al., 2014).

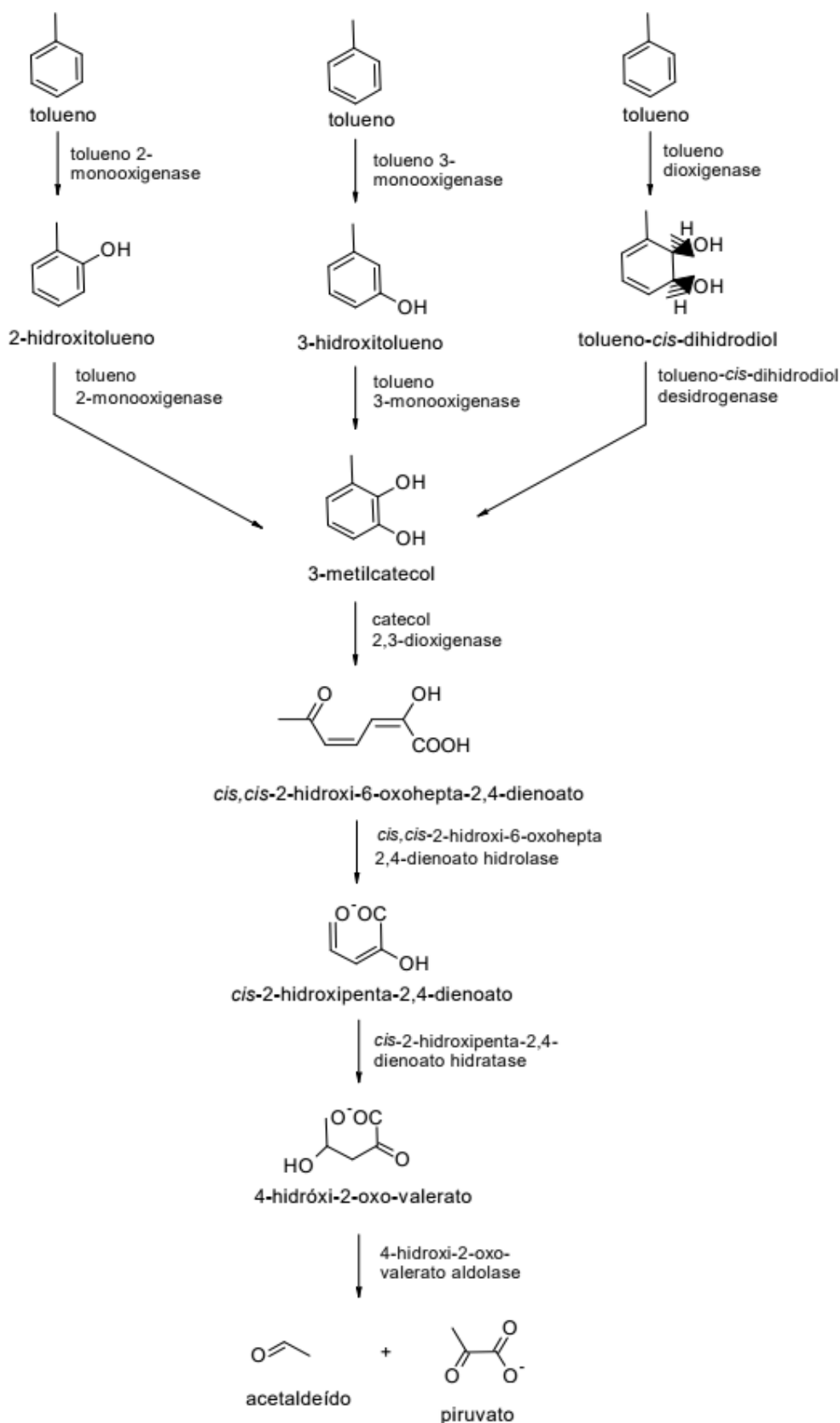
Hidrocarbonetos aromáticos geralmente são hidroxilados a catecóis e os anéis subsequentemente degradados a intermediários, que podem ser facilmente convertidos a intermediários do ciclo de Krebs, como o ácido acético, acetaldeído ou ácido pirúvico, conforme apresenta a Figura 2 (FUCHS et al., 2011; PEIXOTO et al., 2011).

Otenio et al. (2005) estudaram a ação da bactéria *P. putida* CCMI 852 com presença do plasmídeo TOL sobre benzeno, tolueno e xileno, individualmente e em misturas. Os autores concluíram que a *P. putida* CCMI 852 foi capaz de metabolizar tolueno e xileno, mas o benzeno não foi metabolizado. Quando em presença do benzeno nas misturas, ocorreu inibição da ação da bactéria sobre os substratos tolueno e xileno, com velocidade de degradação 50% menor, comparado com soluções contendo apenas tolueno e xileno. Segundo Lee et al. (1994) e

Martino et al. (2012), o benzeno pode ser metabolizado via TOD unicamente, enquanto que o tolueno e xilenos podem estar sujeitos à oxidação por ambas as vias.

Cavalca et al. (2000), em estudos conduzidos para selecionar bactérias degradadoras de compostos aromáticos, verificaram a presença de genes que codificam as enzimas tolueno-di-oxigenase, xileno-mono-oxigenase e catecol 2,3-di-oxigenase. Quinze das cinquenta cepas isoladas foram identificadas como *P. putida*, *P. aureofaciens*, *P. aeruginosa* e *Alcaligenes xilosoxidans*. Estas espécies foram crescidas em vários hidrocarbonetos aromáticos, dentre os quais, os compostos BTEX. O benzeno, m-xileno e p-xileno foram utilizados por 53,3% das quinze espécies, seguida pelo etilbenzeno com utilização de 66,7%. Todas as quinze espécies foram capazes de utilizar o tolueno, e nenhuma cresceu no o-xileno. A via TOL foi detectada quando a utilização dos substratos ocorreu com *P. putida* e *A. xilosoxidans*, enquanto que a via TOD foi encontrada com *P. aureofaciens*, *A. xilosoxidans* e *P. putida*. O crescimento da *P. putida* CM23 no benzeno, tolueno e m-p-xileno sugeriu a presença das rotas metabólicas TOD e TOL.

Figura 2 - Vias de degradação aeróbia do tolueno (pela ação das enzimas tolueno 2- e 3-monooxigenases e tolueno dioxigenase).



Fonte: Dörr (2008).

Dessa maneira, a grande motivação de pesquisadores envolvidos em estudos de biodegradação é a busca por micro-organismos versáteis capazes de degradarem, de maneira eficiente, uma grande variedade de poluentes a baixo custo operacional. Esforços relativos à modificação genética de bactérias têm sido desenvolvidos a fim de encontrarem micro-organismos que incorporem caminhos metabólicos para mineralizar todos os compostos BTEX e suas misturas. A completa mineralização da mistura dos compostos BTEX por *P. putida* é possível a partir de modificações genéticas que combinem os caminhos TOD e TOL (LEE et al., 1995).

3.6 Biossurfactantes

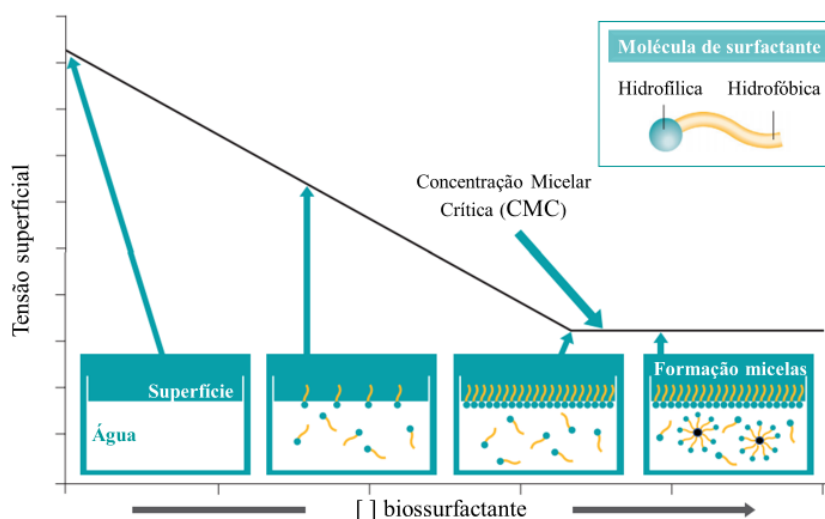
Em situações onde há substratos e receptores de elétrons em quantidades suficientes e micro-organismos para biodegradação, pode não haver a indução enzimática devido à dificuldade de acesso à fonte de carbono pela biomassa. A baixa biodisponibilidade desses contaminantes, resulta em um fator limitante que interfere no processo de biorremediação. Uma reduzida biodisponibilidade faz com que a fonte de carbono, mesmo em altas concentrações, dificulte tanto a evolução da degradação quanto a construção e manutenção da biomassa catabolicamente ativa (PEREIRA et al., 2013; GONG et al., 2015).

Dessa forma, a fim de promover maior acessibilidade destas moléculas, os micro-organismos são capazes de emulsificar os hidrocarbonetos em solução por meio da produção de biossurfactantes, que agem como tensoativos e auxiliam no transporte e na translocação de substratos insolúveis como os hidrocarbonetos, por meio da membrana celular, aumentando o acesso dos micro-organismos ao substrato e facilitando a ocorrência de reações de degradação (PIRÔLLO et al., 2008; COIMBRA et al., 2009; GONG et al., 2015; GUDIÑA et al., 2015b; MAPELLI et al., 2017; PARTHIPAN et al., 2017).

Os biossurfactantes possuem uma estrutura anfipática, com uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica (PIRÔLLO et al., 2008). A porção hidrofílica pode ser composta de aminoácidos ou peptídeos, mono, di ou polissacarídeos, enquanto a porção hidrofóbica é constituída de uma cadeia hidrocarbônica de um ou mais ácidos graxos, saturados ou insaturados (VIJAYAKUMAR e SARAVANAN, 2015). Esses tensoativos tendem a se distribuírem na interface de fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo), aumentando a solubilidade dos compostos imiscíveis em água. Esta distribuição das moléculas é responsável pela principal propriedade desses compostos, que é a capacidade de redução das tensões superficial e interfacial (PIRÔLLO et al., 2008).

Devido à presença dos surfactantes ocorre a redução da tensão superficial, sendo que um bom surfactante pode reduzir a tensão superficial da água de 72 para 30 mN m⁻¹ (LOVAGLIO et al., 2014). A tensão superficial correlaciona-se com a concentração dos compostos tensoativos até o momento em que a concentração micelar crítica (CMC) é alcançada (Figura 3). Assim, a CMC é definida como a concentração mínima de tensoativo necessária para atingir os valores mais baixos de tensão superficial e interfacial, a partir da qual se inicia a formação de micelas, estruturas globulares a partir de agregados das moléculas anfipáticas. A CMC desses compostos varia normalmente de 5 a 200 mg L⁻¹ (LOVAGLIO et al., 2014), sendo que surfactantes eficientes apresentam baixa CMC, ou seja, menos surfactante é necessário para reduzir a tensão superficial (VIJAYAKUMAR e SARAVANAN, 2015).

Figura 3 - Estrutura dos biossurfactantes e formação de micelas.



Fonte: Adaptado de Particle Sciences (2010).

A formação das micelas, conforme apresenta a Figura 3, permite que os hidrocarbonetos se solubilizem em água. Elas atuam no remanejamento molecular, através do acúmulo na superfície de compostos insolúveis, modificando as ligações de hidrogênio, assim como outras interações hidrofílicas e hidrofóbicas, o que leva a um aumento da biodisponibilidade de substrato e, conseqüentemente, aumento da biodegradabilidade (EMTIAZI et al., 2005). Em termos de localização celular, esses compostos podem ser encontrados intracelularmente, permanecendo ligados à superfície celular ou, ainda, serem conduzidos para o meio extracelular (MAKKAR et al., 2011).

Estas propriedades os tornam adequados para serem utilizados em diferentes aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, formação de espuma,

umedecimento, solubilização e dispersão de fases (NITSCHKE e PASTORE, 2002; VIJAYAKUMAR e SARAVANAN, 2015).

A produção de biossurfactantes pode ser espontânea ou induzida pela presença de substratos hidrofóbicos e hidrofílicos (NITSCHKE et al., 2005a), por variações de pH, temperatura, aeração e velocidade de agitação, ou ainda, quando o crescimento celular é mantido sob condições de estresse, como baixas concentrações da fonte de nitrogênio (MAKKAR et al., 2011).

Quando comparados com surfactantes sintéticos, os biossurfactantes apresentam várias vantagens incluindo, diversidade estrutural, biodegradabilidade, biocompatíveis, menos tóxicos, alta seletividade e estabilidade a variações de pH, de salinidade e de temperatura (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010; HAZRA et al., 2011; GUDIÑA et al., 2015a; GUDIÑA et al., 2015c; VIJAYAKUMAR e SARAVANAN, 2015).

Dessa forma, podem ser aplicados em diferentes processos industriais, como nas indústrias farmacêuticas, de cosméticos e de alimentos, o maior mercado é na indústria de petróleo, na qual tais componentes podem ser utilizados na limpeza e biorremediação de mares e solos contaminados com petróleo, na remoção de resíduos de óleo em tanques de armazenamento e na recuperação do produto (THANOMSUB et al., 2007; COIMBRA et al., 2009; GUDIÑA et al., 2015b; VIJAYAKUMAR e SARAVANAN, 2015).

Biossurfactantes de *P. aeruginosa* foram testados para remoção da contaminação por óleo no acidente com o navio Exxon Valdez no Alasca. Harvey et al. (1990) observaram que amostras contendo solução 1% de biossurfactante apresentaram uma remoção do óleo por micro-organismos três vezes mais eficiente do que os ensaios controle. Tais resultados demonstraram a habilidade dos biossurfactantes na remoção de poluentes ambientais oleosos.

Contudo, a viabilidade comercial dos biossurfactantes é ainda limitada pelos altos custos de produção, associados a métodos ineficientes de recuperação e ao uso de matérias primas de alto valor. Dessa forma, para melhorar a eficiência da produção de biossurfactantes por micro-organismos, os custos podem ser significativamente minimizados com o desenvolvimento de processos mais eficientes e o uso de matérias primas de baixo custo no meio de cultivo, como resíduos agroindustriais, dentre eles, melaço, vinhaça, resíduos lácteos, resíduo de coco, mandioca, glicerol, óleos usados, devem ser explorados uma vez que representam cerca de 30-50% do custo total de produção (BENINCASA e ACCORSINI, 2008; APARNA et al., 2012; BANAT et al., 2014; LOVAGLIO et al., 2014; FAI et al., 2015; GUDIÑA et al., 2015a; VECINO et al., 2017).

A composição do biossurfactante depende do micro-organismo produtor, do substrato e das condições do processo de produção. Neste sentido, os biossurfactantes são classificados por sua estrutura química, podendo ser agrupados nas seguintes classes: glicolipídios (ramnolipídios, soforolipídios, trealopídios), lipopeptídios e lipoproteínas (peptídio, viscosina, surfactina, gramicidina, polimixina), ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios, surfactantes poliméricos (emulsan, biodispersan, liposan, carboidrato-lipídeo-proteína, mananalipídeo-proteína) e surfactantes particulados (NITSCHKE et al., 2005b; NITSCHKE e PASTORE, 2006; GUDIÑA et al., 2015b; VIJAYAKUMAR e SARAVANAN, 2015). A Tabela 3 apresenta alguns tipos de biossurfactantes produzidos por diferentes micro-organismos.

Tabela 3 – Produção de biossurfactantes por diferentes micro-organismos.

Micro-organismos	Biossurfactantes	Referências
<i>Bacillus licheniformis</i>	Surfactina	El-Sheshtawy et al. (2015)
<i>Bacillus subtilis</i> A1	Surfactina	Parthipan et al. (2017)
<i>Candida bombicola</i>	Soforolipídios	Elshafie et al. (2015)
<i>Lactobacillus paracasei</i>	Glicolipopeptídeo	Vecino et al. (2017)
<i>Pichia anomala</i>	Soforolipídios	Thaniyavarn et al. (2008)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> TMN	Ramnolipídios	Moussa et al. (2014)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA1	Ramnolipídios	Mendes et al. (2015)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> LBI 2A1	Ramnolipídios	Lovaglio et al. (2014)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ramnolipídios	Vasileva-Tonkova et al. (2011)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> SBW25	Viscosinas	Alsohim et al. (2014)
<i>Pseudomonas putida</i> KT2440	Ramnolipídios	Beuker et al. (2016)
<i>Pseudomonas putida</i> BD2	Fosfolipídios	Janek et al. (2013)

Fonte: Elaborado pelo autor.

3.6.1 Ramnolipídios

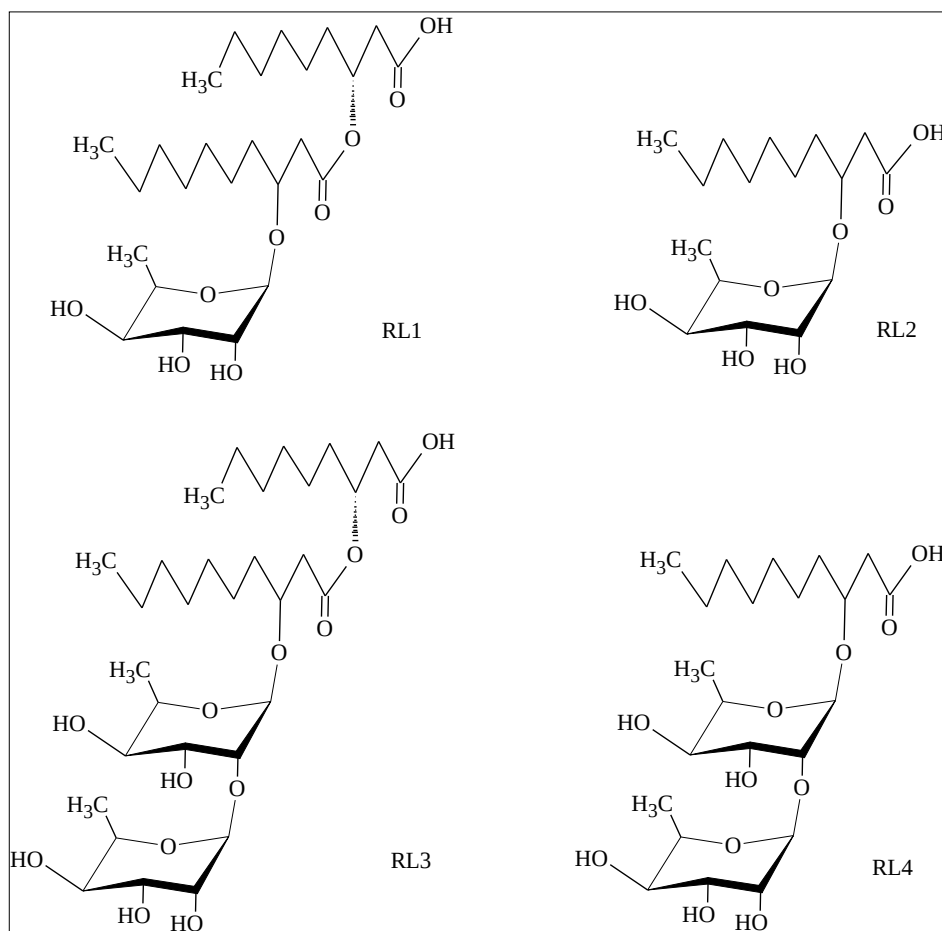
Dentre a gama de micro-organismos produtores de biossurfactantes, as bactérias encontram-se em grande destaque. Bactérias pertencentes ao gênero *Pseudomonas*, como a *P. aeruginosa* são capazes de sintetizar biossurfactantes conhecidos como ramnolipídios, que são os glicolipídios mais estudados. Esses compostos contêm ácidos graxos ligados a moléculas de ramnose (NITSCHKE e PASTORE, 2002; NITSCHKE et al., 2005a; ABOUSEOUD et al., 2008; LOVAGLIO et al., 2014; BAI e MCCLEMENTS, 2016).

As estirpes de *Pseudomonas* excretam principalmente dois tipos de ramnolipídios, mono-ramnolipídios e di-ramnolipídios (Figura 4), que são glicolipídios que contêm uma ou duas moléculas de ramnose, ligadas a uma ou duas moléculas de ácido -hidroxidecanóico (BAI

e MCCLEMENTS, 2016; KŁOSOWSKA-CHOMICZEWSKA et al., 2017). Os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa* foram descritos por Lang e Wagner (1987) como uma mistura de espécies homólogas, Rha₂C₁₀C₁₀, RhaC₁₀C₁₀, Rha₂C₁₀ e RhaC₁₀ (LOVAGLIO, 2011).

Suas propriedades dependem da composição da mistura em relação às moléculas homólogas, sendo determinada pela linhagem bacteriana e pelas condições do meio de cultura e do cultivo (NITSCHKE et al., 2005b; PORNSUNTHORNTAWEE et al., 2010; LOVAGLIO et al., 2014). Estes diferentes tipos de ramnolipídios possuem atividade de superfície semelhantes, sendo considerados como a classe mais promissora em termos de produção industrial, por suas características físico-químicas e biológicas distintas e alta produtividade (NITSCHKE et al., 2005a; SOBERÓN-CHÁVEZ, 2005).

Figura 4 – Estrutura dos quatro principais homólogos dos ramnolipídios.



Fonte: Adaptado de Bai e McClements (2016).

Ramnolipídios produzidos por diferentes linhagens de *Pseudomonas*, apresentaram-se estáveis (pH, temperatura e salinidade), com alta capacidade tensoativa e habilidade em emulsificar diferentes hidrocarbonetos (LOVAGLIO et al., 2011; APARNA et al., 2012).

3.6.2 Interação: hidrocarbonetos x biossurfactante x micro-organismo

Conforme Das e Chandran (2011), os biossurfactantes promovem o aumento da disponibilidade do substrato hidrofóbico (hidrocarbonetos) para os micro-organismos, devido à dispersão do hidrocarboneto, por meio de seu encapsulamento em micelas, vesículas esféricas ou irregulares e estruturas lamelares.

Rahman et al. (2007), durante o estudo do aumento da degradação de hidrocarbonetos do petróleo, estimulada por ramnolipídio em meio líquido e solo, observaram que a adição do surfactante aumentou a degradação dos hidrocarbonetos e que o tratamento com adição de nutrientes e surfactante obteve melhores resultados. Segundo os autores, uma das principais razões para persistência de alguns poluentes hidrofóbicos no ambiente, se deve a sua forte adesão às partículas do solo. Portanto, a quantidade de contaminante biodegradado não depende apenas da sua estrutura química, mas também das condições ambientais a qual ele está inserido. A adição do ramnolipídio aumentou a disponibilidade dos hidrocarbonetos aos micro-organismos, que receberam o devido aporte de nutrientes.

Em estudo realizado por Rahman et al. (2002), foram observadas a produção de ramnolipídios por duas cepas de *P. aeruginosa* DS10-129 e GS9-119. As cepas foram capazes de emulsificar uma variedade de hidrocarbonetos, entre eles o xileno e o benzeno. A cepa DS10-129 apresentou capacidade de emulsificação superior a 70% para todos os compostos testados.

3.7 Soro de ricota

De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2015), a produção de leite no Brasil em 2015 foi estimada em 35 bilhões de litros, o que tornou o país o quarto maior no ranking mundial dos países produtores. Desse volume, 24 bilhões de litros foram adquiridos por laticínios sob inspeção sanitária. Do leite inspecionado, 46% (11 bilhões de litros) foram transformados em queijos.

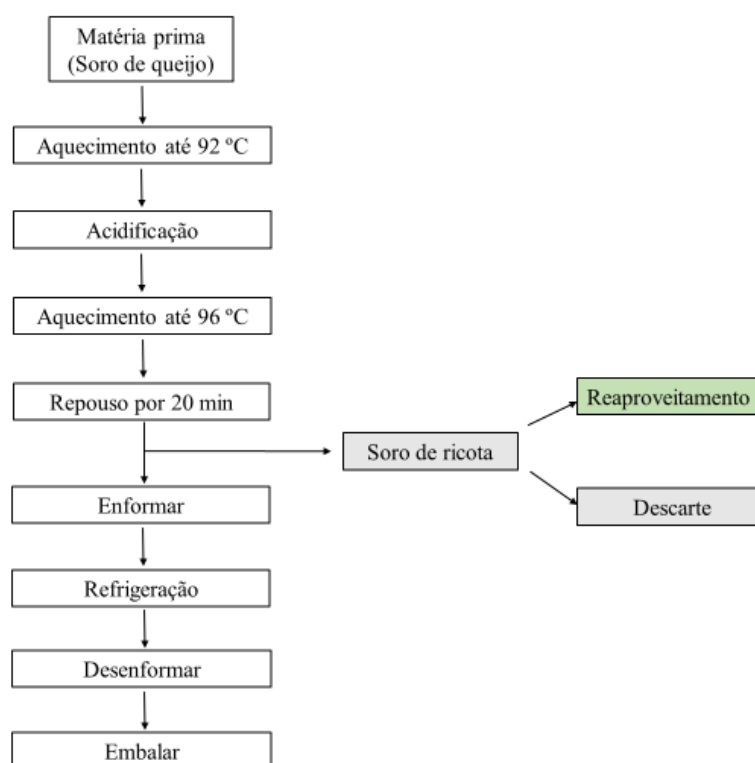
O queijo é o produto resultante da coagulação do leite por meio da adição de enzimas coagulantes e/ou ácido láctico. Na fabricação é gerado o soro de queijo, que representa de 80 a 95% do volume total do leite utilizado durante a produção de queijos e contém, aproximadamente 55% dos nutrientes do leite: proteínas solúveis, lactose, vitaminas, minerais e uma quantidade mínima de gordura (ALVES et al., 2014; BALD et al., 2014).

A ricota, de origem italiana, suave, não maturada e de coloração branca, é uma alternativa de aproveitamento do soro resultante da fabricação de queijo ou de uma mistura de soro e leite bovino pasteurizado integral ou desnatado. Por seu baixo teor de gordura e alta

digestibilidade, a ricota é considerada um produto dietético, com alto teor de umidade (RIBEIRO et al., 2005; CERESER et al., 2011).

O princípio da fabricação da ricota é baseado na coagulação e precipitação das proteínas do soro (albumina e lactoglobulina) não coaguláveis pelo coalho. São proteínas facilmente desnaturadas e precipitadas por aquecimento a 80-92 °C e subsequente acidificação com ácido acético ou láctico em concentrações adequadas, conforme apresenta a Figura 5, o que constitui como princípio básico da fabricação da ricota (RIBEIRO et al., 2005; CAROTA et al., 2017). Após repouso por 20 min, ocorre o descarte do soro da produção da ricota, um fluido opaco e verde-amarelado, denominado soro de ricota, principal subproduto da produção (SANSONETTI et al., 2010; CAROTA et al., 2017). Esse soro é tipicamente composto por aproximadamente 93-94% de água, 4,8-5,0% de lactose, 1,0-1,3% de sais minerais, 0,15-0,45% de proteínas e 0,20-0,25% de ácidos orgânicos (GERHARDT et al., 2013; BALD et al., 2014; CAROTA et al., 2017).

Figura 5 – Fluxograma de obtenção do soro de ricota.



Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com Carvalho et al. (2013) e Vincenzi et al. (2014), em torno de 1 kg de ricota pode ser obtido a partir de 15 a 20 L de soro de queijo, correspondendo a um rendimento de 6% (m/v), sendo produzido como subproduto de 14 a 19 L de soro de ricota.

Com o crescente aumento na produção de queijos, é inadequado considerar os soros de queijo e de ricota como resíduos industriais. Considerado um soro ácido, o soro de ricota tem sido utilizado como suplemento dietético para animais, como uma fonte de enriquecimento de nutrientes em produtos de maior valor agregado, bem como para novos produtos alimentícios, porém pode deixar um gosto residual salgado, o que o torna menos aceito pelos consumidores (JOSHI et al., 2008; CARVALHO et al., 2013; MAGALHÃES-GUEDES et al., 2013; BALD et al., 2014).

Enquanto que na Europa e América do Norte a utilização do soro é próxima a 95% do total na indústria de alimentos, no Brasil, apenas 50% da produção é utilizada, causando perdas financeiras, desperdícios de nutrientes e impactos ambientais sérios pela alta carga orgânica, possuindo uma DBO de 30.000 a 50.000 mg L⁻¹ e uma demanda química de oxigênio (DQO) variando entre 50.000 a 80.000 mg L⁻¹, valores 10 vezes superiores aos do esgoto doméstico (SANSONETTI et al., 2009; BALD et al., 2014; CAROTA et al., 2017).

Ues et al. (2006), avaliaram a DQO do soro antes e após a produção da ricota e verificou que a carga orgânica do soro não apresentou redução significativa, que passou de 94.197,6 mg L⁻¹ para 61.516,8 mg L⁻¹, sendo necessário ainda realização de um tratamento secundário para diminuição da DQO. A maior parte do poder poluidor do soro de ricota é devido à presença da lactose.

Dessa maneira, este soro deve ser encaminhado às plantas de tratamento de efluentes dos laticínios, antes do lançamento em corpos hídricos, representando um custo de produção adicional para as indústrias, devido ao tratamento necessário para redução de sua carga orgânica (PRAZERES et al., 2012). Por isso, é estabelecido pela legislação ambiental a proibição do descarte de soro, de forma direta ou indireta, nos cursos de água. Segundo a Lei Federal nº 9605 de 13 de fevereiro de 1998 (BRASIL, 1998), os laticínios devem, obrigatoriamente, tratar seus efluentes industriais antes do descarte final.

Assim, o desenvolvimento de tecnologias que permitam o aproveitamento do soro, são incentivadas de forma que seja viável, tanto do ponto de vista econômico como tecnológico (ALVES et al., 2014). Os ramnolipídios produzidos por *P. aeruginosa*, podem ser produzidos a partir de vários substratos. Óleos vegetais estão como os substratos alternativos mais utilizados na produção, enquanto que fontes de carbono hidrofílica, como o soro de ricota, são menos exploradas.

Otto et al. (1999) e Joshi et al. (2008) relataram boa produção de biossurfactantes por diversos micro-organismos, quando o soro de queijo foi utilizado como fonte de carbono, evidenciando o seu potencial de uso para produção desta biomolécula.

4 Capítulo 1

Viabilidade de aproveitamento do soro de ricota como meio de cultivo para produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* LBI

4.1 Introdução

O contínuo crescimento da preocupação ambiental, combinado com novas legislações de controle do meio ambiente, resultaram na busca por biossurfactantes como alternativa aos surfactantes sintéticos, tendo como grande desafio a redução dos custos do processo produtivo (HENKEL et al., 2012; FREITAS et al., 2016; VECINO et al., 2017).

As vantagens destes compostos, quando comparado aos surfactantes sintéticos, são a sua diversidade estrutural, baixa toxicidade, estabilidade (pH, temperatura e força iônica) e alta biodegradabilidade (LOVAGLIO et al., 2011; FAI et al., 2015; FREITAS et al., 2016). Devido às suas propriedades tensoativas, esses detergentes biológicos podem ser aplicados em diferentes indústrias, como o ramo alimentício, cosmético, farmacêutico, químico, petroquímico, da saúde, têxtil, etc., além de serem aplicados na biorremediação de ambientes contaminados por hidrocarbonetos de petróleo (BANAT et al., 2014; SZULC et al., 2014; VECINO et al., 2017).

Embora extremamente eficientes, os biossurfactantes são vendidos a um alto custo devido aos substratos empregados para sua produção e ao alto nível de pureza requerido para aplicação nas indústrias farmacêuticas (SANTOS et al., 2016).

A disponibilidade e o tipo de matéria prima podem contribuir, consideravelmente, para o custo de produção. Estima-se que as matérias-primas representem de 30-50% do custo total de um produto biotecnológico (FREITAS et al., 2016). Para purificação desses compostos, é

considerado 60% do custo total da produção, podendo ser eliminado esse custo, utilizando-se os biossurfactantes no meio ambiente de forma bruta (SANTOS et al., 2016).

Muitos substratos podem ser utilizados na síntese de biossurfactante, dentre eles as fontes de carbono solúveis em água, hidrofílicas (glicerol, glicose e etanol), os substratos insolúveis em água, hidrofóbicas (óleos vegetais e alcanos), fontes de nitrogênio (amônia, sais e ureia), além de resíduos agroindustriais (BENINCASA et al. 2002; NITSCHKE et al., 2004; DUBEY et al., 2012; BANAT et al., 2014; SARUBBO et al., 2015). Alguns micro-organismos produzem biossurfactantes tanto em substratos hidrofóbicos quanto em hidrofílicos (GAUTAM e TYAGY, 2006).

Dessa maneira, a fonte de carbono pode influenciar diretamente na produção dos biossurfactantes, permitindo a possibilidade de utilização de resíduos agroindustriais, já que estes possuem elevados índices de carboidratos ou lipídios em sua composição, suprimindo a necessidade de fonte de carbono para a produção desses metabólitos pelos micro-organismos (NITSCHKE et al., 2004).

Segundo Banaszewska et al. (2014), a produção mundial de soro de queijo está estimada em cerca de 200 milhões de toneladas/ano, sendo o Brasil responsável pela produção de aproximadamente 3 milhões de toneladas/ano. Esse soro pode ser utilizado na fabricação da ricota, que após, ainda gera o soro de ricota como subproduto, com elevada carga orgânica (SANSONETTI et al., 2010; CAROTA et al., 2017) e seu descarte representa um sério problema ambiental por elevar a carga nutricional e microbiana do local (RICHARDS, 2002; CAROTA et al., 2017).

A maior parte dos trabalhos realizados para aproveitamento de resíduos lácteos, concentra-se no soro de queijo, o que, no entanto, difere substancialmente do soro de ricota, devido à menor concentração de sais e ácidos orgânicos e maior teor de proteínas e lactose (CAROTA et al., 2017).

O soro de ricota ainda é visto como um resíduo sem qualquer valor comercial, normalmente descarregado em cursos de água ou utilizado em menor quantidade, para alimentação de animais. Esse conceito está sendo modificado devido as suas propriedades funcionais e nutricionais, servindo como substratos para a produção microbiana de metabólitos (JOSHI et al., 2008; SANTOS et al., 2016), visando minimizar os impactos ambientais e valorizar esse subproduto.

Dessa maneira, o objetivo deste capítulo foi avaliar a viabilidade de aproveitamento do soro de ricota como meio de cultivo para produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* LBI.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Caracterização físico-química do soro de ricota como meio de produção

O soro de ricota foi disponibilizado pelo Laticínios Coalhada's Ltda, situado no bairro Retiro, na cidade de Juiz de Fora, MG. As amostras de soros foram coletadas, armazenadas em recipientes plásticos de 5 L e acondicionadas em caixa isotérmica com gelo e transportadas para o Laboratório Multidisciplinar de Pesquisas do Meio Ambiente, UNESP, Rio Claro. As amostras foram mantidas sob refrigeração. Após, foram realizadas análises para avaliação das características físico-químicas do soro.

4.2.1.1 Determinação do pH

O pHmetro (Digimed DMPH-2) foi calibrado com suas soluções tampões em pH 4 e 7 e então mediu-se o pH diretamente na amostra.

4.2.1.2 Extrato Seco Total

O extrato seco total do soro de ricota foi determinado segundo o método de secagem até peso constante, em estufa a 105 °C, conforme metodologia do Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008).

4.2.1.3 Determinação da densidade a 15 °C

A densidade foi determinada segundo metodologia do IAL (2008). O soro foi transferido para uma proveta de 500 mL, previamente homogeneizado e resfriado de forma que permitisse introduzir o termolactodensímetro. A leitura foi feita ao nível do soro, no menisco superior após a coluna de mercúrio do termômetro e o densímetro se estabilizarem, procedendo a leitura da densidade e da temperatura. A densidade foi expressa a 15 °C utilizando uma tabela de correção da densidade do leite, segundo a temperatura, sendo que os valores dos graus lactodensimétricos correspondem à 2^a, 3^a e 4^a casas decimais do valor da densidade. A análise de densidade foi realizada no Laboratório de Tecnologia de Produtos de Origem Animal (LTPOA), na Faculdade de Ciências Agrônômicas da UNESP, Campus de Botucatu.

4.2.1.4 Teor de gordura

O teor de gordura do soro de ricota foi determinado utilizando-se o método de Gerber, que se baseia na quebra da emulsão do leite pela adição de ácido sulfúrico e álcool isoamílico,

na centrifugação e posterior determinação da gordura, de acordo com metodologia do IAL (2008) e da Instrução Normativa nº 68 de 2006 (BRASIL, 2006). A análise de gordura foi realizada no LTPOA, da UNESP, Campus de Botucatu.

4.2.1.5 Proteínas

A determinação quantitativa de proteína do soro de ricota foi realizada de acordo com o método de Kjeldahl (BRASIL, 2006; GALVANI e GAERTNER, 2006 e IAL, 2008), pelo laboratório de análise de alimentos da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, MG.

4.2.2 Micro-organismo

Foi utilizada a linhagem *Pseudomonas aeruginosa* LBI, isolada por Benincasa et al. (2002) de solo contaminado com petróleo, previamente selecionadas por sua capacidade de produzir ramnolipídios.

Quando necessário, a cultura foi inoculada em ágar nutriente. Após ser esterilizado em autoclave a 121 °C, durante 15 min, o meio ágar nutriente (Difco) foi distribuído em tubos de ensaio e estes foram posteriormente inclinados. Os repiques foram realizados periodicamente, incubados a 30 °C por 24 h e, posteriormente, utilizados ou armazenados a 4 °C em geladeira.

4.2.3 Preparo do inóculo

O preparo do inóculo de *P. aeruginosa* LBI e as condições de cultivo seguiram a metodologia descrita por Benincasa et al. (2002).

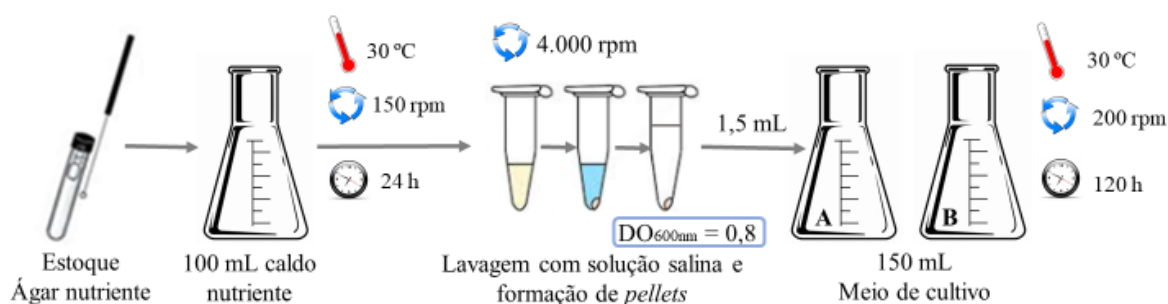
Primeiramente, a cultura mantida em meio ágar nutriente foi reativada em frascos Erlenmeyers de 250 mL, contendo 100 mL de caldo nutriente (Himedia) estéril, onde permaneceu em mesa agitadora (Incubadora Shaker Solab) em 150 rpm, a 30 °C por 24 h, para obtenção do inóculo. Posteriormente, as células foram centrifugadas (centrífuga CentriBio) a $2,897 \times g$ (4.000 rpm) por 20 min e lavadas com solução salina (NaCl 0,85%) estéril. Este procedimento foi repetido três vezes. Ao fim do processo, o *pellet* foi ressuspensão em solução salina e foram realizadas leituras de absorbância em comprimento de onda de 600 nm utilizando espectrofotômetro (Shimadzu UV-2401 PC – UV-Vis), com uma densidade ótica (DO_{600nm}) de 0,8, de modo a padronizar a concentração inicial de células a ser empregada como inóculo.

4.2.4 Montagem dos ensaios

Para avaliar a viabilidade inicial da produção do biossurfactante, foram realizados ensaios conforme a Figura 6, de acordo com Dubey et al. (2012). Os ensaios foram montados

em Erlenmeyers de 250 mL contendo um volume de 150 mL do soro de ricota (100%) como meio de cultivo (Figura 7), sendo o pH inicial ajustado para 7,0 com NaOH 1 N. Os meios foram esterilizados em autoclave a 121 °C e 1 atm por 15 min. Posteriormente, 1,5 mL do inóculo padronizado de *P. aeruginosa* LBI foi adicionado. Os frascos permaneceram sob mesa agitadora em 200 rpm, a 30 °C por 120 h de incubação. Os ensaios foram realizados em duplicata.

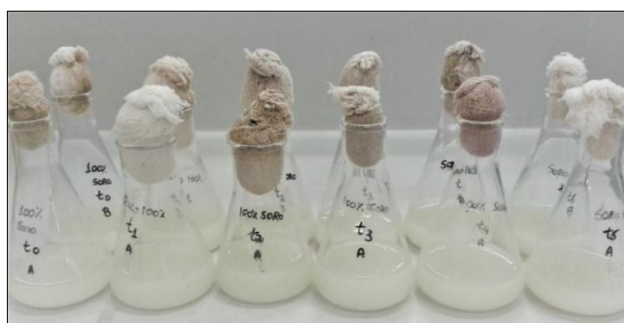
Figura 6 – Esquema experimental do processo de produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* LBI em soro de ricota como fonte de carbono.



Fonte: Adaptado de Lopes (2014).

No tempo inicial e a cada 24 h, dois frascos de cada amostra foram retirados e centrifugados (centrífuga MLW, modelo K24) a $3.935,36 \times g$ (7.000 rpm) por 15 min para obter o caldo livre de células, que foram direcionados para análise de crescimento celular, pH e produção de ramnose. Portanto, a caracterização dos parâmetros no processo de produção do biossurfactante foi realizada em seis tempos: 0, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h e 120 h.

Figura 7 – Erlenmeyers contendo 150 mL do meio de produção (100% soro de ricota).



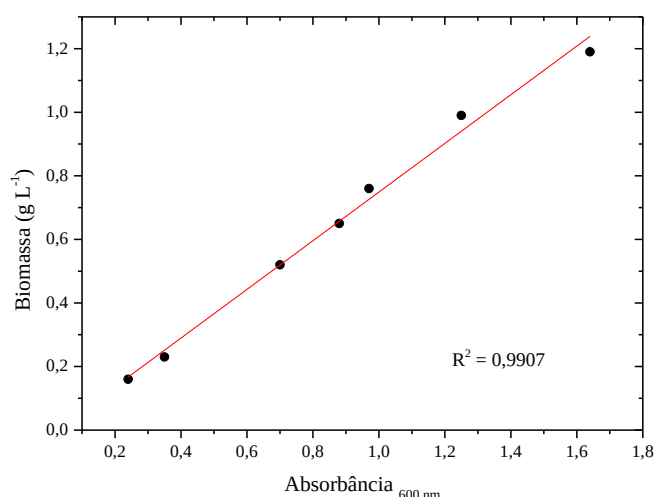
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.4.1 Determinação do crescimento celular – Absorbância em 600 nm

O crescimento microbiano foi realizado por medidas de absorbância em 600 nm utilizando espectrofotômetro (Shimadzu UV-2401 PC – UV-Vis), baseado no método descrito por Wu e Ju (1998), Das e Ma (2013) e Padhi e Gokhale (2017). O *pellet* (biomassa) das amostras centrifugadas, separado do caldo, foi lavado com solução salina 0,85% por três vezes, nas mesmas condições. Após, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em volume apropriado de solução salina 0,85%. O crescimento celular foi expresso em peso seco (g L^{-1}), obtido a partir de uma curva padrão, conforme a Figura 8, onde foi calculado a equação da reta (Equação 4).

$$\text{Biomassa (g L}^{-1}\text{)} = (0,76556 \times \text{Abs}_{600}) - 0,01662 \quad (4)$$

Figura 8 – Curva padrão de biomassa x absorbância (600 nm).



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.4.2. Determinação do pH

A determinação do pH foi realizada a partir das amostras do caldo livre de células, utilizando o medidor de pH Digimed DMPH-2.

4.2.4.3 Determinação da concentração de ramnose

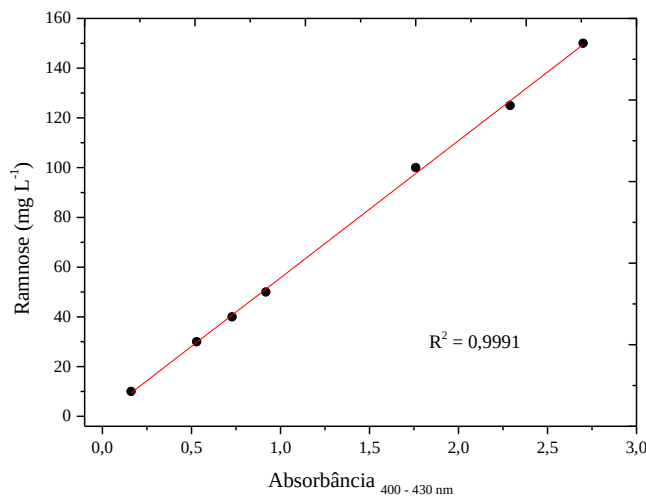
A produção do ramnolipídio foi quantificada colorimetricamente em termos de concentração de ramnose produzida no meio de cultivo, pelo método descrito por Chandrasekaran e Bemiller (1980), para análise de 6-desoxihexose. Adicionou-se 4,5 mL de solução de H_2SO_4 , composta por 90 mL de H_2SO_4 (Dinâmica) e 15 mL de água destilada, a 1

mL de amostra, constituída pelo caldo livre de células. Os tubos contendo a mistura foram agitados e levados ao banho Maria (Nova Ética, modelo 316/3) à 100 °C por 10 minutos. Após atingir a temperatura ambiente, adicionou-se 0,1 mL de solução de ácido tioglicólico (0,1 mL de ácido tioglicólico (Merck) e 2,9 mL de água destilada - preparada no momento da utilização); os tubos foram homogeneizados e mantidos sob ausência de luz por três horas. Após este período realizou-se a medida de absorbância nos comprimentos de onda de 400 e 430 nm em espectrofotômetro. A leitura realizada em 430 nm indica interferência de outros açúcares.

A concentração de ramnose (mg L^{-1}) foi determinada colocando-se o valor de absorbância, obtido da diferença entre os dois comprimentos de onda, em uma curva padrão, a partir de uma solução inicial de ramnose comercial. As análises foram conduzidas em duplicatas. A Figura 9 apresenta a curva padrão de ramnose, onde foi calculado a equação da reta (equação 5).

$$\text{Ramnose (mg L}^{-1}\text{)} = [(55,15852 \times \text{Abs final}) - 0,54237] \times \text{fator de diluição} \quad (5)$$

Figura 9 – Curva padrão da concentração de ramnose x absorbância (400–430 nm).



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.5 Ensaios com meios de cultivo salino adicionado de soro de ricota

Após a primeira etapa, visando verificar um maior potencial na produção de ramnolipídios para posterior utilização nos testes de biodegradação, foram utilizados dois meios salinos ao meio de cultivo: Meio mineral Bushnell-Haas (BH) e meio mineral sais de Robert (SR), que tiveram o pH ajustado para $6,8 \pm 2$ com NaOH ou HCl 1N, quando necessário.

4.2.5.1 Bushnell-Haas

O meio mineral mínimo BH descrito por Difco (1984), foi preparado em balão volumétrico de 1.000 mL, pela dissolução dos sais apresentados na Tabela 4 em 1.000 mL de água destilada. O meio BH é normalmente utilizado em estudos de avaliação da biodegradação de hidrocarbonetos (HANSON et al., 1993), porém também foi utilizado na produção de ramnolipídios por Mariano et al. (2008).

Tabela 4 – Composição de sais do meio mineral Bushnell-Haas.

Composto	Fórmula	Quantidade (g L ⁻¹)
Nitrato de amônio (Vetec)	NH ₄ NO ₃	1,000
Fosfato de potássio dibásico (Impex)	K ₂ HPO ₄	1,000
Fosfato de potássio monobásico (Synth)	KH ₂ PO ₄	1,000
Cloreto férrico (Merck)	FeCl ₃	0,050
Sulfato de magnésio (Chemco)	MgSO ₄	0,200
Cloreto de cálcio (Vetec)	CaCl ₂	0,020

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.5.2 Sais de Robert

O meio mineral mínimo SR foi descrito por Robert et al. (1989) e preparado em balão volumétrico de 1.000 mL, pela dissolução dos sais apresentados na Tabela 5 em 1.000 mL de água destilada. Costa et al. (2008) e Benincasa e Accorsini (2008) utilizaram SR como meio mineral mínimo para produção de biossurfactantes.

Tabela 5 – Composição do meio mineral sais de Robert.

Composto	Fórmula	Quantidade (g L ⁻¹)
Nitrato de sódio (Cinética Química)	NaNO ₃	4,000
Fosfato de potássio dibásico (Impex)	K ₂ HPO ₄	1,000
Fosfato de potássio monobásico (Synth)	KH ₂ PO ₄	0,500
Sulfato de magnésio (Chemco)	MgSO ₄ .7H ₂ O	0,500
Cloreto de potássio (Cinética Química)	KCl	0,100
Sulfato de ferro (Merck)	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,010
Cloreto de cálcio (Vetec) CaCl ₂	CaCl ₂	0,010
Extrato de levedura (BD)	-	0,010
Elementos traços*	-	0,05 mL L ⁻¹
*Elementos traços	Fórmula	Quantidade
Ácido bórico (Mallinckrodt)	H ₃ BO ₃	0,026%
Sulfato de cobre (Reagen)	CuSO ₄ .7H ₂ O	0,050%
Sulfato manganoso (Mallinckrodt)	MnSO ₄ .H ₂ O	0,050%
Molibdato de Amônio (Mallinckrodt)	NH ₄ Mo ₇ O ₂₄ .H ₂ O	0,006%
Sulfato de zinco (Grupo Química)	ZnSO ₄ .H ₂ O	0,070%

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.6 Condições de cultivo

Os meios de cultivos utilizados, conforme a composição, são apresentados na Tabela 6, de acordo com a concentração de soro de ricota e suplementação dos meios minerais.

Assim, os ensaios para produção de biossurfactantes por *P. aeruginosa* LBI foram realizados sob as mesmas condições citadas no item 4.2.4 deste capítulo. Todo material utilizado nos ensaios de cultivo foi esterilizado em autoclave a 121 °C e 1 atm por 15 minutos.

Os ensaios foram realizados em duplicata, por 120 h, com coleta de amostra a cada 24 h. O caldo de cultivo foi centrifugado a 3.935,36 x g (7.000 rpm) por 15 min para obter o caldo livre de células, que posteriormente foram direcionados para quantificação da ramnose, visando obter a maior produção dos ramnolipídios.

Tabela 6 – Condições de cultivo do biossurfactante em diferentes concentrações dos meios de fermentação contendo meio Bushnell-Haas (BH) e Sais de Robert (SR).

Amostras (Denominação)	Soro de ricota	Meio BH (v/v)	Meio SR (v/v)
BH1	100%	Adição de sal *	-
BH2	75%	25%	-
BH3	50%	50%	-
SR1	100%	-	Adição de sal *
SR2	75%	-	25%
SR3	50%	-	50%

*Adição diretamente ao soro de ricota.s

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2.7 Processamento das amostras

4.2.7.1 Ramnose

Após a suplementação com diferentes meios salinos ao soro de ricota, foi realizada a quantificação da ramnose das amostras para avaliação da melhor produção de ramnolipídios, conforme item 4.2.4.3, descrito anteriormente.

4.2.7.2 Tensão superficial

A análise da tensão superficial do caldo livre de células foi usada para determinar qualitativamente a síntese biológica do composto tensoativo, por meio do método do anel de Du Nöuy utilizando tensiômetro Krüss K6, sendo as medidas realizadas à temperatura ambiente e em duplicata. Este equipamento realiza medidas analógicas da amostra, com indicação direta em mN m^{-1} , por meio do anel de platina-irídio (6,0 cm de circunferência) em um recipiente de vidro (50 mm de diâmetro).

4.2.8 Avaliação da produção de ramnolipídios

4.2.8.1 Processamento das amostras

Na melhor condição do meio, a avaliação da produção dos ramnolipídios foi realizada segundo a metodologia descrita por Lovaglio et al. (2014) onde, nos tempos determinados, retirou-se um volume de 10 mL de cada amostra, o qual foi centrifugado a $2,897 \times g$ (4.000 rpm) por 30 min. Após, foi adicionado 20 μL de ácido fosfórico 85% (Merck) e a mistura agitada fortemente em agitador de tubos tipo vórtex (Phoenix AP 56) por 1 minuto. Em seguida

adicionou-se 2,5 mL de acetato de etila (Merck), seguindo-se nova agitação por 1 minuto, e posteriormente centrifugada por 20 min a $3,621 \times g$ (5.000 rpm). Após, o sobrenadante foi retirado e armazenado e a fase inferior foi novamente submetida à extração com acetato de etila. Com as amostras extraídas, foram realizadas cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (*High-Performance Liquid Chromatography* - HPLC)

4.2.8.2 Determinação da produção de Ramnolipídios – Cromatografia em Camada Delgada

A CCD foi realizada com o objetivo de verificar se houve produção de ramnolipídios antes de prosseguir com às análises em HPLC. Para isso, foram utilizadas placas de sílica-gel 60 (Merck) como fase estacionária e como fase móvel a mistura de clorofórmio/metanol/ácido acético (65:15:2). O agente revelador utilizado foi a mistura de 2 mL de anisaldeído (Nuclear) em 100 mL de ácido acético (Dinâmica) acrescido de 2 mL de ácido sulfúrico (Dinâmica). As amostras consistiram em 40 μL de extratos de ramnolipídios obtidos de acordo com o item 4.2.8, em diferentes tempos de produção, além dos padrões de ramnolipídios obtidos da *Jeneil Biosurfactant Company*, USA.

4.2.8.3 Determinação da concentração de Ramnolipídios - Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

a) Derivatização

Para que os ramnolipídios pudessem ser analisados via detector UV, os padrões e as amostras de ramnolipídios foram derivatizados de acordo com Schenk et al. (1995), com pequenas modificações. As amostras extraídas, contendo ramnolipídios e acetato de etila, foram primeiramente evaporadas; em seguida adicionou-se 360 μL de acetonitrila e 40 μL da mistura 1:1 de brometo de 4-bromofenacil 40 mM e trietilamina 20 mM, ambos em acetonitrila. A derivatização foi feita por 90 min à 60 °C e 1.400 rpm, em um banho seco, termomixer (Thermomixer comfort, Eppendorf AG).

b) HPLC

As análises foram feitas com um equipamento HPLC (Shimadzu) acoplado a um detector UV. Para a calibração do HPLC utilizou-se solução padrão de mono e di-ramnolipídio nas seguintes concentrações: 0,25; 0,50; 0,75 e 1,0 g L⁻¹. Para as análises utilizou-se uma coluna de fase reversa (Supelcosil LC18, Supelco - 150 mm x 4,6 mm, 5 μm sílica gel) à 30 °C. As fases móveis foram Solução A com 5% de metanol e Solução B com 95%, ambas em água

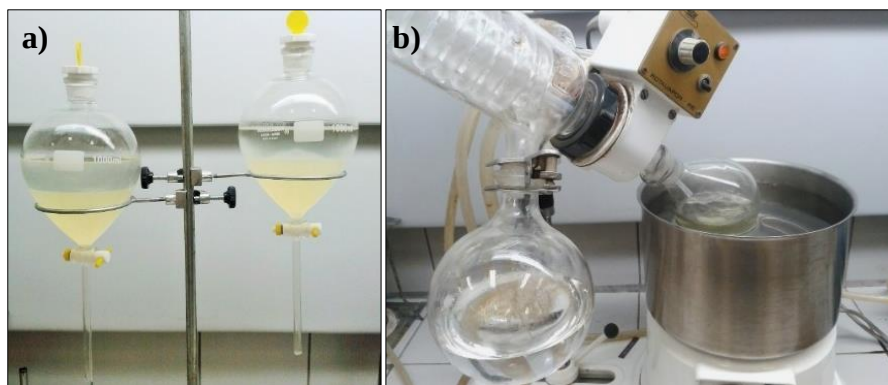
ultrapura Milli-Q (Millipore). Para que houvesse separação dos homólogos presentes, foi estabelecido um gradiente de 80 a 100% da Solução B, de acordo com o seguinte protocolo: de T=0 à T=17 min, aumento da solução B de 80 para 100%, conservando-se em 100% até 25 min. Em seguida ocorreu um decréscimo para 80% até 30 min, mantendo-se por mais 5 min para que houvesse equilíbrio. O fluxo utilizado foi de 0,4 mL min⁻¹ e os ramnolipídios foram monitorados à 254 nm. Os tempos de retenção foram 22,7 ± 0,1 min para R3 (Rha₂C₁₀C₁₀) e 23,4 ± 0,1 min para R1 (RhaC₁₀C₁₀).

4.2.9 Recuperação dos ramnolipídios

Para recuperação e caracterização do biossurfactante produzido, 1 L do caldo fermentado, após 72 h, foi submetido à centrifugação por 3.443,44 x g (7.000 rpm) durante 20 min. Os ramnolipídios encontram-se menos solúveis em água pelo fato de estarem na sua forma aniônica, sendo então, o seu rendimento aumentado após acidificação do caldo livre de células, a pH 2,0 com solução de HCl 2 N para precipitação dos ramnolipídios, permanecendo *overnight* a 4 °C.

Após a precipitação, para a extração do tensoativo, o caldo foi transferido para um funil de separação, juntamente com um volume de acetato de etila (Nuclear) 1:1,25 (v/v). Agitou-se suavemente por 10 min e novamente a mistura foi mantida em repouso por 30 min, até a separação das fases orgânica (superior) e aquosa (inferior), conforme Figura 10a. Esse procedimento foi repetido três vezes para garantir que o máximo de ramnolipídios fossem extraídos. A fase orgânica obtida foi levada ao rotavapor (RE – Buchi) para ser concentrado a uma temperatura de 40 °C (Figura 10b). Após total evaporação do solvente orgânico, o produto foi coletado por lavagem do frasco com solução tampão (pH 7,0) e totalmente evaporado em estufa a 37 °C, para concentração e obtenção do ramnolipídio.

Figura 10 – a) Extração de ramnolipídios com solvente acetato de etila e separação das fases orgânica (superior) e aquosa (inferior); b) Concentração da fase orgânica do caldo livre de células no rotavapor a 40 °C.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Previamente pesado para o cálculo de rendimento na produção de ramnolipídio, um cadinho foi utilizado na coleta do biossurfactante extraído. Após esse procedimento, as soluções de biossurfactantes foram obtidas por meio da dissolução do precipitado em água destilada e NaOH 0,1 N, até pH 7,0. Para caracterização do biossurfactante, foram realizadas análises de concentração micelar crítica e do índice de emulsificação, descritas a seguir.

4.2.10 Caracterização das propriedades tensoativas

4.2.10.1 Concentração micelar crítica

A CMC foi obtida a partir da determinação da tensão superficial de diluições sucessivas (25, 50, 100, 400, 500, 1000, 1500 e 2000 mg L⁻¹) de uma solução concentrada do biossurfactante extraído, com igual volume de água destilada, segundo Sheppard e Mulligan (1987). A tensão superficial foi determinada em tensiômetro pelo método do anel de Du Nöuy, sendo as medidas realizadas à temperatura ambiente e em duplicata.

4.2.9.2 Índice de emulsificação (E_{24})

O índice de emulsificação foi realizado segundo a metodologia descrita por Cooper e Goldenberg (1987) com as soluções do biossurfactante bruto a 10% (m/v), adicionando 1,5 g de biossurfactante a 15 mL de água destilada.

Os experimentos foram conduzidos em tubos de ensaio, aos quais se adicionou 2,0 mL de óleo diesel S10 (diesel puro Replan) e 2,0 mL da solução de biossurfactante 10% (m/v). O tubo foi submetido à agitação vigorosa em agitador de tubos tipo vórtex durante 2 min. Os tubos foram mantidos em repouso e as medidas das emulsões foram realizadas após 24 h. O índice

E₂₄ foi determinado pela razão entre a altura da camada emulsionada (cm) e a altura total do líquido (cm) com o auxílio de uma régua, de acordo com a Equação 6. As análises foram realizadas em triplicata à temperatura de 25 °C. Além disso, o teste foi realizado com gasolina comercial e com o surfactante químico Tween80 (Synth) a 10%.

$$E_{24} = \frac{AE}{AT} \times 100 \quad (6)$$

Onde:

AE = altura da emulsão;

AT = altura total.

4.3 Resultados e discussão

4.3.1 Caracterização do soro de ricota

A composição físico-química do soro de ricota utilizado para produção de biossurfactantes está apresentada na Tabela 7. De acordo com Bald et al. (2014), o soro de ricota contém fontes de carbono, nitrogênio e sais minerais que tornam este resíduo passível de ser utilizado para o cultivo de micro-organismos.

Tabela 7 – Características físico-químicas do soro de ricota utilizado como fonte de carbono para produção de biossurfactantes.

Análises	Soro de ricota
pH	5,32
Extrato seco total (g L ⁻¹)	6,40
Densidade (g L ⁻¹)	1,025
Gordura (%)	0,60
Proteínas (%)	0,45

Fonte: Elaborado pelo autor.

A ricota tem como matéria-prima para sua fabricação o soro de queijo e possui como princípio a precipitação das proteínas do soro de queijo por meio de calor associado à acidificação, para sua fabricação (VENTURINI-FILHO, 2010). A adição de ácido provoca a redução do pH para 4,5-5,0, valores encontrados no soro de ricota utilizado nesse trabalho (Tabela 7). Neste processo de fabricação da ricota, ocorre a desnaturação durante o aquecimento e a agregação das proteínas, após a acidificação do meio, o que resulta em um soro com baixos teores de proteínas (BALD et al., 2014).

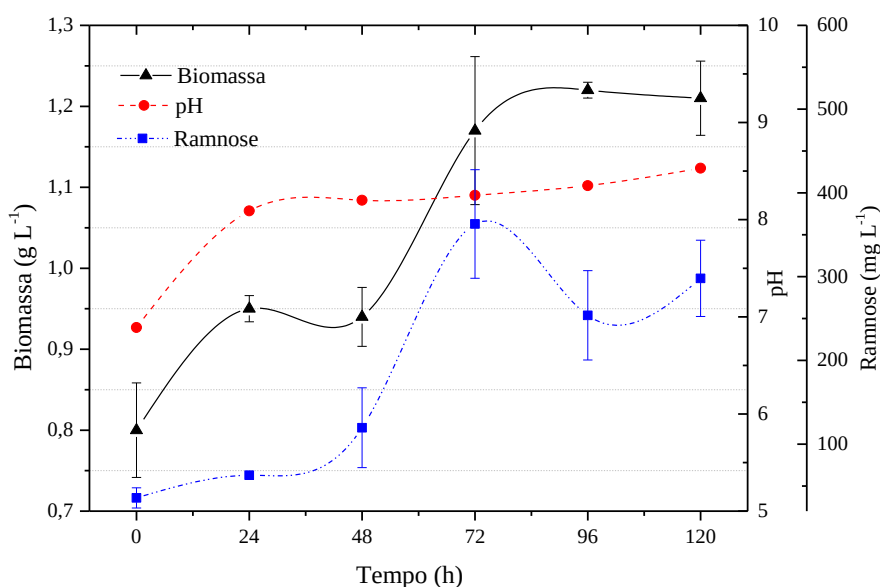
Sansonetti et al. (2010) caracterizaram um soro de ricota que continha 0,15-0,22% de proteínas, valor inferior ao encontrado no presente estudo, o que pode denotar diferentes rendimentos na precipitação das proteínas do soro de queijo. Além disso, o teor de gordura foi de 0,3%, indicando que praticamente toda a gordura presente no soro de queijo de matéria prima, foi carregada juntamente com as proteínas no momento da produção da ricota.

De acordo com Pinto (2010), o soro ácido proveniente da fabricação da ricota é rico em cálcio e fósforo, por causa da solubilização do complexo cálcio-fósforo das micelas de caseína em pH ácido.

4.3.2 Ensaio preliminar da produção de biossurfactante

Nesse estudo, a utilização de soro de ricota como substrato pela *P. aeruginosa* LBI foi evidenciada pelo leve aumento da biomassa, pH e produção de ramnose, conforme apresenta a Figura 11.

Figura 11 - Efeito do soro de ricota como meio de cultivo sobre o crescimento celular, pH e produção de ramnose.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A concentração de biomassa no meio tendeu a um aumento em até 72 h de produção, estando na fase exponencial de crescimento e com estabilização após esse período, quando a bactéria entrou na fase estacionária, provavelmente devido ao consumo de grande parte da fonte de carbono. Os caldos de cultivo tornaram-se turvos no decorrer do período de fermentação, evidenciando a formação da biomassa. Pode-se inferir que após 72 h, quando foi atingido a produção máxima da biomassa (1,25 g L⁻¹), tenha ocorrido o consumo do próprio ramnolipídio devido a queda na concentração de ramnose, que anteriormente foi produzido para emulsificar o meio. Segundo Cameotra e Makkar (1998) e Ron e Rosenberg (2001), a maioria dos biossurfactantes são liberados no meio de cultura na fase exponencial ou na fase estacionária do crescimento microbiano, fato observado nesse estudo.

Hori et al. (2002) utilizaram a linhagem *P. aeruginosa* IFO3924 com glicose como fonte de carbono e demonstraram que a síntese de ramnolipídios iniciou-se após a fase exponencial de crescimento da bactéria e que a produção máxima foi alcançada, após o consumo total da fonte de carbono.

A análise do pH foi realizada para acompanhar o crescimento dos micro-organismos, a fim de se verificar alguma alteração no caráter ácido, básico ou neutro do meio de cultivo. O aumento de biomassa pode ser indiretamente observado mediante a determinação do pH dos ensaios, onde o máximo valor atingido em 72 horas, foi de 8,7, conforme a Figura 11, atingindo também a produção máxima de ramnose de 370 mg L⁻¹. Para Lincopan e Trabulsi (2008), valores de pH para meio neutro a pouco alcalinos favorecem o crescimento celular de bactérias, assim como a produção de ramnolipídios.

Em trabalho realizado por Capelini (2009) utilizando *P. aeruginosa* LBI e óleo de fritura como fonte de carbono, foi observado um valor máximo de pH de 8,2 em 24 h, havendo uma diminuição desses valores ao final da fermentação para 7,01. Costa (2010) observou valores de pH entre 7,01 e 8,64 após 120 h, utilizando diferentes linhagens de *P. aeruginosa*, quando utilizado gordura vegetal como substrato.

A fonte de carbono afeta consideravelmente a produção de biossurfactante. Tanto as fontes hidrofílicas como as hidrofóbicas têm sido usadas para a produção de biossurfactante. Porém, alguns estudos mostram que usando óleo vegetal como substrato, por exemplo, se obtém melhores resultados de rendimento, porém encontra-se dificuldade na recuperação do produto pelo fato de haver resíduo de óleo no meio (CHEN et al., 2007). Nitschke et al. (2005b) demonstraram que a *P. aeruginosa* também é capaz de sintetizar ramnolipídios utilizando glicerol, embora em pequena quantidade se a mesma é comparada à quantidade gerada quando utiliza-se substratos hidrofóbicos.

Costa et al. (2008) ao estudar manipueira e óleo de fritura como fontes de carbono para produção de ramnolipídios, observou que quando utilizou o substrato hidrofóbico gerou 6,8 g L⁻¹ de biomassa em 120 h, enquanto que em manipueira, obteve-se menores quantidades de biomassa (2,5 g L⁻¹).

A produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* PA1 foi avaliada usando como substrato n-hexadecano, petróleo, óleo de babaçu e glicerol por Santa Anna et al. (2002), e obteve-se respectivamente 130, 260, 200 e 690 mg L⁻¹ de ramnose. Além disso, também foi observada a habilidade em utilizar frutose, glicose, manitol, manose e ácido láctico, que são boas fontes de carbono para a produção de ramnolipídios.

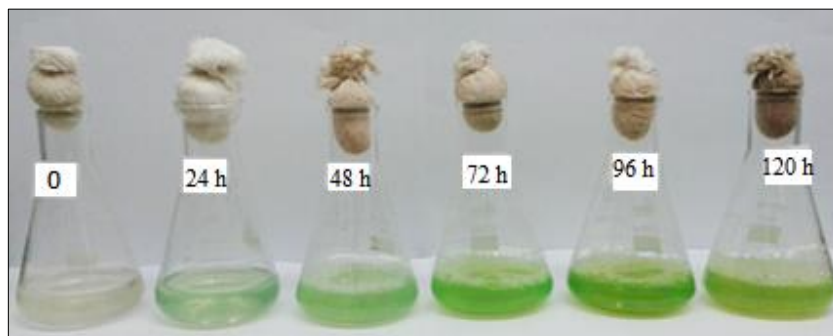
Na literatura são encontrados relatos de que o principal problema encontrado para a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* em resíduos lácteos, é a baixa capacidade de utilização da lactose pela bactéria, sendo a lactose residual provavelmente consumida mais lentamente (KOCH et al., 1988).

4.3.3 Pigmento pioverdina como metabólito secundário

O meio de cultura contendo 100% de soro de ricota, também favoreceu a produção de metabólitos secundários, como a pioverdina e a piocianina, um pigmento azul-esverdeado fluorescente, hidrossolúvel e difusível no meio de cultura, característicos da *P. aeruginosa* (LINCOPAN e TRABULSI, 2008; DAS e MA, 2013; EL-FOULY et al., 2015). Similar a *P. aeruginosa* LBI, cerca de 90-95% das linhagens de *P. aeruginosa* produzem piocianina (SAHA et al., 2008).

A Figura 12 apresenta a mudança da coloração do meio de cultivo contendo 100% de soro de ricota, associada à síntese do biossurfactante.

Figura 12 – Meio de cultivo evidenciando a produção de pioverdina, um pigmento verde fluorescente, característico da *P. aeruginosa* em diferentes tempos de fermentação.



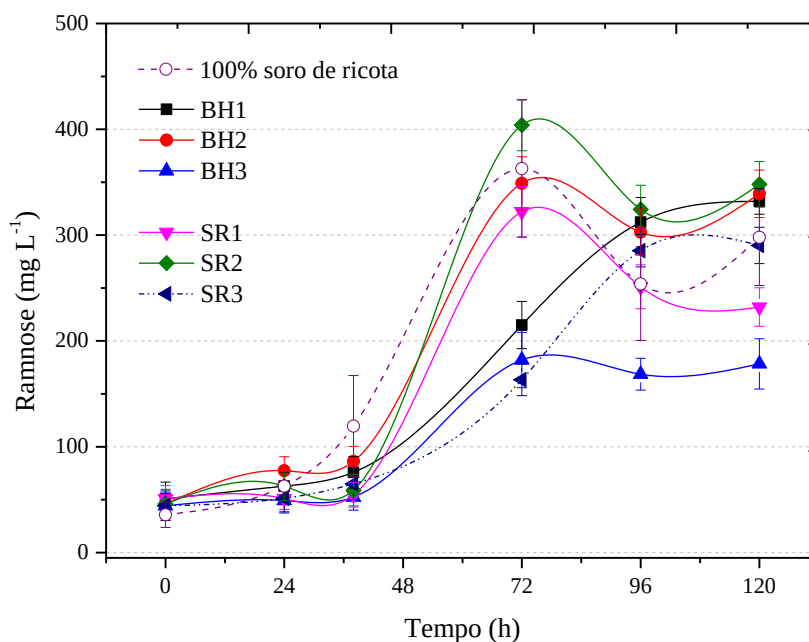
Fonte: Elaborado pelo autor.

Em estudo realizado por Das e Ma (2013) utilizando linhagens de *P. aeruginosa* para produção de biossurfactantes em meio contendo hidrocarbonetos e metais como o ferro, observaram a produção da piocianina como metabólito secundário, indicando uma estratégia de defesa das bactérias, à medida que produzem biossurfactante para conseguirem sobreviver em condições não favoráveis. Dessa maneira justifica-se o fato da produção de piocianina no meio contendo BH, por este conter altas concentrações de ferro.

4.3.4 Meio mineral salino adicionado ao soro de ricota

Após a primeira etapa, visando verificar o potencial do soro de ricota e o aumento da produção de ramnolipídios para posterior utilização nos testes de biodegradação, foram utilizados dois diferentes meios salinos como suplementação do soro de ricota e, após o cultivo, foram realizadas análises de ramnose presente no caldo livre de células, conforme apresenta a Figura 13.

Figura 13 – Produção de biossurfactantes em diferentes meios de cultivo, em termos de ramnose por *P. aeruginosa* LBI, em diferentes tempos e concentrações de soro de ricota.



*Onde: BH1: soro de ricota com adição direta de sais do meio Bushnell-Haas; BH2: 75% de soro de ricota suplementado de 25% de meio mineral Bushnell-Haas; BH3: 50% de soro de ricota suplementado de 50% de meio mineral Bushnell-Haas; SR1: soro de ricota com adição de sais do meio mineral sais de Robert; SR2: 75% de soro de ricota suplementado de 25% do meio mineral sais de Robert; SR3: 50% de soro de ricota suplementado de 50% do meio mineral sais de Robert.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nas diversas concentrações utilizadas, observa-se a mesma tendência na produção do ramnolipídio, em relação ao meio contendo 100% soro de ricota utilizado inicialmente. A concentração máxima de ramnose alcançada pela bactéria foi de $404,88 \text{ mg L}^{-1} \pm 24,2$, utilizando o meio SR2 (75% de soro de ricota suplementado de SR) em 72 h de produção, apresentando aumento de 8,61% em relação ao soro de ricota sem suplementação de meio mineral. Em seguida, a produção do meio BH2 (75% de soro de ricota com 25% de BH) apresentou em 72 h de produção $348,92 \text{ mg L}^{-1} \pm 25,10$ de ramnose.

O aumento crescente da produção de ramnose até 72 h, coincide com a fase exponencial de crescimento da biomassa, conforme observado na Figura 11 anteriormente.

Costa (2010), ao produzir ramnolipídios por *P. aeruginosa* em 120 h, utilizando manipueira como fonte de carbono (hidrofílica), produziu de 169,9 a $300,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ramnose, variando conforme a linhagem bacteriana, em comparação com manipueira adicionado com óleo de fritura, que teve a concentração variando de 129,2 a $609,1 \text{ mg L}^{-1}$, de acordo com a linhagem utilizada, valores próximos ao encontrado nesse estudo.

O meio SR foi empregado na produção de biossurfactantes por diversos autores, utilizando as linhagens *P. aeruginosa* 44T1 e LBI em diversas fontes de carbono, apresentando alto desempenho na produção (ROBERT et al., 1989; BENINCASA et al., 2002; COSTA et al., 2008; PIRÔLLO et al. 2008).

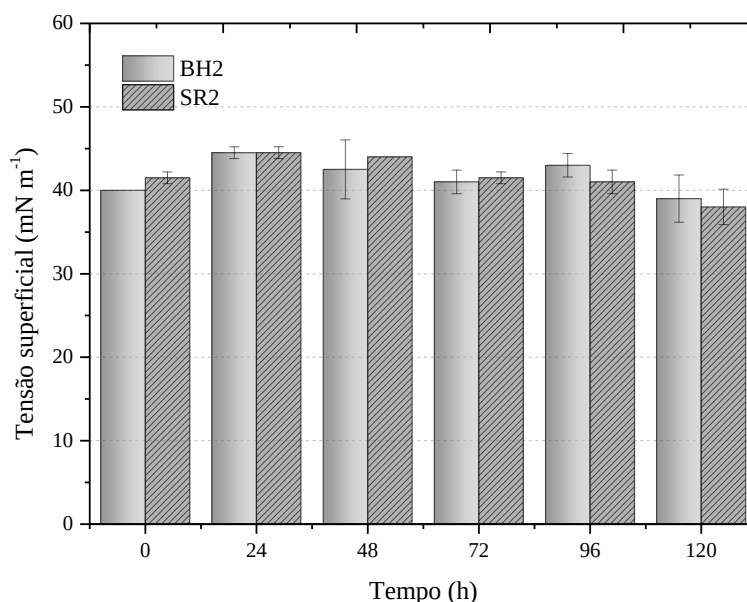
Mariano et al. (2008) utilizaram meio mineral BH e SR para produção de biossurfactantes por *Staphylococcus hominis*, *Kocuria palustris* e *P. aeruginosa* LBI utilizando hidrocarboneto como fonte de carbono e não foi observada produção com o meio BH. Segundo os mesmos autores, o meio BH não possui qualquer fonte de carbono facilmente biodegradável, como extracto de levedura, que pode ser usado como *start-up* para os micro-organismos. Além disso, o meio BH contém altas concentrações de ferro.

Ramana e Karanth (1989) observaram que a presença de ferro no meio de cultivo inibiu a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* CFTR-6, principalmente em concentrações de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ superior a $0,01 \text{ g L}^{-1}$, enquanto que o nitrato é relatado como a melhor fonte de nitrogênio para a produção de ramnolipídios, pois estimula a expressão do gene *rhlAB*, um dos principais responsáveis pela síntese desse bioproduto. A preferência por essa fonte de nitrogênio pode estar relacionada ao fato de *P. aeruginosa* ser apta a fazer desnitrificação utilizando o nitrato como aceptor de elétrons (MANRESA et al., 1991).

Estudos realizados por Pruthi e Cameotra (2003) evidenciam a importância da fonte de carbono e de outros elementos minerais constituintes do meio de cultura para a produção desse biossurfactante tais como a concentração de nitrato, fósforo, enxofre e íons metálicos como ferro e magnésio, assim como Lovaglio et al. (2010) que demonstraram que a razão entre as concentrações de carbono e nitrogênio (C/N) possui um papel fundamental na produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa*.

Dessa forma, os meios BH2 e SR2 foram utilizados para caracterização e avaliação do melhor desempenho para produção dos ramnolipídios e visando confirmar a produção de biossurfactantes, foram realizadas medidas da tensão superficial dos dois meios, no caldo livre de células, nos diferentes tempos de produção, conforme apresenta a Figura 14.

Figura 14 – Valores da tensão superficial (mN m^{-1}) do caldo livre de células, nos diferentes tempos de fermentação. Onde: BH2: 75% de soro de ricota suplementado de 25% de meio mineral Bushnell-Haas; SR2: 75% de soro de ricota suplementado de 25% do meio mineral sais de Robert.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nos dois meios avaliados, a tensão superficial apresentou pequena diferença, ficando em torno de $38\text{--}44 \text{ mN m}^{-1}$, não apresentando variação significativa, o que pode indicar pequena concentração de compostos tensoativos no meio de cultivo. Além disso, o soro de ricota utilizado possuía valor de tensão superficial de 43 mN m^{-1} . Segundo MAPA (2003), o baixo valor de tensão superficial do soro deve-se ao efeito exercido pelos lipídios sobre a tensão superficial, ou seja, quanto maior teor de lipídios menor a tensão superficial. Além disso, a liberação de ácidos graxos oriundos da hidrólise dos glicerídios faz com que a tensão diminua consideravelmente.

De acordo com Pinto et al. (2009), os micro-organismos podem não ter conseguido sintetizar de forma independente as porções hidrofóbicas e hidrofílicas das moléculas de biossurfactante ou, ainda, pela síntese da porção hidrofóbica ser dependente do substrato, sendo necessária a presença de uma fonte de carbono altamente hidrofóbica no meio. Muitos trabalhos descrevem a importância da combinação entre um substrato insolúvel em água e um carboidrato, como constituintes do meio de cultura.

Costa et al. (2008) realizaram a produção de ramnolipídios utilizando *P. aeruginosa* LBI e gordura vegetal como fonte de carbono e encontraram um valor de 35 mN m^{-1} para a tensão superficial, após 120 h.

Haba et al. (2000) consideram bons produtores de biossurfactantes aqueles micro-organismos que reduzem a atividade superficial a 40 mN m^{-1} ou menos.

A redução da tensão superficial é frequentemente utilizada como um critério primário para selecionar micro-organismos produtores de biossurfactantes, embora agentes emulsificantes e dispersantes não possuam, necessariamente, habilidade de reduzir a tensão. O bioemulsificante liposan, produzido por *Candida lipolytica*, por exemplo, não é capaz de reduzir a tensão superficial da água, embora emulsifique e estabilize efetivamente emulsões água-em-óleo (CIRIGLIANO e CARMAN, 1985).

4.3.5 Determinação da produção de Ramnolipídios

Vários métodos são utilizados para identificação dos ramnolipídios, sendo de grande importância na elucidação das estruturas, e geralmente envolvem, inicialmente, uma separação cromatográfica das misturas em várias frações por CCD e em seguida, por HPLC.

Assim, a CCD foi realizada a fim de verificar a produção de mono e di-ramnolipídios, para dar continuidade ao processo de quantificação, nos diferentes tempos de fermentação dos meios BH2 e SR2. Para o meio BH2, a produção de ramnolipídios foi baixa, não sendo possível a visualização na CCD, porém, a presença dos ramnolipídios produzidos pela *P. aeruginosa* LBI, a partir do meio SR2 como substrato, foi confirmada por CCD, ainda que pequena, onde um componente majoritário foi encontrado, o di-ramnolipídio, que pôde ser visualizado qualitativamente por meio da intensidade dos *spots* obtidos na CCD, nos tempos de 48, 72 e 120 h.

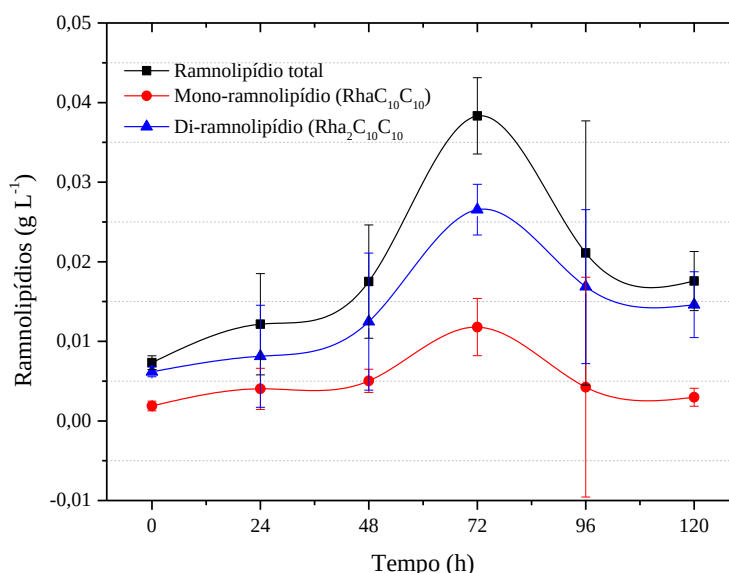
Dessa forma, para dar continuidade ao processo de quantificação, foi realizada a quantificação dos ramnolipídios somente do meio SR2, contendo 75% de soro de ricota e 25% de SR.

4.3.6 Quantificação de ramnolipídios

A concentração de ramnolipídios produzidos foi determinada pela análise via detector UV em HPLC. Além de quantificar o total de ramnolipídio (R total) presente nas amostras, o procedimento permitiu também diferenciar duas espécies homólogas produzidas: $\text{Rha}_2\text{C}_{10}\text{C}_{10}$ e $\text{RhaC}_{10}\text{C}_{10}$.

Observa-se pela Figura 15 um aumento na concentração de R total, atingindo 0,040 g L⁻¹ em 72 h. Nas concentrações das espécies homólogas, observa-se que o processo fermentativo produziu maior quantidade de di-ramnolipídio (Rha₂C₁₀C₁₀). Contudo, as curvas de produção destes dois homólogos seguem praticamente o mesmo padrão, inclusive, no aumento de produção em 72 h. A produção máxima do biossurfactante encontrada neste experimento foi muito baixa, se comparada às produções encontradas para cepas de *P. aeruginosa*, quando utilizados meios similares, com o glicerol como fonte de carbono.

Figura 15 – Quantificação de espécies homólogas e do total de ramnolipídios (R total) produzidos por *P. aeruginosa* LBI, utilizando meio SR2 (75% de soro de ricota suplementado de 25% do meio mineral sais de Robert).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em trabalho realizado por Nitschke et al. (2005b), os autores utilizaram fontes de carbono hidrofílicas (glicerol e glicose) e hidrofóbicas (borra de soja, óleo de fritura e gordura de frango) para a produção de ramnolipídios por *P. aeruginosa* LBI, os autores verificaram que os substratos oleosos apresentaram produção de ramnolipídios 64% maior do que os substratos não oleosos. Além disso, foi predominante a produção de mono-ramnolipídios, quando cultivado em substrato hidrofóbico e de di-ramnolipídios, quando cultivados em substrato hidrofílico, corroborando com os apresentados nesse trabalho.

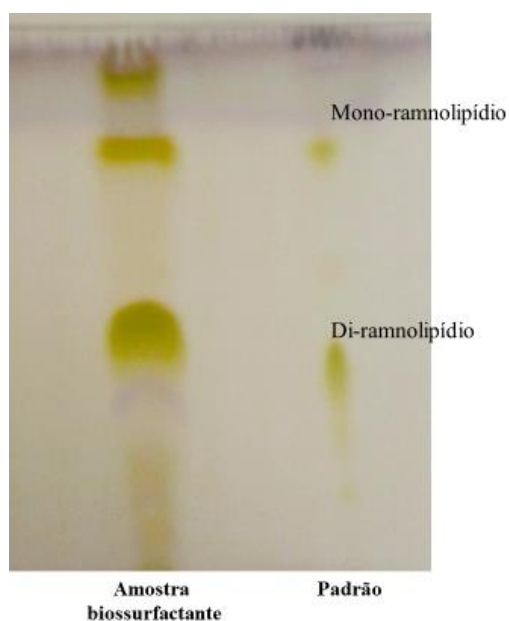
Dessa forma, sugere-se que a biossíntese seja direcionada de forma desejável pela simples seleção do substrato. Resultados similares também foram encontrados por Gudiña et

al. (2015a) ao utilizar a estirpe bacteriana *P. aeruginosa* #112 com diferentes resíduos agro-industriais como substrato.

Outras pesquisas revelaram que a proporção de homólogos determina as propriedades dos ramnolipídios, e que mesmo as pequenas diferenças na composição do biossurfactante, podem ocasionar um impacto significativo nas suas propriedades físico-químicas (GUO et al., 2009).

Após a produção do biossurfactante pelo meio SR2, em 72 h, foi realizada a extração do biossurfactante bruto do caldo livre de células em rotavapor e observou-se claramente a presença dos dois ramnolipídios, o di-ramnolipídio e o mono-ramnolipídio, de acordo com o padrão, conforme apresenta a Figura 16.

Figura 16 – Cromatografia de camada delgada do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBI em meio SR2 (75% de soro de ricota suplementado de 25% do meio mineral sais de Robert), extraído com acetato de etila em rotavapor após 72 h de fermentação.



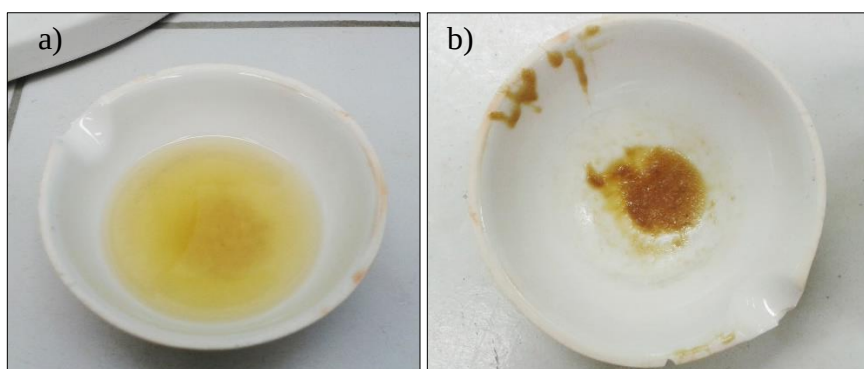
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.7 Rendimento na produção bruta de ramnolipídios

Após 72 h de produção, o caldo livre de células do meio SR2 foi utilizado para a recuperação bruta de biossurfactante em g L⁻¹, por meio da extração com solvente acetato de etila em rotavapor. Em seguida, a quantidade do biossurfactante extraída foi concentrada em um cadinho previamente pesado (Figura 17).

Deste modo, a concentração de biossurfactante obtida no processo fermentativo foi de $0,45 \text{ g L}^{-1}$ em 72 h de produção, para meio de cultivo contendo 75% de soro de ricota adicionado de meio mineral SR. É evidente o potencial do soro como substrato alternativo para produção de biossurfactante por micro-organismos, contudo é importante considerar que as diferenças de produção em relação a outros autores, bem como as propriedades do biossurfactante produzido podem ter sido afetadas pelas condições de cultivo utilizadas.

Figura 17 - Obtenção do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBI, após extração em rotavapor com solvente acetato de etila. Onde: a) Biossurfactante concentrado logo após extração; b) Biossurfactante bruto extraído após ser seco em estufa.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir do resultado da extração foi possível calcular o rendimento do processo fermentativo e estabelecer uma perspectiva para a utilização do soro de ricota na produção de biossurfactantes. Foi necessário 100 mL de soro de ricota (100,4 g) para que a bactéria *P. aeruginosa* LBI produzisse 0,044 g de ramnolipídio, ou seja, rendimento de 0,044% no processo fermentativo, conforme mostra a Tabela 8.

Tabela 8 – Rendimento do processo de produção de biossurfactante a partir de soro de ricota.

Data de coleta do soro de ricota	19/04/2016
Massa do soro	1 L
Peso seco	$6,7 \text{ g L}^{-1}$
Produção de biossurfactante	$0,45 \text{ g L}^{-1}$
Rendimento do biossurfactante em relação ao peso seco (m/m)	6,71%
Rendimento do biossurfactante em relação ao volume do soro (m/v)	0,044%

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.8 Caracterização do biossurfactante

Caracterizar as propriedades físico-químicas dos biossurfactantes é importante para avaliar a aplicabilidade dos biossurfactantes, tais como CMC e capacidade de emulsão (SHAO et al., 2017).

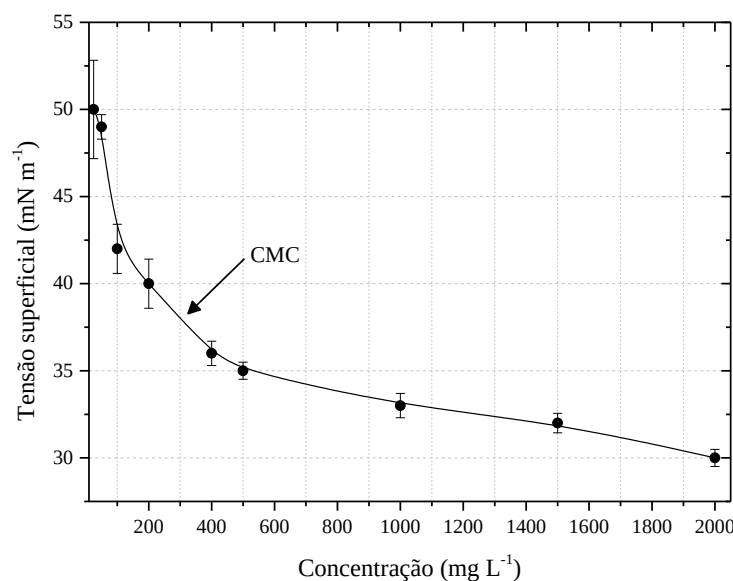
4.3.8.1 Determinação da Concentração Micelar Crítica

A CMC é um importante parâmetro que indica qual é a concentração mínima necessária de biossurfactante em solução, para que ocorra redução máxima de tensão superficial, formando micelas, onde menores concentrações adicionadas do biossurfactante representariam um fator econômico (SOUZA et al., 2014).

Assim, a tensão superficial da solução de biossurfactante bruta em pH 7,0 foi reduzida com o aumento da concentração de ramnolipídios. Pode-se observar que acima da concentração de 300 mg L⁻¹, a intensidade da redução das medidas foi menor, ocorrendo tendência à estabilização das mesmas (Figura 18).

É também conhecido que as propriedades dos ramnolipídios dependem da distribuição de seus homólogos, mas é pouco conhecida a contribuição individual de cada homólogo nas propriedades tenso-ativas, porém algumas evidências podem ser observadas. Segundo Nitschke et al. (2005a) e Gudiña et al. (2015a), os di-ramnolipídios do tipo Rha₂C₁₀C₁₀ geralmente apresentam uma CMC mais baixa (5 mg L⁻¹), devido à presença de duas moléculas de açúcar. Em contrapartida, alguns mono-ramnolipídios, como RhaC₁₀C₁₀ por exemplo, podem apresentar valores de CMC de 40 mg L⁻¹, enquanto que a mistura de ramnolipídios, RhaC₁₀ e Rha₂C₁₀, por exemplo, pode apresentar uma CMC de 200 mg L⁻¹.

Figura 18 – Determinação da concentração micelar crítica em função da tensão superficial (mN m^{-1}), utilizando-se diferentes diluições de uma solução concentrada do biossurfactante extraído.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Ao se alcançar o valor da CMC, nenhuma redução da tensão é observada, mesmo com aumento da concentração de biossurfactante. Na CMC, a formação das micelas leva à redução da tensão superficial. Estes agregados são formados a partir de numerosas interações entre os grupos polares e não-polares, incluindo forças de Van der Waals e ligação de hidrogênio, levando à diminuição da força de repulsão entre as fases líquidas imiscíveis (APARNA et al., 2012).

4.3.8.2 Índice de emulsificação

O poder emulsificante é outra importante característica para qualquer surfactante (ABDEL-MAWGOUD et al., 2010). A Tabela 9 apresenta os valores da atividade emulsificante obtidos pelos ramnolipídios de *P. aeruginosa* LBI e do Tween80 (surfactante comercial), frente a gasolina e óleo diesel, após 24 horas. O ramnolipídio apresentou boa atividade emulsificante, tendo alcançado um índice máximo de emulsificação de 56,8% para o óleo diesel, frente a 60,1% do Tween80. A gasolina não foi emulsionada de forma eficiente pelo ramnolipídio, ao contrário do Tween 80.

De acordo com Willumsen e Karlson (1996), um bom biossurfactante, com propriedades emulsionantes, apresenta um índice de emulsificação maior que 50,0% e Batista et al. (2006) acrescenta que o biossurfactante tem que estabilizar a emulsão, mantendo pelo menos 50% do volume da emulsão original, após 24h de formação. Pirôllo et al. (2008) também

utilizaram a estirpe *P. aeruginosa* LBI, para produção de biossurfactante a partir de diesel comercial, sendo que este foi capaz de emulsionar diferentes compostos, tais como o óleo diesel, apresentando índice de emulsificação de 70,0%.

Tabela 9 – Índice de emulsificação do biossurfactante produzido por *P. aeruginosa* LBI a partir de soro de ricota e do Tween80, com diferentes hidrocarbonetos após 24 h.

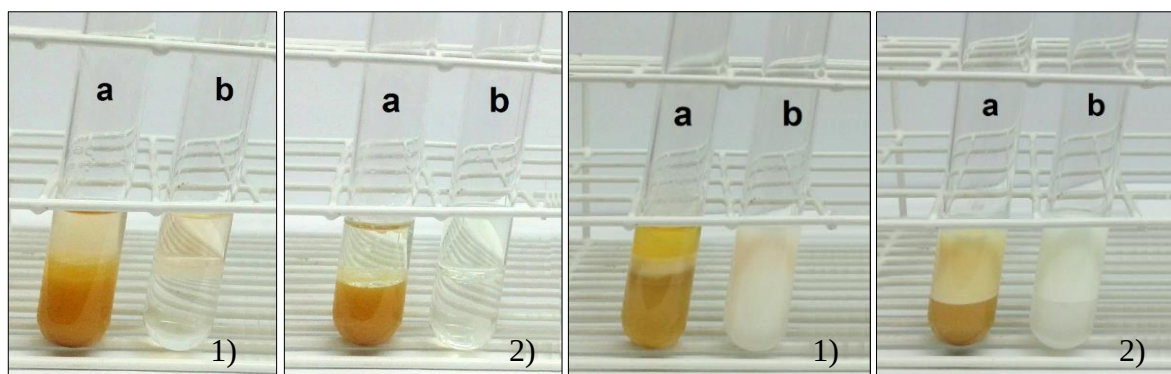
Índice de Emulsificação E ₂₄ (%)*		
Hidrocarbonetos	Ramnilipídios	Tween80
Gasolina	10,2 ± 2,11	100,0
Óleo diesel	56,8 ± 1,96	60,1 ± 0,75

*Dados apresentados como média±desvio padrão

Fonte: Elaborado pelo autor.

A maioria dos surfactantes de origem microbiana são específicos, solubilizando ou emulsionando hidrocarbonetos diferentes de forma distinta, o que explicaria a diversidade de valores E₂₄ 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 (RAHMAN et al., 2007). Segundo Santos et al. (2016), as emulsões têm uma estabilidade mínima, mas a adição de biossurfactantes pode levar a uma emulsão que permanece estável por meses ou mesmo anos. A Figuras 19 apresenta a montagem do teste para as medidas de E₂₄, antes da emulsificação e após 24 h, respectivamente.

Figura 19 – Teste para medida do índice de emulsificação, antes da emulsificação e após a emulsificação (24 h). Na sequência: Gasolina (1) e óleo diesel (2), Biossurfactante (a) e Tween80 (b).



Fonte: Elaborado pelo autor.

A habilidade dos ramnolipídios em emulsificar hidrocarbonetos derivados do petróleo pode facilitar a assimilação microbiana desses compostos como fonte de carbono. Assim, esses dados são úteis para o planejamento estratégico na remediação de ambientes contaminados por estes compostos (BENINCASA et al., 2004).

5 Capítulo 2

Avaliação do potencial de biodegradação de hidrocarbonetos por *Pseudomonas putida* CCMI 852

5.1 Introdução

Para demonstrar que uma tecnologia de biorremediação é potencialmente útil, é importante verificar a biodegradação dos poluentes sob condições controladas. Isto geralmente não é possível de se obter *in situ*, assim, esta verificação deve ser obtida por meio de experimentos laboratoriais, os quais demonstram o potencial que um determinado tratamento pode ter em estimular a remoção de contaminantes de um local contaminado (MARIANO, 2008).

Vários métodos têm sido propostos para avaliar o potencial de utilização de hidrocarbonetos como fonte de carbono por micro-organismos. Entre esses métodos, foram sugeridos por Hanson et al. (1993), Braddock e Catterall (1999) e Souza et al. (2016) a utilização dos indicadores 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) e do 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP). Esses métodos colorimétricos são referidos como um procedimento de baixo custo e rápidos na detecção do metabolismo microbiano, tanto em processos aeróbios quanto anaeróbios (MAHMOUD e GHALY, 2004; BURDOCK et al., 2011; MONTAGNOLLI et al., 2014).

5.1.1 Indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio

Sob condições aeróbicas, o potencial de oxidação de compostos orgânicos pode ser determinado pela capacidade dos micro-organismos em produzir um grupo de enzimas da

cadeia respiratória designadas de desidrogenases (BURDOCK et al., 2011; WOLIŃSKA et al., 2016). Além disso, a atividade de desidrogenases representa um fluxo intracelular de elétrons ao aceptor final como o O_2 (BURDOCK et al., 2011). Isso reflete a atividade de muitas enzimas estarem envolvidas no catabolismo de compostos orgânicos, sendo estes utilizados como fonte de carbono e energia pelas células (NANNIPIERI et al., 1990).

Um dos métodos mais utilizados para estimar a atividade da enzima desidrogenase foi desenvolvido por Casida et al. (1964) e adaptado por Braddock e Catterall (1999), sendo baseado no uso do indicador redox TTC (Tabela 10), como um aceptor final de elétrons.

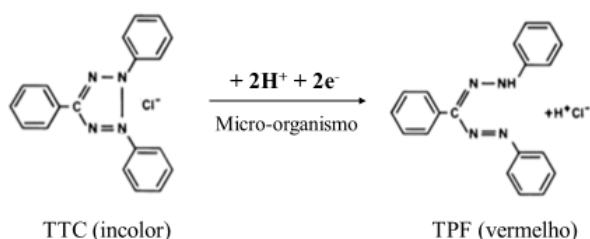
Tabela 10 – Propriedades do indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio.

2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC)	
λ máx.	485 nm
Peso molecular	334,80 g mol ⁻¹
Nº CAS	298-96-4
Forma oxidada (TTC _{ox})	Incolor
Forma reduzida (TPF _{red})	Lilás -avermelhado
Fórmula química	C ₁₉ H ₁₅ ClN ₄

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 20 apresenta o mecanismo, que na presença de enzimas desidrogenase, reduz o TTC, incolor, a 1,3,5-trifenilformazan (TPF), de coloração lilás-avermelhada (OLGA et al., 2008; BURDOCK et al., 2011). Assim, esse método é considerado como um teste qualitativo e rápido para avaliar a atividade bacteriana, podendo-se dizer que a coloração é uma indicação positiva sobre a oxidação dos hidrocarbonetos pelos micro-organismos, uma vez que a absorbância do TPF, medida a 480 nm, é diretamente proporcional à quantidade de bactérias vivas no meio (BENTO et al., 2005; MOUSSA et al., 2013).

Figura 20 – Mecanismo da oxirredução do 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio a 1,3,5-trifenilformazan pela enzima desidrogenase.



Fonte: Adaptado de Moussa et al. (2013).

Embora nem todos os micro-organismos utilizem o TTC como um carreador artificial de elétrons no seu metabolismo, ele tem se mostrado uma ferramenta bastante sensível, visto que possui alta capacidade por competir com outros transportadores de elétrons da cadeia respiratória, como NAD^+ e o NADP^+ , demonstrando resultados bastante fidedignos para atividade enzimática (BENTO et al., 2005; WOLIŃSKA et al., 2016).

Dessa forma, como um grande grupo de desidrogenases tem alta afinidade pelo TTC, esse carreador artificial atua como um marcador adaptado com o intuito de avaliar tanto a atividade dessas enzimas cuja presença e intensidade contribuem para determinação da qualidade dos solos e de outros ambientes (BURDOCK et al., 2011), assim como parâmetro para caracterizar a presença e a quantidade de micro-organismos com potencial degradador de fontes de contaminação por gasolina e diesel nesses mesmos ambientes.

5.1.2 Indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol

A capacidade de diferentes micro-organismos em utilizar hidrocarbonetos como fonte de carbono, pode ser verificada utilizando também a técnica colorimétrica baseada no indicador redox DCPIP (KUBOTA et al., 2008). As propriedades e estrutura do DCPIP são apresentados na Tabela 11.

Com a adição do DCPIP ao meio de cultura, é possível determinar a capacidade dos micro-organismos em utilizar hidrocarbonetos como substrato, podendo indicar uma série de reações em que ocorram trocas de elétrons como a biodegradação, observada pela mudança de cor do DCPIP de azul, forma oxidada, para incolor, forma reduzida (MARIANO et al., 2007; BIDOIA et al., 2010).

Tabela 11 – Propriedades do indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol.

2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP)	
λ máx.	600 nm
Peso molecular	268,09 g mol ⁻¹
Nº. CAS	956-48-9
Forma oxidada (DCPIP_{ox})	Azul
Forma reduzida (DCPIP_{red})	Incolor
Fórmula química	C ₁₂ H ₇ Cl ₂ NO ₂

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 21 – Reação de oxirredução do 2,6-diclorofenol indofenol como aceptor de elétrons.



Tais reações redox não estão associadas unicamente ao consumo de um substrato, mas sim ao metabolismo total das células. Dessa forma, considera-se que o que o DCPIP realmente mede é a resposta metabólica microbiana a um dado substrato e/ou ambiente em que é exposto (MONTAGNOLLI et al., 2017b).

Mariano et al. (2007) demonstraram que bactérias encontradas em água subterrânea, próximo a um vazamento de combustível, têm a capacidade de biodegradar óleo diesel em curto prazo. Assim, a técnica revelou-se eficiente em identificar a microbiota melhor adaptada em biodegradar hidrocarbonetos.

5.2 Material e Métodos

5.2.1 Preparo do inóculo

Para os testes de biodegradação, foi utilizada a linhagem *Pseudomonas putida* CCMI 852, da coleção de cultura de micro-organismos industriais do Laboratório de Microbiologia Industrial, Instituto Nacional de Engenharia e Tecnologia Industrial, em Lisboa, Portugal, isolada a partir de uma estação de tratamento de esgoto doméstico, de acordo com Otenio et al. (2005).

No preparo do pré-inóculo, a *P. putida* CCMI 852 foi transferida, com o auxílio de uma alça de platina, da cultura estoque para um frasco Erlenmeyer, contendo 100 mL de caldo nutriente estéril e foi incubado sob agitação de 180 rpm, a 30 °C por 24 h. Posteriormente, as células foram centrifugadas a $2,897 \times g$ (8.000 rpm), por 20 min e lavadas com solução salina (NaCl 0,85%) estéril. Este procedimento foi repetido três vezes. Ao fim do processo, o *pellet* foi ressuspensão em solução salina e foram realizadas leituras de absorbância em comprimento de onda de 600 nm, utilizando espectrofotômetro (Shimadzu UV-2401 PC – UV-Vis), de modo a padronizar a concentração inicial de células a ser empregada como inóculo.

5.2.2 Adaptação bacteriana

O crescimento das células microbianas varia em diferentes fontes externas de carbono, a menos que sejam aclimatados a esse substrato específico. Dessa maneira, para aclimação da linhagem de *P. putida*, foram utilizados como fonte de carbono, óleo diesel S10 (diesel puro Replan) e gasolina comercial, separadamente. O etanol presente na gasolina comercial foi removido, utilizando um funil de separação com água mili-Q (1:1), pois sua presença atrasa a degradação dos hidrocarbonetos, por possuir degradação preferencial pelos micro-organismos (RUIZ-AGUILAR et al., 2002; SILVA e ALVAREZ, 2004; NUNES e CORSEUIL, 2007; CORSEUIL et al., 2015).

Os ensaios foram preparados em duplicata, em Erlenmeyer de 250 mL contendo 150 mL de meio BH (conforme descrito no item 4.2.5.1) estéril e 1% de gasolina sem etanol ou 1% de óleo diesel (v/v) como fonte de carbono, baseado em trabalhos de Kubota et al. (2008) e Oliveira et al. (2011). A esterilização dos compostos foi realizada por filtros descartáveis de seringa (Millex FG estéril, membrana PTFE 0,22 μ m, 25 mm). Como inóculo, foi adicionado 1,5 mL da *P. putida* padronizada ($DO_{600nm} = 0,8$). Os Erlenmeyers foram mantidos em incubadora, sob agitação constante de 180 rpm a 30 °C por 48 h.

Após confirmação do crescimento microbiano por turbidez, os cultivos foram repicados para aplicação no processo de degradação e estocados a 4 °C, em ágar nutriente.

5.2.3 Potencial de biodegradação utilizando o indicador redox TTC

Inicialmente, para otimização das condições do potencial de biodegradação, foi realizado um delineamento experimental por meio de ensaios da atividade da enzima desidrogenase com o indicador redox TTC em óleo diesel como fonte de carbono (1% v/v) e inóculo de *P. putida* CCM 852, em 48 h, conforme descritos no item 5.2.3.2.

5.2.3.1 Otimização das variáveis – Planejamento experimental

A necessidade da otimização de processos e a minimização de custos e tempo, levam à busca de técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos (IEMMA e RODRIGUES, 2009). Assim, para o estudo inicial da atividade bacteriana, frente ao óleo diesel (ensaios montados de acordo com o item 5.2.5), foram investigadas as influências de algumas variáveis, utilizando-se a técnica do planejamento experimental.

Para isso, foi gerado um modelo geral, com 27 ensaios (3^3), com base em 3 variáveis independentes: (A) inóculo, (B) temperatura, (C) agitação e 3 níveis (-1, 0, +1), conforme a Tabela 12. Posteriormente, foram reduzidos para 15 experimentos utilizando o *Box-Behnken design*, para análise da metodologia de superfície de resposta. Os experimentos de Box-Behnken possuem três níveis dos fatores e suportam modelos de segunda ordem. Os ensaios no ponto central podem fornecer informações úteis sobre o comportamento das respostas entre os níveis avaliados, além de evidenciar a qualidade da repetibilidade do processo (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Para isso, utiliza-se análises de gráficos de superfície de resposta, uma técnica estatística utilizada para a modelagem e análise de problemas nos quais a variável resposta é influenciada por vários fatores, cujo objetivo é a otimização dos resultados esperados (BARROS NETO et al., 2002). A análise estatística favorável permite a elaboração de modelos matemáticos preditivos (polinômio quadrático) para definir faixas ótimas operacionais das variáveis dentro dos limites estudados. Deve ser realizada a validação experimental das condições otimizadas (IEMMA e RODRIGUES, 2009).

O delineamento dos experimentos foi realizado utilizando-se o software *Design Expert* 10.06 (Stat – Ease Inc.) e os ensaios foram realizados em triplicata. Todos os experimentos foram realizados em ordem aleatória para minimizar o efeito de variações inexplicáveis das respostas, devido a erros sistemáticos.

A variável de resposta empregada no planejamento experimental foi a atividade da enzima desidrogenase em óleo diesel, utilizando o indicador redox TTC em 48 h de tratamento. No Anexo A, a Tabela A.1 apresenta a matriz do planejamento experimental. Os inóculos utilizados para avaliação dos efeitos foram preparados conforme item 5.2.1, em 600 nm.

Tabela 12 – Variáveis independentes e seus respectivos níveis empregados no planejamento experimental.

Variáveis independentes	Símbolo	Níveis		
		-1	0	+1
Inóculo de <i>P. putida</i> CCMI 852 (DO _{600nm})	A	0,5	0,8	1,1
Temperatura (°C)	B	25	30	35
Agitação (rpm)	C	120	150	180

Fonte: Elaborado pelo autor.

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para se obter a interação entre as variáveis e as respostas. Como intervalo de confiança, foi escolhido o valor de 95%, ou seja, um “p-valor” inferior a 0,05, inferindo que a variável é estatisticamente significativa. Após a eliminação dos fatores não significativos, verificou-se a significância da regressão e da falta de ajuste a um nível de confiança de 95%, utilizando teste F para o planejamento estudado. O ajuste foi repetido várias vezes, mapeando a superfície em direção do ponto ótimo desejado (BARROS NETO et al., 2002).

Para a resposta estudada, um modelo quadrático, denominado modelo de segunda ordem de superfície de resposta, foi utilizado para estabelecer um modelo matemático preditivo da resposta. Após o ajuste do modelo de segunda ordem, foram obtidas as condições ótimas.

5.2.3.2 Montagem dos ensaios

Foi utilizado meio mineral mínimo salino acrescido de TTC (MMM-TTC), preparado conforme Tabela 13, em balão volumétrico, pela dissolução de 1.000 mL dos macronutrientes e 1 mL da solução de micronutrientes, de acordo com Richard e Vogel (1999). Após, foi pesado 0,025 g de TTC (Sigma-Aldrich), segundo Braddock e Catterall (1999), que foi diluído em 100 mL de água destilada. Em seguida, misturou-se a 400 mL do meio mineral. Posteriormente, o pH foi ajustado para 7,2 e o MMM-TTC foi esterilizado em autoclave a 121 °C, 1 atm, durante 15 min.

Tabela 13 – Composição de sais no preparo de meio mineral salino acrescido de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC).

Composto	Fórmula	Quantidade
Macronutrientes		
Cloreto de potássio (Cinética química)	KCl	0,700 g
Fosfato de potássio monobásico (Synth)	KH ₂ PO ₄	2,000 g
Fosfato de sódio dibásico (Synth)	Na ₂ HPO ₄	3,000 g
Nitrato de amônio (Vetec)	NH ₄ NO ₃	1,000 g
Micronutrientes		
Sulfato de magnésio (Chenco)	MgSO ₄	4,000 g
Sulfato de magnésio heptahidratado (Reagen)	MgSO ₄ 7H ₂ O	8,200 g
Sulfato de ferro (Merck)	FeSO ₄	2,000 g
Sulfato de ferro heptahidratado (Merck)	FeSO ₄ 7H ₂ O	0,360 g
Cloreto de manganês (Merck)	MnCl ₂	0,200 g
Cloreto de manganês tetrahidratado (Merck)	MnCl ₂ 4H ₂ O	0,310 g
Cloreto de cálcio (Synth)	CaCl ₂	0,200 g
Cloreto de cálcio dihidratado (Synth)	CaCl ₂ 2H ₂ O	0,260 g

Fonte: Elaborado pelo autor.

O potencial biodegradador da *P. putida* foi determinado pela atividade da enzima desidrogenase, conforme método proposto por Thalmann (1968), descrito por Alef (1995) e Alef (1996) e modificado por Braddock e Catterall (1999).

Conforme citado no item 5.2.4, para otimização das condições de biodegradação, foram realizados ensaios somente com óleo diesel como fonte de carbono. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

Após a otimização das variáveis, os ensaios foram realizados em tubos de ensaio com tampa, contendo, conforme apresenta a Tabela 14, 7,5 mL de MMM-TTC previamente esterilizado, 100 µL de inóculo de *P. putida*, além do biossurfactante produzido a partir do soro de ricota (conforme capítulo 1) em concentração 300 mg L⁻¹ (valor da CMC). Como fonte de carbono foram fornecidos gasolina e óleo diesel 1% (v/v). A esterilização dos compostos não esterilizados, foi realizada por filtros descartáveis de seringa. Os ensaios foram conduzidos em triplicata.

Tabela 14 – Composição dos ensaios acrescidos de 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC).

Ensaio	Composição	MMM-TTC (mL)	Inóculo (μL)**	Gasolina (μL)	Óleo diesel (μL)	Bs (μL)***
Controle meio	C – MMM*	7,5	-	-	-	-
Controle Gas	C - MMM + gasolina	7,5	-	75	-	-
Controle Diesel	C - MMM + óleo diesel	7,5	-	-	75	-
Controle In.	C – MMM + inóculo	7,5	100	-	-	-
Controle Bs	C - MMM + Biossurfactante	7,5	-	-	-	100
In.+ Gas	MMM + inóculo + gasolina	7,5	100	75	-	-
In.+ Diesel	MMM + inóculo + óleo diesel	7,5	100	-	75	-
In.+ Bs	MMM + inóculo + Biossurfactante	7,5	100	-	-	100
In.+ Gas + Bs	MMM + inóculo + gasolina + Biossurfactante	7,5	100	75	-	100
In.+ Diesel + Bs	MMM + inóculo + óleo diesel + Biossurfactante	7,5	100	-	75	100

* MMM: Meio Mineral Salino.

**Inóculo: inóculo de *P. putida* CCMI 852.

***Bs.: Biossurfactante produzido a partir de soro de ricota.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Para evitar a foto-oxidação, todos os frascos foram recobertos por papel alumínio. Os ensaios foram realizados por 48, 144 e 240 h. Após a incubação, foram adicionados 16 mL de acetona (Chemicals) para retardar a velocidade de reação, deixando o homogeneizado no escuro por mais 2 horas. A redução do TTC a TPF pelo micro-organismo, foi avaliada pela mudança na coloração do meio de incolor para lilás a vermelho (Figura 22), medindo-se a absorbância em comprimento de onda de 484 nm em espectrofotômetro (Shimadzu UV-2401 PC – UV-Vis

Figura 22 – Ensaio do potencial de biodegradação de hidrocarbonetos por *P. putida* CCMI 852 utilizando TTC, antes da leitura em espectrofotômetro.

Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.3.3 Reta padrão do TPF

Previamente à análise quantitativa da biodegradação por leituras de absorbância, foi determinada a reta padrão para concentração de TPF. O comprimento de máxima absorbância, em 484 nm foi obtido por espectrofotometria no visível e após, confeccionou-se a reta padrão (Figura 23) das seguintes concentrações: 5, 10, 20, 30 e 40 µg de TPF mL⁻¹ (Sigma-Aldrich) e calculou-se a equação da reta (equação 7).

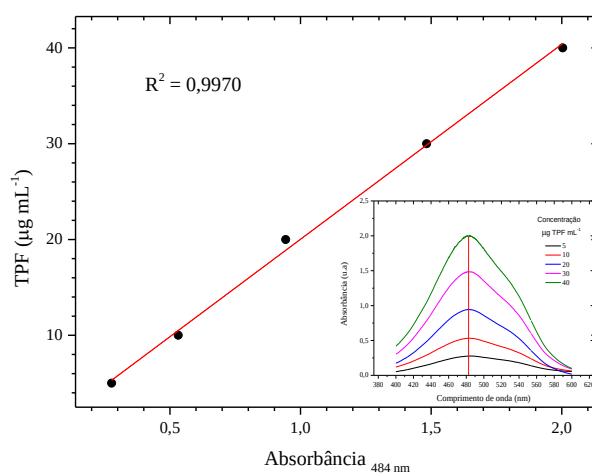
$$[\text{TPF}] = (20,35 \times \text{abs}_{484\text{nm}}) - 0,3248 \quad (7)$$

Onde:

[TPF] = Concentração do indicador redox TPF, em µg mL⁻¹;

Abs_{484nm} = Absorbância no comprimento de onda 484 nm.

Figura 23 – Reta padrão do 1,3,5-trifenilformazan e seu espectro de absorção em diferentes concentrações.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.4 Determinação da concentração de hidrocarbonetos

Mesmo após aclimação, alguns estudos mostraram que o crescimento do micro-organismo é inibido pela alta toxicidade do substrato (PADHI e GOKHALE, 2017). Assim, a determinação da concentração ideal do substrato para o crescimento do micro-organismo é extremamente importante.

Dessa forma, após a definição das condições otimizadas, realizada pelo delineamento experimental, foram preparados cultivos, em duplicata, em tubos de ensaio com tampa, contendo 10 mL de meio BH, previamente esterilizado e 100 µL de inóculo de *P. putida* CCM 852 padronizado (DO_{600nm} = 1,0) e aclimatado para avaliar a melhor concentração para o

crescimento bacteriano. Dessa forma, como fonte de carbono, foram fornecidos isoladamente, benzeno 99,96% e tolueno 99,90% (Sigma-Aldrich). A esterilização dos compostos foi realizada por filtros descartáveis de seringa.

As concentrações dos compostos benzeno e tolueno foram variáveis, sendo individualmente, 12,5, 25, 50, 100 e 150 mg L⁻¹. Controles negativos sem o inóculo, contendo os compostos isoladamente, foram igualmente preparados. Os tubos foram mantidos em incubadora com agitação constante a 180 rpm e 32±2 °C. Os ensaios foram removidos em intervalos de tempo de até 12 h, durante um período de 48 h, para análise do crescimento bacteriano por medidas de absorbância em 600 nm, em espectrofotômetro Nanocolor® UV/Vis-Macherey-Nagel.

5.2.5 Potencial de biodegradação utilizando o indicador redox DCPIP

5.2.5.1 Montagem dos ensaios

O método colorimétrico foi realizado segundo Hanson et al. (1993) e Bidoia et al. (2010), em tubos de ensaio com tampa, próprios para leitura no espectrofotômetro Nanocolor® UV/Vis-Macherey-Nagel. Foram utilizados o meio BH (meio isento de fontes de carbono), conforme descrito no item 4.2.3.2, previamente esterilizado, o indicador DCPIP (Vetec) 1,000 g L⁻¹, concentração de acordo com estudos de Bidoia et al. (2010), Montagnolli et al. (2014), Montagnolli et al. (2017a) e a solução de biossurfactante (300 mg L⁻¹).

Para o preparo da solução de DCPIP, dissolveram-se 0,100 g de DCPIP em balança analítica (Adam ADA 210/L) em um balão volumétrico de 100 mL de água destilada, sendo homogeneizada, armazenada em frasco âmbar protegida de luz e mantida em geladeira a 4 °C.

O inóculo de *P. putida* CCMI 852 foi obtido de acordo com o item 5.2.1, ressuspenso em solução salina, DO_{600nm} = 1,0. Como fonte de carbono, foi fornecido óleo diesel e gasolina a 1% (v/v) e mistura de compostos BTE(o-)X (25 mg L⁻¹ de cada) e individualmente, na concentração de 100 mg L⁻¹. A esterilização dos compostos não esterilizados em autoclave foi realizada por filtros descartáveis de seringa. Os ensaios foram conduzidos em triplicata. As quantidades e substâncias utilizadas nos ensaios colorimétricos são apresentadas pela Tabela 15.

Depois de montados, cada um dos tubos foi agitado em vórtex (Phoenix AP56) por 10 segundos e armazenados em incubadora com agitação a 180 rpm e 32±2 °C. Os resultados consideraram a alteração da coloração do meio e as leituras de absorbância ao longo do tempo de incubação.

Tabela 15 – Composição dos ensaios colorimétricos utilizando indicador redox 2,6-diclorofenol indofenol (DCPIP).

Ensaio	Composição	Meio BH (mL)	DCPIP (µL)	Inóculo (µL)	Gasolina (µL)	Óleo diesel (µL)	Bs (µL)
Branco	BH (Bushnell-Haas)	7,5	-	-	-	-	-
Controle meio	BH + DCPIP	7,5	400	-	-	-	-
Controle Gas	BH + DCPIP + Gasolina	7,5	400	-	75	-	-
Controle Diesel	BH + DCPIP + Diesel	7,5	400	-	-	75	-
Controle BTEX**	BH + DCPIP + BTEX**	7,5	400	-	-	-	-
Controle In.***	BH + DCPIP + Inóculo	7,5	400	100	-	-	-
Controle In. + Bs*	BH + DCPIP + In + Bs	7,5	400	100	-	-	100
In.+ Gas	BH + DCPIP + In + Gasolina	7,5	400	100	75	-	-
In.+ Diesel	BH + DCPIP + In + Diesel	7,5	400	100	-	75	-
In. + BTEX**	BH + DCPIP + In + BTEX**	7,5	400	100	-	-	-
In.+ Gas + Bs	BH + DCPIP + In + Gasolina + Bs	7,5	400	100	75	-	100
In.+ Diesel + Bs	BH + DCPIP + In + diesel + Bs	7,5	400	100	-	75	100
In.+ BTEX + Bs**	BH + DCPIP + In + BTEX + Bs**	7,5	400	100	-	75	100

*Bs.: Biossurfactante produzido a partir de soro de ricota.

**BTEX: (BTE(o-)X) mistura (25 mg L⁻¹ de cada) e individualmente, na concentração de 100 mg L⁻¹.

***In.: Inóculo de *P. putida* CCMI 852.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A descoloração do DCPIP, foi monitorada duas vezes ao dia, às 8:00 h e às 20:00 h. As medidas quantitativas foram realizadas em espectrofotômetro Nanocolor® UV/Vis-Macherey-Nagel (Figura 24) pela leitura de absorbância no comprimento de 600 nm e convertidos em mg L⁻¹ de DCPIP.

Dessa forma, a descoloração foi avaliada em termos de porcentagem (%), expressa pela equação 8.

$$PD(\%) = \frac{C_0}{C} \times 100\% \quad (8)$$

Onde:

C₀ = Concentração inicial do DCPIP no ensaio (mg L⁻¹);

C = Concentração do DCPIP após t minutos (mg L⁻¹).

Figura 24 – Leitura dos ensaios colorimétricos em espectrofotômetro Nanocolor® UV/Vis-Macherey-Nagel a 600 nm.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.5.2 Reta padrão do DCPIP

Previamente à análise quantitativa da biodegradação, foi necessário estabelecer o comprimento de onda de maior absorbância, utilizando espectrofotômetro. Logo, visando confeccionar a reta padrão, foram realizadas leituras de absorbância a 600 nm de cinco soluções de concentrações conhecidas, sendo elas 10, 20, 30, 40 e 50 mg L⁻¹. A partir dos valores da concentração do DCPIP e das absorbâncias obtidas, confeccionou-se a reta padrão (Figura 25) e calculou-se a equação da reta (Equação 9). Dessa forma, determinou-se a quantidade de DCPIP em sua conformação azul presente em solução ao longo do processo de biodegradação.

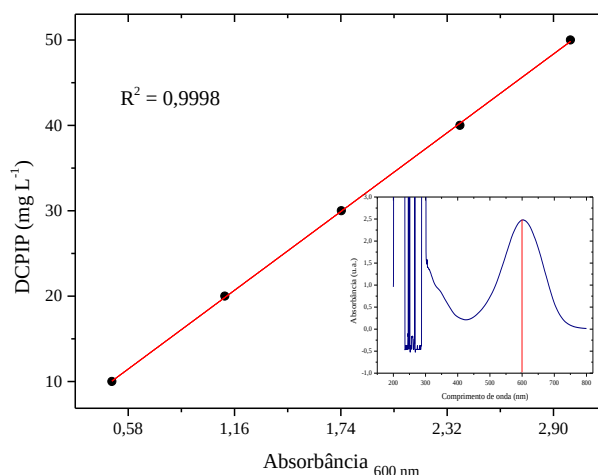
$$[\text{DCPIP}] = (15,92 \times \text{Abs}_{600\text{nm}}) + 2,21 \quad (9)$$

Onde:

[DCPIP] = Concentração do indicador redox DCPIP, em mg L⁻¹;

Abs_{600nm} = Absorbância no comprimento de onda 600 nm.

Figura 25 – Reta padrão do indicador redox DCPIP e seu espectro de absorção UV-Vis em diferentes concentrações.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2.5.3 Avaliação cinética dos processos de degradação

As taxas de biodegradação de hidrocarbonetos de petróleo são geralmente difíceis de prever devido à complexidade do meio (NWANKWEGU e ONWOSI, 2017). No entanto, uma comparação quantitativa entre os processos de biodegradação pode ser realizada por meio da avaliação das constantes de velocidade, com base na determinação do coeficiente de correlação R^2 mais próximo de 1 analisado. Geralmente, os processos de degradação de hidrocarbonetos seguem o modelo cinético de Langmuir-Hinshelwood, obedecendo a uma cinética de pseudo-primeira ordem, na qual a relação entre $\ln(C/C_0)$ e tempo é aproximadamente linear. A cinética de pseudo-primeira ordem apresenta uma transição entre um comportamento de primeira ordem a um de ordem zero (PALÁCIO et al., 2009).

Para a determinação da constante cinética de pseudo-primeira ordem (k) foi utilizada a Equação 10, simplificada (HAMAD et al., 2016). Assim, a constante de velocidade foi calculada para todos os ensaios realizados com DCPIP.

$$\ln \frac{C}{C_0} = -kt \quad (10)$$

Onde:

C e C_0 = Concentrações inicial e final do DCPIP, respectivamente (mg L^{-1});

k = Constante de velocidade de pseudo-primeira ordem (h^{-1});

t = Tempo de tratamento (h).

Além da constante cinética, foi possível calcular o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) para cada um dos processos, parâmetro que de acordo com Hamad et al. (2016) expressa o tempo necessário para que a concentração da espécie considerada diminua à metade do seu valor inicial. Considerando o processo como de pseudo-primeira ordem, tem-se, de acordo com a Equação 11 que:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (11)$$

5.3 Resultados e Discussão

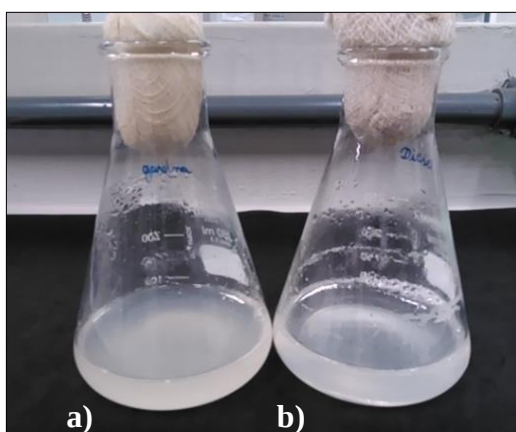
5.3.1 Verificação da adaptação bacteriana

A degradação microbiana de contaminantes é influenciada por muitos aspectos ambientais de acordo com Yeom et al. (1997), tais como, concentração de poluentes, concentração de biomassa viável, existência de Inibidor, temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes, interação poluente, competição microbiana e adaptação microbiana. Quando mais de dois substratos estão envolvidos, a adaptação microbiana deve ser sempre considerada.

Assim, para estimular o crescimento dos micro-organismos, foram utilizados, gasolina comercial sem etanol e óleo diesel como fonte de carbono em um meio de cultura mínimo. A exposição prévia dos micro-organismos a hidrocarbonetos, mesmo que tenham sido isolados de ambientes com hidrocarbonetos, é importante para acelerar a biodegradação por meio da diminuição do tempo de adaptação e latência dos micro-organismos aos compostos (LEAHY e COLWELL, 1990).

A adaptação foi confirmada por meio do crescimento microbiano por turbidez, conforme apresenta a Figura 26, indicando o potencial da linhagem *P. aeruginosa* em degradar os compostos derivados de petróleo. Posteriormente, inóculos preparados dessas culturas adaptadas foram utilizados para os ensaios de biodegradação.

Figura 26 – Ensaio para aclimação da *P. putida* CCMI 852, onde: a) gasolina e b) óleo diesel como fontes de carbono, após 48 h de incubação.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Mariano et al. (2009) ao realizarem bioaumento para avaliar a taxa de biodegradação do óleo diesel, observaram que em solos contaminados anteriormente com óleo diesel, o bioaumento não alterava a taxa de biodegradação, uma vez que os micro-organismos presentes

já estavam adaptados ao meio, evidenciando então, a necessidade da preparação do inóculo base.

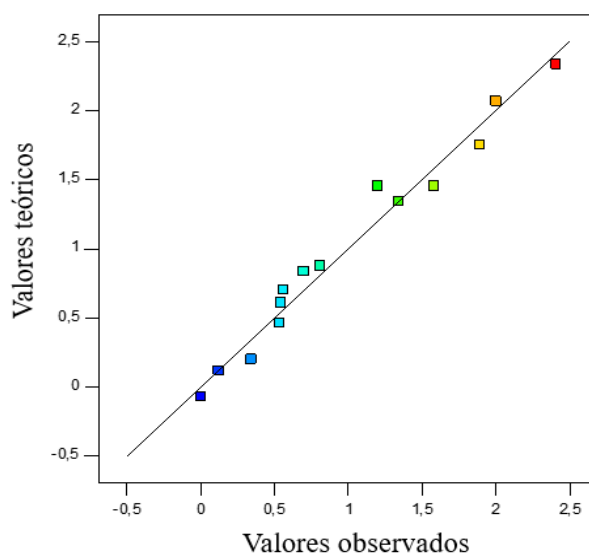
5.3.2 Otimização dos parâmetros para a biodegradação

A pesquisa das condições ideais para regular o processo da biodegradação é importante para estabelecer um processo bem sucedido de biorremediação (BIDOIA et al., 2010). Assim, a partir da metodologia de superfície de resposta, foram avaliados os efeitos da quantidade de inóculo, da temperatura e da agitação, em relação a atividade bacteriana pela enzima desidrogenase utilizando diesel como fonte de carbono. Os valores da análise estatística dos dados experimentais, estão apresentados na Tabela 16.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para avaliar a significância da equação do modelo polinomial quadrático no nível de Prob> F inferior a 0,05, indicando que as variáveis independentes são estatisticamente significativas. Neste caso, A, B, C, AB, AC e B² são os termos significativos do modelo.

O valor de $R^2 = 0,9790$ obtido e o valor de F, mostram que a regressão explica 97,30% das variações dos resultados, inferindo que o modelo matemático obtido é preditivo, ou seja, indica que o modelo proposto possui aproximação ao valor real, validando estatisticamente o modelo ($p < 0,05$). Para que o modelo matemático seja considerado preditivo, na regressão, o $F_{\text{calculado}}$ deve ser maior que o F_{tabelado} . Dessa forma, foi possível estimar a precisão do modelo de regressão, conforme apresenta a Figura 27.

Figura 27 - Gráfico dos valores preditos (teóricos) pelos observados, da atividade da enzima desidrogenase utilizando o indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC).



Fonte: Elaborado pelo autor

A Equação 12 apresenta o modelo codificado otimizado para a atividade da enzima desidrogenase utilizando o indicador redox TTC, após 48 h, o qual foi validado pela análise de variância apresentada na Tabela 16 e que permitiu a construção da superfície de resposta conforme apresenta a Figura 28.

$$R = 1,45 + 0,55A + 0,34B + 0,25C + 0,32AB + 0,26AC - 0,054BC - 0,041A^2 - 0,64B^2 - 0,20C^2 \quad (12)$$

Onde:

R = Atividade da enzima desidrogenase utilizando indicador redox TTC (TPF $\mu\text{g mL}^{-1}$);

A = Inóculo ($\text{DO}_{600\text{nm}}$);

B = Temperatura ($^{\circ}\text{C}$);

C = Agitação (rpm).

Tabela 16 - Análise de variância do modelo ajustado para atividade enzimática utilizando metodologia de superfície de resposta.

Fatores	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F _{calculado}	p-valor* Prob> F**
Média	6,31	9	0,70	25,92	0,0011
A	2,41	1	2,41	89,05	0,0002
B	1,18	1	1,18	43,67	0,0012
C	0,67	1	0,67	24,66	0,0042
AB	0,42	1	0,42	15,54	0,0109
AC	0,27	1	0,27	10,16	0,0243
BC	0,000378	1	0,000378	0,14	0,7237
A²	0,025	1	0,025	0,94	0,3763
B²	1,30	1	1,30	48,25	0,0009
C²	0,093	1	0,093	3,42	0,1235
Resíduo	0,14	5	0,027		
Falta de ajuste	0,039	3	0,013	0,27	0,8457
Erro puro	0,096	2	0,048		
Total	6,44	14			

*fatores significativos a $p \leq 0,05$.

**Prob>F = F_{tabelado}

Fonte: Elaborado pelo autor.

Pela Figura 28 observa-se que, na faixa investigada, as três variáveis independentes apresentaram efeito significativo sobre a atividade enzimática da *P. putida* CCMI 852, frente

ao diesel. A variável resposta atingiu resultados mais expressivos na região de ponto ótimo, localizada em torno do ponto central (temperatura 32 ± 2 °C), concentração do inóculo, $DO_{600nm} = 1,0$ e agitação de 180 rpm.

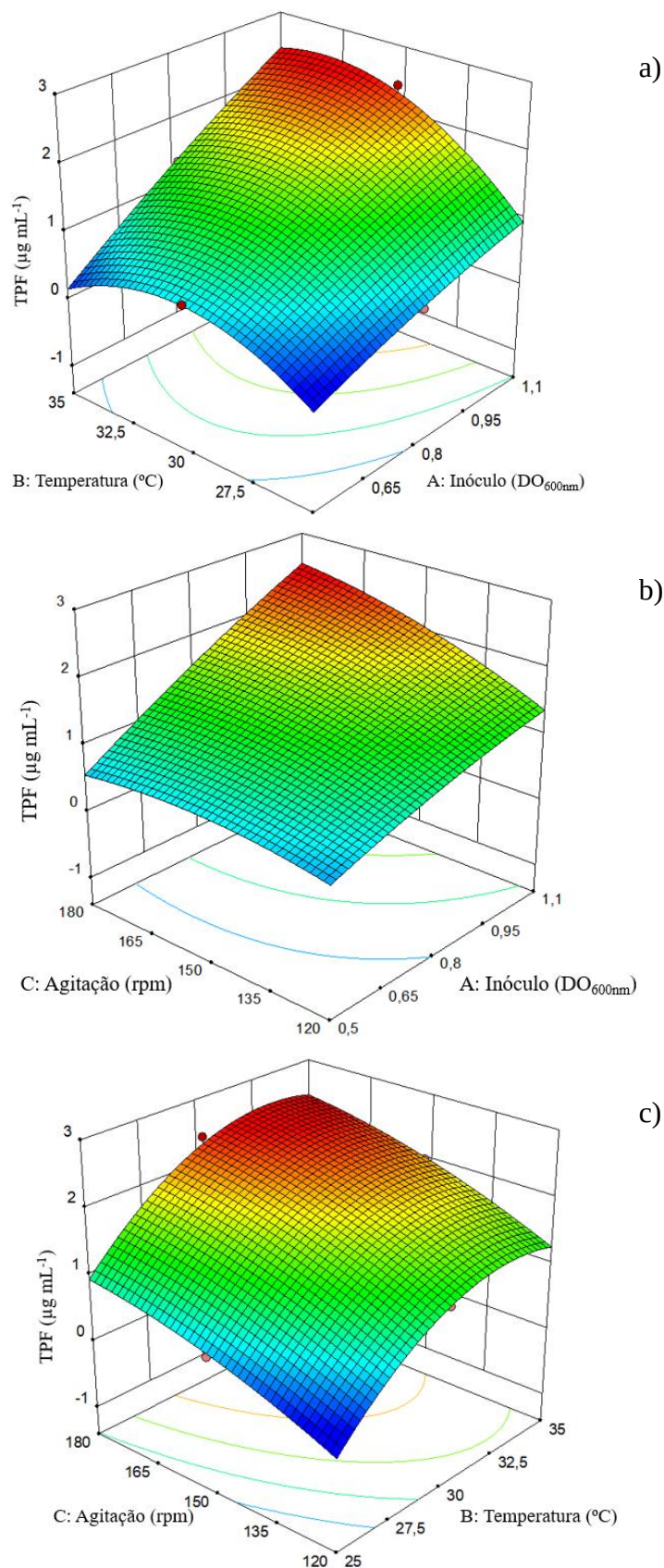
De acordo com Madigan et al. (2016), as condições ótimas de crescimento refletem a condição na qual todos os componentes das células, ou a maioria deles, encontram-se atuando em sua taxa máxima ou geralmente encontram-se mais próximos da taxa máxima do que da taxa mínima.

A agitação pode ser considerada um fator importante para a biodegradação por promover a aeração e o contato óleo-água, já que tanto o oxigênio, como a relativa insolubilidade do óleo na água, são fatores limitantes na biodegradação (TOLOSA et al., 2005). Segundo Chen et al. (2007), a agitação afeta a eficiência de transferência de oxigênio e a transferência de massa, sendo um parâmetro operacional importante para a atividade bacteriana.

Os resultados corroboram com os já descritos na literatura. Este comportamento está coerente com os encontrados na literatura por Otenio et al. (2005) para biodegradação de hidrocarbonetos utilizando *Pseudomonas*.

Após as variáveis otimizadas para a biodegradação, os pontos ótimos foram utilizados para todos os testes de biodegradação apresentados.

Figura 28 - Superfície de resposta sobre o efeito do inóculo (A), temperatura (B) e agitação (C) na atividade da enzima desidrogenase, utilizando o indicador redox TTC.



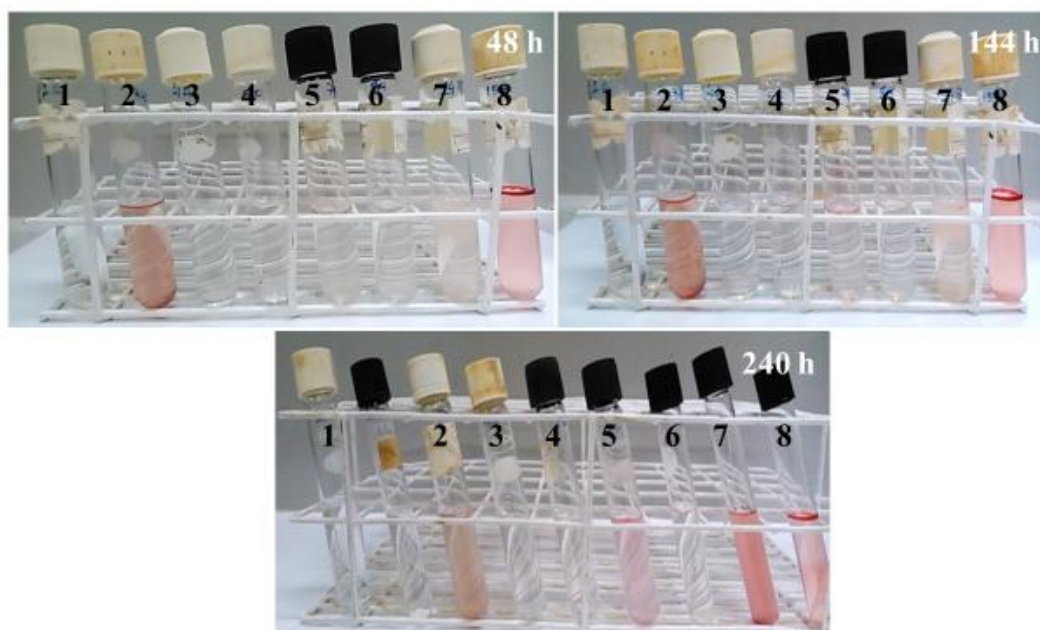
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3.3 Biodegradação utilizando indicador redox TTC

O método colorimétrico utilizando o indicador redox TTC possibilitou estimar inicialmente, de forma simples, o potencial de biodegradação de hidrocarbonetos por meio da atividade da bactéria *P. putida* CCMI 852, pela leitura de absorbância em 484 nm, em função do tempo.

A mudança de coloração do meio de incolor para a cor lilás avermelhado do TPF, dos sistemas contendo gasolina e diesel em relação aos controles e o branco, está registrada na Figura 29, assim como as concentrações obtidas estão apresentadas na Figura 30.

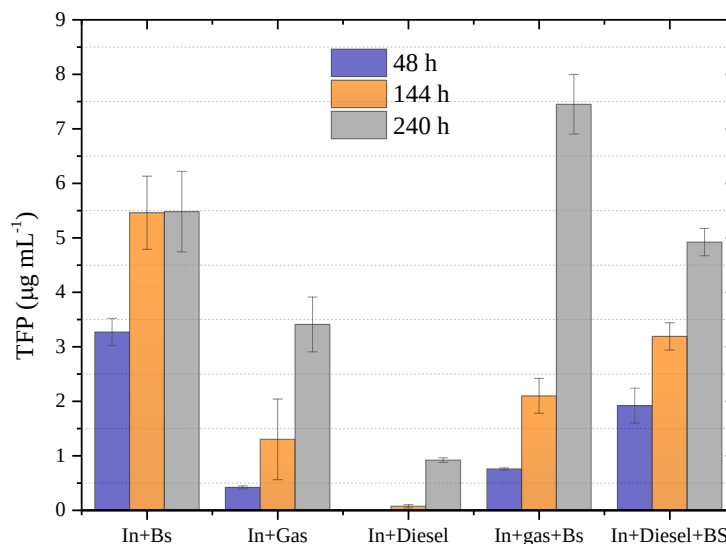
Figura 29 - Medida qualitativa da atividade da enzima desidrogenase pelo indicador redox TTC em diferentes tempos de tratamento, onde: 1. Controle: Inóculo; 2. Controle: Inóculo+Biossurfactante; 3. Controle: gasolina; 4. Controle: óleo diesel; 5. Inóculo+gasolina; 6. Inóculo+diesel; 7. Inóculo+gasolina+Biossurfactante; 8. Inóculo+diesel+Biossurfactante.



Fonte: Elaborado pelo autor.

De acordo com os resultados expressos na Figura 30, foi possível observar os diferentes comportamentos da atividade microbiana nos ensaios realizados. Os ensaios controle foram feitos para investigar uma possível interação entre *P. putida* CCMI 852 e o meio, assim como a atividade metabólica do *P. putida* CCMI 852 sobre o biossurfactante.

Figura 30 - Atividade da enzima desidrogenase pelo indicador redox 2,3,5-cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) em diferentes tempos de biodegradação e diferentes compostos. Onde: In: Inóculo; Bs: Biossurfactante; Gas: Gasolina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dentre as maiores taxas encontram-se os ensaios de controle do biossurfactante, evidenciando a aceitação imediata do metabolismo microbiano. Porém, houve uma estabilização em 144 h na atividade microbiana, o que pode ser devido ao término da fonte de carbono disponível. Somente após o possível término do biossurfactante disponível no meio contendo gasolina, que se observou, em 240 h, um aumento na degradação de 20,80% em relação ao controle com biossurfactante, não apresentando diferença significativa, quando comparado com o meio contendo inóculo e gasolina.

Em contrapartida, o meio contendo óleo diesel e o inóculo apresentou uma atividade enzimática mais lenta em relação à gasolina, evidenciando a capacidade destes micro-organismos em assimilar a gasolina em seu metabolismo mais fácil e/ou mais rapidamente que outros grupos.

Na investigação da biodegradabilidade do óleo diesel e da gasolina pelos vários micro-organismos do meio ambiente, Marchal et al. (2003) observaram considerável degradação intrínseca da gasolina (96%) e menor do óleo diesel (60 a 73%), o que é esperado, uma vez que o óleo diesel é constituído por hidrocarbonetos mais pesados e recalcitrantes do que a gasolina.

Dessa forma, foi demonstrado pelo método colorimétrico utilizando TTC como indicador de atividade biológica, que o metabolismo das bactérias são importantes ferramentas na avaliação do potencial biodegradador de hidrocarbonetos, sendo um método simples, relativamente rápido e de baixo custo, além de possuir uma elevada aptidão para competir com

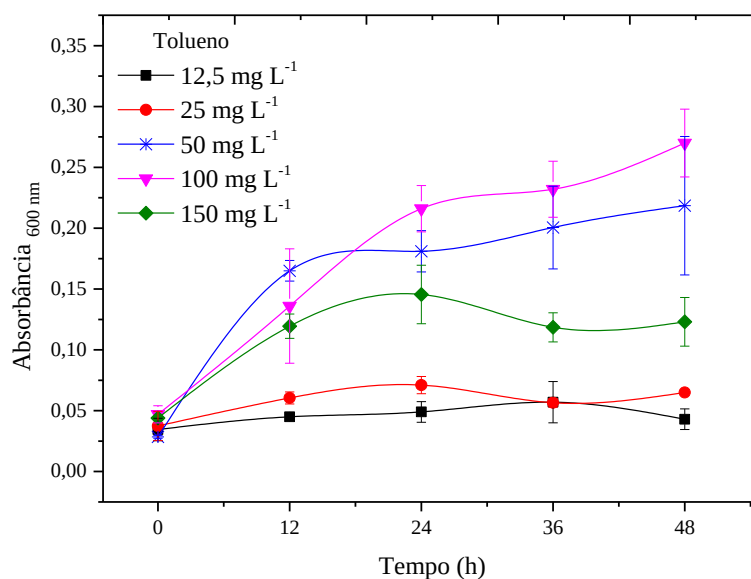
outros transportadores de elétrons da cadeia respiratória. O TTC torna-se acceptor artificial de elétrons, substituindo o oxigênio, que é necessário para a metabolização aeróbica dos compostos (BRADDOCK e CATTERALL, 1999; RICHARD e VOGEL, 1999; NWANKWEGUA e ONWOSI, 2017). Este indicador ainda atua como um relevante sinalizador de enzimas intracelulares, como as desidrogenases, que tem a capacidade de catalisar reações de oxirredução de compostos orgânicos e apresentam elevada afinidade por transportadores de elétrons (OLGA et al., 2008).

Diversos autores vêm utilizando este teste rápido para prever micro-organismos degradadores de hidrocarbonetos, dentre eles, Bento et al. (2005); Wyszowska et al. (2006); Kumar et al. (2013); Alrumman et al. (2015) e Nwankwegua e Onwosi (2017).

5.3.4 Crescimento bacteriano em diferentes concentrações de hidrocarbonetos

Foram testados volumes variáveis de benzeno e tolueno, fornecidos na forma líquida para determinar a concentração ótima de BTE(o-)X para que maior crescimento da linhagem *P. putida* CCMI 852 fosse visualizado,. Os dois hidrocarbonetos foram escolhidos como parâmetros, pois é conhecido que o benzeno não é degradado por bactérias que contêm a via metabólica TOL, ao contrário do tolueno. As intensidades de crescimento, determinadas por densidade ótica a 600 nm, demonstram que um maior crescimento ocorreu na presença de 100 mg L⁻¹ de tolueno, conforme apresenta a Figura 31.

Figura 31 – Efeito de diferentes concentrações de tolueno no crescimento da linhagem *P. putida* CCMI 852.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Como descrito na literatura, a bactéria *P. putida* CCMI 852, portadora do plasmídeo TOL pWW0, não foi capaz de degradar benzeno como única fonte de carbono, fato observado pela ausência de turbidez e a baixa atividade metabólica e/ou ausência de crescimento das células.

Segundo Lee et al. (1994) e Martino et al. (2012), o benzeno pode ser metabolizado via TOD unicamente. Otenio et al. (2005), ao realizar uma pesquisa para biodegradação de BTX utilizando *P. putida* CCMI 852, mesma linhagem bacteriana desse trabalho, comprovou que o benzeno não é metabolizado, devido à falta da via específica para isso.

Os micro-organismos utilizados são ditos como concentração-dependentes, pois o efeito sobre a morte bacteriana foi maior quando ocorreu aumento da concentração do hidrocarboneto até 100 mg L⁻¹. A concentração de 150 mg L⁻¹ de tolueno mostrou-se mais tóxica, sendo observado menor turbidez em relação à concentração de 100 mg L⁻¹. Sabe-se que maior quantidade de substrato leva a um maior crescimento bacteriano, porém, quantidades muito elevadas de hidrocarbonetos, conferem a estes compostos maior toxicidade (PADHI e GOKHALE, 2017). Os solventes são conhecidos por acumularem-se e promoverem o rompimento da membrana celular, afetando a integridade estrutural e funcional da célula (SIKKEMA et al., 1995; DÖRR, 2008).

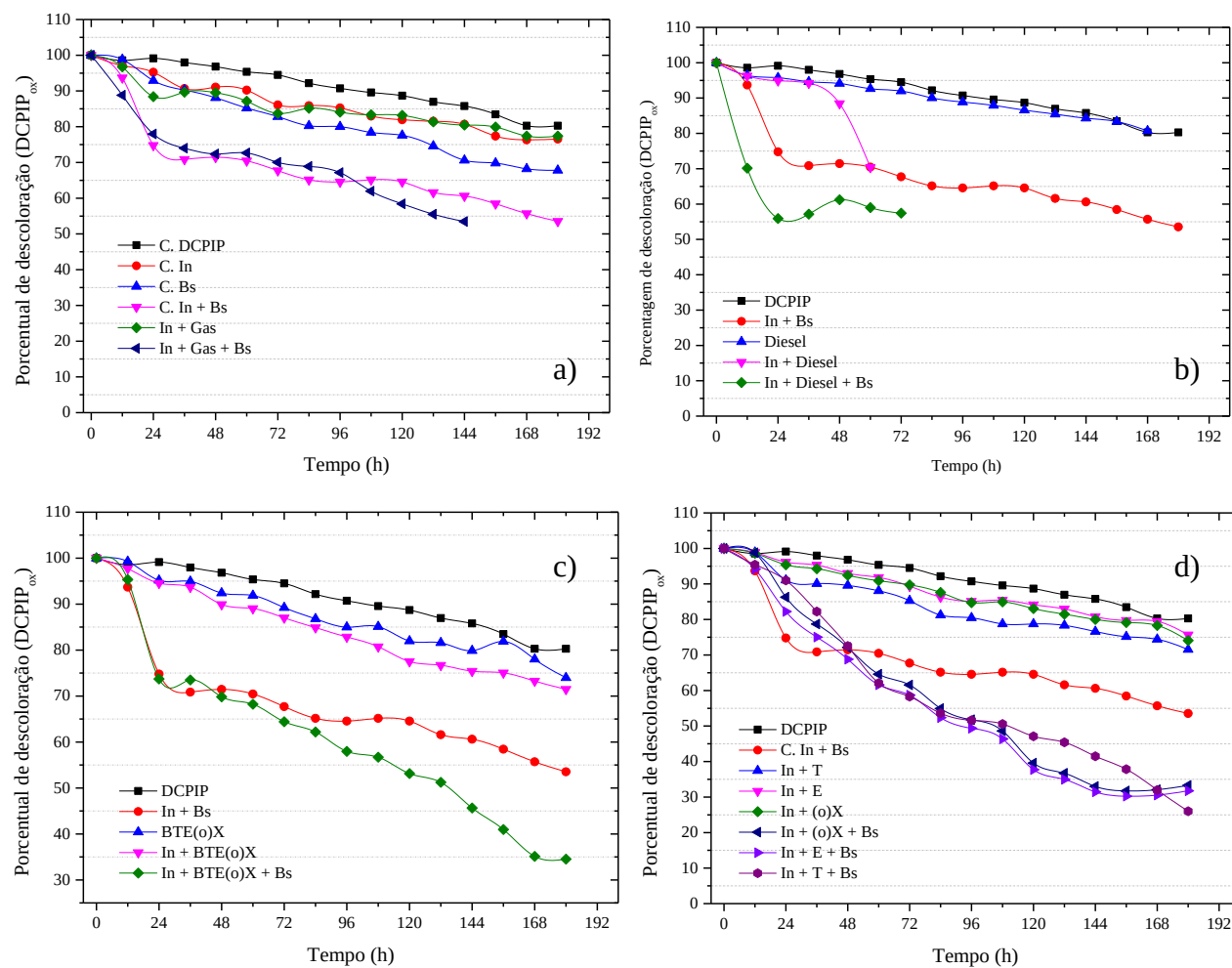
As concentrações de 12,5 e 25 mg L⁻¹ de tolueno foram insuficientes para o crescimento dos micro-organismos. A baixa absorbância verificada nas menores concentrações, pode ter sido consequência de uma quantidade pequena de substrato (PADHI e GOKHALE, 2017). Lapertot et al. (2007) descreveram que quantidades limitantes de substrato provocam danos às células e levam à diminuição de crescimento.

Como os limites de solubilidade em água dos compostos benzeno, tolueno, etilbenzeno e o-xileno são respectivamente, 1750 mg L⁻¹, 520 mg L⁻¹, 150 mg L⁻¹ e 175 mg L⁻¹, e todas as concentrações testadas estão abaixo do limite de solubilidade, optou-se por utilizar os hidrocarbonetos na concentração de 100 mg L⁻¹.

5.3.5 Biodegradação utilizando indicador redox DCPIP

O método colorimétrico utilizando o indicador redox DCPIP possibilitou observar os diferentes comportamentos de atividade microbiana pela leitura de absorbância em 600 nm, em função do tempo. Dessa forma, a eficiência da degradação, em termos de atividade microbiana, pelo estado oxidado do DCPIP (DCPIP_{ox}) está representada na Figura 32.

Figura 32 – Porcentagem de descoloração do indicador DCPIP_{ox} em função do tempo. Onde: a) amostras controle e inóculos com gasolina; b) Inóculos com óleo diesel; c) Inóculos com BTE(o-)X em mistura; d) Inóculos com TE(o-)X individuais. In.: Inóculo de *P. putida* CCMI 852; Bs.: Biossurfactante; Gas.: Gasolina.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os ensaios controle foram feitos para investigar a estabilidade do corante, uma possível interação entre *P. putida* e DCPIP, uma possível interação entre o biossurfactante e o DCPIP e a atividade metabólica da *P. putida* sobre o biossurfactante.

Dentre as menores taxas de eficiência de degradação, conforme a Figura 32, encontram-se os ensaios de controle, exceto o controle contendo inóculo e biossurfactante (In+B_s), que conforme visto anteriormente, é de fácil assimilação pelos micro-organismos. A extensão da degradação não biológica do DCPIP foi insignificante.

Pela colorimetria, no ensaio contendo gasolina com inóculo e biossurfactante, foi observada uma rápida mudança de cor do indicador DCPIP após 48 h. A alta biodegradabilidade da gasolina nos ensaios colorimétricos pode estar associada à baixa toxicidade da substância para *P. putida*. Outra possibilidade também é a não formação de metabólitos secundários e subprodutos potencialmente tóxicos em longo prazo nos ensaios colorimétricos.

Na literatura, são relatados vários estudos envolvendo biodegradação de hidrocarbonetos, variando a concentração de 0,5 a 1,5% (PRATHYUSHA et al., 2016). Porém, Shukor et al. (2009) relataram degradação de óleo diesel por micro-organismos a 3,5% e Kwapisz et al. (2008) a 6% de óleo diesel. Nesse estudo, foi utilizada a concentração de 1,0% (v/v) de óleo diesel, porém a bactéria apresentou mais dificuldades na sua degradação, em relação à gasolina, conforme descrito anteriormente.

A partir dos resultados, foi possível calcular a constante de velocidade aparente (k) de pseudo-primeira ordem. Na Tabela 17 são apresentados os valores de k obtidos para a atividade microbiana utilizando o indicador DCPIP. Logo, foram construídos gráficos de $\ln(C/C_0)$ em função do tempo, sendo obtida uma linha reta onde o declive da regressão linear foi considerado igual a k .

O estudo da cinética de biodegradação de compostos orgânicos, possibilita estimar a persistência dos contaminantes no ambiente e prever a variação de suas concentrações no tempo, conforme apresenta a Tabela 17. As reações de biodegradação dos compostos orgânicos dissolvidos ocorrem em velocidade específica para cada composto. O modelo cinético de pseudo-primeira ordem, assume que o coeficiente de biodegradação do substrato é proporcional à sua concentração. Um aumento na concentração origina aumento na cinética de degradação.

Tabela 17 – Porcentagem de descoloração (D%) em relação aos controles, constantes de velocidade (k) e tempo de meia vida ($T_{1/2}$).

Ensaio	Tempo	D (%) (Controle DCPIP)	D (%) (Controle In+Bs)	Constante de velocidade k (h^{-1})	Tempo de meia vida $T_{1/2}$ (h)	Coefficiente de correlação (R^2)
In + Bs	180 h	26,76	-	-0,0026	266,59	0,9168
Gasolina + In	108 h	26,79	-	-0,0036	192,54	0,9653
Gasolina + In + Bs	48 h	39,79	13,02	-0,0170	40,77	0,9767
Diesel + In	180 h	17,19	-	-0,0028	247,55	0,9534
Diesel + In + Bs	96 h	26,87	0,10	-0,0047	147,47	0,8359
BTE(o-)X + In	180 h	6,31	-	-0,0017	396,08	0,9905
BTE(o-)X + In + Bs	180 h	45,77	18,97	-0,0055	125,57	0,9713
T + In	180 h	8,74	-	-0,0017	402,99	0,9551
T + In + Bs	180 h	54,28	27,51	-0,0067	102,23	0,9698
E + In	180 h	4,61	-	-0,0014	474,75	0,9835
E + In + Bs	180 h	48,54	21,77	-0,0071	96,53	0,9741
X + In	180 h	6,20	-	-0,0015	450,09	0,9808
X + In + Bs	180 h	46,99	20,22	-0,0072	95,60	0,9846

Onde: In.: Inóculo de *P. putida* CCMI 852

Bs.: Biossurfactante produzido a partir de soro de ricota.

BTE(o-)X: (BTE(o-)X) mistura (25 mg L⁻¹ de cada) e individualmente, na concentração de 100 mg L⁻¹.

Fonte: Elaborado pelo autor.

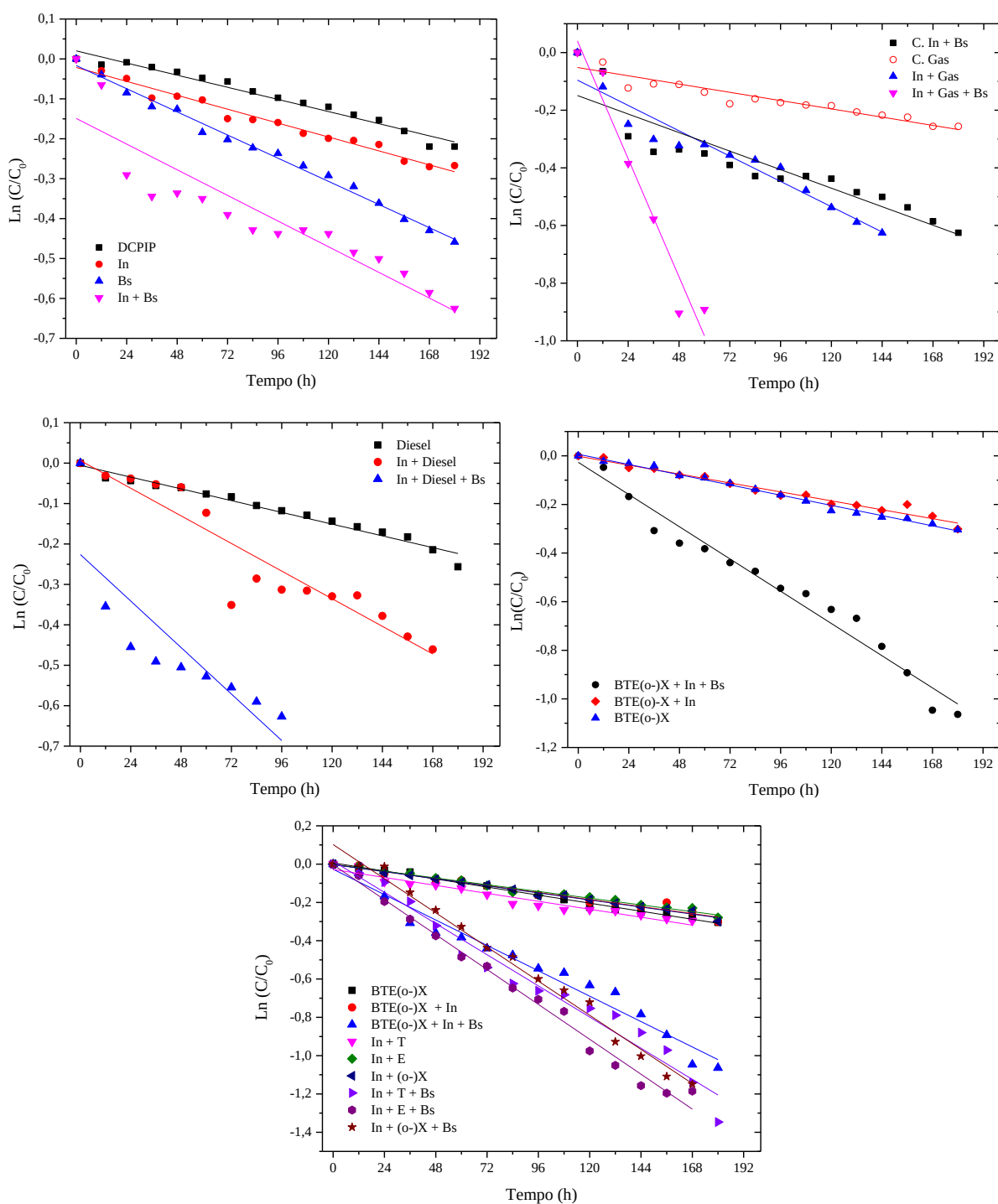
A partir da Tabela 17 é possível observar que os valores do coeficiente de relação R^2 para todos os tratamentos, se aproximam de 1. A Figura 33, apresenta o comportamento obtido pela cinética, na qual se pode verificar que há um comportamento de pseudo-primeira ordem, pois a concentração do corante DCPIP decresce exponencialmente com o tempo, esperando-se assim obter um gráfico linear decrescente.

Para fins de comparação, as constantes de velocidades foram transformadas em tempo de meia vida ($t_{1/2}$), parâmetro que indica o tempo necessário para que a concentração do substrato caia à metade do valor inicial (CHAPRA, 2008).

Na presença dos biossurfactantes, os hidrocarbonetos aromáticos tolueno, etilbenzeno e xileno (individualmente), mostraram um decaimento mais acentuado, quando comparados com as curvas de cinética dos BTE(o-)X em conjunto, que demonstrou ser mais lentamente biodegradados pela bactéria. Somente na presença do inóculo, a constante de velocidade k indicou que o $t_{1/2}$ dos compostos BTE(o-)X testados em conjunto, foram de 396,08 h (16,5 dias)

ao passo que a adição do biossurfactante, aumentou a velocidade de degradação para $t_{1/2}$ de 125,57 h (5,2 dias).

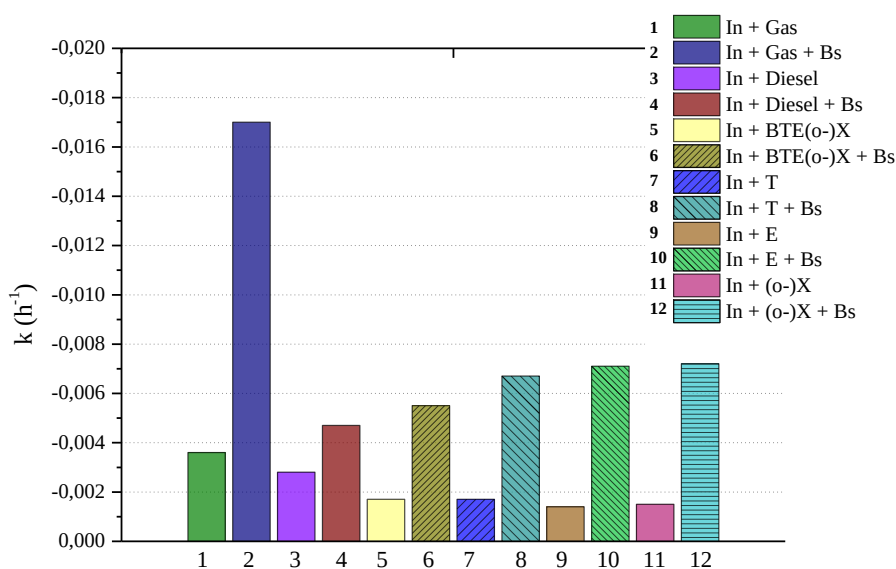
Figura 33 - Curva de decaimento de pseudo-primeira ordem nas condições estabelecidas, ao longo do tempo de degradação. Onde: In.: Inóculo de *P. putida* CCMI 852; Bs.: Biossurfactante produzido a partir de soro de ricota; BTEX: (BTE(o)-X) mistura (25 mg L⁻¹ de cada) e individualmente, na concentração de 100 mg L⁻¹.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 34 por meio da cinética, ajuda a demonstrar o efeito positivo do biossurfactante na biodegradação de todos os compostos, evidenciando que a gasolina, dentre todos, apresentou a maior velocidade de biodegradação, e o $t_{1/2}$, indicando o tempo necessário para que a concentração do substrato caia à metade do valor inicial, apresentou a seguinte ordem de biodegradação: gasolina, (o-)xileno, etilbenzeno, tolueno, BTE(o-)X e óleo diesel.

Figura 34 – Constantes de velocidade obtidas pela cinética de pseudo-primeira ordem para biodegradação de diferentes hidrocarbonetos. Onde: In.: Inóculo de *P. putida* CCM 852; Bs.: Biossurfactante produzido a partir de soro de ricota; Gas.: Gasolina; BTE(o-)X): mistura (25 mg L⁻¹ de cada) e individualmente, na concentração de 100 mg L⁻¹.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em situações onde há substratos e receptores de elétrons em quantidades suficientes e micro-organismos para biodegradação, pode não haver a indução enzimática devido à dificuldade de acesso ao substrato pela biomassa. Dessa maneira, o uso de biossurfactantes nos processos de biodegradação, aumenta a biodisponibilidade dos hidrocarbonetos de petróleo, devido à melhor interação óleo-surfactante-micro-organismo, que facilita e estimula as bactérias a degradarem o composto poluente (WHANG et al., 2008). A capacidade dos biossurfactantes em emulsificar e dispersar hidrocarbonetos em água, aumenta a degradação destes compostos no ambiente, sendo utilizados para aumentar a solubilidade de contaminantes hidrofóbicos (NITSCHKE e PASTORE, 2002).

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. 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 C7 até C11 estão presentes na gasolina, na qual há uma alta concentração de alcenos comparada a outros derivados do petróleo. Ensign (2001) descreveu que compostos como propileno e eteno ativam enzimas específicas (mono-oxigenases) que são carboxiladas e passam para o metabolismo do micro-organismo, permitindo com que a gasolina seja mais facilmente biodegradada.

Segundo Sasaki et al. (1998), pequenas moléculas de hidrocarbonetos são mais facilmente biodegradadas e os compostos aromáticos são degradados em taxa mais lenta que alcanos.

A sequência de biodegradação observada entre o óleo diesel e a gasolina foi semelhante à encontrada na colorimetria utilizando o indicador TTC, podendo ser utilizada como uma confirmação dos resultados obtidos pela outra técnica. Souza et al. (2016) investigaram o potencial de biodegradação da bactéria *Serratia marcescens* em mistura de diesel e biodiesel também utilizando os indicadores TTC e DCPIP.

Para Kubota et al. (2008), no entanto, apesar do bom desempenho, a técnica com DCPIP apresenta uma limitação em relação a taxa de crescimento e o tamanho da célula, que influenciam a densidade ótica medida em 600 nm. Essa limitação também foi observada nesse estudo. Entretanto, o método colorimétrico com o indicador redox DCPIP vem sendo empregado em diversos trabalhos pela análise do tempo de descoloração do meio contendo hidrocarbonetos, evidenciando o potencial de diversos micro-organismos para biodegradação desses compostos, entre eles os gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus* e *Acinetobacter* (MARIANO et al., 2008; KUBOTA et al., 2008; LUZ et al., 2011; MONTAGNOLLI et al., 2015; MONTAGNOLLI et al., 2017a).

6 Capítulo 3

Acompanhamento da biodegradação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

6.1 Introdução

Indubitavelmente, a medida mais direta da eficiência da biodegradação é o o emprego de medidas quantitativas para o monitoramento da taxa de consumo dos poluentes. A caracterização dos componentes individuais de uma classe específica de hidrocarbonetos exige o uso de técnicas de análise como a cromatografia. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (*Gas Chromatography–Mass Spectrometry* - GC/MS) é uma ferramenta muito utilizada na identificação, elucidação estrutural e quantificação de componentes em misturas orgânicas (HARRIS, 2012).

A cromatografia gasosa é um método físico-químico de separação, que se baseia pela distribuição da amostra entre a fase estacionária e a fase móvel gasosa, sendo uma excelente técnica quantitativa, com um bom poder de resolução e baixos limites de detecção, apresentando resultados que variam de picogramas a miligramas. As substâncias a serem analisadas por essa técnica são gases ou substâncias volatilizáveis, termicamente estáveis (HELENO et al., 2010; COLLINS et al., 2011). A detecção dos compostos pode ser realizada utilizando-se diversos tipos de detectores, que se dividem em detectores universais, sensíveis a qualquer substância, detectores seletivos, sensíveis apenas a alguma classe de substâncias e detectores específicos, sensíveis a um ou alguns elementos (HELENO et al., 2010; COLLINS et al., 2011).

Segundo Blackburn et al. (1993), a combinação de técnicas GC/MS na avaliação da biodegradação, é o método mais eficaz para a quantificação de um resíduo oleoso, pois, combina a resolução do ponto de ebulição com informações sobre o tipo de molécula dos compostos.

O GC/MS consta de um cromatógrafo, usualmente com uma coluna capilar, uma interface para ligação dos dois sistemas, uma câmara de ionização onde os íons são formados, uma câmara mantida sob vácuo onde ocorre a separação destes e um sistema de detecção dos íons, acoplado a um sistema de registro com um programa para a interpretação dos dados obtidos (COLLINS et al., 2006).

A fonte de ionização mais comum em espectrometria de massas é a ionização por elétrons (*EI - electrons impact*), a qual emprega um filamento aquecido para gerar elétrons com energia suficiente para provocar ionização nos analitos de interesse. Os íons formados são direcionados para o analisador, cuja função é separá-los de acordo com sua relação massa/carga (m/z). Os analisadores de massas mais utilizados no presente são o quadrupolo e o íon *trap* (LANÇAS, 2004).

Depois de separados, os íons são detectados e um sistema sofisticado processa os dados obtidos, fornecendo informações qualitativas e quantitativas. As informações qualitativas são obtidas por meio de interpretação dos espectros de massas. Esse espectro de massas é característico da substância e pode ser comparado a espectros de massas de padrões analisados simultaneamente, ou provenientes de bibliotecas armazenadas no computador (COLLINS et al., 2006). Quando os compostos presentes na amostra já foram identificados e se deseja proceder à quantificação de um ou mais desses compostos, a análise normalmente é feita no modo de monitoramento de íons selecionados (*SIM – selected ion monitoring*), no qual apenas alguns íons específicos de determinados compostos são monitorados, aumentando a detecção do equipamento (HARRIS, 2012).

O preparo das amostras é uma etapa importante em análises cromatográficas, principalmente na determinação de analitos em níveis traços, em matrizes ambientais complexas (REZAEI et al., 2010). O preparo de amostras, especialmente a extração, são etapas críticas da análise de hidrocarbonetos aromáticos, devido a alta volatilidade desses compostos (BONILLA et al., 2009). Um dos objetivos é promover a transferência dos analitos de interesse da matriz para um meio adequado, de modo que se possa introduzi-los no instrumento analítico sem causar danos ao mesmo. Algumas das características desejáveis para uma técnica de extração ideal é que ela seja de baixo custo, eficiente, simples e rápida.

Assim, para a escolha do modo mais adequado à extração, deve-se levar em conta o tipo de amostra a ser trabalhada e os analitos que ela contém. O *headspace* é uma técnica excelente e sensível, utilizada para analisar compostos em baixas concentrações. Nesta técnica, na qual o analito é, necessariamente, mais volátil que a matriz, este volatiliza preferencialmente, podendo ser determinado sem os interferentes dos outros componentes da amostra, por meio da análise do vapor desprendido do analito (GOBATO e LANÇAS, 2001).

A extração por *headspace* oferece várias vantagens, entre elas, ser uma técnica pouco onerosa, não requerer instrumentação complicada, o uso de solvente orgânico não é necessário e a sensibilidade para BTEX é drasticamente aumentada em relação ao método de injeção direta (GILBERT-LÓPEZ et al., 2010). A amostra é normalmente colocada em um frasco selado e mantido em aquecimento até os compostos alcançarem o equilíbrio com a fase gasosa. A concentração relativa de cada analito nas duas fases, gasosa e líquida, é determinada pelo coeficiente de partição, definido como a razão da concentração de analito na fase líquida por aquele na fase gasosa (BOSSE et al., 2017).

A microextração em fase sólida (*solid-phase microextraction*, SPME) é outra opção, relativamente simples, que tem sido bastante empregada para a extração e determinação de hidrocarbonetos em amostras de água (GONZÁLEZ et al., 2017).

6.2 Material e métodos

6.2.1 Montagem dos ensaios

Para o desenvolvimento dos ensaios foram testados gasolina comercial sem etanol e óleo diesel S10 (1% v/v), BTE(o-)X (benzeno, tolueno e o-xileno 99%, etilbenzeno 99,80%, todos Sigma-Aldrich) em mistura (BTE(o-)X, 25 mg L⁻¹ de cada e TE(o-)X, 33,3 mg L⁻¹ de cada), e individualmente, na concentração de 100 mg L⁻¹. As misturas dos compostos monoaromáticos foram utilizadas para compreender a influência de um contaminante sobre os demais presentes na biodegradação de uma mistura.

Assim, todos os ensaios foram conduzidos em frascos de vidro estéreis (do tipo penicilina) de 100 mL, e a composição foi conforme descrito na Tabela 18. O inóculo pradonizado de *P. putida* CCMI 852 foi de DO_{600nm}=1,0 (conforme capítulo 2) e o biossurfactante utilizado foi o produzido conforme capítulo 1, solução 300 mg L⁻¹. Também foram realizados ensaios controle preparados da mesma forma dos demais ensaios, porém sem a adição do inóculo microbiano e biossurfactante, permitindo diferenciar perdas por volatilização, da degradação bacteriana. A esterilização dos combustíveis, compostos BTE(o-)X e biossurfactante, foram realizadas por filtros descartáveis de seringa (Millex FG estéril, membrana PTFE 0,22 µm, 25 mm).

Para os BTE(o-)X, por se tratar de compostos voláteis, alguns cuidados foram tomados no desenvolvimento do trabalho, como por exemplo, a estabilização do potencial de volatilização da mistura no volume de ar presente no recipiente. Para a promoção da estabilização, a concentração final levou em consideração os cálculos pela Lei de Henry. Estes cálculos mostram a necessidade de se acrescentar nas soluções preparadas, quantidades adicionais de cada um dos componentes da mistura (0,09 µL de benzeno, 0,007 µL de tolueno, 0,000715 µL de etilbenzeno e 0,005 µL de xileno).

Tabela 18 - Composição dos ensaios de biodegradação utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS).

Ensaio	Composição	Meio BH (mL)	Inóculo (µL)	Gasolina (µL)	Óleo diesel (µL)	Bs (µL)**
Controle Gas	BH + Gasolina	50	-	75	-	-
Controle Diesel	BH + Diesel	50	-	-	75	-
Controle BTE(o-)X *	BH + BTE(o-)X	50	-	-	-	-
Controle TEX**	BH + TE(o-)X	50	-	-	-	-
Controle T***	BH + Tolueno	50	-	-	-	-
Controle E***	BH + Etilbenzeno	50	-	-	-	-
Controle (o-)X***	BH + o-Xileno	50	-	-	-	-
In.+ Gas	BH + In + Gasolina	50	500	75	-	-
In.+ Gas + Bs	BH + In + Gasolina + Biossurfactante	50	500	75	-	200
In.+ Diesel	BH + In + Diesel	50	500	-	75	-
In.+ Diesel + Bs	BH + In + diesel + Bs	50	500	-	75	200
In. + BTE(o-)X	BH + In + BTE(o-)X	50	500	-	-	-
In.+ BTE(o-)X + Bs	BH + In + BTE(o-)X + Bs	50	500	-	-	200
In. + TEX	BH + In + TE(o-)X	50	500	-	-	-
In.+ TEX + Bs	BH + In + TE(o-)X + Bs	50	500	-	-	200
In. + T	BH + In + Tolueno	50	500	-	-	-
In.+ T + Bs	BH + In + Tolueno + Bs	50	500	-	-	200
In. + E	BH + In + Etilbenzeno	50	500	-	-	-
In.+ E + Bs	BH + In + Etilbenzeno + Bs	50	500	-	-	200
In. + X	BH + In + (o-)Xileno***	50	500	-	-	-
In.+ X + Bs	BH + In + (o-)Xileno + Bs***	50	500	-	-	200

*Mistura com BTE(o-)X: 25 mg L⁻¹ de cada composto;

**Mistura com TEX: 33,3 mg L⁻¹ de cada composto;

***Compostos individuais: 100 mg L⁻¹;

BH: Meio mineral salino Bushnell-Haas;

In.: Inóculo de *P. putida* CCMI 852

Bs.: Biossurfactante produzido a partir de soro de ricota.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Após montagem dos testes, os frascos foram fechados hermeticamente com tampa de silicone, faceado com fita teflon e lacre de alumínio, conforme a Figura 35, com o objetivo de evitar ao máximo a perda dos compostos por volatilização. Os frascos foram mantidos a

temperatura de 32 °C, sem agitação para minimizar perdas dos compostos por volatilização. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Figura 35 - Frascos de 100 mL utilizados nos experimentos de biodegradação de hidrocarbonetos por *P. putida* CCM 852.



Fonte: Elaborado pelo autor.

6.2.2 Determinação por *headspace* estático

As análises foram realizadas no tempo inicial, 24 h, 48 h, 144 e 240 h de tratamento, com excessão do óleo diesel que foi realizado leitura com 29 dias de tratamento. Os ensaios e controles foram transferidos para um banho Maria (Nova Ética, modelo 316/3) a 60 °C e mantidos por 15 min. Os compostos BTEX, bastante voláteis, possuem pressões de vapor elevadas, e assim, rapidamente atinge-se um equilíbrio dinâmico entre as fases líquida e gasosa (BALSEIRO-ROMERO et al., 2016).

Em seguida, por meio de uma seringa *gastight* (Hamilton), 100 µL da fase vapor (*headspace*) foi recolhido à meia altura entre a tampa do frasco e a superfície do líquido e injetado no GC/MS, mantida por 10 min, para pré-concentração dos compostos presentes no *headspace*. As amostras de gás não passaram por qualquer tipo de preparação e foram injetadas por meio da seringa *gastight* da mesma maneira que foram retiradas do frasco, evitando assim a abertura dos frascos ao longo do processo de biodegradação.

6.2.3 Análises cromatográficas

As concentrações dos compostos antes e após a degradação, foram determinadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa com o equipamento GC/MS Shimadzu QP2010 ULTRA.

Para a determinação dos BTE(o-)X, inicialmente foi necessário a otimização das condições experimentais cromatográficas para a separação, identificação e quantificação dos

analitos. Nessa parte foram feitos experimentos afim de aumentar a eficiência de separação dos compostos na coluna cromatográfica e, principalmente, melhorar a resolução dos picos.

Dessa forma, foi utilizada uma coluna Rtx[®]-5MS (5% fenil, 95% dimetilpolissiloxano) da Restek (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) e um *liner* com diâmetro interno de 0,75 mm, especial para injeção da amostra por *headspace*. As condições cromatográficas de análise dos compostos BTE(o-)X, da gasolina e do óleo diesel são descritos conforme Tabela 19.

Para a detecção por espectrometria de massas utilizou-se um detector contendo uma fonte de ionização por elétrons (EI-70 eV) e um analisador de massas quadrupolo, operado no modo varredura (SCAN) para identificação e no modo “*Total Ion Current*” (TIC) para quantificação dos compostos. O detector foi mantido a 250 °C e a fonte de íons a 200 °C. O programa LabSolutions GCMSsolution, da Shimadzu e a biblioteca de espectrometria de massa disponível no software NIST11 Mass Spectral Library EPA/NIH fornecida com o GC/MS, foram utilizados para análise das respostas do equipamento.

Tabela 19 – Condições utilizadas na cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa, para biodegradação de hidrocarbonetos.

Parâmetros	Condições GC/MS para Gasolina e BTE(o-)X	Condições GC/MS para Óleo diesel
Modo de injeção	Split – razão 1:10	Split – razão 1:16
Temperatura do injetor	200 °C	250 °C
Volume injetado	100 µL	100 µL
Fase móvel	Hélio	Hélio
Vazão da fase móvel	1 mL min ⁻¹	3 mL min ⁻¹
Programa de temperatura	34 °C (5 min)	34 °C (7 min)
	10 °C/min – 80 °C (1 min)	8 °C/min – 200 °C (1 min)
	25 °C/min – 220 °C	10 °C/min – 250 °C (5 min)
	7 °C/min – 280 °C (4 min)	
Tempo de corrida	25 min	38 min
Temperatura do detector	250 °C	250 °C

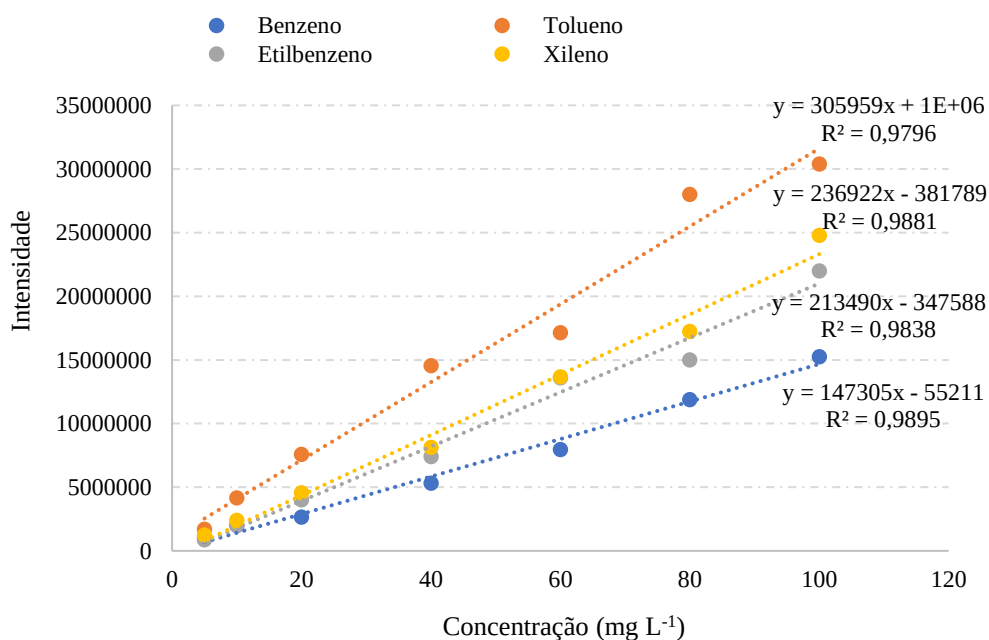
Fonte: Elaborada pelo autor.

6.2.4 Construção de curvas analíticas para a quantificação dos BTE(o-)X

Para a quantificação dos BTE(o-)X nas amostras sob estudo, após todas as etapas experimentais de otimização estarem cumpridas, tais como condições cromatográficas e de extração, foram preparadas curvas analíticas para cada composto, conforme apresenta a Figura 36.

Cada padrão foi preparado em uma solução aquosa, conforme cada concentração requerida, em água Milli-Q (Millipore), sob as mesmas condições experimentais utilizadas em todos os ensaios desse projeto. A faixa de trabalho utilizada para a construção das curvas analíticas foi: 0; 5; 10; 20; 40; 60; 80; e 100 mg L⁻¹. Para cada ponto obteve-se a leitura da área correspondente à concentração da amostra. Com os valores obtidos, elaborou-se um gráfico da área versus a concentração do composto, obtendo-se a curva de calibração para cada um dos compostos estudados. De posse da curva de calibração, a concentração do composto de cada alíquota pode ser facilmente determinada.

Figura 36 - Curva de calibração em GC/MS para os compostos BTE(o-)X.

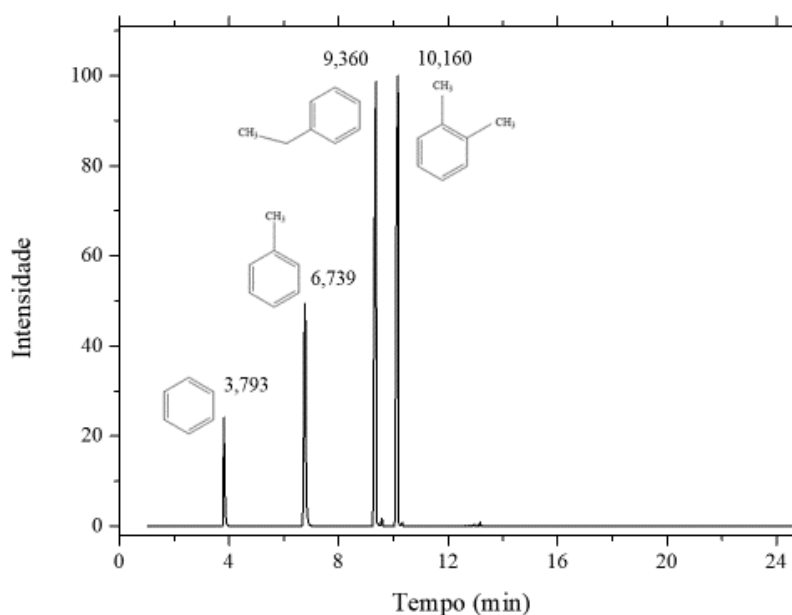


Fonte: Elaborado pelo autor.

6.3 Resultados e Discussão

O cromatograma de BTE(o-)X obtido com o método descrito, apresentou resolução suficiente para quantificar o consumo de BTE(o-)X pela *P. putida* CCMI 852 (Figura 37).

Figura 37 - Cromatograma de BTE(o-)X, obtido por GC/MS. Os sinais de resposta indicam diferentes substâncias com base nos diferentes tempos de retenção, sendo respectivamente, benzeno, tolueno, etilbenzeno e o-xileno.

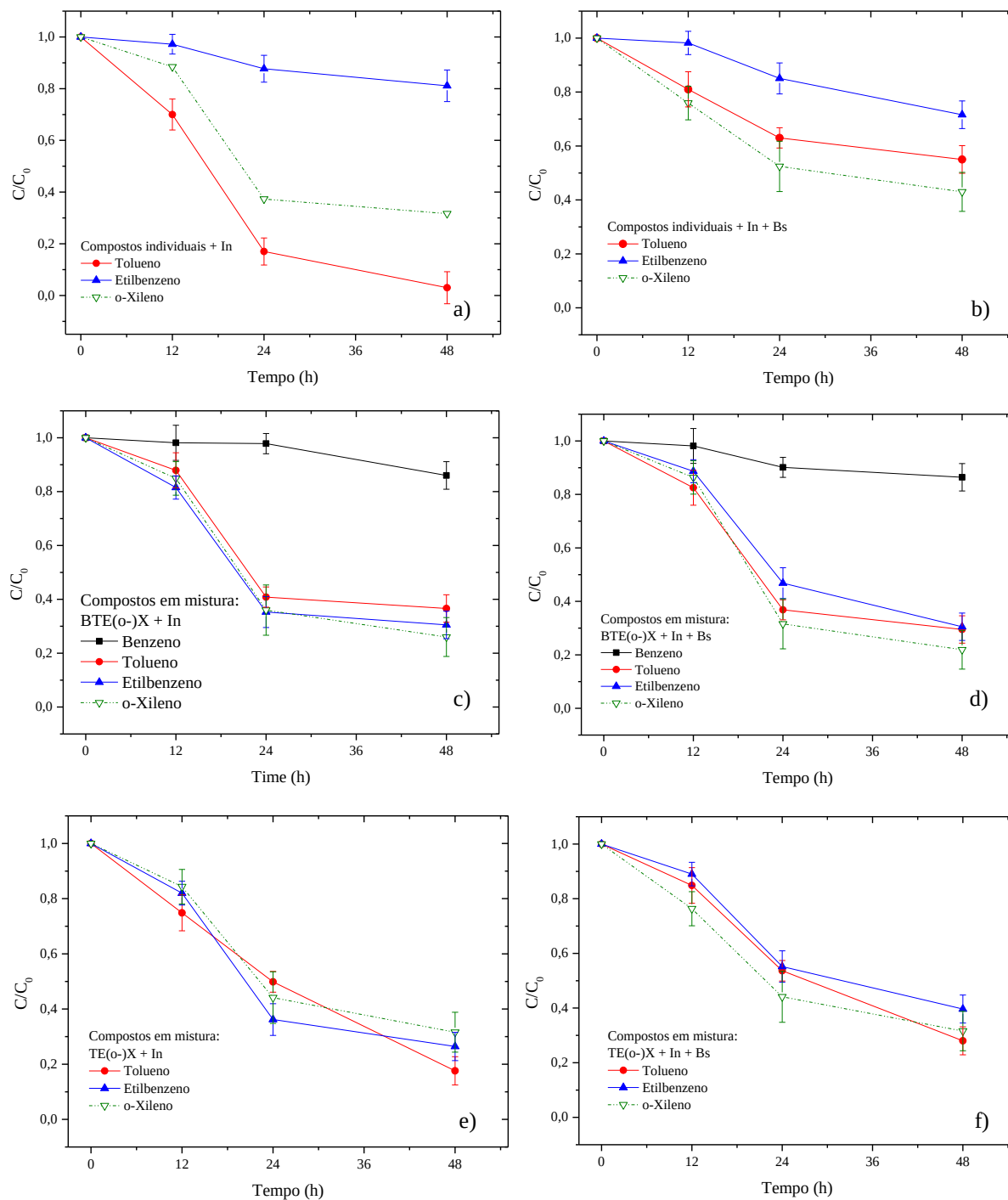


Fonte: Elaborado pelo autor.

Muitas pesquisas trabalham com a biodegradação de compostos BTEX de forma individual, com diferentes linhagens de bactérias isoladas (SHINODA et al., 2004; LIOU et al., 2008; MANCINI et al., 2008; RADNIECKI et al., 2008). No entanto, é importante verificar a degradação simultânea desses compostos para avaliar o potencial dos micro-organismos, uma vez que os compostos BTEX são encontrados misturados em locais contaminados (ZHANG et al., 2013).

Assim, a Figura 38 apresenta a curva de degradação dos hidrocarbonetos aromáticos, em misturas e individuais, enquanto que a Tabela 20 apresenta a eficiência (taxa) da degradação e as constantes de velocidade.

Figura 38 - Curvas de degradação do benzeno, tolueno, etilbenzeno e o-xileno, em misturas e individuais. Onde: In.: Inóculo de *P. putida* CCMI 852; Bs.: Biossurfactante produzido com soro de ricota.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 20 – Eficiência de biodegradação por *P. putida* CCMI 852 dos compostos BTE(o-)X em diferentes condições, em 48 h de tratamento.

Composto	Mistura BTE(o-)X (25 mg L ⁻¹ cada)			Mistura TE(o-)X (33,3 mg L ⁻¹ cada)			Compostos individuais (100 mg L ⁻¹)		
	ED (%) ^a	R ^{2b}	k (h ⁻¹) ^c	ED (%)	R ²	k (h ⁻¹)	ED (%)	R ²	k (h ⁻¹)
In + B	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-
In + B + Bs^d	0,0	-	-	-	-	-	-	-	-
In + T	63,4	0,946	-0,017	85,7	0,992	-0,026	96,9	0,987	-0,034
In + T + Bs^d	70,5	0,949	-0,019	78,2	0,957	-0,013	44,4	0,998	-0,015
In + E	69,4	0,970	-0,018	73,0	0,940	-0,014	18,8	0,975	-0,004
In + E + Bs^d	61,4	0,968	-0,012	65,0	0,983	-0,015	25,9	0,979	-0,006
In + o-X	73,5	0,956	-0,016	80,0	0,924	-0,020	68,3	0,939	-0,026
In + o-X + Bs^d	78,0	0,944	-0,028	72,8	0,944	-0,014	58,0	0,995	-0,023

^aEficiência de degradação;

^bCoeficiente de correlação;

^cConstante de velocidade k;

^dBiossurfactante produzido conforme descrito no Capítulo 1.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme visualizado no Capítulo 2, pelo teste colorimétrico utilizando o indicador DCPIP, o benzeno não foi metabolizado pela *P. putida* CCMI 852 como fonte de carbono, sendo confirmado pela análise em GC/MS. Os compostos TE(o-)X individualmente, em concentração de 100 mg L⁻¹, foram degradados pela *P. putida* CCMI, sendo que o tolueno e (o-)xileno apresentaram um padrão semelhante, ainda que o tolueno tenha sido degradado mais rapidamente, seguido do (o-)xileno e etilbenzeno. Embora a degradação individual do etilbenzeno não tenha sido expressiva, a bactéria apresentou potencial de degradação, porém com menor velocidade em relação ao tolueno e ao (o-)xileno, mas não apresentou inibição.

Quando os micro-organismos foram expostos a mistura dos quatro compostos BTE(o-)X, a presença do benzeno teve consistentemente um efeito negativo na degradação do tolueno que apresentou taxa de degradação 33,5% menor do que quando degradado individualmente. Contudo, a degradação do (o-)xileno praticamente não se alterou, enquanto que a do etilbenzeno foi favorecida em presença dos outros compostos, aumentando em 50,3% a taxa de degradação. Otenio et al. (2005), ao estudar a biodegradação da *P. putida* CCMI 852 em mistura ternária (BTX), verificou que a taxa de degradação caiu 50% em relação a mistura binária de TX.

Nas misturas ternárias, os compostos TE(o-)X apresentaram maior taxa de degradação, em relação a mistura BTE(o-)X, apresentando aumento de 14,2% para tolueno, seguido de 4,8% e 2,5% para (o-)xileno e etilbenzeno, respectivamente.

A presença de diversos substratos para degradação, possuem um papel de grande importância permitindo com que ocorra a expressão enzimática, facilitando acesso microbiano ao substrato (atuando como substrato primário e estimulando o crescimento). Esse processo pode aumentar o cometabolismo de outro composto (DOMÍNGUEZ-CUEVAS e MARQUÉS, 2017). Qualquer composto sofrerá biodegradação somente se houver uma enzima ou um sistema enzimático capaz de catalisá-lo (DIEZ, 2010).

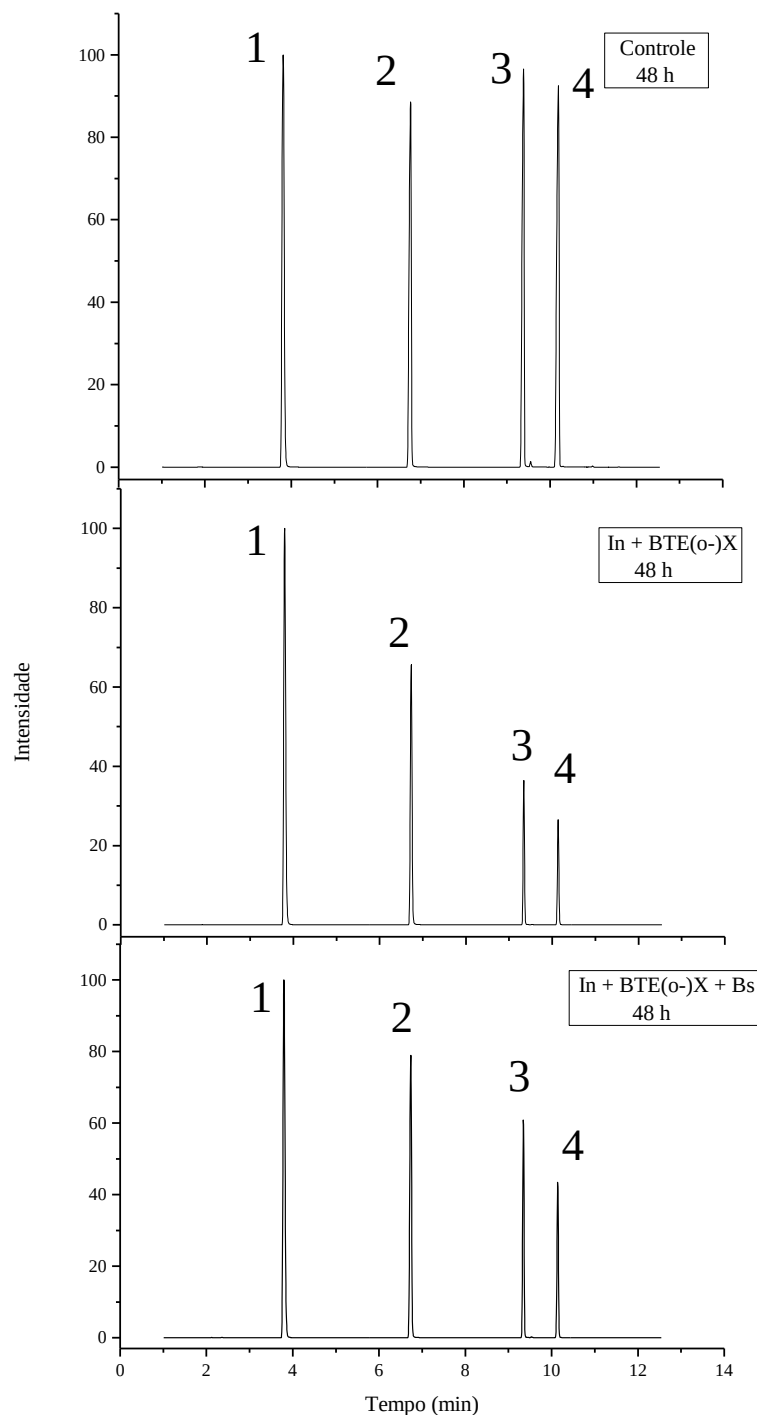
O uso simultâneo de diferentes substratos pode ser considerado uma estratégia de sobrevivência em que os micro-organismos metabolizam dezenas de compostos orgânicos ao mesmo tempo equipando a célula com uma vantagem cinética e flexibilidade metabólica, além de permitir um rápido crescimento em mínimas concentrações de cada alimento. Essa estratégia de sobrevivência, para Semple et al. (2007), pode indicar uma maneira dos micro-organismos lidarem com a baixa disponibilidade de substratos.

A Figura 39, apresenta o cromatograma da biodegradação dos compostos BTE(o-)X em 48 h de tratamento, com a presença de inóculo e com inóculo e biossurfactante.

Para verificar os possíveis efeitos do biossurfactante produzido com soro de ricota aos hidrocarbonetos, conforme o capítulo 1, foi realizado uma análise estatística pelo ANOVA e, comparando a degradação somente com inóculo e com a presença de biossurfactante, foi constatado que a degradação não foi estatisticamente significativa. Conforme discutido nos capítulos anteriores, a presença do biossurfactante se tornou uma fonte de carbono mais facilmente disponível ao micro-organismo, fazendo com que retardasse o processo de degradação dos compostos BTE(o-)X, como pode ser visto claramente no tratamento com os compostos individuais.

De acordo com Schaefer et al. (2010) e El-Naas et al. (2014), além das interações do substrato, a degradação também pode ser inibida pela presença de compostos estruturalmente diferentes. Quando um substrato contém etanol, a sua presença inibe a produção das enzimas que são necessárias para iniciar a degradação do BTEX. O etanol pode ser degradado usando enzimas constitutivas e a exposição a longo prazo reduz a necessidade das bactérias em produzir as enzimas necessárias para a degradação de BTEX. O mesmo efeito possivelmente ocorreu nesse estudo, na presença do biossurfactante.

Figura 39 – Cromatograma de mistura de compostos BTE(o-)X, extraídas por *headspace* para análise em GC/MS, em 48 h de biodegradação utilizando *P. putida* CCMI 852. Onde: In.: Inóculo de *P. putida* CCMI 852; Bs.: Biossurfactante produzido com soro de ricota. 1. Benzeno; 2. Tolueno; 3. Etilbenzeno; 4. (o-)Xileno.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para que o processo de degradação dos BTEX se inicie, é necessário que haja uma indução de enzimas degradadoras apropriadas, as dioxigenases e monooxigenases, envolvendo

então, a ativação de regiões específicas do genoma bacteriano, que codificam a síntese dessas enzimas (ZHANG et al., 2013; EL-NAAS et al., 2014).

As duas principais vias metabólicas aeróbias de degradação que levam a mineralização dos compostos BTEX são fornecidas por dois sistemas enzimáticos: via TOD, pelas enzimas dioxigenases e via TOL pelas enzimas monooxigenases. A via TOD ataca o anel aromático e a via TOL aos substituintes metil dos compostos, adicionando átomo de oxigênio (EL-NAAS et al., 2014).

O plasmídeo TOL pWW0 é naturalmente encontrado e auto-transmitido nessa linhagem *P. putida* CCM1 852 estudada, conferindo à célula somente a capacidade de codificar a via de degradação para tolueno, etilbenzeno e xileno, via TOL (OTENIO et al., 2005; D'ALVISE et al., 2010; DOMÍNGUEZ-CUEVAS e MARQUÉS, 2017).

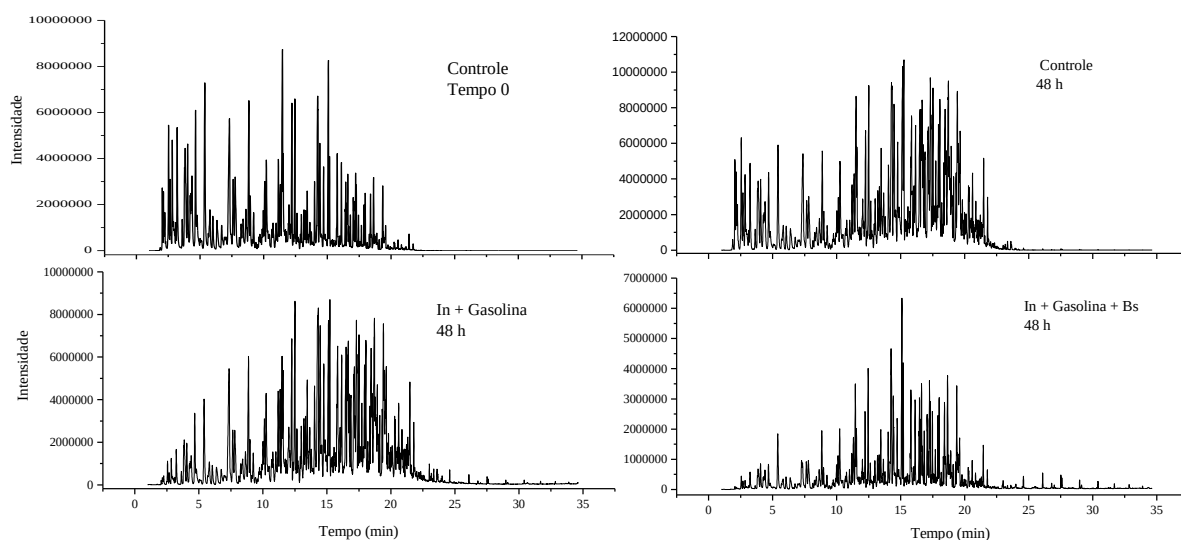
Para o benzeno ser degradado, é necessário a via TOD de degradação. Segundo Martino et al. (2012), o benzeno pode ser metabolizado via TOD unicamente, enquanto que o tolueno, etilbenzeno e xilenos podem estar sujeitos à oxidação por ambas as vias. Esses fatos comprovam a via de degradação em presença do plasmídeo TOL por essa linhagem de *Pseudomonas*. Esta via, envolve a oxidação do grupo metila para formar o ácido benzoico. Este é subsequentemente, transformado em cis-benzoato dihidrodiol que é desidrogenado formando o catecol e em seguida, clivado na via de meta-clivagem.

Zhang et al. (2013), ao estudarem a biodegradação dos compostos BTE(o-)X em misturas e individualmente por meio da bactéria *Mycobacterium cosmeticum* byf-4, observaram que a mesma foi capaz de metabolizar todos os compostos e comprovaram a presença do plasmídeo TOD, que permite a síntese de todas as enzimas necessárias para a degradação desses compostos.

Ao analisar os dados da biodegradação do óleo diesel, verificou-se degradação em 10 dias, porém muito mais lenta para esse derivado de petróleo (fator anteriormente observado no capítulo 2) em relação à gasolina. Dessa forma, a gasolina foi acompanhada por 48 h, enquanto o óleo diesel foi acompanhado ao longo de 29 dias. As Figuras 40 e 41 apresentam o comportamento da degradação da gasolina e do óleo diesel, respectivamente.

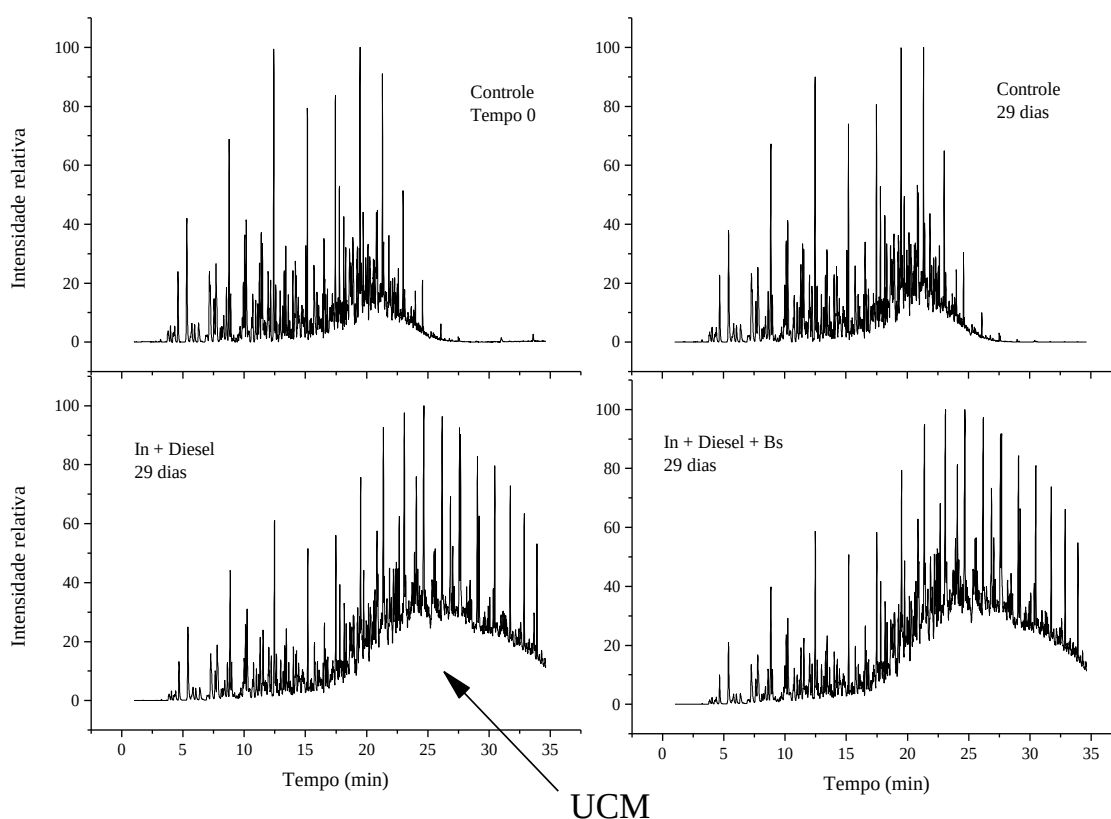
A *P. putida* CCM1 852 é caracterizada por conseguir degradar efetivamente compostos aromáticos pelo plasmídeo TOL, porém, na presença de muitos outros compostos, a degradação ocorre com velocidade menor. Pode-se inferir que devido a presença de muitos compostos tanto na gasolina, quanto no óleo diesel, a metabolização dos compostos aromáticos se tornou mais lenta, podendo ser tanto pela ativação mais lenta das enzimas pelo plasmídeo TOL, tanto pela toxicidade dos compostos não degradados.

Figura 40 - Cromatograma da gasolina, extraída por *headspace* para análise em GC/MS após 48 h de biodegradação. Onde: In.: Inóculo; Bs.: Biossurfactante produzido com soro de ricota.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 41 - Cromatograma do óleo diesel, extraído por *headspace* para análise em GC/MS após 29 dias de biodegradação. Onde: In.: Inóculo; Bs.: Biossurfactante produzido com soro de ricota.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O comportamento da degradação do óleo diesel foi lentamente alterado ao longo de 29 dias, apresentando diferença em relação ao ensaio controle. Foi possível identificar uma elevação na linha-base dos cromatogramas, caracterizando a biodegradação sofrida. A gasolina se mostrou com o mesmo comportamento, porém com uma inclinação pouco acentuada, apresentando degradação dos compostos aromáticos TE(o-)X em 10 dias.

De acordo com Farrington e Quinn (2015), a perda de alcanos lineares acoplada a um aumento na complexidade da fração hidrocarbonetos alifáticos, leva ao aparecimento contínuo da chamada mistura complexa não resolvida ou UCM (*Unresolved Complex Mixture*), que corresponde a uma fração mais pesada do óleo constituída por hidrocarbonetos ramificados e cíclicos, que nem sempre são resolvidos em coluna capilar.

Frysjnger et al. (2003) e Booth et al. (2007), descrevem a UCM como uma mistura de compostos orgânicos que não pode ser caracterizada por cromatografia gasosa, sendo considerada a fração mais biodegradada ou intemperizada dos hidrocarbonetos presentes no meio ambiente.

Esse comportamento característico de compostos derivados de petróleo, são tidos como possíveis “impressões digitais” por Jeon et al. (2017). Os autores afirmam que a UCM se refere às frações dos hidrocarbonetos não separadas pelo cromatógrafo, consistindo em cerca de 250.000 compostos, incluindo alcanos, alcanos ramificados, cicloalcanos, monoaromáticos, entre outros, sendo encontrados relatos na literatura observando que mesmo após longo prazo, a UCM aparece em análises de cromatografia.

Estudos anteriores sugeriram que a presença da UCM evidencia contaminação por petróleo em solos (ASIA et al., 2009; ROUIDI et al., 2013). Além disso, Jeon et al. (2017) relataram que os diferentes tempos de retenção podem variar de acordo com o tipo de composto, como gasolina, querosene, óleo diesel, óleo combustível pesado e óleo lubrificante. Assim, a presença da UCM é um importante parâmetro na identificação da origem da contaminação de um local (CARREIRA et al., 2009).

Embora a UCM de hidrocarbonetos de petróleo seja comumente encontrada durante a análise cromatográfica, pouca atenção tem sido dada à sua toxicologia. Estudos recentes mostraram que componentes de UCM em sedimentos podem ser acumulados em organismos bentônicos, causando efeitos sub-letais para os organismos. Além de seu próprio potencial de bioacumulação e toxicidade, a UCM também pode alterar a biodisponibilidade e toxicidade de outros contaminantes em sedimentos (PETERSEN et al., 2017).

A partir desses resultados, verifica-se que os ensaios descritos no capítulo 2 utilizando o indicador redox DCPIP indicaram o potencial da biodegradação de diferentes hidrocarbonetos

aromáticos pela *P. putida* CCMII 852, que foi confirmado pelas análises em GC/MS. Esses resultados indicam que a colorimetria com DCPIP pode avaliar a atividade dos micro-organismos frente a degradação dos hidrocarbonetos de forma simples e sensível, porém apresenta a limitação com o crescimento dos micro-organismos influenciando na densidade ótica. Kubota et al. (2008) também estudaram o potencial de diversas estirpes bacterianas (qualitativamente) em degradar hidrocarbonetos por meio da colorimetria com o indicador DCPIP e compararam com os resultados observados em cromatografia gasosa. Assim como nesse estudo, os autores observaram um alto potencial no indicador DCPIP em avaliar a atividade bacteriana.

7 Capítulo 4

Toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade de gasolina e óleo diesel, antes e após biodegradação por *Pseudomonas putida* CCMI 852

7.1 Introdução

7.1.1 Ensaio de toxicidade utilizando sementes de alface (*Lactuca sativa*)

A eficácia da biodegradação é frequentemente avaliada em termos da diminuição da concentração de contaminantes, mas nem sempre é possível alcançar a mineralização total de compostos ou ainda a mineralização pode ocorrer em tempos muito longos, fazendo com que compostos intermediários tóxicos gerados durante o processo de degradação fiquem disponíveis por longos períodos, podendo acarretar uma maior toxicidade, mesmo que esses metabólitos estejam em concentrações mais baixas (TAMADA et al., 2012; OBEROI e PHILIP, 2017).

Os organismos vivos utilizados nos testes de toxicidade funcionam como “biosensores”, que respondem à presença de contaminantes, representando uma ferramenta que se fundamenta no princípio dessas respostas, frente à dose do tóxico a que foram submetidos (ESPÍNOLA et al., 2003). A aplicação dos testes de toxicidade na análise ambiental é bastante abrangente e sua importância aumenta na proporção que cresce a complexidade das transformações químicas no meio ambiente (MAGALHÃES e FERRÃO FILHO, 2008).

Tendo em vista que durante o período de germinação, nos primeiros dias de desenvolvimento da plântula ocorrem numerosos processos fisiológicos, a presença de uma substância tóxica nesse período, pode interferir na sobrevivência e no crescimento da planta,

sendo uma etapa de grande sensibilidade frente a fatores externos adversos (SOBRERO e RONCO, 2008).

Diferentemente da prova tradicional de germinação de sementes, a avaliação do efeito no crescimento da raiz e radícula das plântulas permite ponderar sobre o efeito tóxico de compostos solúveis presentes em níveis de concentração tão baixos que não são suficientes para inibir a germinação, mas que, no entanto, podem retardar ou inibir completamente os processos de crescimento da raiz ou da radícula, dependendo do modo e sítio de ação do composto (SOBRERO e RONCO, 2008).

Testes ecotoxicológicos têm sido utilizados com sucesso como uma ferramenta complementar para monitorar a eficiência na biorremediação (WANG et al., 1987), podendo elucidar os efeitos da biodegradação e avaliar o risco associado à contaminação. De tal modo, o monitoramento detalhado e uma avaliação final, acerca da eficiência do processo, são cruciais para adequação da biorremediação, com o intuito de estabelecer os padrões de segurança ambiental (MONTAGNOLLI e BIDOIA, 2012; LOPES, 2014; MONTAGNOLLI et al., 2017a).

7.1.2 Bioensaios com sementes de cebola (*Allium cepa*)

Os hidrocarbonetos do petróleo além de serem compostos envolvidos em contaminação ambiental, são agentes tóxicos, que podem apresentar riscos à saúde humana, pois alguns metabólitos desses são reconhecidamente mutagênicos e cancerígenos (BANKS e SCHULTZ, 2005). Os produtos biodegradados podem ser mais tóxicos e mutagênicos que o hidrocarboneto original e, portanto, existe a preocupação de que ocorra um aumento, ao longo do tempo, na toxicidade e mutagenicidade decorrente do processo de biodegradação (PIRÔLLO, 2006).

O uso de atividades biológicas como bioindicadores da remoção de poluentes orgânicos pode ser um complemento às ferramentas tradicionais existentes por possibilitar, pelas respostas biológicas apresentadas, melhores avaliações da eficiência dos processos tecnológicos aplicados na melhoria das condições ambientais (MAILA e CLOETE, 2005). Testes citogenéticos são bastante adequados para a identificação de efeitos perigosos de substâncias, em diferentes concentrações e em diversos tempos de exposição (MORAES, 2000).

A espécie *Allium cepa* tem sido, frequentemente, utilizada na avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de várias substâncias (YI e MENG, 2003; LEME e MARIN-MORALES, 2009; HAQ et al., 2017), devido às características que possui na sua cinética de proliferação, pelo crescimento rápido de suas raízes, pelo grande número de células

em divisão, pela sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, disponibilidade durante o ano todo, pelo seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido ($2n = 16$) e de grande tamanho, além de serem facilmente corados e observados (MATSUMOTO e MARIN-MORALES, 2004; CARITÁ e MARIN-MORALES, 2008; LEME e MARIN-MORALES, 2009; MAZZEO et al., 2011).

As células meristemáticas de *A. cepa* podem quantificar uma série de parâmetros morfológicos e citogenéticos, incluindo a morfologia e o crescimento da raiz, a determinação do índice mitótico (IM), bem como a indução de micronúcleos (MN) e de anormalidades nas diversas fases do ciclo celular, como as aberrações cromossômicas (AC) do tipo C-metáfases, aderências cromossômicas, presença de pontes, fragmentações cromossômicas, dentre outras. Estas alterações podem evidenciar ou até servirem como indicadores de eventuais mutações no conteúdo genético dos organismos expostos a agentes genotóxicos (EVSEEVA et al., 2003; EGITO et al., 2007; MAZZEO et al., 2011, HAQ et al., 2017).

As AC têm sido reconhecidas como importantes indicadores da exposição de organismos a agentes genotóxicos (HAQ et al., 2017), sendo decorrentes de alterações na estrutura normal dos cromossomos, originadas a partir de quebras cromossômicas, trocas de material cromossômico ou distúrbios na divisão celular, ou ainda de alterações no número total de cromossomos (VENTURA-CAMARGO et al., 2016). O teste de AC é uma das metodologias mais antigas utilizadas no monitoramento ambiental, como biomarcadora de efeitos genotóxicos induzidos por químicos ambientais (HAGMAR et al., 2004).

Agentes químicos e físicos podem induzir AC por meio de diferentes mecanismos, envolvendo tanto ações clastogênicas, como aneugênicas. A ação clastogênica é caracterizada pela indução de quebras cromossômicas durante a divisão celular (FENECH, 2000), ocasionando alterações cromossômicas estruturais (ALBERTINI et al., 2000). A ação aneugênica é decorrente da inativação de estruturas citoplasmáticas da célula (como, por exemplo, o fuso mitótico) (FENECH, 2000), que leva a uma segregação anormal dos cromossomos, tendo como consequência desta anormalidade a formação de células aneuplóides e ou poliplóides (ALBERTINI et al., 2000).

Os testes de AC têm apresentado posição de destaque entre a bateria de testes recomendados por lei, para a avaliação de agentes genotóxicos. As vantagens destes testes incluem a possibilidade de identificação dos diferentes tipos de AC, de detecção de alterações no índice mitótico e de avaliação do modo de ação dos químicos testados (MATEUCA et al., 2006). Além disso, é considerado um teste simples, fácil, rápido, confiável e de baixo custo (MAZZEO et al., 2011; HAQ et al., 2017).

Estes testes são usualmente utilizados para monitoramento dos potenciais efeitos sinérgicos de misturas de poluentes, incluindo metais pesados e químicos hidrofílicos e lipofílicos (CARITÁ e MARIN-MORALES, 2008).

Muitos estudos têm considerado o teste *A. cepa*, em degradações de hidrocarbonetos como uma técnica muito eficaz para determinar a toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade desses compostos (EGITO et al., 2007; CARITÁ e MARIN-MORALES, 2008; LEME e MARIN-MORALES, 2008; MAZZEO et al., 2011; HAQ et al., 2017; HARA e MARIN-MORALES, 2017). O teste faz uso do índice mitótico como indicador do nível de proliferação celular (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

Em vista da problemática da contaminação ambiental por compostos derivados do petróleo, o objetivo desse capítulo foi verificar a toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade de compostos formados após a biodegradação da gasolina e do óleo diesel por *P. putida* CCM 852.

7.2 Material e métodos

7.2.1 Ensaios de toxicidade após biodegradação por *P. putida* CCMI 852

Para as avaliações de toxicidade foram utilizadas sementes de alface (*L. sativa*), seguindo metodologias padronizadas e 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.

As sementes utilizadas no teste foram da marca ISLA PAK, sem defensivos agrícolas, variedade Alface brava, lote 36000-S2, obtidas comercialmente em loja de produtos agropecuários de Rio Claro, SP, com identificação do fabricante de 89% de potencial de germinação.

Os bioensaios de toxicidade foram realizados antes e após 10 dias de biodegradação das amostras contendo gasolina e óleo diesel (conforme descrito no Capítulo 2 e 3). Foi testada também a toxicidade das substâncias biodegradadas com biossurfactante e sem biossurfactante.

Um disco de papel de filtro (Qualy, 90 mm de diâmetro) foi colocado em placa de Petri (100 mm de diâmetro), previamente marcada com a amostra correspondente. O papel foi posteriormente saturado com 4 mL da respectiva amostra tratada (uma placa para cada amostra) evitando a formação de bolsas de ar. Com a ajuda de uma pinça, 20 sementes de *L. sativa* foram cuidadosamente acondicionadas sobre o papel, com espaço suficiente entre elas para permitir o crescimento das raízes, como demonstrado na Figura 42.

Figura 42 - Disposição das sementes de alface (*L. sativa*) utilizadas como organismos-teste nos bioensaios de toxicidade.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Como controle positivo (CP) foram adicionados 4 mL de solução de sulfato de zinco ZnSO_4 (Synth PA) 0,05 M, para testar a sensibilidade das sementes utilizadas e ao controle negativo (CN) foi adicionada 4 mL de água destilada. As placas foram tampadas e envoltas com filme PVC, a fim de não perder umidade, e na sequência incubadas em câmara climática (incubadora BOD Solab SL224) durante 5 dias (120 h) em temperatura de 22 ± 2 °C, em ausência total de luz. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Na análise do desenvolvimento da plântula, o método consistiu inicialmente no congelamento das plântulas, após 120 h de incubação. 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 (MORALES, 2004).

Os resultados foram determinados de acordo com a germinação das sementes, relativa ao CN (%G), pelo desenvolvimento relativo da raiz em relação ao CN (%R - alongamento da raiz, $\geq 0,1$ mm) e pelo índice de germinação (IG - *Germination Index*), dados pelas Equações 13 a 15 (LABOURIAU e AGUDO, 1987):

$$\%G = \left(\frac{SGa}{SGc} \right) \times 100 \quad (13)$$

$$\%R = \left(\frac{MRa}{MRc} \right) \times 100 \quad (14)$$

$$IG = \frac{(\%G) \times (\%R)}{100} \quad (15)$$

Onde:

SGa = número total de sementes germinadas na amostra analisada;

SGc = número total de sementes germinadas no CN;

MRa = média do alongamento da raiz nas sementes germinadas na amostra analisada;

MRc = média do alongamento da raiz nas sementes germinadas no CN.

7.2.2 Bioensaios com células meristemáticas de *Allium cepa*

O bioensaio de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade foi realizado com amostras de gasolina e óleo diesel, antes e após 10 dias de biodegradação (conforme os capítulos anteriores), utilizando sementes de *A. cepa* da variedade cebola Baia Periforme, da marca TopSeed Garden - Blue Line, germinação: 90%, lote 32443-S2.

Um disco de papel de filtro foi colocado em placa de Petri e marcada com a amostra correspondente. O papel foi posteriormente umedecido com 5 mL da respectiva amostra,

evitando a formação de bolsas de ar. Com a ajuda de uma pinça, 100 sementes de *A. cepa* foram cuidadosamente acondicionadas sobre o papel.

Os controles foram realizados com água Mili-Q, para o controle negativo, e solução aquosa de metilmetano sulfonato (MMS, Sigma-Aldrich – 10 mg L⁻¹), para o controle positivo. As placas foram tampadas e envoltas com filme PVC, a fim de não perder umidade e, na sequência, incubadas em câmara climática (incubadora BOD) durante 5 dias (120 h) em temperatura de 24 ± 1 °C, em ausência total de luz. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Após a germinação, as raízes foram coletadas entre 12:00 e 13:00 h, pois neste período a divisão mitótica, para essa espécie, apresenta os seus melhores índices, e foram fixadas em Carnoy 3:1 (etanol absoluto: ácido acético glacial, v/v) por 5 h em temperatura ambiente, sendo, após este período, transferidas para um novo Carnoy, onde foram conservadas, sob refrigeração, até o momento da confecção das lâminas. A metodologia foi realizada de acordo com o protocolo estabelecido por Grant (1982), com modificações de Hara e Marin-Morales (2017).

Para a confecção das lâminas, as raízes fixadas passaram por três banhos em água destilada. Posteriormente, foram submetidas à hidrólise ácida em HCl 1 N a 60 °C por 10 minutos e, novamente, lavadas em água destilada (3 banhos). Após essa etapa, as raízes foram transferidas para frascos escuros contendo reativo de Schiff por, aproximadamente, 2 horas. Realizada a reação, as raízes passaram por banhos em água destilada, até a total retirada do excesso de corante.

Para o preparo das lâminas, a região meristemática da raiz foi coberta com lamínula e suavemente esmagada em uma gota de carmim acético (2%). As lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas, permanentemente, com Entelan (resina sintética) para posterior análise microscópica.

Um outro ensaio foi realizado nas mesmas condições com o meio de cultura e a bactéria, porém sem adição da gasolina ou do óleo diesel, para servir como controle da biodegradação (branco). Este teste foi desenvolvido para uma certificação de que os possíveis efeitos observados nos ensaios fossem decorrentes das concentrações testadas e não da solução nutritiva utilizada.

Dessa forma, foram confeccionadas 12 lâminas, das quais foram analisadas 500 células por lâmina, totalizando uma contagem de 6.000 células por tratamento.

Os efeitos citotóxicos foram avaliados pelas alterações observadas nos índices mitóticos de todas as amostras, em relação aos testes controles. O índice mitótico foi obtido pela relação entre as células em divisão celular e o total de células observadas.

Para efeitos genotóxicos e mutagênicos, as anormalidades celulares observadas nas células meristemáticas foram divididas em dois grupos, conforme Caritá e Marin Morales (2008): a) anormalidades cromossômicas (alterações genotóxicas), envolvendo alterações em diferentes fases do ciclo celular (prófase, metáfase, anáfase, telófase), como por ex. perdas, aderências cromossômicas, pontes, atrasos, broto nuclear, células multipolares e b) anormalidades (alterações mutagênicas), como quebras cromossômicas e células com presença de micronúcleos.

Todos os resultados obtidos foram comparados com o controle negativo, por meio do teste estatístico paramétrico (ANOVA) para IM e não paramétrico (KruskalWallis) para AC e MN, com nível de significância de 0,05.

7.3 Resultados e discussão

7.3.1 Bioensaios de toxicidade com sementes de alface (*L. sativa*)

Após 120 h de incubação no escuro, foi observado que não houve germinação no ensaio CP para ambos os tempos. Este bioensaio avalia dois parâmetros simultaneamente, a taxa de germinação das sementes (%G) em relação ao controle e o índice de germinação (IG), que relaciona o número total de sementes germinadas, em relação ao controle e o crescimento mediano da raiz. Para o índice de germinação a interpretação se relaciona em quanto maior a porcentagem, mais próximo se está do controle negativo, ou seja, menor será sua toxicidade.

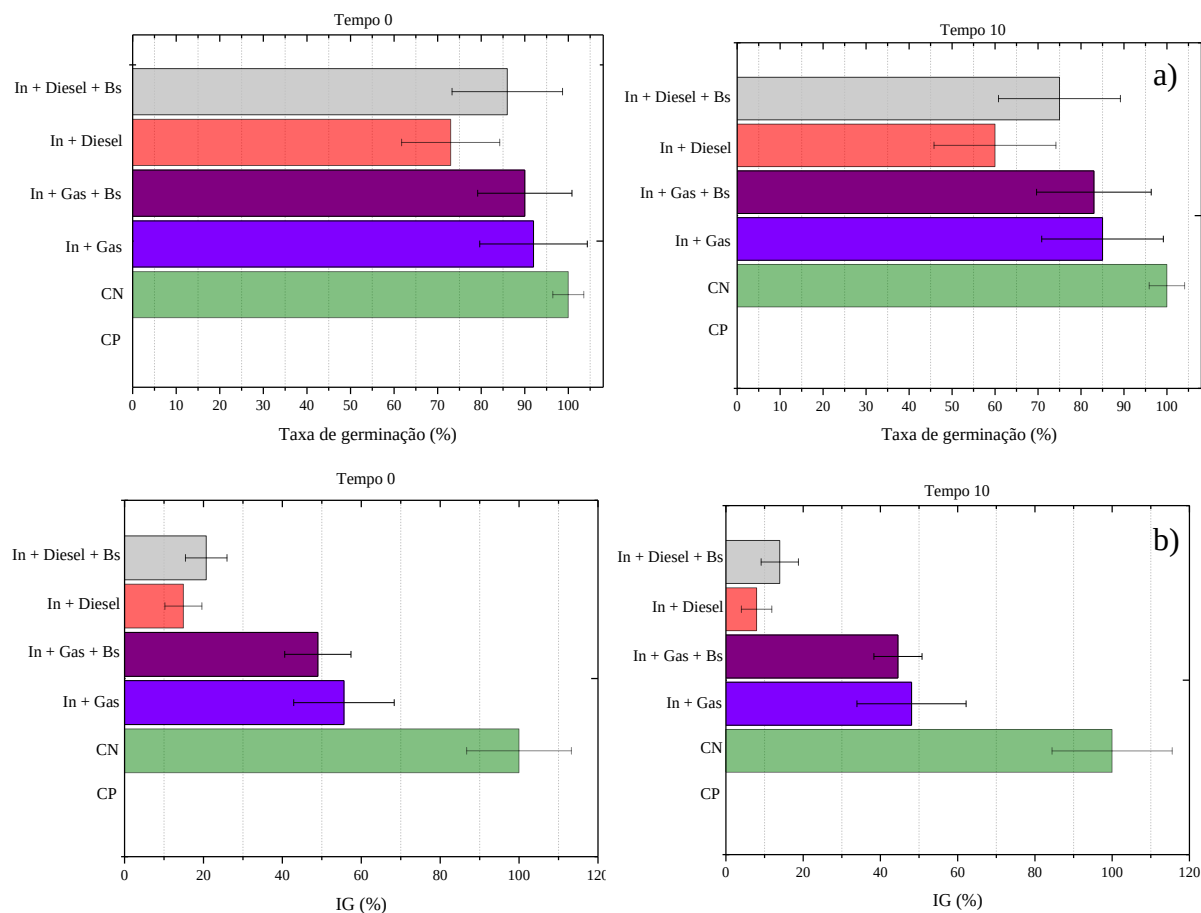
Os dois parâmetros devem ser considerados separadamente, porém serão ilustrados em conjunto para melhor comparação. Os resultados dos bioensaios de fitotoxicidade estão expressos nas Figuras 43.

Verifica-se na Figura 43a que a gasolina apresentou valores de taxas de germinação próximos de 100%. Entretanto, o índice de germinação para a gasolina e o óleo diesel foram baixos. Sugere-se então, que a gasolina apresentou toxicidade média em relação a estes ensaios, quando comparado ao controle negativo do ensaio, enquanto que o diesel foi considerado tóxico para semente de alface.

A Figuras 43b expressa os resultados gerados dos bioensaios de fitotoxicidade utilizando sementes de *L. sativa*, em ensaios de biodegradação de gasolina e óleo diesel. Conforme verificado no capítulo 3, a biodegradação desses derivados de petróleo foi mais lenta em relação aos compostos BTE(o-)X, que foram degradados com valores próximos a 100%. Optou-se então, seguir com os testes de toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade para os ensaios contendo gasolina e óleo diesel, em presença e ausência de biossurfactante.

Assim, pelo índice de germinação (IG) pode-se observar que no tempo inicial ocorreu toxicidade mediana para a gasolina e uma toxicidade expressiva para o óleo diesel. Após 10 dias de degradação, a toxicidade aumentou para ambos os compostos.

Figura 43 – (a) Taxa de germinação das sementes de alface, em relação ao controle negativo, e (b) índice de germinação, antes e após a biodegradação da gasolina e óleo diesel, por *P. putida* CCM 852. Onde: In. Inóculo; Bs.: Biossurfactante; Gas.: Gasolina; CN: Controle negativo; CP: Controle positivo; Tempo 0: Tempo inicial de tratamento; Tempo 10: 10 dias de tratamento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a análise dos resultados, também foram realizadas análises estatísticas, pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, que indicaram diferença significativa em relação ao controle negativo no tempo de 10 dias, para gasolina e para o óleo diesel, evidenciando a toxicidade dos contaminantes durante a biodegradação.

A eficiência da biorremediação de ambientes contaminados com hidrocarbonetos está diretamente ligada não somente à degradação destes compostos, como também à diminuição da toxicidade inicial na área impactada (DORN e SALANITRO, 2000).

A toxicidade do biossurfactante produzido (solução 300 mg L⁻¹), conforme o capítulo 1 e utilizado para os testes de biodegradação, não apresentou toxicidade, se desenvolvendo consideravelmente em relação ao controle. Santa Anna et al. (2007) testaram a toxicidade do ramnolipídio produzido por *P. aeruginosa* PA1 e compararam com a de um surfactante

quimicamente sintetizado, o Corexit®. Este surfactante químico, com uma característica aniônica idêntica a dos ramnolipídios produzidos, apresentou toxicidade 10 vezes superior à do biossurfactante. Também, Lima et al. (2011) confirmaram que os diferentes surfactantes de origem bacteriana possuem uma toxicidade significativamente inferior do que o surfactante aniônico SDS.

Em ensaios realizados por Millioli et al. (2009), os autores avaliaram a fitotoxicidade do ramnolipídio sobre a germinação de sementes de alface (*L. sativa*) e observaram que a atividade fitotóxica do biossurfactante é concentração dependente, ou seja, quanto maior a concentração testada maior o índice de inibição de germinação. Os autores destacam que as concentrações de 1 e 1,5% de ramnolipídio contribuíram para que houvesse uma inibição de 70 e 80%, respectivamente, no índice de germinação, quando comparados à germinação do controle (sem o biossurfactante).

Assim, os resultados permitiram visualizar que o processo de biodegradação com óleo diesel gerou nos ensaios produtos de biodegradação mais tóxicos do que a substância original.

7.3.2 Ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade com *A. cepa*

A partir desses valores, foram realizados ensaios com sementes de *A. cepa*, para avaliar o possível efeito genotóxico das amostras. Para isso, foram utilizados parâmetros celulares relacionados ao desempenho da atividade cromossômica durante o processo de divisão celular mitótica, como a frequência de aberrações cromossômicas (perdas e pontes cromossômicas, c-metáfases, anáfases multipolares e poliploidias) em células das regiões meristemáticas da raiz.

Tabela 21 - Frequência de alterações celulares e cromossômicas observadas em células meristemáticas de *Allium cepa*, antes e após a biodegradação utilizando *Pseudomonas putida* CCMI 852. Onde: IM: Índice mitótico; AC: Aberrações cromossômicas; MN: Micronúcleos

Amostra	IM	AC	MN
Negativo	12,53 ± 0,99	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Positivo	11,57 ± 0,31	0,26* ± 0,89	2,60* ± 0,32
Gasolina t0	9,28 ± 0,49	0,413 ± 0,21	0,40 ± 0,22
Gasolina t10	8,38 ± 0,48	0,06 ± 0,02	0,41* ± 0,11
Óleo diesel t0	9,29 ± 0,48	0,205* ± 0,04	0,42* ± 0,07
Óleo diesel t10	11,21 ± 0,55	0,208* ± 0,04	0,25* ± 0,06

T0: Tempo 0 (inicial) de tratamento; T10: tempo após 10 dias de tratamento

*Estatisticamente diferente do controle negativo ($p < 0,05$), pelo teste estatístico de KruskalWallis.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A Tabela 21 apresenta, respectivamente, os resultados obtidos para os ensaios contendo gasolina e óleo diesel, antes e após a biodegradação. Em relação ao índice mitótico, não houve diferença estatisticamente significativa entre os resultados obtidos nos ensaios, porém, foi observado um grande aumento de células em prófase e uma diminuição de células em telófase, após 10 dias de tratamento, para ambos os compostos.

A análise dos efeitos genotóxicos nas amostras contendo óleo diesel, realizada pela quantificação de alterações cromossômicas e nucleares em células meristemáticas de *A. cepa*, apontou resultados significativos, sendo encontrados em maior frequência broto nuclear e pontes cromossômicas, assim como efeito mutagênico após 10 dias.

Para as amostras contendo gasolina, embora no ensaio com sementes de *L. sativa* tenha apresentado toxicidade, os resultados para *A. cepa* indicaram uma resposta negativa para a gasolina, quanto aos efeitos genotóxicos, pois as frequências de aberrações cromossômicas, nas células da região meristemática da raiz não foram estatisticamente significativas, quando comparadas aos resultados do controle.

Considera-se como importante, que o fato das sementes não germinarem, significa que o agente foi capaz de inibir ou impedir o processo de divisão celular. A interferência na multiplicação de células que dariam origem ao tecido meristemático e, conseqüentemente, ao desenvolvimento da raiz primária, sugere que esse agente é tóxico para o organismo utilizado no teste. Esta classificação foi assumida conforme descrito por Leme e Marin-Morales (2008), por não se poder atribuir, com segurança, as derivações das anormalidades genotóxicas, uma vez que as células podem sofrer injúrias que as leve a morte em decorrência da alteração, ou podem, ainda, corrigir o “erro” promovido, não derivando assim em uma célula com mutação. A presença destas alterações, contudo, podem indicar que a substância tem ação sobre o material genético de células em divisão e, portando, são de ação genotóxicas.

A incidência de micronúcleos aponta para um efeito significativo para mutagenicidade, em relação aos compostos, após 10 dias de degradação. As células portadoras de MN na região meristemática são células que sofreram alterações cromossômicas durante o processo de divisão e que podem manter a alteração, nas gerações celulares subsequentes, na forma de uma pequena estrutura circular semelhante, em composição, ao núcleo principal.

Assim, observa-se que no início do processo de germinação, houve ação mutagênica do óleo diesel que pode ser atribuída aos metabólitos formados no processo de biotransformação, que induziu a formação de hidrocarbonetos de difícil degradação, altamente reativos com as células. Estes resultados corroboram com os dados de Leme e Marin-Morales (2008), que

encontraram altos índices de MN decorrentes da ação de hidrocarbonetos presentes em amostras de água contaminadas com petróleo.

Conforme descrito no Capítulo 3, a degradação de óleo diesel gerou a formação de compostos comprovadamente tóxicos, que não puderam ser caracterizados por cromatografia. Segundo Petersen et al. (2017), estudos recentes mostraram que componentes de UCM (fração não degradada dos compostos derivados de petróleo) em sedimentos, podem ser acumulados em organismos bentônicos, causando efeitos sub-letais para os organismos. Além de seu próprio potencial de bioacumulação e toxicidade, a UCM também pode alterar a biodisponibilidade e toxicidade de outros contaminantes em sedimentos.

A partir dos resultados obtidos, confirmou-se que a realização de biosensaio de toxicidade são fatores chave na determinação da eficácia do processo de biorremediação, não considerando apenas a diminuição na concentração dos hidrocarbonetos no ambiente e/ou os altos índices de atividade microbiana.

8 Considerações Finais

- O potencial do soro como substrato alternativo para produção de biossurfactante por micro-organismos foi evidente, contudo é importante considerar que as diferenças de produção em relação a outros autores, bem como as propriedades do biossurfactante produzido podem ter sido afetadas pelas condições de cultivo utilizadas.
- *Pseudomonas aeruginosa* LBI também foi capaz de sintetizar ramnolipídios utilizando soro de ricota como fonte de carbono, embora em pequena quantidade quando a mesma é comparada à quantidade gerada utilizando substratos hidrofóbicos.
- O rendimento da produção do biossurfactante foi de 0,45 g L⁻¹ a partir do soro de ricota, sugerindo-que esse substrato possa ser utilizado, desde que busque maior adaptação dos isolados ou de novos micro-organismos a estes resíduos e/ou complementação de nutrientes.
- A adição do biossurfactante preparado nessas condições, representou pouco aumento no metabolismo microbiano para a biodegradação;
- O teste utilizando o indicador redox TTC foi eficiente para verificar a degradação de óleo diesel e gasolina, porém, a técnica utilizando o indicador redox DCPIP se mostrou mais sensível e demonstrando o potencial da linhagem *P. putida* CMMI 852 em degradar os hidrocarbonetos, se mostrando uma boa técnica para identificação de micro-organismos degradadores de compostos orgânicos.
- Pelas análises de GC/MS comprovou-se a degradação dos hidrocarbonetos aromáticos TE(o-)X pela *P. putida* CMMI 852 com plasmídeo TOL pWW0.

- A *P. putida* não foi capaz de metabolizar o benzeno, nem individualmente, nem em misturas, indicando a via de degradação da linhagem sendo via TOL.
- Em presença do benzeno, ocorreu um efeito negativo na degradação do tolueno que apresentou taxa de degradação 33,5% menor do que quando degradado individualmente, enquanto que em mistura, o etilbenzeno aumentou em 50,3% a sua taxa de degradação.
- Em misturas ternárias, os compostos TE(o-)X apresentaram maior taxa de degradação, em relação a mistura BTE(o-)X, apresentando aumento de 14,2% para tolueno, seguido de 4,8% e 2,5% para (o-)xileno e etilbenzeno, respectivamente. Assim, a bactéria apresentou a seguinte sequência de degradação: tolueno, o-xileno e etilbenzeno.
- A linhagem *P. putida* CCM1 852 também se mostrou capaz de metabolizar compostos presentes na gasolina e no óleo diesel, ainda que mais lentamente, se mostrando eficiente em utilizar uma grande variedade de compostos orgânicos como fonte de energia.
- Esse estudo também evidenciou a toxicidade para gasolina e óleo diesel frente a sementes de alface (*L. sativa*), assim como o óleo diesel apresentou genotoxicidade e mutagenicidade. A gasolina não apresentou genotoxicidade, que pode ser devido ao pequeno desenvolvimento das células meristemáticas em presença dos compostos, todavia, esse fato permite concluir que o composto teve efeito sobre o material genético de células em divisão.
- O uso da *P. putida* CMM1 852 como micro-organismo degradador de ambientes impactados por hidrocarbonetos, possui um potencial promissor, sendo capazes de degradar gasolina, óleo diesel e seus compostos aromáticos TE(o-)X.

Referências

ABDEL-MAWGOUD, A. M.; LÉPINE, F.; DÉZIEL, E. Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 86, p. 1323–1336, 2010.

ABOUSEOUD, M.; MAACHI, R.; AMRANE, A.; BOUDERGUA, A. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. **Desalination**, v. 223, p. 143–151, 2008.

AHMED, Z.; SONG, J. Removal of gaseous toluene using immobilized *Candida tropicalis* in a fluidized bed bioreactor. **Biotechnology**, v. 1, p. 111-116, 2011.

AISLABIE, J.; SAUL, D. J.; FOGHT, J. M. Bioremediation of hydrocarbon-contaminated polar soils. **Extremophiles**, v. 10, p. 171-179, 2006.

AKMIRZA, I.; PASCUAL, C.; CARVAJAL, A.; PÉREZ, R.; MUÑOZ, R.; LEBRERO, R. Anoxic biodegradation on BTEX in a biotrickling filter. **Science of the Total Environment**, v. 1, p. 457-465, 2017.

ALBERTINI, R. J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G. R.; HAGMAR, L.; HEMMINK, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, A. T.; NORPPA, H.; SHUKER, D. E.; TICE, R.; WATER, M.D.; AITIO, A. IPCS guideline for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety. **Mutation Research**, v. 463, p. 111-172, 2000.

ALEF, K. Estimation of microbial activities. In: ALEF, K.; NANNIPIERI, P. **Methods in applied soil microbiology and biochemistry**. San Diego: Academic Press, 1995, p. 193-270.

ALEF, K. Dehydrogenase activity. In: ALEF, K., NANNIPIERI, P. **Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry**, Academic Press, London, 1996, p. 228-231.

ALMEDA, R.; WAMBAUGH, Z.; CHAI, C.; WANG, Z.; LIU, Z.; BUSKEY, E. J. Effects of crude oil exposure on bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons and survival of adult and larval stages of gelatinous zooplankton. **Plos One**, v. 8, p. 1-15, 2013.

ALRUMMAN, S. A.; STANDING, D. B.; PATON, G. I. Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. **Journal of King Saud University – Science**, v. 27, p. 31-41, 2015.

- ALSOHIM, A. S.; TAYLOR, T. B.; BARRETT, G. A.; GALLIE, J.; ZHANG, X.; JUNQUEIRA, A. E. A.; JOHNSON, L. J.; RAINEY, P. B.; JACKSON, R. W. The biosurfactant viscosin produced by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 aids spreading motility and plant growth promotion. **Environmental Microbiology**, v. 16, p. 2267-2281, 2014.
- ALVAREZ, P. J. J.; HUNT, C. S. The effect of fuel alcohol on monoaromatic hydrocarbon biodegradation and natural attenuation. **Revista Latino Americana de Microbiologia**, v. 44, p. 83-104, 2002.
- ALVES, M. P.; MOREIRA, R. O.; RODRIGUES JR, P. H.; MARTINS, M. C. F.; PERRONE, I. T.; CARVALHO, A. F. Soro de leite: Tecnologias para o processamento de coprodutos. **Revista Instituto Laticínios Cândido Tostes**, v. 69, p. 212-226, 2014.
- ANP. Agência Nacional do Petróleo. Investigação do incidente de vazamento de petróleo no Campo de Frade - Relatório final. 2012. Disponível em: <www.anp.gov.br/SITE/acao/download/?id=61108>. Acesso em: 09 fev. 2017.
- ANP. Agência Nacional do Petróleo. Etanol anidro na gasolina sobe para 27% a partir de 16/03/16. 2016. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/?pg=80025&m=gasolina&t1=&t2=gasolina&t3=&t4=&ar=0&ps=1&1460034118766>>. Acesso em: 27 jul. 2016.
- ANP. Agência Nacional do Petróleo. Produção de petróleo aumenta 12,6% na comparação com março de 2016. 2017a. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/noticias/anp-e-p/3723-producao-de-petroleo-aumenta-12-6-na-comparacao-com-marco-de-2016>>. Acesso em: 18 jun. 2017.
- ANP. Agência Nacional do Petróleo. Gasolina. 2017b. Disponível em: <<http://www.anp.gov.br/wwwanp/petroleo-derivados/155-combustiveis/1855-gasolina>>. Acesso em: 18 jun. 2017.
- APARNA, A.; SRINIKETHAN, G.; SMITHA, H. Production and characterization of biosurfactant produced by a novel *Pseudomonas* sp. 2B. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 23-29, 2012.
- ARAÚJO, L. V.; FREIRE, D. M. G.; NITSCHKE, M. Biosurfactants: anticorrosive, antibiofilm and antimicrobial properties. **Química Nova**, v. 36, p. 848-858, 2013.
- ASIA, L.; MAZOUZ, S.; GUILIANO, M.; DOUMENQ, P.; MILLE, G. Occurrence and distribution of hydrocarbons in surface sediments from Marseille Bay (France). **Marine Pollution Bulletin**, v. 58, p. 443-451, 2009.
- ATLAS, R. M. Microbial hydrocarbon degradation-bioremediation of oil spills. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 52, p. 149, 156, 1991.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for fuel oils. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. 1995. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp75.pdf>>. Acesso em: 20 mai. 2017.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease registry. Public Health Statement Total petroleum hydrocarbons. 1999. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp123-c1-b.pdf>>. Acesso em: 14 set. 2016.
- ATSDR. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Interaction profile for: Benzene, Toluene, Ethylbenzene, and Xylenes (BTEX). U.S. Department of Health and Human Services, Public

- Health Service. 2004. Disponível em: <<https://www.atsdr.cdc.gov/interactionprofiles/IP-btex/ip05.pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2016.
- BAI, L.; McCLEMENTS, D. J. Formation and stabilization of nanoemulsions using biosurfactants: Rhamnolipids. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 479, p. 71-79, 2016.
- BALD, J. A.; VINCENZI, A.; GENNARI, A.; LEHN, D. N.; SOUZA, C. F. V. Características físico-químicas de soros de queijo e ricota produzidos no Vale do Taquari, RS. **Revista Jovens Pesquisadores**, v. 4, p. 90-99, 2014.
- BALSEIRO-ROMERO, M.; KIDD, P. S.; MONTERROSO, C. Leachability of volatile fuel compounds from contaminated soils and the effect of plant exudates: A comparison of column and batch leaching tests. **Journal of Hazardous Materials**, v. 304, p. 481-489, 2016.
- BANASZEWSKA, A.; CRUIJSSEN, T. F.; CLAASSEN, G. D. H.; VORST, A. J. VAN DER. Effect and key factors of byproducts valorization: The case of dairy industry. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p. 1893-1908, 2014.
- BANAT, I. M.; SATPURE, S. K.; CAMEOTRA, S. S.; PATIL, R.; NYAYANIT, N. V. Cost effective technologies and renewable substrates for biosurfactants' production. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-14, 2014.
- 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.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 2. ed. Campinas: Editora da Unicamp, 2002, 405 p.
- BATISTA, S. B.; MOUNTEER, A. H.; AMORIM, F. R.; TOTOLA, M. R. Isolation and characterization of biosurfactant/bioemulsifier-producing bacteria from petroleum contaminated sites. **Bioresourch Technology**, v. 97, p. 868-875, 2006.
- BENINCASA, M.; CONTIERO, J.; MANRESA, M. A.; MORAES, I. O. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI growing on soapstock as the sole carbon source. **Journal of Food Engineering**, v. 54, p. 283-288, 2002.
- BENINCASA, M.; ABALOS, A.; OLIVEIRA, I.; MANRESA, A. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 85, p. 1-8, 2004.
- BENINCASA, M. Rhamnolipid produced from agroindustrial wastes enhances hydrocarbon biodegradation in contaminated soil. **Current Microbiology**, v. 54, p. 445-449, 2007.
- BENINCASA, M.; ACCORSINI, F. R. *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. **Bioresourch Technology**, v. 99, p. 3843-3849, 2008.
- BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A. O.; OKEKE, B. C.; FRANKENBERGER, W. T. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, bioestimulation and bioaugmentation. **Bioresourch Technology**, v. 96, p. 1049-1055, 2005.
- BEUKER, J.; BARTH, T.; STEIER, A.; WITTEGENS, A.; ROSENAU, F.; HENKEL, M.; HAUSMANN, R. High titer heterologous rhamnolipid production. **AMB Express**, v. 6, p. 1-10, 2016.

- BIDOIA, E. D.; MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M. **Microbial biodegradation potential of hydrocarbons evaluated by colorimetric technique: a case study**. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Méndez-Vilas, A. (Ed.), 2010, p. 1277-1288.
- BLACKBURN, T. M.; BROWN, V. K.; DOUBE, B. M. M.; GREENWOOD, J. J. D.; LAWTON, J. H.; STORK, N. E. The relationship between abundance and body size in natural animal assemblages. **Journal of Animal Ecology**, v. 62, p. 519 – 528, 1993.
- BOLDEN, A. L.; KWIATKOWSKI, C. F.; COLBORN, T. New look at BTEX: are ambient levels a problem? **Environmental Science & Technology**, v. 49, p. 5261–5276, 2015.
- BONILLA, N. B.; VIDAL, J. L. M.; FRENICH, A. G.; GONZÁLEZ, R. R. Comparison of ultrasonic and pressurized liquid extraction for the analysis of polycyclic aromatic compounds in soil samples by gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Talanta**, v. 78, p. 156–164, 2009.
- BOOTH, A. M.; SUTTON, P. A.; LEWIS, C. A.; LEWIS, A. C.; SCARLETT, A.; CHAU, W.; ROWLAND, S. J. Unresolved complex mixtures of aromatic hydrocarbons: thousands of overlooked persistent, bioaccumulative, and toxic contaminants in mussels. **Environmental Science Technology**, v. 41, p. 457-464, 2007.
- BOSSE, R.; WIRTH, M.; KONSTANZ, A.; BECKER, T.; WEISS, J.; GIBIS, M. Determination of volatile marker compounds in raw ham using headspace-trap gas chromatography. **Food Chemistry**, v. 219, p. 249-259, 2017.
- BOWEN, S. E.; HANNIGAN, J. H. Development toxicity of prenatal exposure to toluene. **The AAPS Journal**, v. 8, p. 419-424, 2006.
- BRADDOCK, J. F.; CATTERALL, P. H. A simple method for enumerating gasoline and diesel-degrading microorganisms. **Bioremediation Journal**, v. 3, p. 81-84, 1999.
- BRASIL. Lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998. Dispõe sobre as sanções penais e administrativas derivadas de condutas e atividades lesivas ao meio ambiente, e dá outras providências. 1998. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9605.htm>. Acesso em 27 out. 2016.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Relatório sobre o impacto ambiental causado pelo derramamento de óleo na Baía de Guanabara. 2001. Disponível em: <www.mma.gov.br/port/conama/processos/67B2E6A7/artigo5.doc>. Acesso em: 25 jul. 2017.
- BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa nº 68 de 12 de dezembro de 2006. Oficializa os métodos analíticos oficiais físico-químicos, para controle de leite e produtos lácteos, em conformidade com o anexo desta Instrução Normativa, determinando que sejam utilizados nos Laboratórios Nacionais Agropecuários. 2006. Disponível em: <<https://www.diariodasleis.com.br/busca/exibelinck.php?numlink=1-77-23-2006-12-12-68>>. Acesso em: 11 jul. 2016.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Dispõe sobre critérios e valores orientadores de qualidade do solo quanto à presença de substâncias químicas e estabelece diretrizes para o gerenciamento ambiental de áreas contaminadas por essas substâncias em decorrência de atividades antrópicas. Resolução nº 420, de 28 de dezembro de 2009. Brasília, 2009. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=620>>. Acesso em: 16 jan. 2017.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de

- vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Portaria MS nº 2.914/2011. 2011a. Disponível em:
<http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html> Acesso em: 30 mai 2017.
- BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA. Resolução Nº 430, de 13 de maio de 2011. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução no 357, de 17 de março de 2005. 2011b. Disponível em:
<<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res11/res43011.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2017.
- BURDOCK, T. J.; BROOKS, M. S.; GHALY, A. E. A Dehydrogenase activity test for monitoring the growth of *Streptomyces venezuelae* in a nutrient rich medium. **Bioprocessing & Biotechniques**, v. 1, p. 1-10, 2011.
- BURLAGE, R. S.; HOOPER, S. W.; SAYLER, G. S. The TOL (pWW0) catabolic plasmid. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 55, p. 1323-1328, 1989.
- CAMEOTRA, S. S.; MAKKAR, R. S. Synthesis of biosurfactants in extreme conditions. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 50, p. 520-529, 1998.
- CAPELINI, T. L. **Produção de ramnolipídios por linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* em diferentes fontes de carbono e condições de cultivo**. 52 f. Trabalho de Conclusão de curso – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Campus de Rio Claro, 52 f. 2009.
- CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**, v. 72, p. 722-725, 2008.
- CARMONA, M.; ZAMARRO, M. T.; BLÁZQUEZ, B.; DURANTE-RODRÍGUEZ, G.; JUARÉZ, J. F.; VALDERRAMA, A.; BARRAGÁN, M. J. L.; GARCÍA, J. L.; DÍAZ, E. Anaerobic catabolism of aromatic compounds: a genetic and genomic view. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 73, p. 71-133, 2009.
- CAROTA, E.; CROGNALE, S.; D’ANNIBALE, A.; GALLO, A. M.; STAZI, S. R.; PETRUCCIOLI, M. A sustainable use of ricotta cheese whey for microbial biodiesel production. **Science of the Total Environment**, v. 584-585, p. 554-560, 2017.
- CARREIRA, R. S.; RIBEIRO, P. V.; SILVA, C. E. M. Hidrocarbonetos e esteróis como indicadores de fontes e destino de matéria orgânica em sedimentos da Baía de Sepetiba, Rio de Janeiro. **Química Nova**, v. 32, p. 1805-1811, 2009.
- CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445-446, p. 385-396, 2013.
- CASIDA, L.; KLEIN, D.; SANTORO, T. Soil dehydrogenase activity. **Soil Science**, v. 98, p. 371-376, 1964.
- CAVALCA L, DI GENNARO P, COLOMBO M, ANDREONI V, BERNASCONI S, RONCO I, BESTETTI G. Distribution of catabolic pathways in some hydrocarbon-degrading bacteria from a subsurface polluted soil. **Researcher Microbiology**, v. 151, p. 877-887, 2000.
- CERESER, N. D.; ROSSI JR., O. D.; MARCHI, P. G. F.; SOUZA, V.; CARDOZO, M. V.; MARTINELLI, T. M. Avaliação da qualidade microbiológica da ricota comercializada em supermercados do Estado de São Paulo. **Ciência Animal Brasileira**, v. 12, p. 149-145, 2011.

- CESARINO, I.; CESARINO, V.; MORAES, F. C.; FERREIRA, T. C. R.; LANZA, M. R. V.; MASCARO, L. H.; MACHADO, S. A. S. Electrochemical degradation of benzene in natural water using silver nanoparticle-decorated carbon nanotubes. **Materials Chemistry and Physics**, v. 141, p. 304-309, 2013.
- CETESB - Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Relação de áreas contaminadas e reabilitadas no Estado de São Paulo. São Paulo, 2016, 14 p. Disponível em: <<http://areascontaminadas.cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/sites/45/2013/11/Texto-explicativo-1.pdf>>. Acesso em: 25 abr. 2017.
- CIRIGLIANO, M. C.; CARMAN, G. M. Purification and characterization of liposan, a bioemulsifier from *Candida lipolytica*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 50, p. 846-850, 1985.
- CHANDRASEKARAN, E. V.; BEMILLER, J. N. **Constituent analysis of glycoaminoglycans**. In: Methods in carbohydrate chemistry, v. III, Academic Press, New York, 1980, p. 89-96.
- CHAPRA, S. C. **Surface Water-Quality Modeling**. New York: Waveland Press, 2008. 844 p.
- CHEN, S-Y.; WEI, Y-H.; CHANG, J-S. Repeated pH-stat fed-batch fermentation for rhaminolipid production with indigenous *Pseudomonas aeruginosa* S2. **Applied Microbiology & Biotechnology**, v. 76, p. 67-74, 2007.
- CHEN, Y. D.; BARKER, J. F.; GUI, L. A strategy for aromatic hydrocarbon bioremediation under anaerobic conditions and the impacts of ethanol: a microcosm study. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 96, p. 17-31, 2008.
- CHIKERE, C. B.; OKPOKWASILI, G. C.; CHIKERE, B. O. Monitoring of microbial hydrocarbon remediation in the soil. **3 Biotech**, v. 1, p. 117-138, 2011.
- COIMBRA, C. D.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SARUBBO, L. A. Studies of the cell surface properties of *Candida* species and relation to the production of biosurfactants for environmental applications. **Current Microbiology**, v. 58, p. 245-251, 2009.
- COLLA, L. M.; PRIMAZ, A. L.; LIMA, M.; BERTOLIN, T. E.; COSTA, J. A. V. Isolamento e seleção de fungos para biorremediação a partir de solo contaminado com herbicidas triazínicos. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 32, p. 809-813, 2008.
- COLEDAM, D. A. C.; PUPO, M. M. S.; SILVA, B. F.; SILVA, A. J.; EGUILUZ, K. I. B.; SALAZAR-BANDA, G. R.; AQUINO, J. M. Electrochemical mineralization of cephalexin using a conductive diamond anode: A mechanistic and toxicity investigation. **Chemosphere**, v. 168, p. 638-647, 2017.
- COLLINS, C. Implementing phytoremediation of petroleum hydrocarbons. **Methods in Biotechnology**, v. 23, p. 99-108, 2007.
- COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas: Editora Unicamp, 2011.
- COOPER, D. G.; GOLDENBERG, B. G. Surface active agents from two *Bacillus* species. **Applied Environmental Microbiology**, v. 53, p. 224-229, 1987.
- CORSEUIL, H. X.; WEBER JR, W. J. Potential biomass limitations on rates of degradation on monoaromatic hydrocarbons by indigenous microbes in subsurface soils. **Water Research**, v. 28, p. 1415-1423, 1994.

- CORSEUIL, H. X.; GOMEZ, D. E.; SCHAMBECK, C. M.; RAMOS, D. T.; ALVAREZ, P. J. J. Nitrate addition to groundwater impacted by ethanol-blended fuel accelerates ethanol removal and mitigates the associated metabolic flux dilution and inhibition of BTEX biodegradation. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 174, p. 1-9, 2015.
- COSTA, S. G. V. A. O.; NITSCHKE, M.; CONTIERO, J. Produção de biotensoativos a partir de resíduos de óleos e gorduras. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 34-38, 2008.
- COSTA, S. G. V. A. O. **Estudo da produção de metabólitos por *Pseudomonas aeruginosa*: Rhamnolipídios e polihidroxialcanoatos (PHAs)**. 138 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, 2010, 139 p.
- COZZARELI, I. M.; BEKINS, B. A.; EGANHOUSE, R. P.; WARREN, E.; ESSAID, H. I. In situ measurements of volatile aromatic hydrocarbon biodegradation rates in groundwater. **Journal of Contaminant Hydrology**, v. 111, p. 48-64, 2010.
- CUNHA, P. O.; GUIMARÃES, J. R. D.; VARGAS JR., E. A.; SILVA, M. I. P. Study of biodegradation processes of BTEX-ethanol mixture in tropical soil. **Water Air Soil Pollution**, v. 181, p. 303-317, 2007.
- D'ALVISE, P. W.; SJØHOLM, O. R.; YANKELEVICH, T.; JIN, Y.; WUERTZ, S.; SMETS, B. F. TOL plasmid carriage enhances biofilm formation and increases extracellular DNA content in *Pseudomonas putida* KT2440. **FEMS Microbiology Letters**, v. 312, p. 84-92, 2010.
- DAS, N.; CHANDRAN, P. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. **Biotechnology Research International**, v. 2011, p. 1-13, 2011.
- DAS, S.; DASH, H. R. Microbial biodegradation and bioremediation. A potential toll for restoration of contaminated areas. **Microbial Biodegradation and Bioremediation**, p. 1-22, 2014.
- DAS, P.; MA, L. Z. Pyocyanin pigment assisting biosurfactant-mediated hydrocarbon emulsification. **International Biodeterioration & biodegradation**, v. 85, p. 278-283, 2013.
- DEEB, R. A.; SHARP, J. O.; STOCKING, A.; MCDONALD, S.; WEST, K. A.; LAUGIER, M.; ALVAREZ, P. J. J.; KAVANAUGH, M. C.; ALVAREZ-COHEN, L. Impact of ethanol on benzene plume lengths: Microbial and modeling studies. **Journal of Environmental Engineering**, v. 128, p. 868-875, 2002.
- DIEZ, M. C. Biological aspects involved in the degradation of organic pollutants. **Journal of Soil Science Plant Nutrition**, v. 10, p. 244-267, 2010.
- DIFCO MANUAL, 10ed. Detroit: Difco Laboratories, 1984.
- DOBLER, L.; VILELA, L. F.; ALMEIDA, R. V.; NEVES, B. C. Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting. **New Biotechnology**, v. 33, p. 123-135, 2016.
- DOMÍNGUEZ-CUEVAS, P.; MARQUÉS, S. Current view of the mechanisms controlling the transcription of the TOL plasmid aromatic degradation pathways. In: ROJO, F. *Aerobic Utilization of Hydrocarbons, Oils and Lipids*. Springer International Publishing, 2017, p. 1-22.
- DONG, C-D.; TSAI, M-L.; CHEN, C-W.; HUNG, C-M. Heterogeneous persulfate oxidation of BTEX and MTBE using Fe₃O₄-CB magnetite composites and the cytotoxicity of degradation products. **International Biodeterioration & Biodegradation**, *In Press*, 2017.

DORN, P. B.; SALANITRO, J. P. Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation. **Chemosphere**, v. 40, p. 419-426, 2000.

DÖRR, F. **Consórcios degradadores de btex: isolamento, caracterização e avaliação do potencial de degradação**. 176 f. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

DUBEY, K. V.; CHARDE, P. N.; MESHRAN, S. U.; SHENDRE, L. P.; SUBEY, V. S.; JUWARKAR, A. A. Surface-active potential of biosurfactants produced in curd whey by *Pseudomonas aeruginosa* strain-PP2 and *Kocuria turfanesis* strain-J at extreme environmental conditions. **Bioresource Technology**, v. 126, p. 368-374, 2012.

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

EGITO, L. C. M.; MEDEIROS, M. G.; MEDEIROS, S. R. B.; AGNEZ-LIMA, L. F. Cytotoxic and genotoxic potential as surface water from the Pitimbu river, northeastern/RN, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v. 30, p. 435-441, 2007.

EL-FOULY, M. Z.; SHARAF, A. M.; SHAHIN, A. A. M.; EL-BIALY, H. A.; OMARA, A. M. A. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Radiation Research and Applied Sciences**, v. 8, p. 36-48, 2015.

EL-NAAS, M. H.; ACIO, J. A.; EL TELIB, A. E. Aerobic biodegradation of BTEX: Progresses and prospects. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, p. 1104-1122, 2014.

ELSHAFIE, A. E.; JOSHI, S. J.; AL-WAHAIBI, Y. M.; AL-BERMANI, A. S.; AL-BAHRY, S. N.; AL-MAQBALI, D.; BANAT, I. M. Sophorolipids production by *Candida bombicola* ATCC 22214 and its potential application in microbial enhanced oil recovery. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 1-11. 2015.

EL-SHESHTAWY, H. S.; AIAD, I.; OSMAN, M. E.; ABO-ELNASR, A. A.; KOBISY, A. S. Production of biosurfactant from *Bacillus licheniformis* for microbial enhanced oil recovery and inhibition the growth of sulfate reducing bacteria. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 24, p. 155-162, 2015.

EMTIAZI, G.; SHAKARAMI, H.; NAHVI, I.; MIRDAMADIAN, S. H. Utilization of petroleum hydrocarbons by *Pseudomonas* sp. and transformed *Escherichia coli*. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 172-176, 2005.

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

ESPÍNOLA, E. L. G.; BRIGANTE, J.; DORNFELD, C. B. Estudos ecotoxicológicos no rio Mogi-Guaçu. In: BRIGANTE, J.; ESPINOLA, E. L. G. (Org.) **Limnologia fluvial: um estudo no rio Mogi Guaçu**. São Carlos: Rima, 2003, p.129-148.

EVSEEVA, T. I.; GERASKIN, S. A.; SHUTOMOVA, I. I. Genotoxicity and toxicity assay of water sampled from a radium production industry storage cell territory by means of *Allium*-test. **Journal of Environmental Radioactivity**, v. 68, p. 235-248, 2003.

FAI, A. E. C.; SIMIQUELI, A. P. R.; ANDRADE, C. J.; GHISELLI, G.; PASTORE, G. M. Optimized production of biosurfactant from *Pseudozyma tsukubaensis* using cassava wastewater and consecutive production of galactooligosaccharides: An integrated process. **Biocatalysis and Agricultura Biotechnology**, v. 4, p. 535-542, 2015.

- FARHADIAN, M.; DUCHEZ, D.; VACHELARD, C.; LARROCHE, C. Monoaromatics removal from polluted water through bioreactors-a review. **Water Research**, v. 42, p. 1325-1341, 2008.
- FARRINGTON, J. W.; QUINN, J. G. Unresolved Complex Mixture (UCM): A brief history of the term and moving beyond it. **Marine Pollution Bulletin**, v. 96, p. 29-31, 2015.
- FATHEPURE, B. Z. Recent studies in microbial degradation of petroleum hydrocarbons in hypersaline environments. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p. 1-16, 2014.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.
- FREITAS, B. G.; BRITO, J. G. M.; BRASILEIRO, P. P. F.; RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; SANTOS, V. A.; SARUBBO, L. A. Formulation of a commercial biosurfactant for application as a dispersant of petroleum and by-products spilled in oceans. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-9, 2016.
- FRYSINGER, G. S.; GAINES, R. B.; XU, L.; REDDY, C. M. Resolving the unresolved complex mixture in petroleum-contaminated sediments. **Environmental Science and Technology**, v. 37, p. 1653-1662, 2003.
- FUCHS, G.; BOLL, M.; HEIDER, J. Microbial degradation of aromatic compounds – from one strategy to four. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 803-816, 2011.
- GALVANI, F.; GAERTNER, E. Adequação da metodologia Kjeldahl para determinação de nitrogênio total e proteína bruta. Embrapa, Circular Técnica, p. 1-9, 2006. Disponível em: <<http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/CT63.pdf>>. Acesso em: 11 jul. 2016.
- GAUTAM, K. K.; TYAGI, V. Microbial surfactants: a review. **Journal of Oleo Science**, v. 55, p. 155-166, 2006.
- GERHARDT, A.; MONTEIRO, B. W.; GENNARI, A.; LEHN, D. N.; SOUZA, C. F. V. Características físico-químicas e sensoriais de bebidas lácteas fermentadas utilizando soro de ricota e colágeno hidrolisado. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, p. 41-50, 2013.
- GIBSON, D. T.; SUBRAMANIAN, V. **Microbial degradation of aromatic hydrocarbons**. In: GIBSON, D. T. (ed.), *Microbial degradation of organic compounds*. Marcel Dekker, Inc. New York, NY, 1984, p. 181-252.
- GILBERT-LÓPEZ, B.; ROBLES-MOLINA, J.; GARCÍA-REYES, J. F.; MOLINA-DÍAZ, A. Rapid determination of BTEXS in olives and olive oil by headspace-gas chromatography/mass spectrometry (HS-GC-MS). **Talanta**, v. 83, p. 391-399, 2010.
- GOBATO, E. A. A. F.; LANÇAS, M. F. Comparação entre injeção na coluna ("on-column") e *headspace* dinâmico na determinação de benzeno, tolueno e xilenos (BTX) em amostras de água. **Química Nova**, v. 24, 2001.
- GONG, H.; LI, Y.; BAO, M.; LV, D.; WANG, Z. Petroleum hydrocarbon degrading bacteria associated with chitosan as effective particle-stabilizers for oil emulsification. **RSC Advances**, v. 5, p. 37640-37647, 2015.
- GONZÁLEZ, J. L.; PELL, A.; LÓPEZ-MESAS, M.; VALIENTE, M. Simultaneous determination of BTEX and their metabolites using solid-phase microextraction followed by HPLC or GC/MS: An application in teeth as environmental biomarkers. **Science of the Total Environment**, v. 603-604, p. 109-117, 2017.

- GUO, Y.-P., HU, Y.-Y., GU, R. R., AND LIN, H. Characterization and micellization of rhamnolipidic fractions and crude extracts produced by *Pseudomonas aeruginosa* mutant MIG-N146. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 331, p. 356–363, 2009.
- GRANT, W. Chromosome aberration assays in *Allium*. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Genotoxic Program. **Mutation Research**, v. 281, p. 89-92, 1982.
- GREATER, A.; LAMBERTSEN, L.; WILLIAMS, P. A.; THOMAS, C. M. Complete sequence of the IncP-9 TOL plasmid pWW0 from *Pseudomonas putida*. **Environmental Microbiology**, v. 4, p. 856-871, 2002.
- GUARINO, C.; SPADA, V.; SCIARRILLO, R. Assessment of three approaches of bioremediation (natural attenuation, landfarming and bioaugmentation – assisted landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. **Chemosphere**, v. 170, p. 10–16, 2017.
- GUDIÑA, E. J.; RODRIGUES, A. I.; ALVES, E.; DOMINGUES, M. R.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Bioconversion of agro-industrial by-products in rhamnolipids toward applications in enhanced oil recovery and bioremediation. **Bioresource Technology**, v. 177, p. 87-93, 2015a.
- GUDIÑA, E. J.; FERNANDES, E. C.; RODRIGUES, A. I.; TEIXEIRA, J. A.; RODRIGUES, L. R. Biosurfactant production by *Bacillus subtilis* using corn steep liquor as culture medium. **Frontiers Microbiology**, v. 6, p. 1-7, 2015b.
- GUDIÑA, E. J.; PEREIRA, J. F. B.; COSTA, R.; EVTUGUIN, D. V.; COUTINHO, J. A. P.; TEIXEIRA, J.; RODRIGUES, L. R. Novel bioemulsifier produced by a *Paenibacillus* strain isolated from crude oil. **Microbial Cell Factories**, v. 14, p. 1-11, 2015c.
- GUSMÃO, V. R.; MARTINS, T. H.; CHINALIA, F. A.; SAKAMOTO, I. K.; THIEMANN, O. H. BTEX and ethanol removal in horizontal-flow anaerobic immobilized biomass reactor, under denitrifying condition. **Process Biochemistry**, v. 41, p. 1391-1400, 2006.
- HABA, E.; ESPUNY, M. J.; BUSQUETS, M.; MANRESA, A. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB 40044 from waste frying oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 379-387, 2000.
- HAGMAR, L.; STROMBERG, U.; BONASSI, S.; HANSTEEN, I. L.; KNUDSEN, L. E.; LINDHOLM, C.; NORPPA, H. Impact of types of lymphocyte chromosomal aberrations on human cancer risk: results from Nordic and Italian cohorts. **Cancer Research**, v. 64, p. 2258-2263, 2004.
- HAMAD, H. A.; SADIK, W. A.; EL-LATIF, M. M. A.; KASHYOUT, A. B.; FETEHA, M. Y. Photocatalytic parameters and kinetic study for degradation of dichlorophenol-indophenol (DCPIP) dye using highly active mesoporous TiO₂ nanoparticles. **Journal of Environmental Sciences**, v. 43, p. 26-39, 2016.
- 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.

- HAQ, I.; KUMAR, S.; RAJ, A.; LOHANI, M.; SATYANARAYANA, G. N. V. Genotoxicity assessment of pulp and paper mill effluent before and after bacterial degradation using *Allium cepa* test. **Chemosphere**, v. 169, p. 642-650, 2017.
- HARA, R. V.; MARIN-MORALES, M. A. *In vitro* and *in vivo* investigation of the genotoxic potential of waters from rivers under the influence of a petroleum refinery (São Paulo State – Brazil). **Chemosphere**, v. 174, p. 321-330, 2017.
- HARRIS, D. C. Análise química quantitativa. 8.ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.
- HARVEY, S.; ELASHVILI, L.; VALDES, J. J.; KAMELY, D.; CHAKQABRARTY, V. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by a microbial surfactant. **Biotechnology**, v. 8, p. 228-238, 1990.
- HAZRA, C.; KUNDU, D.; GHOSH, P.; JOSHI, S.; DANDIA, N.; CHAUDHARIA, A. Screening and identification of *Pseudomonas aeruginosa* AB4 for improved production, characterization and application of a glycolipid biosurfactant using lowcost agro-based raw materials. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 86, p. 185-198, 2011.
- HELENO, F. H.; LIMA, A. C.; AFONSO, R. J. C. F.; COUTRIM, M. C. Otimização e validação de métodos analíticos para determinação de BTEX em água utilizando extração por *headspace* e microextração em fase sólida. **Química Nova**, v. 33, p. 329-336, 2010.
- HENKEL, M.; MÜLLER, M. M.; KÜGLER, J. H.; LOVAGLIO, R. B.; CONTIERO, J.; SYLDATK, C.; HAUSMANN, R. Rhamnolipids as biosurfactants from renewable resources: Concepts for next-generation rhamnolipid production. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 1207-1219, 2012.
- HOLLENDER, J.; ALTHOFF, K.; MUNDT, M.; DOTT, W. Assessing the microbial activity of soil samples, its nutrient limitation and toxic effects of contaminants using a simple respiration test. **Chemosphere**, v. 53, p. 269-275, 2003.
- HORI, K.; ICHINOHE, R.; UNNO, H.; MARSUDI, S. Simultaneous syntheses of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* IFO3924 at various temperatures and from various fatty acids. **Biochemical Engineering Journal**, v. 53, p. 196–202, 2002.
- IAL. Instituto Adolfo Lutz (São Paulo). Métodos físico-químicos para análise de alimentos. Coord: ZENEBON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 4. Ed. 2008 p. 1020. Disponível em: <http://www.ial.sp.gov.br/resources/editorinplace/ial/2016_3_19/analisedealimentosial_2008.pdf>. Acesso em: 12 jul. 2016.
- IARC. International Agency Research on Cancer. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans – Some Industrial Chemicals. In: Ethylbenzene, Lyon, France: World Health Organization, v. 77, p. 227-266. 2000. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK390856/pdf/Bookshelf_NBK390856.pdf>. Acesso em: 18 jan. 2016.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da pecuária municipal. Rio de Janeiro, v. 43, p. 1-49, 2015. Disponível em: <http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/84/ppm_2015_v43_br.pdf>. Acesso em: 01 jul. 2017.

- IEMMA, A. F.; RODRIGUES, M. I. **Planejamento de experimentos & otimização de processos**. 2 ed. Campinas: Cárita Editora, 2009, 326 p.
- IRSHAID, F. I.; JACOB, J. H. Screening and characterization of aerobic xylene-degrading bacteria from gasoline contaminated soil sites around gas stations in northern Jordan. **Journal of Biological Sciences**, v. 15, p. 167-176, 2015.
- JANEK, T.; LUKASZEWICZ, M.; KRASOWSKA, A. Identification and characterization of biosurfactants produced by the Arctic bacterium *Pseudomonas putida* BD2. **Colloids Surf. B. Biointerfaces**, v. 110, p. 379-386, 2013.
- JEON, S-K.; KWON, D.; LEE, S. Identification of weathered multiple petroleum products in contaminated soils by characterizing unresolved complex mixture hump in gas chromatograph data. **Science of the Total Environment**, v. 607-608, p. 42-72, 2017.
- JOHNSON, S. J.; WOOLHOUSE, K. J.; PROMMERA H.; BARRYA, D. A.; HRISTOFI N. Contribution of anaerobic microbial activity to natural attenuation of benzene in groundwater. **Engineering Geology**, v. 2186, p. 1-7, 2003.
- JOSHI, S.; BHARUCHA, C.; JHA, S.; YADAV, S.; NERURKAR, A.; DESAI, A. J. Biosurfactant production using molasses and whey under thermophilic conditions. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 195-199, 2008.
- JOUTEY, N. T.; BAHAFID, W.; SAYEL, H.; EL GHACHTOULI, N. Biodegradation: Life of Science. In: **Biodegradation: Involved microorganisms and genetically engineered microorganisms**. Publisher: InTech, 2013, p. 289-320.
- KANALY, R. A.; BARTHA, R.; WATANABE, K.; HARAYAMA, S. Rapid mineralization of benzo[a]pyrene by a microbial consortium growing on diesel fuel. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 4205-4211, 2000.
- KALYANI, A. L. T.; NAGA, S. G.; ADITYA, A. K. G.; GIRIJA, S. G.; PRABHAKAR, T. Production optimization of rhamnolipid biosurfactant by *Streptomyces coelicoflavus* (NBRC 15399^T) using Plackett-Burman design. **European Journal of Biotechnology and Bioscience**, v. 1, p. 07-13, 2014.
- KHODAEI, K.; NASSERY, H. R.; ASADI, M. M.; MOHAMMADZADEH, H.; MAHMOODLU, M. G. BTEX biodegradation in contaminated groundwater using a novel strain (*Pseudomonas* sp. BTEX-30). **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 116, p. 234-242, 2017.
- KINDER, K. M.; GELLASCH, C. A.; DUSENBURY, J. A.; TIMMES, T. C.; HUGHES, T. M. Evaluating the impact of ambient benzene vapor concentrations of product water from condensation water from air technology. **Science of the Total Environmental**, v. 590-591, p. 60-68, 2017.
- KŁOSOWSKA-CHOMICZEWSKA, I. E.; MĘDRZYCKA, K.; HALLMANN, E.; KARPENKO, E.; POKYNBRODA, T.; MACIERZANKA, A.; JUNGnickel, C. Rhamnolipid CMC prediction. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 488, p. 10-19, 2017.
- KOCH, A. K.; REISER, J. KÄPPELI, O.; FIECHTER, A. Genetic construction of lactose-utilizing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and their application in biosurfactant production. **Nature – Biotechnology**, p. 1335-1339, 1988.
- KUBOTA, K.; KOMA, D.; MATSUMIYA, Y. Phylogenetic analysis of long-chain hydrocarbons-degrading bacteria and evaluation of their hydrocarbon-degradation by the 2,6-DCPIP assay. **Biodegradation**, v. 19, p. 749-757, 2008.

- KUMAR, M.; KHANNA, S. Diversity of 16S rRNA and dioxygenase genes detected in coal tar-contaminated site undergoing active bioremediation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, p. 1252–1262, 2010.
- KUMAR, S.; CHAUDHURI, S.; MAITI, S. K. Soil dehydrogenase enzyme activity in natural and mine soil - a review. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 13, p. 898-906, 2013.
- KWAPISZ, E.; WSZELAKA, J.; MARCHUT, O.; BIELECKI, S. The effect of nitrate and ammonium ions on kinetics of diesel oil degradation by *Gordonia alkanivorans* S7. **International Biodeterioration and Biodegradation**, v. 61, p. 214-222, 2008.
- 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.
- LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográfico de análise**, RiMa, São Carlos, 2004, 62 p.
- LANG, S.; WAGNER, F. Structure and properties of biosurfactants, In: KOSARIC, N.; CAIRNS, W. L.; GRAY, N. C. C. (ed). **Biosurfactants and Biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1987.
- LAPERTOT, M.; SEIGNEZ, C.; EBRAHIMI, S.; DELORME, S.; PERINGER, P. Mass production of bacterial communities adapted to the degradation of volatile organic compounds (TEX). **Biodegradation**, v. 18, p. 343-350, 2007.
- LEAHY, J. G.; COLWELL, R. R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological Reviews**, v. 54, p. 305-315, 1990.
- LEE, J. Y.; ROH, J. R.; KIM, H. S. Metabolic engineering of *Pseudomonas putida* for the simultaneous biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene mixture. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 43, p. 1146-1152, 1994.
- LEE, J. Y.; JUNG, K. H.; CHOI, S. H.; KIN, H. S. Combination of the tod and the tol pathways in redesigning a metabolic route of *Pseudomonas putida* for the mineralization of a benzene, toluene, and p-xylene mixture. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 61, p. 2211-2217, 1995.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: a review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71-81, 2009.
- LI, P.; CAI, Q.; LIN, W.; CHEN, B.; ZHANG, B. Offshore oil spill response practices and emerging challenges. **Marine Pollution Bulletin**, v. 110, p. 6-27, 2016.
- LIMA, T. M. S.; PROCÓPIO, L. C.; BRANDÃO, F. D.; LEÃO, B. A.; TÓTOLA, M. R.; BORGES, A. C. Evaluation of bacterial surfactant toxicity towards petroleum degrading microorganisms. **Bioresource Technology**, v. 102, p. 2957-2964, 2011.
- LIMA, S. D.; OLIVEIRA, A. F.; GOLIN, R.; CAIXETA, D. S.; LIMA, Z. M.; MORAIS, E. B. Gerenciamento de áreas contaminadas por postos de combustíveis em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil. **Revista Ambiente & Água**, v. 12, p. 209-315, 2017.
- LINCOPAN, N.; TRABULSI, L. R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. p. 369-81.
- LIU, J. S. C.; DERITO, C. M.; MADSEN, E. L. Field-based and laboratory stable isotope probing surveys of the identities of both aerobic and anaerobic benzene-metabolizing microorganisms in freshwater sediment. **Environmental Microbiology**, v. 10, p. 1964-1977, 2008.

- LITTLEJOHNS, J. V.; DAUGULIS, A. J. Kinetics and interactions of BTEX compounds during degradation by a bacterial consortium. **Process Biochemical**, 43, p. 1068-1076, 2008.
- LOPES, P. R. M. **Biorremediação de solo contaminado com óleo lubrificante pela aplicação de diferentes soluções de surfactante químico e biosurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* LBI**. 2014, 184 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências - Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, SP, 2014.
- LOVAGLIO, R. B.; COSTA, S. G. V. A. O.; LIMA, C. J. B.; CORTEZI, M.; CONTIERO, J. Effect of C/N ratio and physicochemical conditions on the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Research Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 19-24, 2010.
- LOVAGLIO, R. B. **Produção de ramnolipídios por mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* LBI**. 148 f. 2011. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, SP, 2011.
- LOVAGLIO, R. B.; SANTOS, F. J.; JAFELICCI JUNIOR, M.; CONTIERO, J. Rhamnolipid emulsifying activity and emulsion stability: pH rules. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, p. 301–305, 2011.
- LOVAGLIO, R. B.; SILVA, V. L.; CAPELINI, T. L.; EBERLIN, M. N.; HAUSMANN, R.; HENKEL, M.; CONTIERO, J. Rhamnolipids production by a *Pseudomonas aeruginosa* LBI mutant: solutions and homologs characterization. **Tenside, Surfactants, Detergents**, v. 51, p. 397-405, 2014.
- LOVAGLIO, R. B.; SILVA, V. L.; FERREIRA, H.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J. Rhamnolipids know-how: Looking for strategies for its industrial dissemination. **Biotechnology Advances**, v. 33, p. 1715-1726, 2015.
- LOVANH, N.; HUNT, C. S.; ALVAREZ, P. J. J. Effect of ethanol on BTEX biodegradation kinetics: aerobic continuous culture experiments. **Water Research**, v. 36, p. 3739-3746, 2002.
- LUEDERS, T. The ecology of anaerobic degraders of BTEX hydrocarbons in aquifers. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 93, p. 1-13, 2017.
- LUZ, C. C.; SANTOS, E. A.; SANTOS, M. O. S.; MUSSY, M. Y.; YAMASHITA, M.; BASTOS, W. R.; BRUCHA, G.; REIS, M. M.; REIS, M. G. Estudos de biodegradação de óleo diesel por consórcio microbiano coletado em Porto Velho – RO, Amazônia. **Química Nova**, v. 34, p. 775-779, 2011.
- MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, D. A. **Microbiologia de Brock**. 14 ed. – Porto Alegre: Artmed, 2016. 987 p.
- MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, p. 355-381, 2008.
- MAGALHÃES-GUEDES, K. T.; RODRIGUES, A. K.; GERVASIO, I. M.; GERVASIO, I.; NASCIMENTO, A. P.; SCHWAN, R. F. Ethanol production from deproteinized cheese whey fermentations by co-cultures of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, p. 1121-1127, 2013.
- MAHMOUND, N. S.; GHALY, A. E. Influence of temperature and pH on the nonenzymatic reduction of triphenyltetrazolium chloride. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 346-353, 2004.

- 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 & Biodegradation**, v. 55, p. 1-8, 2005.
- MAKKAR, R. S.; CAMEOTRA, S. S.; BANAT, I. B. Advances in utilization of renewable substrates for biosurfactant production. **AMB Express**, v. 1, p. 1-19, 2011.
- MANCINI, S. A.; DEVINE, C. E.; ELSNER, M.; NANDI, M. E.; ULRICH, A. C.; EDWARDS, E. A.; LOLLAR, B. S. Isotopic evidence suggests different initial reaction mechanisms for anaerobic benzene biodegradation. **Environment Science and Technology**, v. 42, p. 8290-8296, 2008.
- MANRESA, A.; BATISDA, J.; MERCADÉ, M. E.; ROBERT, M.; ANDRÉS, C.; ESPUNY, M. J.; GUINEA, J. Kinetic studies on surfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Society for Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 8, p. 133-136, 1991.
- MAPELLI, F.; SCOMA, A.; MICHOU, G.; AULENTA, F.; BOON, N.; BORIN, S.; KALOGERAKIS, N.; DAFFONCHIO, D. Biotechnologies for marine oil spill cleanup: Indissoluble ties with microorganisms. **Trends in Biotechnology**, *in press*, 2017.
- MARCHAL, R.; PENET, S.; SOLANO-SERENA, F.; VANDECASTEELE, J. P. Gasoline and diesel oil biodegradation. **Oil & Gas Science and Technology**, v. 58, p. 441-448, 2003.
- MARIANO, A. P. **Avaliação do potencial de biorremediação de solos e de águas subterrâneas contaminados com óleo diesel**. 147 f. 2006. Tese (Doutorado em Geociências e Meio Ambiente) – Programa de Pós-Graduação em Geociências e Meio Ambiente, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2006.
- MARIANO, A. P.; DE ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. Monitoramento de indicadores geoquímicos e avaliação de biodegradação em área contaminada com óleo diesel. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, p. 296-304, 2007.
- MARIANO, A. P.; BONOTTO, D. M.; ANGELIS, D. F.; PIRÔLLO, M. P. S.; CONTIERO, J. Use of weathered diesel oil as a low-cost raw material for biosurfactant production. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 25, p. 269-274, 2008.
- MARIANO, A. P.; CRIVELARO, S. H. R.; DE ANGELIS, D. F.; BONOTTO, D. M. The use of vinasse as an amendment to ex-situ bioremediation of soil and groundwater contaminated with diesel oil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, p. 1043-1055, 2009.
- MARTÍNEZ-ALONSO, M.; GAJU, N. El papel de los tapetes microbianos en la biorrecuperación de zonas litorales sometidas a la contaminación por vertidos de petróleo. **Ecosistemas**, v. 14, p. 79-91, 2005.
- MARTINO, C. D.; LÓPEZ, N. I.; IUSTMAN, R. Isolation and characterization of benzene, toluene and xylene degrading *Pseudomonas* sp. selected as candidates for bioremediation. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 67, p. 15-20, 2012.
- MATEUCA, R.; LOMBAERT, N.; AKA, P. V.; DECORDER, I.; KRISCH-VOLDERS, M. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, p. 1515-1531, 2006.
- MATSUMOTO, S. T.; MARIN-MORALES, M. A. Mutagenic potential evaluation of the water of a river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* test system. **Cytologia**, v. 69, p. 399-408, 2004.

MAZZEO, D. E. C.; LEVY, C. E.; DE ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 4334-4340, 2010.

MAZZEO, D. E. C.; FERNANDES, T. C. C.; MARIN-MORALES, M. A.; Cellular damages in the *Allium cepa* test system, caused by BTEX mixture prior and after biodegradation process. **Chemosphere**, v. 85, n. 1, p. 13-18, 2011.

MECKENSTOCK, R. U.; BOLL, M.; MOUTTAKI, H.; KOELSCHBACH, J. S.; TAROUCO, P. C.; WEYRAUCH, P.; DONG, X.; HIMMELBERG, A. M. Anaerobic degradation of benzene and polycyclic aromatic hydrocarbons. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 92-118, 2016.

MENDES, A. N.; FILGUEIRAS, L. A.; PINTO, J. C.; NELE, M. Physicochemical properties of rhamnolipid biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 to applications in microemulsions. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 6, p. 64-79, 2015.

MILLIOLI, V. S.; SERVULO, E. L. C.; SOBRAL, L. G. S.; CARVALHO, D. D. Bioremediation of crude oilbearing soil: evaluating the effect of rhamnolipid addition to soil toxicity and to crude oil biodegradation efficiency. **Global NEST Journal**, v. 11, p. 181–188, 2009.

MINISTÉRIO AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Instrução normativa nº 51 de 18/09/2002. Brasil. 2003.

MITRA, S.; ROY, P. BTEX: A serious ground-water contaminant. **Research Journal of Environmental Sciences**, v. 5, p. 394-398, 2011.

MIZUBUTI, I. Y. Soro de Leite: Composição, processamento e utilização na alimentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 15, p. 80-94, 1994.

MNIF, I.; SAHNOUN, R.; ELLOUZ-CHAABOUNI, S.; GHRIBI, D. Application of bacterial biosurfactants for enhanced removal and biodegradation of diesel oil in soil using a newly isolated consortium. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 109, p. 72–81, 2017.

MONTAGNOLLI, R. N.; BIDOIA, E. D. **Petroleum derivatives biodegradation: Environmental impact and bioremediation strategies**. Amazon, 2012, 104 p.

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Screening the toxicity and biodegradability of petroleum hydrocarbons by a rapid colorimetric method. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 67, p. 1-12, 2014.

MONTAGNOLLI, R. N.; MATOS LOPES, P. R.; BIDOIA, E. D. Assessing *Bacillus subtilis* biosurfactant effects on the biodegradation of petroleum products. **Environmental Monitoring and Assessment**, v. 187, p. 4116, 2015.

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; CRUZ, J. M.; CLARO, E. M. T.; QUITERIO, G. M.; BIDOIA, E. D. The effects of fluoride based fire-fighting foams on soil microbiota activity and plant growth during natural attenuation of perfluorinated compounds. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 50, p. 119-127, 2017a.

MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; CRUZ, J. M.; CLARO, M. T.; QUITERIO, G. M.; BIDOIA, E. D. Metabolical shifts towards alternative BTEX biodegradation intermediates induced by perfluorinated compounds in firefighting foams. **Chemosphere**, v. 173, p. 49-60, 2017b.

- MORAES, D. S. L. **Avaliação dos potenciais tóxicos, citotóxicos e genotóxicos de águas ambientais de Corumbá-MS em raízes de *Allium cepa***. 158f. 2000. Tese (Mestrado em Genética e Melhoramento), Universidade Estadual de Londrina, Brasil, 2000.
- MORALES, C. G. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Agua: estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones**. IMTA, México, 2004.
- MORASCH, B.; SCHINK, B.; TEBBE, C. C.; MECKENSTOCK, R. U. Degradation of o-xylene and m-xylene by a novel sulfate-reducer belonging to the genus *Desulfotomaculum*. **Archives of Microbiology**, v. 181, p. 407-417, 2004.
- MOUSSA, S. H.; TAYEL, A. A.; AL-HASSAN, A. A.; FAROUK, A. Tetrazolium/formazan test as an efficient method to determine fungal chitosan antimicrobial activity. **Journal of Mycology**, v. 2013, p. 1-7, 2013.
- MOUSSA, T. A. A.; MOHAMED, M. S.; SAMAK, N. Production and characterization of di-rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* TMN. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 31, p. 867-880, 2014.
- MUKHERJEE, A. K.; BORDOLOI, N. K. Biodegradation of benzene, toluene and xylene (BTX) in liquid culture and in soil by *Bacillus subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* strains and a formulated bacterial consortium. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 19, p. 3380-3388, 2012.
- MUKHERJEE, S.; DAS, P.; SEN, R. Towards commercial production of microbial surfactants. **Trends in Biotechnology**, v. 24, p. 509-515, 2006.
- NANNIPIERI, P.; GREGO, S.; CECCANTI, B. Ecological significance of the biological activity in soil. In: **Soil Biochemistry**. Nova York, Cap. 6, 1990, p. 293-355.
- NASCIMENTO FILHO, I.; VIECELI, N. C.; CARDOSO, E. M.; LOVATEL, E. R. Analysis of BTEX in experimental columns containing neat gasoline and gasoline-ethanol. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 410-417, 2013.
- NICHOLSON, C. A.; FATHEPURE, B. Z. Biodegradation of benzene by halophilic and halotolerant bacteria under aerobic conditions. **Applied Environmental of Microbiology**, v. 70, p. 1222-1225, 2004.
- NIKOLOVA, N.; NENOV, V. BTEX degradation by fungi. **Water Science and Technology**, v. 51, p. 87-83. 2005.
- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Biosurfactantes: Propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 25, p. 772-776, 2002.
- 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.; COSTA, S. G. V. A. O.; CONTIERO, J. Rhamnolipid Surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1593-1600, 2005a.
- NITSCHKE, M.; COSTA, S. G. V. A. O.; HADAD, R.; GONÇALVES, L. A.; EBERLIN, M. N.; CONTIERO, J. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. **Biotechnology Progress**, v. 21, p. 1562-1566, 2005b.

- NITSCHKE, M.; PASTORE, G. M. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. **Bioresource Technology**, v. 97, p. 336-341, 2006.
- NOEL, C.; GOURRY, J. C.; DEPARIS, J.; BLESSING, M.; IGNATIADIS, I.; GUIMBAUD, C. Combining geoelectrical measurements and CO₂ analyses to monitor the enhanced bioremediation of hydrocarbon-contaminated soils: A field implementation. **Applied and Environmental Soil Science**, v. 2016, p. 1-15, 2016.
- NUNES, C. C.; CORSEUIL, H. X. Importância do etanol na atenuação natural de águas subterrâneas impactadas por gasolina. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, v. 12, p. 259-265, 2007.
- NWANKWEGU, A.; ONWOSI, C. O. Bioremediation of gasoline contaminated agricultural soil by bioaugmentation. **Environmental Technology & Innovation**, v. 7, p. 1-11, 2017.
- NWAOGU, L. A.; ONYEZE, G. O. C.; NWABUEZE, R. N. Degradation of diesel oil in a polluted soil using *Bacillus subtilis*. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, p. 1939-1943, 2008.
- OBEROI, A. S.; PHILIP, L. Variation in toxicity during the biodegradation of various heterocyclic homocyclic aromatic hydrocarbons in single and multi-substrate systems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 135, p. 337-346, 2017.
- OLGA, P.; PETA, K.; JELENA, M.; SRDJAN, R. Screening method for detection of hydrocarbon-oxidizing bacteria in oil-contaminated water and soil specimens. **Journal of Microbiological Methods**, v. 74, p. 110-113, 2008.
- OLIVEIRA, N. M.; BENTO, F. M.; CAMARGO, F. A.; KNORST, A. J.; DOS SANTOS, A. L.; PIZZOLATO, T. M.; PERALBA, M. C. Biodegradation of commercial gasoline (24% ethanol added) in liquid medium by microorganisms isolated from a landfarming site. **Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering**, v. 46, p. 86-96, 2011.
- ORTIZ-HERNÁNDEZ, M. L.; RODRÍGUEZ, A.; SÁNCHEZ-SALINAS, E.; CASTREJÓN-GODÍNEZ, M. L. **Bioremediation in Latin America, current research and perspectives**. In: Chapter 5. Bioremediation of soils contaminated with pesticides: experiences in Mexico. Springer: New York, 2014, p. 69-100.
- OTENIO, M. H.; SILVA, M. T. L.; MARQUES, M. L. O.; ROSEIRO, J. C.; BIDOIA, E. D. Benzene, toluene and xylene biodegradation by *Pseudomonas putida* CCMI 852. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, p. 258-261, 2005.
- OTTO, R. T.; DANIEL, H. J.; PEKIN, G.; MULLER-DECKER, K. Production of sophorolipids from whey. II. Product composition, surface active properties, cytotoxicity and stability against hydrolases by enzymatic treatment. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 52, p. 495-501, 1999.
- PADHI, S. K.; GOKHALE, S. Benzene biodegradation by indigenous mixed microbial culture: Kinetic modelling and process optimization. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 119, p. 511-519, 2017.
- PALÁCIO S. M.; ESPINOZA-Q. F. R.; MÓDENES A. N.; OLIVEIRA C. C.; BORBA F. H.; SILVA Jr. F. G. Toxicity assessment from electro-coagulation treated-textile dye wastewaters by bioassays. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, p. 330-337, 2009.
- PARTICLE SCIENCES. Surfactants. Technical Brief, v. 1, 2010. Disponível em: <http://www.particlesciences.com/docs/technical_briefs/TB_2010_1.pdf>. Acesso em: 16 mar. 2017.

- PARTHIPAN, P.; PREETHAM, E.; MACHUCA, L. L.; RAHMAN, P. K. S. M.; MURUGAN, K.; RAJASEKAR, A. Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by bacterium *Bacillus subtilis* A1. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-14, 2017.
- PEIXOTO, R. S.; VERMELHO, A. B.; ROSADO, A. S. Petroleum-degrading enzymes: bioremediation and new prospects. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1-7, 2011.
- 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, J. F. B.; GUDIÑA, E. J.; COSTA, R.; VITORINO, R.; TEIXEIRA, J. A.; COUTINHO, J. A. P.; RODRIGUES, L. R. Optimization and characterization of biosurfactant production by *Bacillus subtilis* isolates towards microbial enhanced oil recovery applications. **Fuel**, v. 111, p. 259–68, 2013.
- PETERS, K. E.; WALTERS, C. C.; MOLDOWAN, J. M. **The Biomarker Guide: Biomarkers and Isotopes in the Environment and Human History**, 2. ed, V. 1, Cambridge versity Press, 2005.
- PETERSEN, K.; HULTMAN, M. T.; ROWLAND, S. J.; TOLLEFSEN, K. E. Toxicity of organic compounds from unresolved complex mixtures (UCMs) to primary fish hepatocytes. **Aquatic Toxicology**, v. 190, p. 150-161, 2017.
- PINTO, M. H.; MARTINS, R. G.; COSTA, J. A. V. Avaliação cinética da produção de biossurfactantes bacterianos. **Química Nova**, v. 32, p. 2104-2108, 2009.
- PINTO, F. A. **Metodologia da espectroscopia no infravermelho para análise dos soros provenientes da fabricação de queijos Minas padrão e prato**. 45 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizontes, 2010.
- PIRÔLLO M. P.; MARIANO, A. P.; LOVAGLIO, R. B.; COSTA, S. G.; WALTER, V.; HAUSMANN, R.; CONTIERO, J. Biosurfactant synthesis by *Pseudomonas aeruginosa* LBI isolated from a hydRocarbon-contaminated site. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, p. 1484-1490, 2008.
- PIRÔLLO, M. P. S. **Estudo da produção de biossurfactantes utilizando hidrocarbonetos**. 2006, 73 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – Microbiologia Aplicada), Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, SP, 2006.
- PORNSUNTHORNTAWEE, O.; WONGPANIT, P.; CHAVADEJ, S.; ABE, M.; RUJIRAVANIT, R. Structural and physicochemical characterization of crude biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 isolated from petroleum-contaminated soil. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 1589-1595, 2008.
- PORNSUNTHORNTAWEE, O.; WONGPANIT, P.; RUJIRAVANIR, R. Rhamnolipid biosurfactants: Production and their potential in environmental biotechnology. In: RAMKRISNA, S. **Biosurfactants**. Ed. Landes Bio Science & Springer Science: Bangkok, Tailândia, 2010, p. 211-221, Chapter 16.
- PRATHYUSHA, K.; MOHAN, Y. S. Y. V. J.; SRIDEVI, S.; SANDEEP, B. V. Isolation and characterization of petroleum hydrocarbon degrading indigenous bacteria from contaminated sites of Visakhapatnam. **International Journal of Advanced Research**, v. 4, p. 357-362, 2016.
- PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. Cheese whey management: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48-68, 2012.
- PRENAFETA-BOLDÚ, F. X.; VERVOORT, J.; GROTENHUIS, J. T. C.; VAN GROENESTIJN, J. W. Substrate interactions during the biodegradation of Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylene

(BTEX) hydrocarbons by the fungus *Cladophialophora* sp. strain T1. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2660-2665, 2002.

PRINCE, R. C.; NASH, G. W.; HILL, S. J. The biodegradation of crude oil in the deep ocean. **Marine Pollution Bulletin**, v. 111, p. 354-357, 2016.

PRUTHI, V.; CAMEOTRA, S. S. Effect of nutrients on optimal production of biosurfactants by *Pseudomonas putida*—A gujarat oil field isolate. **Journal of Surfactants and Detergents**, v. 6, p. 65-68, 2003.

QU, D.; ZHAO, Y.; SUN, J.; REN, H.; ZHOU, R. BTEX biodegradation and its nitrogen removal potential by a newly isolated *Pseudomonas thivervalensis* MAH1. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 61, p. 691-699, 2015.

RADNIECKI, T. S.; DOLAN, M. E.; SEMPRINI, L. Physiological and transcriptional responses of *Nitrosomonas europaea* to toluene and benzene inhibition. **Environmental Science and Technology**, v. 42, p. 4093-4098, 2008.

RAHMAN, K. S.; RAHMAN, T. J.; MCCLEAN, S.; MACHANT, R.; BANAT, I. M. Rhamnolipid biosurfactant production by strains of *Pseudomonas aeruginosa* using low-cost raw materials. **Biotechnology Progress**, v. 18, p. 1277-1281, 2002.

RAHMAN, K. S.; RAHMAN, T. J.; BANAT, I. M.; LORD, R.; STREET, G. Environmental bioremediation technologies. In: SINGH, S. N.; TRIPATHI, R. D. **Bioremediation of Petroleum Sludge using Bacterial Consortium with Biosurfactant**. Springer: New York, 2007, 391-408 p.

RAHUL, M. A. K.; BALOMAJUMDER, C. Biological treatment and modelling aspect of BTEX abatement process in a biofilter. **Bioresource Technology**, v. 142, p. 9-17, 2013.

RAMANA, K. V.; KARANTH, N. G. Factors affecting biosurfactant production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 45, p. 249-257, 1989.

REARDON, K. F.; MOSTELLER, D. C.; ROGERS, J. B.; DUTEAU, N.; KIM, K-H. Biodegradation kinetics of aromatic hydrocarbon mixtures by pure and mixed bacterial cultures. **Environmental Health Perspectives**, v. 110, p. 1005-1011. 2002.

REZAEI, M.; YAMINI, Y.; MORADI, M.; SALEH, A.; FARAJI, M.; NAEENI, M. H. Supercritical fluid extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction as a sensitive and efficient sample preparation method for determination of organic compounds in solid samples. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 55, p. 161-168, 2010.

RIBEIRO, A. C.; MARQUES, S. C.; SODRÉ, A. F.; ABREU, L. R.; PICCOLI, R. H. Controle microbiológico da vida de prateleira de ricota cremosa. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 29, p. 113-117, 2005.

RICE, D. Background on ethanol. **Underground Tank Technology Update**, v. 14, p. 2-3, 2000.

RICHARD, J. Y.; VOGEL, T. M. Characterization of a soil bacterial consortium capable of degrading diesel fuel. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 44, p. 93-100, 1999.

RICHARDS, N. S. P. S. Soro lácteo: Perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente. **Revista Food Ingredientes**, v. 17, p. 20-24, 2002.

- ROBERT, M.; MERCADÉ, E.; BOSH, M. P.; PARRA, J. L.; ESPUNY, M. J.; MANRESA, M. A.; GUINEA, J. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44T1. **Biotechnology Letters**, v. 1, p. 871-874, 1989.
- RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos: Uma estratégia sequencial de planejamentos**. Campinas: Editora Casa do Pão, 2005. 326 p.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Natural roles of biosurfactants. **Environmental Microbiology**, v. 3, p. 229-236, 2001.
- RON, E. Z.; ROSENBERG, E. Enhanced bioremediation of oil spills in the sea. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 27, p. 191-194, 2014.
- ROUIDI, S.; HADJEM, A.; ASIA, L.; MILLE, G.; TAHAR, A. Sources and distribution of hydrocarbons in surface sediments of saf-saf oued (Skikda city, northeastern Algeria). **Annals of Biological Research**, v. 4, p. 61-69, 2013.
- RÜEGG, I.; HAFNER, T.; BUCHELI-WITSCHER, M.; EGLI, T. Dynamics of benzene and toluene degradation in *Pseudomonas putida* F1 in the presence of the alternative substrate succinate. **Engineering in Life Sciences**, v. 7, p. 331-342, 2007.
- RUIZ-AGUILAR, G. M. L.; FERNANDEZ-SANCHEZ, J. M.; KANE, S. R.; KIM, D.; ALVAREZ, P. J. J. Effect of ethanol and methyl-tert-butyl ether on monoaromatic hydrocarbon biodegradation: Response variability for different aquifer materials under various electron-accepting conditions. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 21, p. 2631-2639, 2002.
- RUFINO, R. D.; LUNA, J. M.; TAKAKI, G. M. C.; SARUBBO, L. A. Characterization and properties of the biosurfactant produced by *Candida lipolytica* UCP 0988. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 17, p. 34-38, 2014.
- SAHA, S.; THAVASI, R.; JAYALAKSHMI, S. Phenazine pigments from *Pseudomonas aeruginosa* and their application as antibacterial agent and food colourants. **Research Journal of Microbiology**, v. 3, p. 122-128, 2008.
- SANDU, C.; POPESCU, M.; ROSALES, E.; PAZOS, M.; LAZAR, G.; SANROMÁN, M. A. Electrokinetic oxidant soil flushing: A solution for in situ remediation of hydrocarbons polluted soils. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 799, p. 1-8, 2017.
- SANSONETTI, S.; CURCIO, S.; CALABRÒ, V.; IORIO, G. Bio-ethanol production by fermentation of ricotta cheese whey as an effective alternative non-vegetable source. **Biomass & Bioenergy**, v. 33, p. 1687-1692, 2009.
- SANSONETTI, S.; CURCIO, S.; CALABRÒ, V.; IORIO, G. Optimization of ricotta cheese whey (RCW) fermentation by response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 9156-9162, 2010.
- SANTA ANNA, L. M.; SEBASTIAN, G. V.; MENEZES, E. P.; ALVES, T. L. M.; SANTOS, A. S.; PEREIRA, N.; FREIRE, D. M. G. Production of biosurfactant from *Pseudomonas aeruginosa* PA1 isolated in oil environments. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v.19, p.159-166, 2002.
- SANTOS D. K. F.; RUFINO R. D.; LUNA J. M.; SANTOS V. A.; SARUBBO L. A. Biosurfactants: multifunctional biomolecules of the 21st century. **International Journal Molecular Sciences**, v. 17, p. 1-31, 2016.

- SARUBBO, L. A.; ROCHA JR, R. B.; LUNA, J. M.; RUFINO, R. D.; SANTOS, V. A.; BANAT, I. M. Some aspects of heavy metals contamination remediation and role of biosurfactants. **Chemistry and Ecology**, v. 31, p. 707–723, 2015.
- 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.
- SCHENK, T.; SCHUPHAN, I.; SCHMIDT, B. High-performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Chromatography A**, v. 693, p. 7–13, 1995.
- SEMADE. Secretaria de Estado de Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável. Vazamento de combustível em Governador Valadares, MG. 2017. Disponível em: <<http://www.grifon.com.br/Portal/Griffon/noticiaDetalhe.aspx?nCdcCategoria=160&nCdTemplate=20000&nCdTipoConteudo=2&nCdConteudo=61939&nRestrito=0>>. Acesso em: 08 jul. 2017.
- SCHAEFER, C.; YANG, X.; PELZ, O.; TSAO, D. T.; STREGER, S. H.; STEFFAN, R. J. Aerobic biodegradation of *iso*-butanol and ethanol and their relative effects on BTEX biodegradation in aquifer materials. **Chemosphere**, v. 81, p. 1104, 1110, 2010.
- SHEPPARD, J. D.; MULLIGAN, C. N. The production of surfactin by *Bacillus subtilis* grown on peat hydrolysate. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 110–116, 1987.
- SHIM, H.; HWANG, B.; LEE, S. S.; KONG, S. H. Kinetics of BTEX biodegradation by a coculture of *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens* under hypoxic conditions. **Biodegradation**, v. 16, p. 319–327, 2005.
- SHINODA, Y.; SAKAI, Y.; UENISHI, H.; UCHIHASHI, Y.; HIRAISHI, A.; YUKAWA, H.; YURIMOTO, H.; KATO, N. Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. strain DNT-1. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p. 1385–1392, 2004.
- SHUKOR, M. Y.; HASSAN, N. A. A.; JUSOH, A. Z.; PERUMAL, N.; SHAMAAN, N. A. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* diesel-degrading strain from Antarctica. **Journal of Environmental Biology**, v. 30, p. 1–6, 2009.
- SIKKEMA, J.; BONT, J. A.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Review**, v. 59, p. 201–222, 1995.
- SILVA, M. L. B.; ALVAREZ, P. J. J. Enhanced anaerobic biodegradation of benzene-toluene-ethylbenzene-xylene-ethanol mixtures in bioaugmented aquifer columns. **Applied Environmental Microbiology**, v. 70, p. 4720–4726, 2004.
- SOBERÓN-CHÁVEZ, G.; AGUIRRE-RAMÍREZ, M.; SÁNCHEZ, R. The *Pseudomonas aeruginosa* RhlA enzyme is involved in rhamnolipid and polyhydroxyalkanoate production. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 32, p. 675–677, 2005.
- SOBRERO, M. C.; RONCO, A. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. p. 55–67. IN: ROMERO, P. R. e CANTÚ, A. M. **Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México**. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología, México, D.F., 2008.
- SONG, H. C.; WANG, X.; BARTHA, R. Bioremediation potential of terrestrial fuel spills. **Applied Environmental Microbiology**, v. 56, p. 652–656, 1990.

- SOUZA, C. E.; VESSONI-PENNA, T. C.; OLIVEIRA, S. P. R. Biosurfactant-enhanced hydrocarbon bioremediation: An overview. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 89, p.88-94, 2014.
- SOUZA, M. M.; COLLA, T. T.; BÜCKER, F.; FERRÃO, M. F.; HUANG, C. T.; ANDREAZZA, R.; CAMARGO, F. A. O.; BENTO, F. M. Biodegradation potential of *Serratia marcescens* for diesel/biodiesel blends. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 110, p. 141-146, 2016.
- STREVA, E. R.; PASA, V. M. D.; SODRÉ, J. R. Aging effects on gasoline–ethanol blend properties and composition. **Fuel**, v. 90, p. 2015-219, 2011.
- SZULC, A.; AMBROZEWICZ, D.; SYDOW, M.; LAWNICZAK, L.; CYPLIK, A. P.; MARECIK, R.; CHRZANOWSKI, L. The influence of bioaugmentation and biosurfactant addition on bioremediation efficiency of diesel-oil contaminated soil: Feasibility during field studies. **Journal of Environmental Management**, v. 132, p. 121-128, 2014.
- TAMADA, I. S.; MONTAGNOLLI, R. N.; LOPES, P. R. M.; BIDOIA, E. D. Toxicological evaluation of vegetable oils and biodiesel in soil during the biodegradation process. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 43, p. 1576-1581, 2012
- TEIXEIRA, A. S. 2007, 95 f. **Isolamento e caracterização de bactérias degradadoras de gasolina comercial**. Dissertação (Mestrado em Ciência do Solo) - Faculdade de Agronomia, Universidade federal do Rio Grande do Sul, 2007.
- THALMANN, A. Zur methodik der bestimmung der dehydrogenase aktivita triphenyltetrazolium chlorid (TTC) im bodem mittels (On a method for estimating the activity of dehydrogenase with triphenyltetrazolium chloride (TTC)). **Lanawiktsch**, v. 21, p. 249-258, 1968.
- THANIYAVARN, J.; CHIANGUTHAI, T.; SANGVANICH, P.; ROONGSAWANG, N.; WASHIO, K.; MORIKAWA, M.; THANIYAVARN, S. Production of sophorolipid biosurfactant by *Pichia anomala*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 72, p. 2061-2068. 2008.
- THANOMSUB, B.; PUMEECHOCKCHAI, W.; LIMTRAKUL, A.; ARUNRATTIYAKORN, P.; PETCHLEELAHA, W.; NITODA, T.; KANZAKI, H. Chemical structures and biological activities of rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* B189 isolated from milk factory waste. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1149-1153, 2007.
- TIBURTIUS, E. R. L.; PERALTA-ZAMORA, P.; LEAL, E. S. Contamination of waters by BTXs and processes used in the remediation of contaminated sites. **Química Nova**, v. 27, p. 441-446, 2004.
- TRELLU, C.; MOUSSET, E.; PECHAUD, Y.; HUGUENOT, D.; VAN HULLEBUSCH, E. D.; ESPOSITO, G.; OTURAN, M. A. Removal of hydrophobic organic pollutants from soil washing/flushing solutions: A critical review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 306, p. 149-174, 2016.
- TOLOSA, I.; MORA, S. J.; FOWLER, S. W.; VILLENEUVE, J. P.; BARTOCCI, J.; CATTINI, C. Aliphatic and aromatic hydrocarbons in marine biota and coastal sediments from the Gulf and Gulf of Oman. **Marine Pollution Bulletin**, v. 50, p. 1619-1633, 2005.
- TURNER, N. R.; RENEGAR, D. A. Petroleum hydrocarbon toxicity to corals: A review. **Marine Pollution Bulletin**, v. 119, p. 1–16, 2017.
- UES, I.; PIZATTO, E.; BEUX, S.; ALFARO, A. T. Otimização do processo de fabricação da ricota. **Synergismus scyentifica UTFPR**, v. 1, p. 382-392, 2006.

- VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. Core flood study for enhanced oil recovery through ex-situ bioaugmentation with thermo- and halo-tolerant rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* NCIM 5514. **Bioresource Technology**, v. 220, p. 175–182, 2016.
- VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 277-286, 2017.
- VARJANI, S. J.; UPASANI, V. N. A new look on factors affecting microbial degradation of petroleum hydrocarbon pollutants. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 120, p. 71-83, 2017.
- VASILEVA-TONKOVA, E.; SOTIROVA, A.; GALABOVA, D. The effect of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens* on model bacterial strains and isolates from industrial wastewater. **Current Microbiology**, v. 62, p. 427-433, 2011.
- VECINO, X.; RODRÍGUEZ-LÓPEZ, L.; GUDIÑA, E. J.; CRUZ, J. M.; MOLDES, A. B.; RODRIGUES, L. R. Vineyard pruning waste as an alternative carbon source to produce novel biosurfactants by *Lactobacillus paracasei*. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry, Article in Press**, 2017.
- VENTURA-CAMARGO, B. C.; DE ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Assessment of the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects of the commercial black dye in *Allium cepa* cells before and after bacterial biodegradation treatment. **Chemosphere**, v. 161, p. 325-332, 2016.
- VENTURINI FILHO, W. G. (coord.). **Bebidas não alcoólicas**. In: Cap. 6. Bebidas lácteas. Ciência e Tecnologia, v. 2. São Paulo: Editora Blucher, 2010, p. 89-116.
- VIJAYAKUMAR, S.; SARAVANAN, V. Biosurfactants - Types, sources and applications. **Research Journal of Microbiology**, v. 10, p. 181-192, 2015.
- VINCENZI, A.; MACIEL, M. J.; BURLANI, E. L.; OLIVEIRA, E. C.; VOLPATO, G.; LEHN, D. N.; SOUZA, C. F. V. Ethanol bio-production from ricotta cheese whey by several strains of the yeast *Kluyveromyces*. **American Journal of Food Technology**, v. 9, p. 281-291, 2014.
- VOGT, C.; KLEINSTEUBER, S.; RICHNOW, H-H. Anaerobic benzene degradation by bacteria. **Microbial Biotechnology**, v. 4, p. 710–724, 2011.
- WANG, W. Root elongation method for toxicity testing of organic and inorganic pollutants. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 6, p. 409-414, 1987.
- WHANG, L. M.; LIU, P. W. G.; MA, C. C.; CHENG, S. S. Application of rhamnolipid and surfactin for enhanced diesel biodegradation-effects of pH and ammonium addition. **Journal of Hazardous Materials**, v. 164, p. 1045-1050, 2008.
- WEELINK, S. A. B.; VAN EEKERT, M. H. A.; STAMS, A. J. M. Degradation of BTEX by anaerobic bacteria: physiology and application. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, v. 9, p. 359-385, 2010.
- WILLIAMS, P. A.; MURRAY, K. Metabolism of benzoate and the methylbenzoates by *Pseudomonas putida* (arvilla) mt-2: Evidence for the existence of a TOL plasmid. **Journal of Bacteriology**, v. 120, p. 416-423, 1974.
- WILLUMSEN, P. A.; KARLSON, U. Screening of bacteria, isolated from PAH-contaminated soils, for production of biosurfactants and bioemulsifiers. **Biodegradation**, v. 7, p. 415-423, 1996.

- WILKES, H.; BUCKEL, W.; GOLDING, B. T.; RABUS, R. Metabolism of hydrocarbons in n-alkane utilizing anaerobic bacteria. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 26, p. 138-151, 2016.
- WOLICKA, D.; SUSZEK, A.; BORKOWSKI, A.; BIELECKA, A. Application of aerobic microorganisms in bioremediation in situ of soil contaminated by petroleum products. **Bioresource Technology**, v. 10, p. 3221-3227, 2009.
- WOLIŃSKA, A.; ZAPASEK, M.; STEPNIEWSKA, Z. The optimal ttc dose and its chemical reduction level during soil dehydrogenase activity assay, **Acta Agrophysica**, v. 23, p. 303-314, 2016.
- WU, J.; JU, L. Extracellular particles of polymeric material formed in n-hexadecane fermentation by *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Biotechnology**, v. 59, p.193-202, 1998.
- WYSZKOWSKA, J.; KUCHARSKI, M.; KUCHARSKI, J. Application of the activity of soil enzymes in the evaluation of soil contamination by diesel oil. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 15, p. 501-506, 2006.
- XIE, F.; LU, Q.; TOLEDO, R. A.; SHIM, H. Combined removal of an MTBE and BTEX mixture using indigenous microbe immobilized on waste silica gel. **International Journal of Environmental Science and Development**, v. 7, p. 244-247, 2016.
- XU, Z.; CHAI, J.; WU, Y.; QIN, R. Transport and biodegradation modeling of gasoline spills in soil-aquifer system. **Environmental Earth Sciences**, v. 74, p. 2871-2882, 2015.
- YEOM, S. H.; YOO, Y. J.; LEE, J. W. The importance of microbial adaptation in the degradation of BTX. **Global Environmental Biotechnology**, v. 66, p. 665-675, 1997.
- YI, H.; MENG, Z. Genotoxicity of hydrated sulfur dioxide on root tips of *Allium sativum* and *Vicia faba*. **Mutation Research**, v. 537, p. 223-226, 2003.
- YU, S.H.; KE, L.; WONG, Y. S.; TAM, N. F. Y. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) by a bacterial consortium enriched from mangrove sediments. **Environment International**, v. 31, p. 149-154, 2005.
- ZHANG, L.; ZHANG, C.; CHENG, Z.; YAO, Y.; CHEN, J. Biodegradation of benzene, toluene, ethylbenzene, and o-xylene by the bacterium *Mycobacterium cosmeticum* byf-4. **Chemosphere**, v. 90, p. 1340-1347, 2013.

ANEXO A

Tabela 1.A Matriz do planejamento experimental utilizando BBD *design* para a atividade da enzima desidrogenase.

	Variáveis independentes			Valor codificado			Resposta	
	Valores observados			A	B	C	TPF ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	Inóculo ($\text{DO}_{600\text{nm}}$)	Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	Agitação (rpm)				Exp	Pred
1	0,8	35	180	0	1	1	1	1,149
2	1,1	30	120	1	0	-1	1,2	1,252
3	0,5	30	180	-1	0	1	0,7	0,647
4	1,1	25	150	1	-1	0	0,562	0,658
5	0,5	30	120	-1	0	-1	0,54	0,658
6	1,1	35	150	1	1	0	2	1,990
7	1,1	30	180	1	0	1	2,408	2,26
8	0,5	35	150	-1	1	0	0,342	0,245
9	0,8	30	150	0	0	0	1,2	1,453
10	0,8	25	180	0	-1	1	0,532	0,574
11	0,8	30	150	0	0	0	1,58	1,453
12	0,5	25	150	-1	-1	0	0,2	0,209
13	0,8	35	120	0	1	-1	0,808	0,765
14	0,8	25	120	0	-1	-1	0,123	-0,02
15	0,8	30	150	0	0	0	1,58	1,453

Fonte: Elaborado pelo autor.